

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

ESTUDIO DE LA GENERACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y LIGNINOLÍTICA, OBTENIDOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE LOS HONGOS *Pleurotus* *ostreatus* 202 Y 896 EN RASTROJO DE MAÍZ

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

ELIANA GUADALUPE ERAS CÁRDENAS

elianaeras@yahoo.es

DIRECTOR: ING. OSCAR BOLÍVAR IZURIETA AMORES

bolivar.izurieta@gmail.com

Quito, noviembre 2012

© Escuela Politécnica Nacional (2012)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Eliana Guadalupe Eras Cárdenas, 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.

Eliana Guadalupe Eras Cárdenas

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Eliana Guadalupe Eras Cárdenas, bajo mi supervisión.

Ing. Bolívar Izurieta
DIRECTOR DE PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del Proyecto semilla 2010-PIS-10-15 “Proyecto integrado para la obtención de hongos comestibles y extractos celulolíticos en rastrojo de maíz”, que se ejecuta en el Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología –DECAB- de la Escuela Politécnica Nacional.

*Este trabajo se lo dedico
con mucho amor a
mis padres, Walter y Aidita,
quienes son lo más
importante de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

A mi amado Padre Dios por guiar mi camino e iluminarme cada día de mi vida.

A mis padres por su amor incondicional; a ti papi por protegerme tanto, por ti siempre he sentido que nada malo puede pasar, mil gracias por todo, y a ti mamita por ser mi confidente, mi mejor amiga y siempre estar dispuesta a ayudarme, eres la mejor madre del mundo; todo lo que he logrado en mi vida ha sido por ustedes, son mi más grande tesoro y los amo con todo mi corazón.

A mi familia, que siempre ha estado pendiente de mí y me ha impulsado a seguir adelante con sus valiosos consejos. Gracias por creer y confiar en mí.

A Diego, que ha estado junto a mí durante esta ardua tarea de escribir la tesis con todo su apoyo y amor. Gracias por ser parte de mi vida y hacerme tan feliz.

Al Ing. Bolívar Izurieta, le agradezco infinitamente por permitirme desarrollar este proyecto de titulación bajo su dirección, gracias por ayudarme en todo momento y siempre mostrar ese optimismo que lo caracteriza y me ayuda a no darme por vencida.

Un agradecimiento especial al Laboratorio de Bioprocesos: Ing. Neyda Espín por dirigirme y explicarme con una sonrisa cada vez que tenía alguna inquietud, Ing. Mary Casa por ayudarme en los trámites de una manera rápida y eficaz, Carlita y Moni, por brindarme su valiosa amistad y estar conmigo en esta etapa de culminación de la carrera y gracias a Don Rodri por toda la ayuda que me brindó durante la realización de la parte experimental.

A todos mis amigos y amigas, tanto de la época colegial como universitaria, gracias a todos los lindos grupos de amistades que he logrado conformar con el paso del tiempo. Prefiero no mencionar nombres porque cada uno sabe lo importantes que son en mi vida y que les agradezco por todos los momentos compartidos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	xvi
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Cultivo del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Técnicas de cultivo	2
1.1.3. Condiciones de cultivo	4
1.1.3.1. Sustrato	5
1.1.3.2. Temperatura	6
1.1.3.3. Humedad relativa	6
1.1.3.4. Concentración de dióxido de carbono (CO ₂)	6
1.1.3.5. Luz	7
1.1.3.6. Potencial de hidrógeno (pH)	7
1.1.3.7. Control ambiental	7
1.1.4. Etapas de cultivo	8
1.1.4.1. Semilla	8
1.1.4.2. Inoculación	8
1.1.4.3. Incubación	8
1.1.4.4. Fructificación	9
1.1.4.5. Cosecha	9
1.2. Capacidad del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> para degradar desechos lignocelulósicos	9
1.2.1. Generalidades	9
1.2.2. Composición de los desechos lignocelulósicos	11
1.2.2.1. Celulosa	11
1.2.2.2. Hemicelulosa	12
1.2.2.3. Lignina	13
1.2.3. Mecanismo de degradación del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	14
1.2.3.1. Degradación enzimática de la celulosa	15
1.2.3.2. Degradación enzimática de la lignina	18
1.3. Extracción, manejo y mantenimiento de la actividad de extractos enzimáticos celulolíticos y ligninolíticos	20
1.3.1. Extracción	21
1.3.2. Actividad enzimática	22
1.3.3. Manejo y mantenimiento de la actividad enzimática	24
1.4. Aplicaciones de enzimas celulolíticas y ligninolíticas	26
1.4.1. Aplicaciones de enzimas celulolíticas	26
1.4.2. Aplicaciones de enzimas ligninolíticas	28

2.	PARTE EXPERIMENTAL	30
2.1.	Objetivos	30
2.1.1.	Objetivo general	30
2.1.2.	Objetivos específicos	30
2.2.	Materiales	30
2.3.	Preparación del inóculo de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	32
2.4.	Preparación del sustrato e inoculación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	32
2.4.1.	Caracterización química del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación	32
2.4.2.	Producción del hongo comestible	33
2.4.2.1.	Esterilización del sustrato e inoculación	33
2.4.2.2.	Desarrollo del micelio	34
2.4.2.3.	Fructificación y cosecha	34
2.4.3.	Muestreo y obtención de los extractos enzimáticos	35
2.4.4.	Caracterización química del rastrojo de maíz después de la primera y segunda cosecha del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	36
2.5.	Determinación de la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica	36
2.6.	Determinación de la generación de extractos enzimáticos con actividad ligninoperoxidásica y/o manganoperoxidásica	38
2.6.1.	Determinación de la actividad lignino peroxidásica	38
2.6.2.	Determinación de la actividad manganeso peroxidásica	40
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1.	Caracterización química del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación	42
3.2.	Períodos de desarrollo y cosecha del hongo comestible	43
3.3.	Determinación de las actividades enzimáticas	48
3.3.1.	Ensayo de actividad celulolítica	48
3.3.2.	Ensayo de actividad lignino peroxidásica	52
3.3.3.	Ensayo de actividad manganeso peroxidásica	55
3.4.	Análisis de las actividades enzimáticas en las tres corridas de fermentación	59
3.4.1.	Análisis de resultados de la primera corrida de fermentación	59
3.4.2.	Análisis de resultados de la segunda corrida de fermentación	62
3.4.3.	Análisis de resultados de la tercera corrida de fermentación	66

3.5.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas	71
3.6.	Caracterización química del rastrojo de maíz después de la primera y segunda cosecha del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896.	74
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
4.1.	Conclusiones	78
4.2.	Recomendaciones	80
	BIBLIOGRAFÍA	81
	ANEXOS	90

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Parámetros medioambientales para diferentes tipos de hongos <i>Pleurotus</i>	4
Tabla 1.2.	Materiales nutritivos para el hongo ostra	5
Tabla 1.3.	Aplicaciones de las enzimas celulolíticas en la industria alimenticia	27
Tabla 2.1.	Equipos requeridos para el desarrollo de la parte experimental	31
Tabla 2.2.	Reactivos utilizados en el desarrollo de la parte experimental	31
Tabla 3.1.	Caracterización del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación	42
Tabla 3.2.	Porcentaje de humedad del rastrojo de maíz en cada corrida de fermentación	43
Tabla 3.3.	Periodos de crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y tiempos de cosecha obtenidos en las tres corridas de fermentación	44
Tabla 3.4.	Periodos de crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 896 y tiempos de cosecha obtenidos en las tres corridas de fermentación	44
Tabla 3.5.	Porcentaje promedio del rendimiento biológico, valor promedio del peso y número de fundas cosechadas del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 en las tres corridas de fermentación	46
Tabla 3.6.	Porcentaje promedio del rendimiento biológico, valor promedio del peso y número de fundas cosechadas del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 896 en las tres corridas de fermentación	46
Tabla 3.7.	Valor promedio de la temperatura máxima y mínima de las cámaras oscura y clara-oscura durante las tres corridas de fermentación	48
Tabla 3.8.	Tiempos y valores de máxima generación enzimática para las tres corridas de fermentación del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202	71
Tabla 3.9.	Tiempos y valores de máxima generación enzimática para las tres corridas de fermentación del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 896	71
Tabla 3.10.	Resultados en base seca de la caracterización del rastrojo de maíz después de la primera y segunda cosecha	74

Tabla 3.11.	Resultados en base húmeda de la caracterización del rastrojo de maíz después de la primera y segunda cosecha	74
Tabla 3.12.	Porcentaje de variación de los componentes del rastrojo de maíz en base húmeda de la primera y segunda cosecha del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896 con respecto al rastrojo de maíz sin fermentar	75
Tabla AV.1.	Pesos de las muestras de rastrojo de maíz húmedo en la primera corrida	102
Tabla AV.2.	Pesos de las muestras de rastrojo de maíz húmedo en la segunda corrida	102
Tabla AV.3.	Pesos de las muestras de rastrojo de maíz húmedo en la tercera corrida	102
Tabla AV.4.	Porcentaje de humedad del rastrojo de maíz esterilizado	103
Tabla AVI.1.	Diluciones y concentraciones de los estándares utilizados	104
Tabla AXI.1.	Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la primera corrida	111
Tabla AXI.2.	Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la primera corrida	112
Tabla AXI.3.	Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la segunda corrida	113
Tabla AXI.4.	Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la segunda corrida.	113
Tabla AXI.5.	Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la tercera corrida	114
Tabla AXI.6.	Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la tercera corrida	115
Tabla AXII.1.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la primera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	116
Tabla AXII.2.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la segunda corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	117

Tabla AXII.3.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la tercera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	117
Tabla AXIII.1.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la primera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	118
Tabla AXIII.2.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la segunda corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	119
Tabla AXIII.3.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la tercera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	119
Tabla AXIV.1.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la primera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	120
Tabla AXIV.2.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la segunda corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	121
Tabla AXIV.3.	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la tercera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	121
Tabla AXV.1.	Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	122
Tabla AXV.2.	Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	123
Tabla AXV.3.	Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	123

Tabla AXVI.1. Valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	124
Tabla AXVI.2. Valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	125
Tabla AXVI.3. Valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	125
Tabla AXVII.1. Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	126
Tabla AXVII.2. Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	127
Tabla AXVII.3. Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	127

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1.	Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> en la naturaleza	1
Figura 1.2.	Cuerpos fructíferos de hongos ostra en diversas formas de cultivo	3
Figura 1.3.	Diagrama de conversión de los desechos lignocelulósicos en componentes de interés industrial	10
Figura 1.4.	Composición de la biomasa lignocelulósica	11
Figura 1.5.	Estructura química de la celulosa	12
Figura 1.6.	Esquema de la molécula de lignina	14
Figura 1.7.	Sistemas enzimáticos utilizados para la degradación de la celulosa	15
Figura 1.8.	Principales tipos de celulasas	16
Figura 1.9.	Degradación enzimática de la celulosa	17
Figura 1.10.	Principales tipos de peroxidasas	18
Figura 1.11.	Ciclo catalítico de las peroxidasas	19
Figura 1.12.	Esquema de los ciclos catalíticos de la MnP y LiP	20
Figura 1.13.	Principios de la espectrofotometría	23
Figura 2.1.	Proceso para la obtención de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	35
Figura 2.2.	Proceso para la determinación de la actividad celulolítica de los extractos enzimáticos	37
Figura 2.3.	Proceso para la determinación de la actividad lignino peroxidásica	39
Figura 2.4.	Proceso para la determinación de la actividad manganeso peroxidásica	41
Figura 3.1.	Crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896 en la cámara de fructificación clara-oscura	45

Figura 3.2.	Actividad celulolítica durante el crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202	49
Figura 3.3.	Actividad celulolítica durante el crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 896	50
Figura 3.4.	Actividad lignino peroxidasa durante el crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202	53
Figura 3.5.	Actividad lignino peroxidasa durante el crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 896	54
Figura 3.6.	Actividad manganeso peroxidasa durante el crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202	55
Figura 3.7.	Actividad manganeso peroxidasa durante el crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 896	57
Figura 3.8.	Actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> 202	59
Figura 3.9.	Actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> 896	61
Figura 3.10.	Actividades 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> 202	63
Figura 3.11.	Actividades 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> 896	64
Figura 3.12.	Actividades 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> 202	66
Figura 3.13.	Actividades 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> 896	67

Figura 3.14.	Variación de los porcentajes de celulosa y lignina con respecto al tiempo para las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 202 y 896	77
Figura AI.1.	Desarrollo del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> en tubos de ensayo con malta agar	91
Figura AI.2.	Crecimiento del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> en cajas petri con malta agar	92
Figura AI.3.	Crecimiento del micelio del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> en granos de trigo	92
Figura AI.4.	Fundas de rastrojo de maíz inoculadas con granos de trigo con hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i>	93
Figura AI.5.	Rastrojo de maíz cubierto completamente por el micelio del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i>	93
Figura AI.6.	Aparición de los primordios del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> en la cámara oscura	94
Figura AI.7.	Cuerpo fructífero del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> cepa 202	94
Figura AI.8.	Cuerpo fructífero del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> cepa 896	95
Figura AVI.1.	Curva de calibración de D-glucosa	105
Figura AX.1.	Informe de los análisis realizados en el rastrojo de maíz por parte del Laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional	110

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I Resumen fotográfico del desarrollo del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i>	91
ANEXO II Determinación de resinas, grasas y ceras	96
ANEXO III Determinación de celulosa	98
ANEXO IV Determinación de lignina	100
ANEXO V Determinación del contenido de humedad del rastrojo de maíz después de la esterilización	102
ANEXO VI Obtención de la curva de calibración de D-glucosa	104
ANEXO VII Ejemplo de cálculo de la actividad celulolítica	106
ANEXO VIII Ejemplo de cálculo de la actividad lignino peroxidásica	107
ANEXO IX Ejemplo de cálculo de la actividad manganeso peroxidásica	108
ANEXO X Resultados del análisis del rastrojo de maíz	109
ANEXO XI Rendimientos biológicos	111
ANEXO XII Resultados de la absorbancia medida en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica	116
ANEXO XIII Resultados de la absorbancia medida en el ensayo de determinación de la lignino peroxidasa	118

ANEXO XIV	
Resultados de la absorbancia medida en el ensayo de determinación de la manganeso peroxidasa	120
ANEXO XV	
Resultados de la actividad celulolítica	122
ANEXO XVI	
Resultados de la actividad lignino peroxidásica	124
ANEXO XVII	
Resultados de la actividad manganeso peroxidásica	126

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviaturas

C	Concentración
C/N	Relación carbono-nitrógeno
CbpA	Celulosa de unión a proteína A
CMC	Actividad celulolítica (Carboximetilcelulosa)
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
l	Longitud
LAC	Lacasa
LiP	Lignino peroxidasa
MnP	Manganeso peroxidasa
n	Número de datos
P.O. 202	<i>Pleurotus ostreatus</i> cepa 202
P.O. 896	<i>Pleurotus ostreatus</i> cepa 896
pH	Potencial de hidrógeno
UIBBM	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

Unidades

cm	Longitud, centímetro
g	Peso, gramo
h	Tiempo, hora
kat	Actividad catalítica, katal
kg	Peso, kilogramo
L	Volumen, litro
lx	Nivel de iluminación, lux
M	Concentración, molaridad
mg	Peso, miligramo
min	Tiempo, minuto
mL	Volumen, mililitro
nm	Longitud, nanómetro
psi	Presión, libra por pulgada cuadrada
ppm	Concentración, partes por millón
t	Peso, tonelada
UI	Unidad Internacional de actividad enzimática
°C	Temperatura, grados Celsius
μmol	Concentración, micromolar

Símbolos

\bar{x}	Media aritmética
β	Beta
ε	Épsilon, coeficiente de extinción molar
λ	Longitud de onda
σ	Desviación estándar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar, a escala de laboratorio, la generación de enzimas con actividad celulolítica y ligninolítica en extractos obtenidos durante el crecimiento de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896. Para esto, se cultivaron las cepas seleccionadas en rastrojo de maíz y se analizaron las actividades enzimáticas a través de métodos espectrofotométricos.

La actividad celulolítica se analizó por el método del reactivo DNS, la actividad manganeso peroxidásica por el método del rojo fenol y la actividad lignino peroxidásica a través del método de oxidación del alcohol veratrílico. El rastrojo de maíz sin fermentar y los residuos, producto de la fermentación, después de la primera y segunda cosecha del hongo fueron analizados en el Laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional.

Se realizaron tres corridas de fermentación, en las cuales se evidenció que la cepa del hongo 202 se adaptó más rápidamente al medio y a las condiciones ambientales de la cámara de cultivo que la cepa 896, por lo que la primera y segunda cosecha así como la generación de actividades enzimáticas se obtuvieron en menor tiempo.

En ambas cepas, se determinó que los extractos presentaron mayor actividad celulolítica, seguida de la actividad manganeso peroxidásica y por último la actividad lignino peroxidásica.

La cepa 202 de *Pleurotus ostreatus* produjo una mayor actividad enzimática de los tres tipos de enzimas analizadas con respecto a la cepa 896, los valores más altos de actividad enzimática se obtuvieron en la tercera corrida de fermentación y corresponden a 0,785 UI de actividad celulolítica, $8,47 \times 10^{-2}$ UI de actividad manganeso peroxidásica y $1,08 \times 10^{-2}$ UI de actividad lignino peroxidásica.

La actividad manganeso peroxidásica aumentó en el período de crecimiento del micelio y se mantuvo en sus máximos valores hasta el período de fructificación y

cosecha, en donde disminuyó a valores cercanos a cero; mientras que, la actividad celulolítica presentó sus máximos valores en los días de la cosecha. Este comportamiento se observó en ambas cepas.

Finalmente, se comprobó que la cepa 202 y 896 son eficientes degradadoras de celulosa y lignina, ya que en la segunda cosecha redujeron el contenido inicial de celulosa en el rastrojo de maíz de 38,47 % a 29,55 % y 30,51 %, respectivamente, y para la lignina se encontró que el contenido inicial de 18,75 % se redujo a 16,45 % para la cepa 202 y a 17,13 % en la cepa 896.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la producción de hongos moviliza cientos de millones de dólares y miles de puestos de trabajo en toda América Latina, ya que esta región tiene gran potencial para el cultivo de las especies comestibles por la diversidad climática y la variedad de residuos agroindustriales que se generan (Torres, 2003, p. 116).

El hongo comestible más cultivado y estudiado, durante los últimos años, es el *Pleurotus ostreatus*, conocido como el hongo ostra, por su facilidad de cultivo, calidad nutricional y porque durante su crecimiento genera un complejo enzimático especializado de celulasas y peroxidasas (lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa) que pueden degradar los desechos agroindustriales y tienen una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas; por este motivo este hongo fue seleccionado para el desarrollo de este trabajo (Chaparro, Rosas y Varela, 2009, p. 239; MushWorld, 2005, p. 5).

Los complejos enzimáticos que generan esta especie de hongos poseen un uso potencial atractivo en la degradación de lignina y celulosa, decoloración de efluentes contaminados con colorantes de origen industrial, oxidación de efluentes derivados del blanqueo del papel, extracción de aceites esenciales, extracción de pigmentos, producción de jugos de frutas y vegetales, entre otros (Ovando y Waliszewski, 2005, p. 113; Tinoco y Vázquez, 2007, p. 353).

El reto actual de la biotecnología es desarrollar mecanismos que formen parte de procesos limpios y energéticamente eficientes para la prevención, el control y la remediación de impactos ambientales (Tinoco y Vázquez, 2007, p. 347).

Con este trabajo es posible obtener productos con valor agregado como el hongo comestible y los extractos con actividad enzimática, mediante el uso de procesos de fermentación en desechos agroindustriales, es así que se puede generar no solo ingresos económicos sino un medio ambiente con menor contaminación, que en esta época es lo más importante.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. CULTIVO DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*

1.1.1. GENERALIDADES

Los hongos son microorganismos heterótrofos que pertenecen al Reino Fungi, los cuales al no poder generar nutrientes, por sí mismos, recurren a diferentes sustratos como madera, hojas y pajas. Los hongos más cultivados a nivel mundial son los hongos saprofitos que descomponen la materia orgánica (Carranza, Luzuriaga y Mejía, 2009, p. 3; MushWorld, 2005, p. 1). Un ejemplo de este tipo de hongos es el *Pleurotus ostreatus* que se observa en la Figura 1.1.



Figura 1.1. Hongo *Pleurotus ostreatus* en la naturaleza
(MushWorld, 2005, p. 82)

Los hongos se reproducen mediante esporas, las cuales germinan para dar origen a las hifas, que en conjunto, forman el micelio primario; posteriormente, debido a la fusión de las hifas, aparece el micelio secundario. Una vez que el micelio coloniza todo el sustrato, se forman los primordios que darán lugar a sombreros y pedicelos, que constituyen los cuerpos fructíferos. Esto se logra en condiciones de cultivo adecuadas, las mismas que se explican en el acápite 1.1.3. Las esporas se producen en las laminillas ubicadas debajo del sombrero y los cuerpos fructíferos las liberan para producir la siguiente generación (Carrillo, 2003, p. 7).

El ciclo de vida de los hongos tiene las siguientes fases (MushWorld, 2005, p. 2):

- Fase Vegetativa: Crecimiento lineal del micelio en el que se disuelven los complejos del sustrato en moléculas simples para absorber los nutrientes.
- Fase Reproductiva: Formación de cuerpos fructíferos.

El hongo ostra es un hongo de pudrición blanca o parásito débil, que pertenece al género *Pleurotus*, familia Pleurotaceae, orden Agaricales, división Basidiomycota, y se lo encuentra en racimos de árboles muertos distribuidos por todo el mundo, principalmente en áreas templadas; hoy en día, se conocen alrededor de 70 especies de *Pleurotus* y todavía se descubren nuevas especies, por lo que ocupan el tercer lugar de consumo a nivel mundial (MushWorld, 2005, p. 1; Sánchez, Esqueda, Gaitán, Córdova y Coronado, 2008, p. 18).

La producción mundial de hongos ha tenido un aumento de alrededor de 350 000 t en 1965 a cerca de 6 160 800 t en 1997, con China como el mayor productor de hongos comestibles, ya que este país aporta con más del 85 % de todas las setas de *Pleurotus* obtenidas en todo el mundo (Royse, 2003, p. 2).

En Nepal, Zinbawe, India y Tailandia el cultivo de hongos ha sido beneficioso y apropiado para disminuir la pobreza, debido a que tiene un bajo costo de producción (MushWorld, 2005, p. 5); además, en países en vías de desarrollo como el Ecuador, la producción de hongos resulta atractiva, ya que la demanda de este producto se ha incrementado a precios favorables para el exportador en los últimos años (Carranza et al., 2009, p. 7).

1.1.2. TÉCNICAS DE CULTIVO

Existen diversas tecnologías de cultivo de hongos que son amigables con el medio ambiente y tienen diferente grado de complejidad, el hongo ostra debido a su facilidad de cultivo es el preferido por la mayor parte de cultivadores del mundo (Chang, 2008, p. 5).

Los cultivadores pueden elegir el tipo de cultivo de acuerdo con la disponibilidad a largo plazo, los costos y la productividad de los materiales. Existen varios tipos de cultivo como: cultivo en leñas, estantes, cajas, botellas y fundas, como se observa en la Figura 1.2. El cultivo en fundas es el método más utilizado porque brinda rendimientos estables, sin demasiada contaminación, a diferencia del cultivo en estantes; por otro lado, el cultivo en botellas requiere una inversión alta pero puede automatizarse (MushWorld, 2005, p. 65).

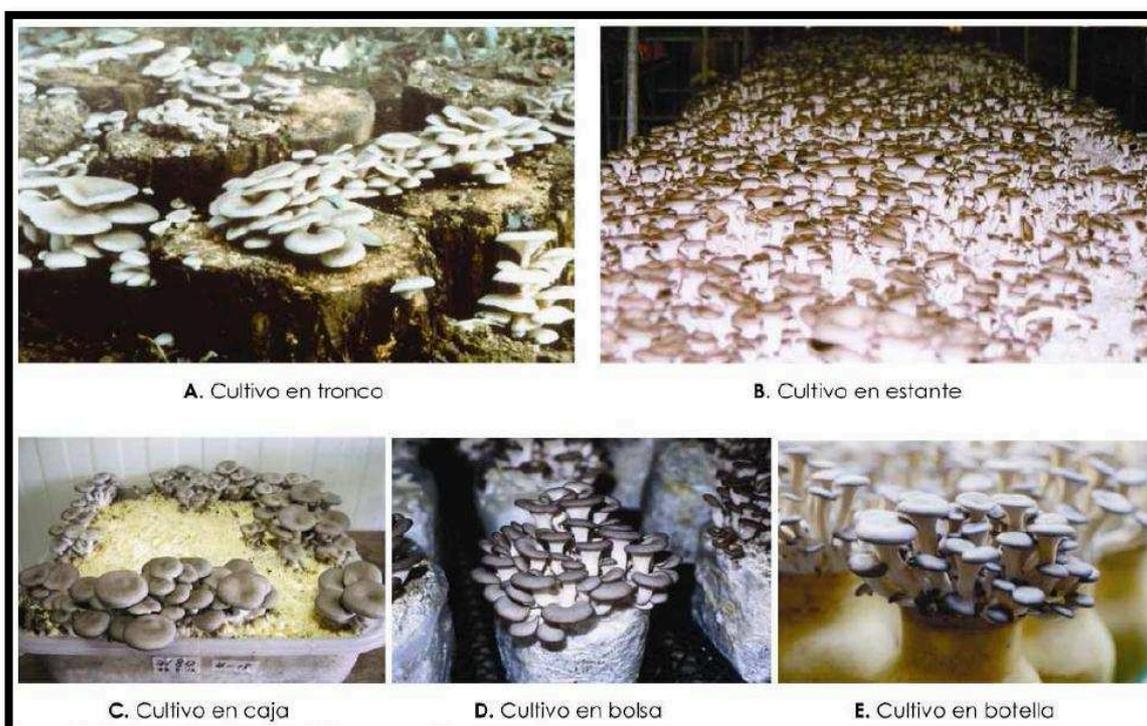


Figura 1.2. Cuerpos fructíferos de hongos ostra en diversas formas de cultivo (MushWorld, 2005, p. 65)

El cultivo en fundas presenta las siguientes ventajas (MushWorld, 2005, p. 150):

- Menor riesgo de fracaso de la cosecha,
- Uso de infraestructuras simples, con inversión mínima,
- Fácil control de pestes y enfermedades,
- Factibilidad de producción continua de hongos, durante todo el año.

El costo del cultivo del hongo ostra depende de las regiones y del tipo de cultivo elegido, pero generalmente tiene un menor costo comparado con otras especies

de hongos comestibles como: *Tricholoma matsutake*, *Lentinula edodes* y *Morchella*, ya que los hongos *Pleurotus ostreatus* utilizan espacios pequeños y materias primas baratas, por lo que se los considera económicamente eficaces; además, tienen la ventaja de que se los puede comercializar y exportar con mayor facilidad como hongos secos, debido a que se deshidratan rápidamente (MushWorld, 2005, p. 7; Romero et al., 2010, p. 54).

1.1.3. CONDICIONES DE CULTIVO

La temperatura, humedad relativa, luz, dióxido de carbono y acidez del sustrato son factores que interactúan para favorecer el crecimiento adecuado del hongo *Pleurotus ostreatus* (MushWorld, 2005, p. 55). En la Tabla 1.1 se indican los parámetros para el desarrollo de los cuerpos fructíferos de diferentes tipos de hongos ostra.

Tabla 1.1. Parámetros medioambientales para diferentes tipos de hongos *Pleurotus*

Especies	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	CO ₂ (ppm)	Luz (lx)
<i>P. citrinopileatus</i> (Hongo ostra dorado)	21 - 29	90 - 95	< 1 000	500 - 1 000
<i>P. cystidiosus</i> (Hongo oreja de mar)	21 - 27	85-90	< 2 000	500 – 1 000
<i>P. djamor</i> (Hongo ostra rosa)	20 - 30	85 - 90	500 – 1 500	750 – 1 500
<i>P. eryngii</i> (Hongo ostra rey)	15 - 21	85 - 90	< 2 000	500 - 1 000
<i>P. euosmus</i> (Hongo ostra estragón)	21 - 27	90 - 95	< 1 000	750 - 1 500
<i>P. ostreatus</i> (Hongo ostra de árbol)	10 - 21	85 - 90	< 1 000	1 000 - 1 500 (2 000)
<i>P. pulmonarius</i> (Hongo ostra phoenix o indio)	18 - 24	85 - 90	400 - 800	1 000 - 1 500 (2 000)
<i>P. tuberregium</i> (Hongo ostra rey tubérculo)	30 - 35	85 - 90	< 2 000	---

(MushWorld, 2005, p. 56)

1.1.3.1. Sustrato

La celulosa, hemicelulosa y la lignina son las principales fuentes de nutrientes para el hongo *Pleurotus ostreatus*, las cuales se encuentran en los diferentes tipos de desechos agroindustriales (MushWorld, 2005, p. 54).

En la Tabla 1.2 se indican los materiales nutritivos que requiere el hongo.

Tabla 1.2. Materiales nutritivos para el hongo ostra

Nutrientes		Materiales	
Orgánicos	Fuentes de carbono	Celulosa	Materiales húmicos como: madera, rastrojo, paja, hojas, entre otros.
		Hemicelulosa	
	Fuentes de nitrógeno	Proteínas	
		Amonio	
Inorgánicos			K, P, Si, Fe, Mg, etc.

(MushWorld, 2005, p. 54)

Para seleccionar el sustrato, se debe conocer su disponibilidad y abundancia en la región en donde se quiere cultivar el hongo. Es importante tomar en cuenta el precio de adquisición y la facilidad de transporte. Los principales residuos utilizados alrededor del mundo son: la paja de cereal, semilla de girasol, cáscara de algodón, rastrojo de maíz, caña de azúcar, aserrín, entre otros (MushWorld, 2005, p. 84).

En el Ecuador, se han realizado trabajos previos de producción de hongos con rastrojo de maíz como sustrato, en los cuales se han obtenido rendimientos biológicos de aproximadamente 50 % (Pazos, 2004, p. 37; Vaca, 2011, p. 32).

La relación carbono-nitrógeno (C/N) en el sustrato, para el crecimiento de este hongo, se encuentra entre 30 y 300. El desarrollo del micelio se produce con relaciones C/N altas y las bajas relaciones C/N ayudan a la producción del cuerpo fructífero. La humedad del sustrato seleccionado debe estar entre 50 y 80 %, y debe recibir un tratamiento térmico previo a la inoculación del microorganismo (Garzón y Cuervo, 2008, p. 127; Gea, 2011, p. 4).

1.1.3.2. Temperatura

La temperatura óptima para el crecimiento del micelio es de 20 a 25 °C. Los primordios se obtienen entre 10 y 20 °C y para la formación de cuerpos fructíferos la temperatura óptima es de 13 a 16 °C. Durante el desarrollo del cuerpo fructífero, la temperatura se relaciona con el color de los sombreros, para producir hongos color oscuro se debe bajar la temperatura dentro del rango establecido (Gea, 2011, p. 6; MushWorld, 2005, p. 63).

1.1.3.3. Humedad relativa

A mayor temperatura en la cámara de cultivo, se produce menor humedad relativa, es por este motivo que la humidificación de la cámara es un factor importante en el desarrollo del hongo (MushWorld, 2005, p. 55).

Durante la incubación se requiere una humedad relativa de 65 a 70 % y en la fructificación debe estar entre 80 a 95 % (Gea, 2011, p. 7).

1.1.3.4. Concentración de dióxido de carbono (CO₂)

Los hongos son microorganismos aerobios, por lo que necesitan aire fresco durante su crecimiento y en su etapa reproductiva. La concentración de CO₂ se debe controlar por ventilación en la cámara, sobretodo en la formación de los cuerpos fructíferos (MushWorld, 2005, p. 64).

Cuando en la cámara de fructificación se presentan niveles altos de CO₂ o ventilación menos frecuente se producen pedicelos largos y sombreros diminutos. En niveles bajos o ventilación frecuente se tienen pedicelos cortos con sombreros anchos, pérdidas de humedad y endurecimiento del sustrato. Si la concentración de CO₂ es mayor a 1 000 ppm se tienen pedicelos demasiado largos (Gea, 2011, p. 7).

1.1.3.5. Luz

La iluminación adecuada constituye un factor decisivo en la producción de los cuerpos fructíferos de los hongos *Pleurotus ostreatus*. El desarrollo del micelio se produce en ausencia de luz y, una vez que aparecen los primordios, el cultivo requiere iluminación indirecta (Gea, 2011, p.7).

Si los hongos no reciben luz en la etapa reproductiva presentan: deformidades, ramificaciones en forma de coral, no se distingue ni el sombrero ni el pie del hongo, son de color blanco y sabor amargo. En cambio, en condiciones de luz limitada las setas brotan con el sombrerillo reducido, el pie alargado, delgado y replegado en dirección a la luz (Gea, 2011, p.7).

1.1.3.6. Potencial de hidrógeno (pH)

El valor óptimo del pH del sustrato es de 5,0 a 6,5 para que el micelio pueda crecer, aunque puede sobrevivir entre valores de pH de 4,2 y 7,5. Cuando el pH baja, el micelio crece despacio y deja de crecer a pH 4,0. Si el pH supera el valor óptimo, el crecimiento del micelio se acelera y se produce una estructura anormal. Para el desarrollo de los primordios y la obtención de cuerpos fructíferos, el pH debe estar entre 5,0 a 7,8. Se puede regular el pH del sustrato con ayuda de cal (MushWorld, 2005, p. 55).

1.1.3.7. Control ambiental

La presencia de microorganismos no deseados, durante el cultivo de hongos, es difícil de controlar, aunque se tenga mucha experiencia en la siembra y se realice una estricta higiene. Una vez que la semilla se infecta, con bacterias u hongos patógenos, causa problemas en todo el sustrato inoculado. El uso de químicos es limitado debido a que puede afectar a las cepas; las condiciones de cultivo de alta humedad y temperatura excesiva favorecen la presencia de invasores, los cuales

son atraídos fácilmente al interior o exterior de las instalaciones, donde se realiza la siembra o el desarrollo de los hongos. La enfermedad más común, durante el cultivo de hongos, es la del moho verde y la invasión de *Aspergillus niger* o moho negro. Una vez que se los detecta es recomendable eliminar los sustratos que se contaminen y planificar una nueva siembra (MushWorld, 2005, pp. 187-188).

1.1.4. ETAPAS DE CULTIVO

1.1.4.1. Semilla

La semilla o inóculo llamada “spawn”, en la industria de hongos, constituye la expansión del micelio, el cual se cultiva inicialmente en tubos de ensayo o cajas petri con agar, a partir de este se podrá formar la semilla en granos de trigo, arroz o cebada, que posteriormente servirá para inocular el sustrato y obtener los cuerpos fructíferos. Con todos estos pasos se logra potenciar el metabolismo del hongo para obtener una cosecha exitosa (MushWorld, 2005, p. 53).

1.1.4.2. Inoculación

Cada frasco de semilla es capaz de inocular hasta diez veces su propia masa; si se agrega más cantidad de inóculo al sustrato, se tendrá una mayor velocidad de colonización. Es recomendable no exceder el 20 % en peso del sustrato, ya que el micelio al producir calor causa que los granos se sobrecalienten y esto da origen al crecimiento de microorganismos no deseados en el medio de cultivo (MushWorld, 2005, p. 81).

1.1.4.3. Incubación

La incubación se realiza en cámaras oscuras y en las condiciones de cultivo adecuadas, descritas en el acápite 1.1.3. Esta fase se caracteriza porque el

micelio coloniza el sustrato por completo. Si la etapa de inoculación se realiza correctamente se tendrá una cosecha exitosa; caso contrario, en la etapa de incubación, se podrá observar la presencia de microorganismos no deseados o plagas, lo que ocasionaría el fracaso de la cosecha (MushWorld, 2005, p. 58).

1.1.4.4. Fructificación

Una vez que el micelio coloniza todo el sustrato, aparecen los primordios; y posteriormente, se desarrollan los cuerpos fructíferos. Para lograr esto, en el cuarto de fructificación se debe: mantener la humedad relativa entre 80 a 95 % mediante boquillas aspersoras de agua que humedecen el medio, ventilar la cámara 2 veces al día por 5 minutos, llevar un registro de la temperatura ambiental y proporcionar luz solar de manera indirecta (Gea, 2011, p. 7).

1.1.4.5. Cosecha

La primera cosecha se da aproximadamente a los 5 días después de que los primordios ingresan a la cámara de fructificación y después de 5 a 9 días más, se produce la segunda cosecha. Estos tiempos varían de acuerdo con la especie, el sustrato y las condiciones ambientales. La cosecha puede seguir mientras el micelio permanezca blanco y firme. En general, se pueden obtener hasta tres cosechas. Cuando el sustrato se suaviza y pierde color es tiempo de retirarlo de la cámara y así evitar su contaminación (Oei y Nieuwenhuijzen, 2005, pp. 50-51).

1.2. CAPACIDAD DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* PARA DEGRADAR DESECHOS LIGNOCELULÓSICOS

1.2.1. GENERALIDADES

Cada año en el planeta, se forman aproximadamente 200 millones de toneladas

de biomasa vegetal rica en celulosa y lignina, por lo que estos desechos constituyen materia prima potencial para el desarrollo de bioproductos como los hongos comestibles y los extractos con actividad enzimática (Álvarez, 2003, p. 2). En la Figura 1.3 se indican las diferentes aplicaciones de los desechos agroindustriales.

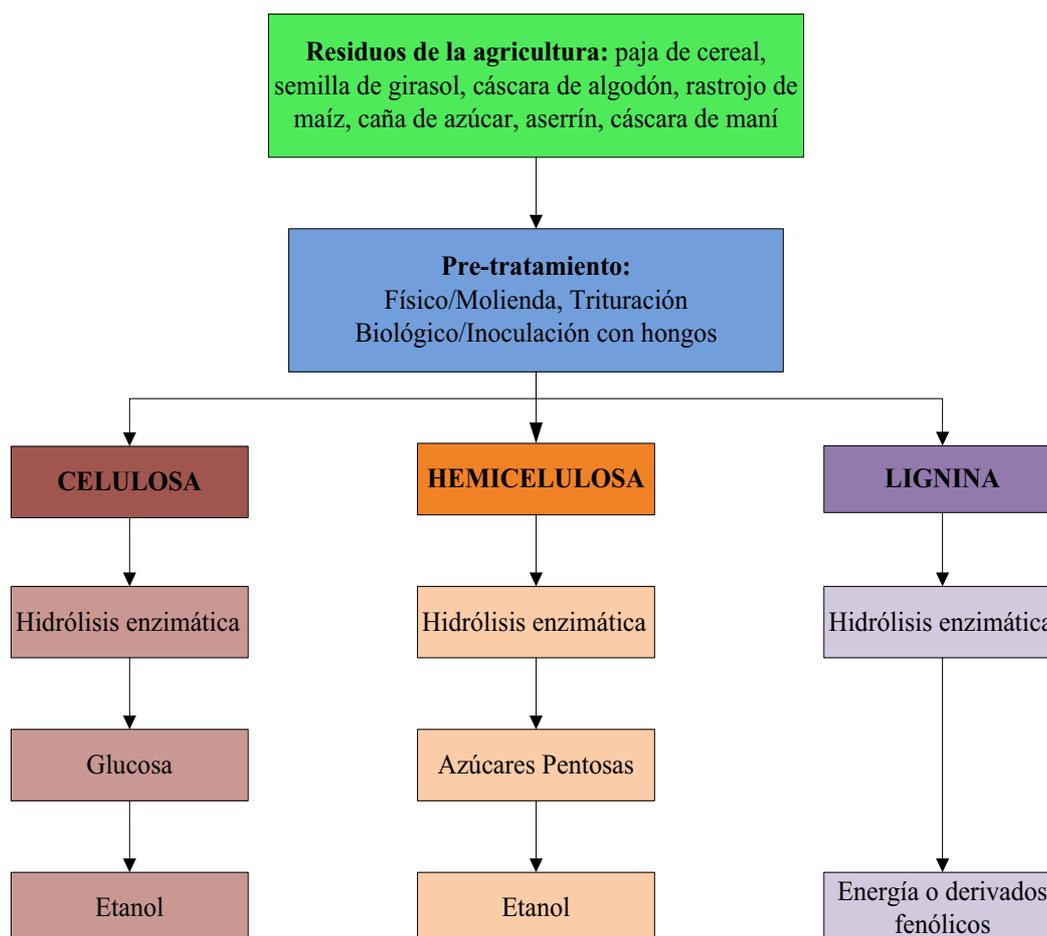


Figura 1.3. Diagrama de conversión de los desechos lignocelulósicos en componentes de interés industrial (Rojas y Cabanillas, 2008, p. 5)

En el Ecuador, anualmente, se generan 1,2 millones de toneladas, en peso seco, de material lignocelulósico; la mayoría de ellos no tienen ningún tratamiento por lo que sirven de alimento animal o se convierten en focos de contaminación en fuentes de agua, botaderos de basura, entre otros (Carvajal, 2010, p. 2).

Según un estudio mundial realizado por MushWorld (2005), se produce una enorme cantidad de desechos de la industria agrícola y maderera, de los cuales

aproximadamente 200 tipos de residuos están disponibles como sustrato para el hongo ostra. Si se ocupara tan solo el 25 % del volumen de las pajas de cereal, que se queman anualmente en el mundo, podrían producirse 317 millones de toneladas de hongos frescos por año (pp. 83-84).

1.2.2. COMPOSICIÓN DE LOS DESECHOS LIGNOCELULÓSICOS

Los principales componentes de los desechos lignocelulósicos se observan en la Figura 1.4.

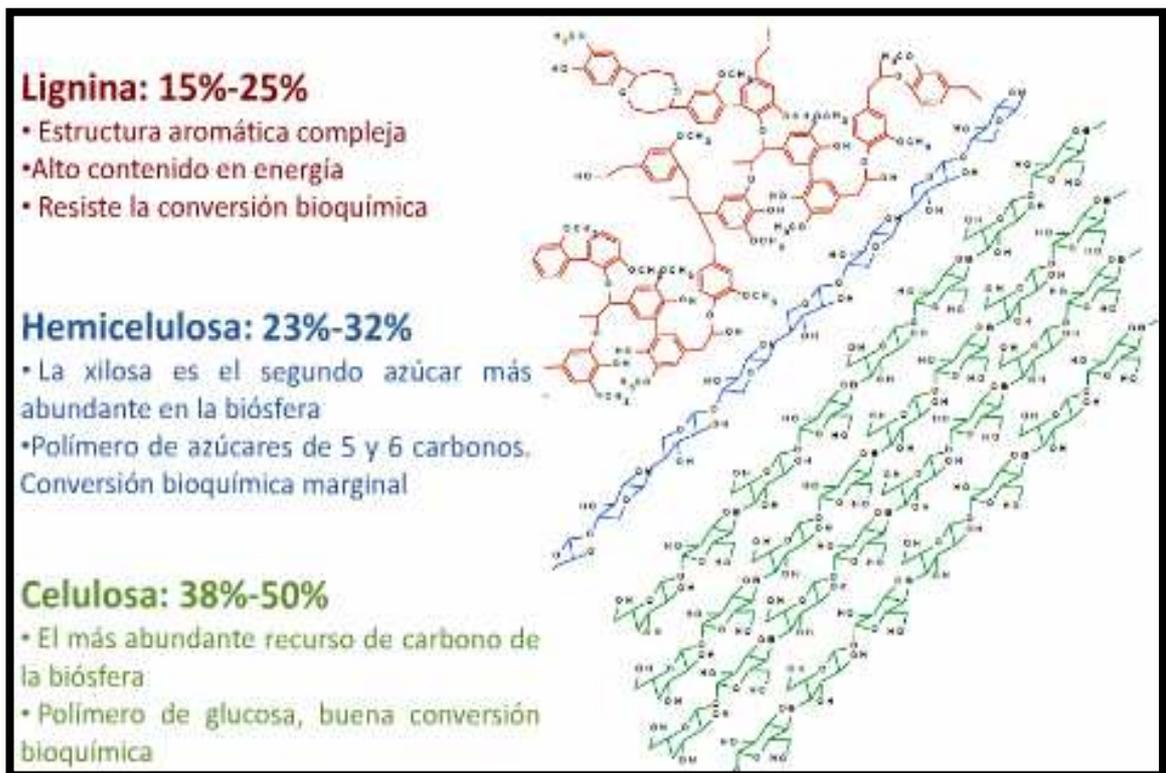


Figura 1.4. Composición de la biomasa lignocelulósica
(Carvajal, 2010, p. 6)

1.2.2.1. Celulosa

La celulosa es el principal componente de la membrana celular y es un biopolímero de lenta degradación. Es el componente que más se ha investigado

debido a su naturaleza fibrosa ya que tiene gran aplicación en la industria del papel, artículos textiles, entre otras (Álvarez, 2003, p. 3). En la Figura 1.5 se indica la estructura química de la celulosa.

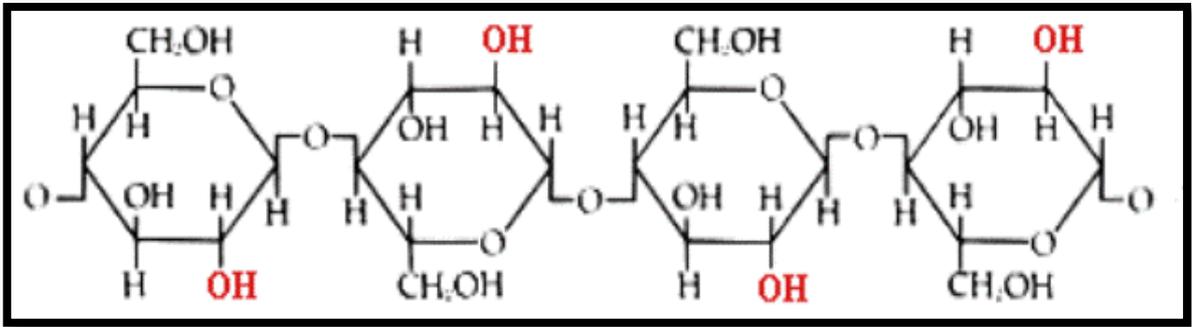


Figura 1.5. Estructura química de la Celulosa
(ArgenBio, 2007, p. 1)

En cuanto a su estructura química, es un polisacárido lineal constituido por monómeros de glucosa, unidos por enlaces beta 1-4 (β -1,4). La configuración beta permite que la celulosa forme cadenas largas y lineales unidas entre sí por puentes de hidrógeno, lo que origina la formación de microfibrillas en regiones cristalinas, las cuales son ordenadas y le proporcionan a la celulosa características de insolubilidad, rigidez y que sea inaccesible al ataque enzimático (Carabajal y Flores, 2011, p. 2).

Las cadenas de celulosa pueden romperse en ciertas regiones del haz de microfibrillas mediante puentes de hidrógeno, esto origina regiones amorfas que se pueden hidratar, lo que permite que las enzimas celulolíticas ataquen y degraden la celulosa. Cuando la hidrólisis de la celulosa se produce, las moléculas de glucosa quedan disponibles para que puedan emplearse como fuente de energía (ArgenBio, 2007, p. 2).

1.2.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polisacárido no celulósico flexible, que se produce en los dictiosomas. La matriz de la pared celular está formada por estas macromoléculas

así como también por pectinas y glucoproteínas estructurales. Entre las hemicelulosas se encuentran los xilanos, glucanos, galactanos, mananos, fructanos, xiloglucanos, glucomananos, arabinoxilanos, entre otros. Estos compuestos forman cadenas que unen a las microfibrillas de celulosa para formar una cadena cohesiva, que sirve como un revestimiento resbaladizo, que no permite el contacto directo entre microfibrillas (Carabajal y Flores, 2011, p. 4).

Esta unión química de las microfibrillas y la celulosa mediante las hemicelulosas forma una estructura sólida llamada macrofibrilla, que contiene hasta medio millón de moléculas de celulosa, en corte transversal. Las hemicelulosas se utilizan para la obtención de etanol, levaduras forrajeras y furfural en las industrias hidrolíticas (Álvarez, 2003, p. 3; Carabajal y Flores, 2011, pp. 4-5).

1.2.2.3. Lignina

Después de la celulosa, la lignina es el polímero vegetal más abundante, la cual no sólo es recalcitrante a la degradación, sino que además, su estructura reticular tridimensional de anillos aromáticos enlazados por átomos de oxígeno, dificulta el acceso de las enzimas hidrolíticas hacia las fibrillas celulósicas (Delfín y Durán, 2003, p. 38).

Es uno de los componentes más importantes de la pared celular secundaria, ya que aumenta la resistencia mecánica. Es un polímero de cuerpos fenólicos que son secretados por los dictiosomas. Se entrelazan en una red tridimensional alrededor de las microfibrillas por la acción de las proteínas enzimáticas, que se encuentran en la membrana plasmática. La lignina no tiene una estructura química uniforme y es compleja, los monómeros son derivados del fenilpropano, principalmente el alcohol coniferílico. La complejidad se debe al gran número de enlaces diferentes que unen a los monómeros. Las unidades fenilpropano están entrecruzadas por múltiples enlaces éter y carbono-carbono, que son resistentes al ataque enzimático (Carrillo, 2003, p. 11; Delfín y Durán, 2003, p. 38). La estructura química de la lignina se observa en la Figura 1.6.

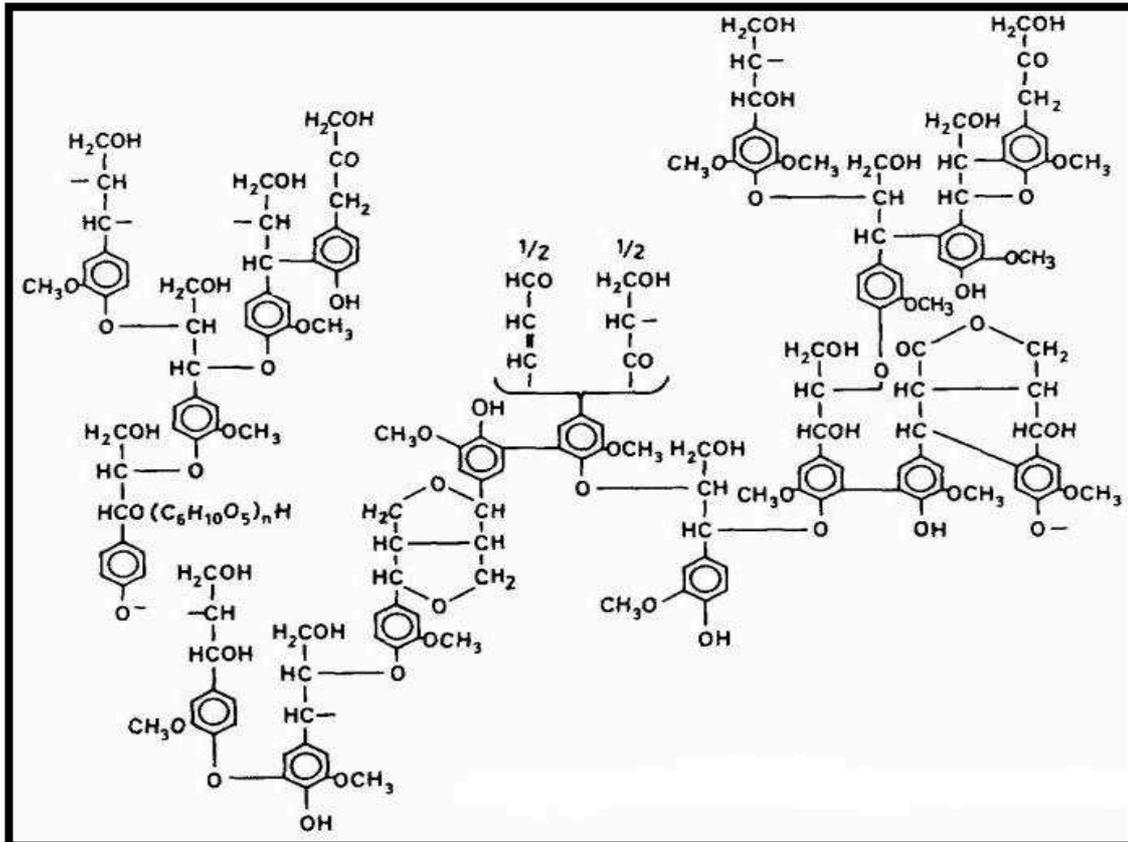


Figura 1.6. Esquema de la Molécula de lignina
(Carrillo, 2003, p. 11)

1.2.3. MECANISMO DE DEGRADACIÓN DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*

Son innumerables los microorganismos que poseen las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar la celulosa y hemicelulosa, pero para el ataque y mineralización de la lignina el número de microorganismos es limitado. Los únicos microorganismos conocidos con la capacidad de degradar y mineralizar la lignina son del grupo causante de pudrición blanca, como el hongo *Pleurotus ostreatus* (Cruz, Rivera, Cruz, Téllez y Arana, 2010, p. 1).

A nivel mundial, se ha encontrado que este hongo es capaz de utilizar los desechos agroindustriales, como sustrato, para convertirlos en su alimento, mediante un sistema enzimático compuesto de celulasas y ligninasas, por lo que durante su crecimiento, la cepa puede degradar selectivamente lignina, sacarificar e hidrolizar celulosa e incrementar la digestibilidad de los sustratos. Estos

microorganismos tienen principalmente dos mecanismos de degradación de los materiales lignocelulósicos. En el primer mecanismo se degrada la lignina, celulosa y hemicelulosa al mismo tiempo; mientras que, en el segundo mecanismo se consume primero la lignina y hemicelulosa presentes en el sustrato; y posteriormente, se degrada la celulosa. La tasa de descomposición varía según la especie de hongo utilizada, además que el crecimiento micelial de estos hongos utiliza para su desarrollo los carbohidratos solubles, glucosa, melazas y fuentes orgánicas de nitrógeno del sustrato (Martínez et al., 2005, p. 197; Ríos, Hoyos y Mosquera, 2010, p. 87; Sánchez et al., 2008, p. 17).

1.2.3.1. Degradación enzimática de la celulosa

El hongo *Pleurotus ostreatus* es capaz de secretar un complejo sistema de enzimas extracelulares de celulasas y xilanasas, que actúan en forma conjunta para hidrolizar celulosa y hemicelulosa (ArgenBio, 2007, p. 2). Estos sistemas enzimáticos agregativos y no agregativos se indican en la Figura 1.7.

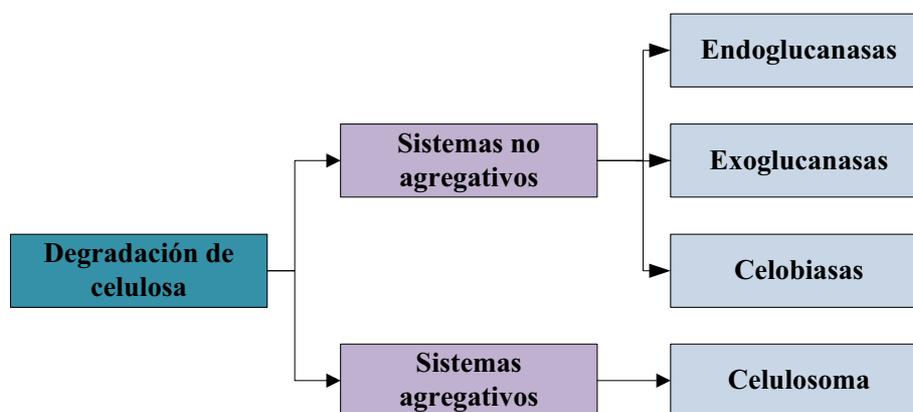


Figura 1.7. Sistemas enzimáticos utilizados para la degradación de la celulosa (ArgenBio, 2007, p. 2)

Los sistemas no agregativos están compuestos por endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas; que actúan en forma conjunta para degradar la celulosa (ArgenBio, 2007, p. 3). En la Figura 1.8 se indican las características de estas enzimas.

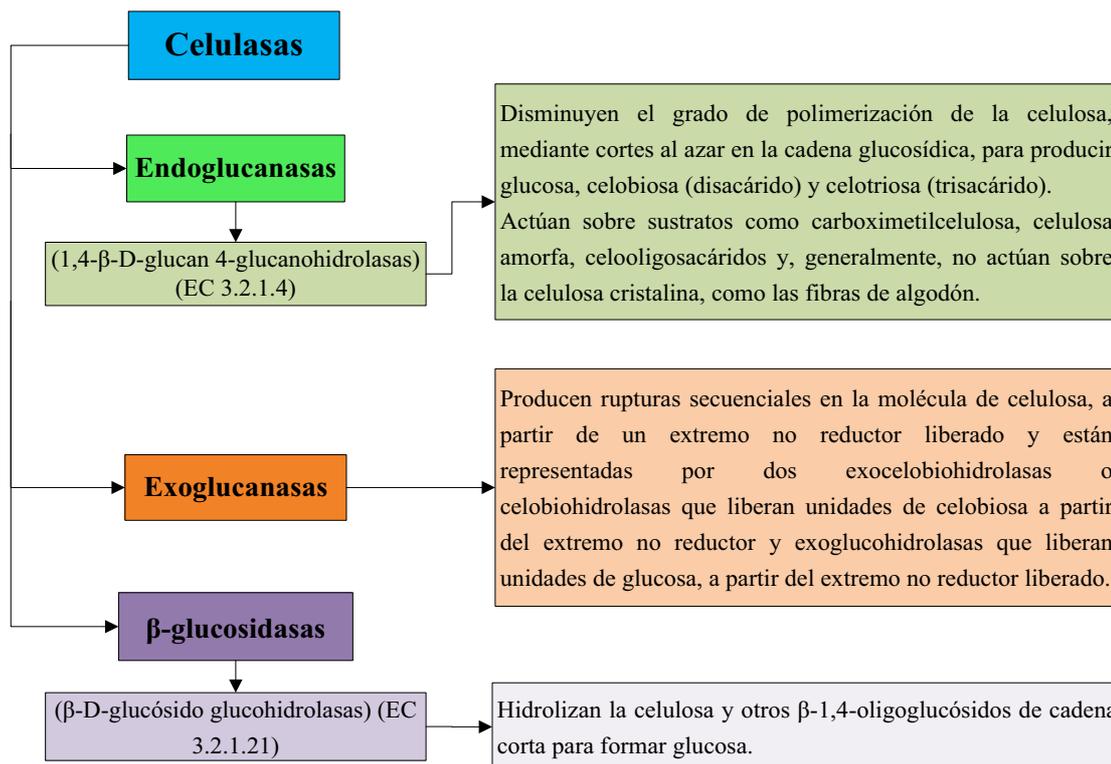


Figura 1.8. Principales tipos de celulasas
(Béguin y Lemaire, 1996, pp. 202-204)

Los microorganismos, que degradan celulosa y hemicelulosa, utilizan los complejos multienzimáticos de alto peso molecular localizados en su superficie. Estos sistemas agregativos se conocen como celulosomas. Este complejo reúne alrededor de 14 polipéptidos distintos, con varias celulasas y xilanasas y al menos una β-glucosidasa, que se encuentran unidos a una proteína sin actividad enzimática, pero que participa en el reconocimiento de las fibras de celulosa. Esta celulosa de unión a la proteína A CbpA (Cellulose binding protein A) junto con las enzimas hidrolíticas son necesarias para romper las regiones amorfas de celulosa, pero no pueden romper las regiones cristalinas (ArgenBio, 2007, p. 3; Carrillo, 2003, p. 6).

El mecanismo sinérgico de acción enzimática, para degradar la celulosa, inicia con la endoglucanasa, que se une al azar a las microfibrillas, y descompone los enlaces internos β-1,4-glucosídicos. Con esto se altera la estructura cristalina de la celulosa y quedan expuestas las cadenas polisacáridas para el ataque de la exoglucanasa (exo-1,4-β-D-glucanasa), que actúa en los extremos no reductores

de la cadena, y origina unidades de celobiosa. Finalmente, las exoglucanasas y las endoglucanasas actúan de manera conjunta con la β -glucosidasa, para hidrolizar los productos formados en monosacáridos de glucosa. La velocidad de descomposición de la celulosa se ve afectada por la cantidad de nitrógeno disponible, la temperatura, el grado de aireación, el porcentaje de humedad, el pH, la presencia de lignina y otros glúcidos (Carrillo, 2003, p. 6; Ovando y Waliszewski, 2005, p. 114). En la Figura 1.9 se indica el mecanismo de degradación de la celulosa.

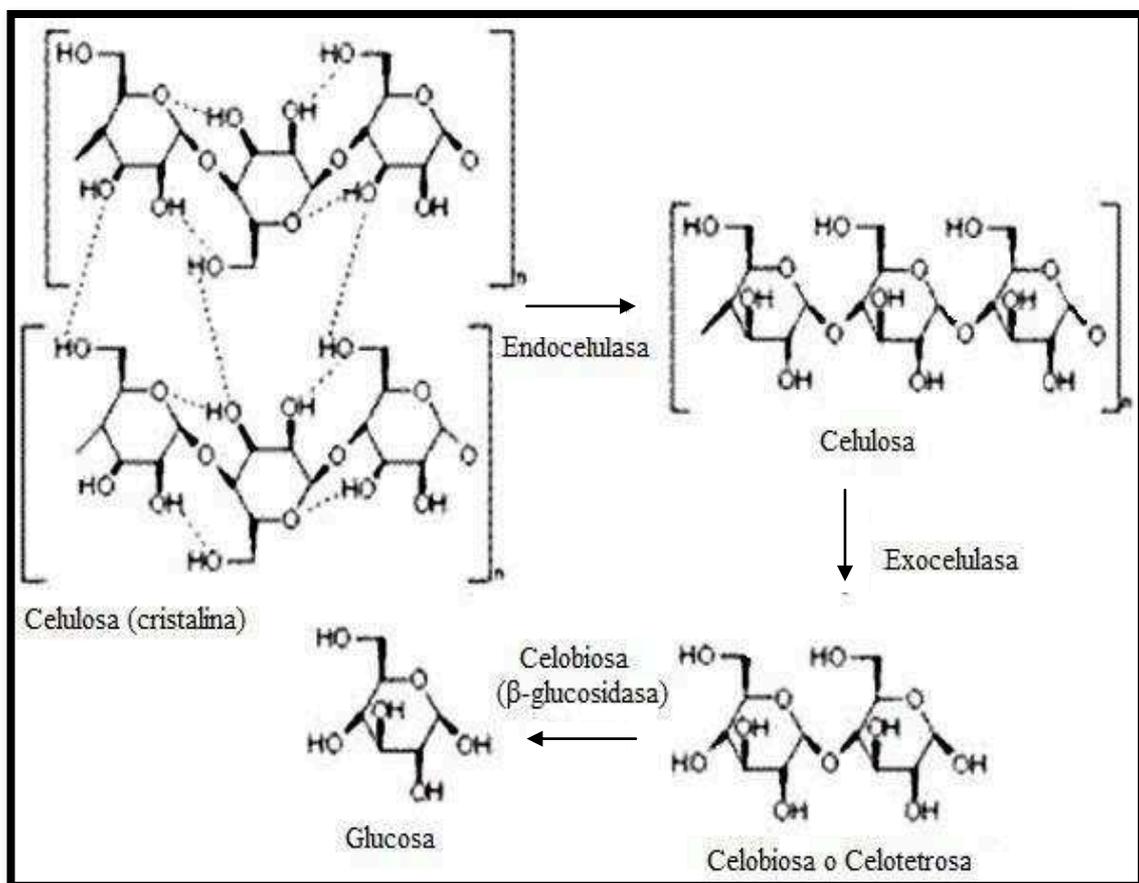


Figura 1.9. Degradación enzimática de la celulosa
(Ovando y Waliszewski, 2005, p. 114)

Los hongos presentan un sinnúmero de actividades enzimáticas oxidativas auxiliares, que no se emplean únicamente para la hidrólisis de la celulosa; pero, ayudan a su degradación mediante conversiones útiles, como oxidaciones o remoción de productos finales, que pueden inhibir algunos de los grupos principales de las enzimas celulolíticas (Carrillo, 2003, p. 6).

1.2.3.2. Degradación enzimática de la lignina

El hongo *Pleurotus ostreatus* es capaz de degradar la lignina de la pared celular de los residuos agroindustriales, debido a que presenta un sistema enzimático no específico con enzimas extracelulares que son Manganese peroxidasa (MnP), Lignino peroxidasa (LiP) y Lacasa (LAC) (Cruz et al., 2010, p. 1). En la Figura 1.10 se describen las principales enzimas peroxidadas.

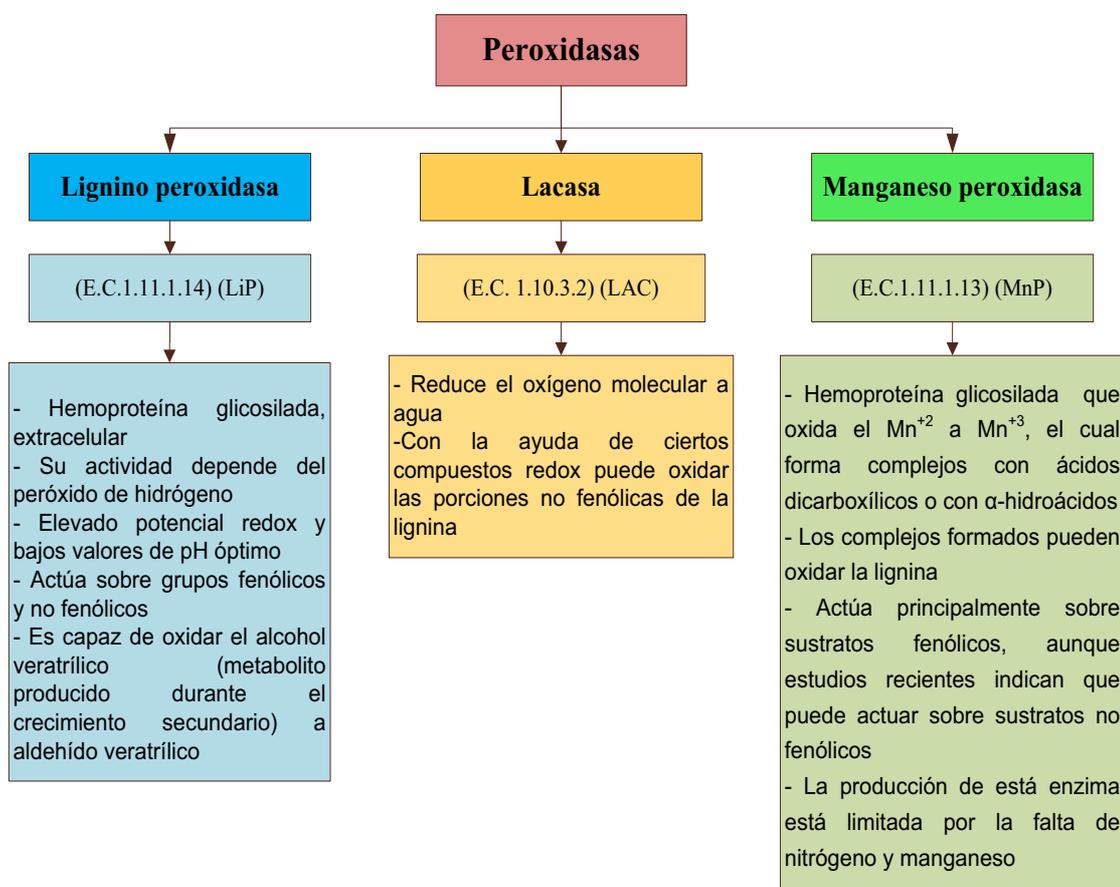


Figura 1.10. Principales tipos de peroxidadas
(Dávila y Vázquez, 2006, pp. 36-38)

Por su capacidad de degradar un compuesto tan complicado como la lignina, la aplicación biotecnológica de estas enzimas es muy versátil, ya que comprende desde el tratamiento de efluentes textiles hasta el tratamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de etanol. La descomposición de la lignina tiene como principal objetivo el acceso a los componentes nitrogenados del sustrato, por lo que las peroxidadas se originan debido a la limitación de

nitrógeno. Según el potencial de oxidación enzimático primero se encuentran las LiP, luego las MnP y por último las LAC. Como producto de la degradación de la lignina se obtiene un tejido de color blanquecino compuesto por celulosa, que después es atacado por los sistemas enzimáticos agregativos del mismo hongo, descritos en el acápite 1.2.3.1 (Carrillo, 2003, p. 12).

La degradación de la lignina ocurre en presencia de glucosa y oxígeno. El sistema enzimático de las peroxidadas cataliza la ruptura oxidativa de los enlaces éter β -O-4 y los enlaces carbono-carbono de la lignina, para lo cual requieren peróxido de hidrógeno (H_2O_2), proveniente de la oxidación por la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4). Posteriormente, actúan las fenoloxidasas sobre los compuestos fenólicos, de bajo peso molecular, liberados (Carrillo, 2003, p. 12).

El ciclo catalítico de la LiP y la MnP se visualiza en la Figura 1.11 y se resume en la Figura 1.12.

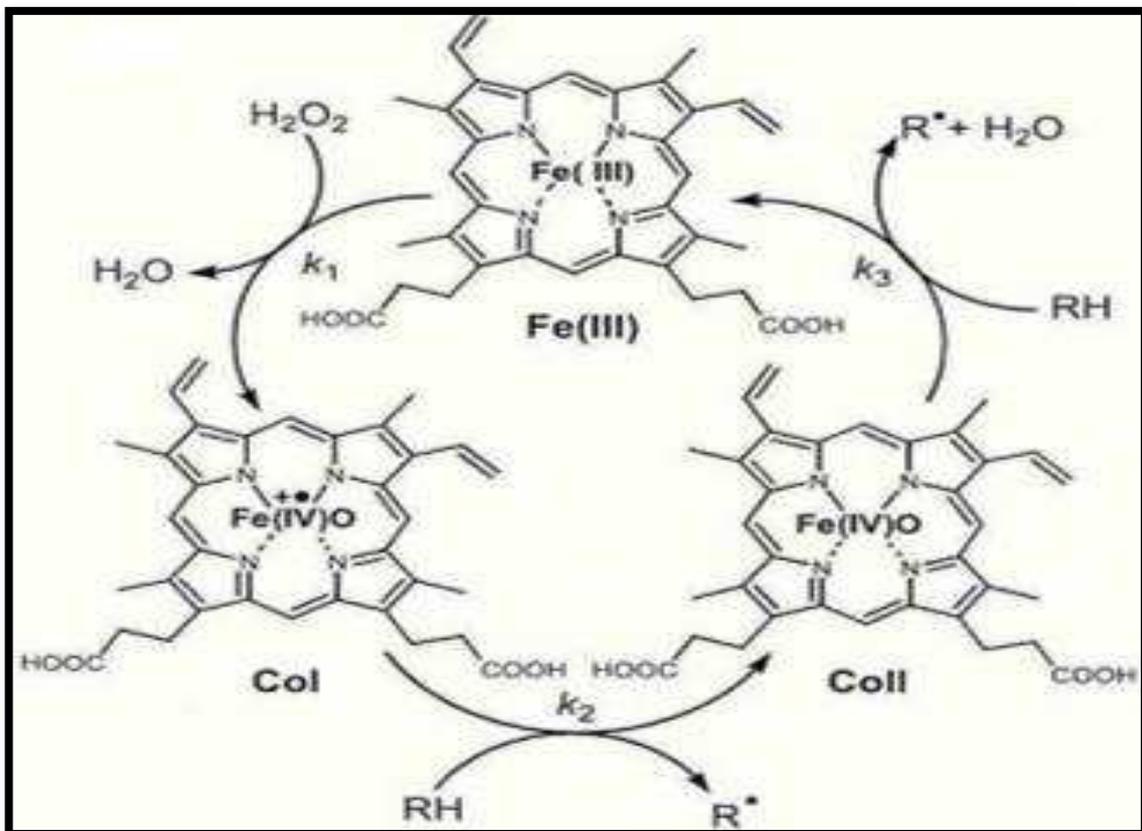


Figura 1.11. Ciclo catalítico de las peroxidadas
(Sánchez, 2009, p. 26)

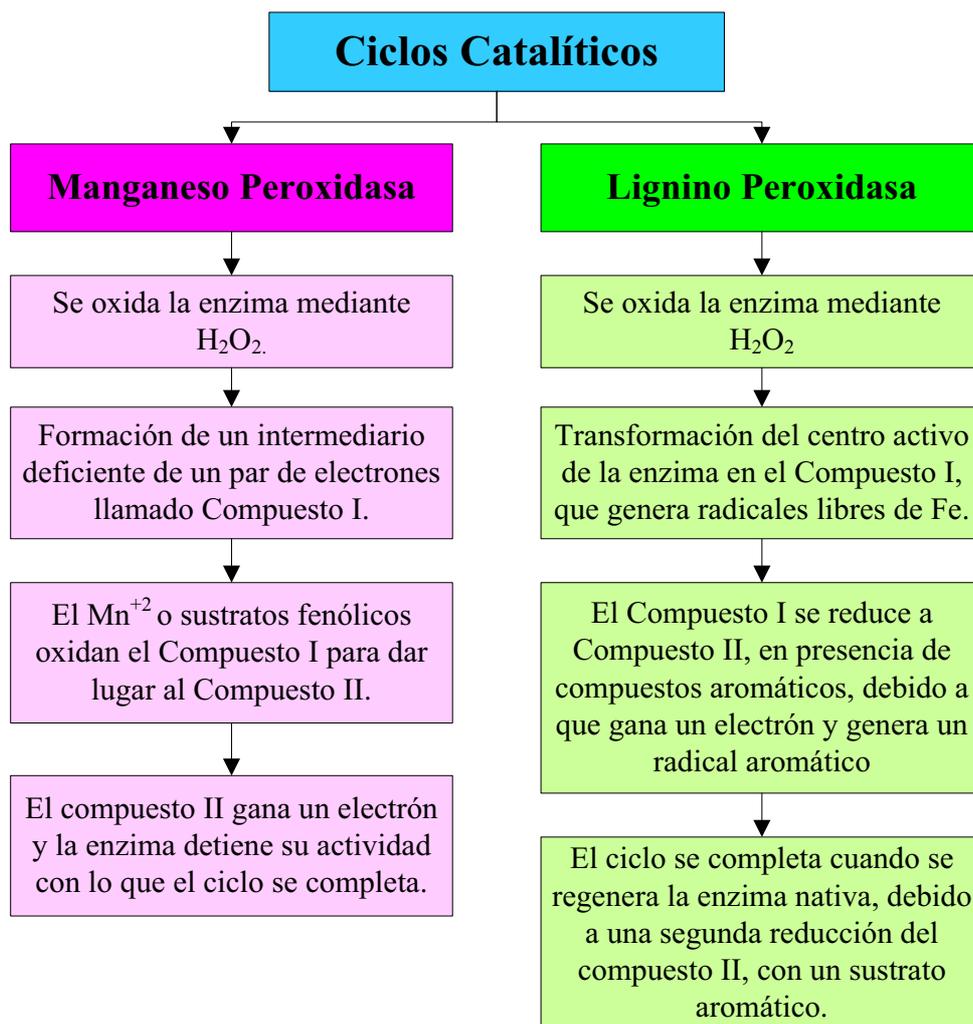


Figura 1.12. Esquema de los ciclos catalíticos de la MnP y LiP
(Dávila y Vázquez, 2006, pp. 36-38)

1.3. EXTRACCIÓN, MANEJO Y MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CELULOLÍTICOS Y LIGNINOLÍTICOS

Las enzimas se han utilizado durante siglos, ya sea como parte de células o extractos crudos de materiales vegetales, microbiológicos o de animales. Su aplicación se ha extendido tanto que ha dado origen a una nueva área de estudio en la biotecnología llamada ingeniería enzimática, la cual se encarga del desarrollo de fuentes de producción de enzimas para uso industrial, métodos de aislamiento, purificación y diseño de reactores enzimáticos (Mateos, 2011, p. 7).

Las enzimas son los catalizadores de los sistemas biológicos, se encargan de acelerar las reacciones químicas sin participar en ellas y sin formar parte de los productos, tienen un alto poder catalítico que se debe en parte a su alta especificidad por los sustratos (Brandan, Llanos, Barrios y Ruiz, 2008, p. 1).

En los hongos filamentosos, el sistema de secreción enzimática tiene como objetivo el transporte de nutrientes hacia el ápice hifal, que es el área activa de secreción enzimática. Para mantener la actividad metabólica existe cierta actividad secretora de enzimas en todo el micelio. Los complejos enzimáticos celulolíticos y ligninolíticos de los hongos están constituidos por isoenzimas, las cuales son variantes enzimáticas que le otorgan diferentes características físico-químicas, de modo que realizan el mismo tipo de reacción y actúan sobre el mismo sustrato, pero en condiciones distintas (Brandan et al., 2008, p. 1; (Papinutti, Dorio y Forchiassin, 2003, p. 17).

1.3.1. EXTRACCIÓN

Las principales fuentes de enzimas utilizadas en la industria son de origen vegetal, animal y microbiano; las enzimas vegetales y animales se obtienen mediante la trituración de los tejidos que forman una papilla en la que se extraen las enzimas con un solvente ya sea agua, acetona, glicerina o solución salina. Por otro lado, para obtener las enzimas de origen microbiano que se encuentran en el medio de cultivo, se separa la biomasa junto con el resto de las células y los componentes sólidos del medio de fermentación, con ayuda de soluciones amortiguadoras de extracción, por filtración o centrifugación. El líquido resultante se puede utilizar directamente como preparado enzimático; sin embargo, es preferible que antes de su aplicación industrial, el extracto obtenido se someta a una purificación y/o aislamiento de las enzimas (Mateos, 2011, p. 7).

Las nuevas tendencias industriales apuntan al reemplazo de muchas enzimas provenientes de tejidos, por aquellas que se originan en el cultivo de microorganismos, las cuales generan enzimas específicas del tipo degradativo y

extracelular, que son excretadas al medio de fermentación por el microorganismo que las produce, motivo por el cual no es necesario romper las células microbianas para extraer las enzimas (Mateos, 2011, p. 8).

La principal ventaja de la producción de enzimas microbiológicas es el costo, ya que este es menor que el de las extracciones enzimáticas vegetales y animales; además, se puede aumentar el rendimiento de una enzima específica mediante la modificación de las condiciones de cultivo del microorganismo en cuestión y también por vía genética (Mateos, 2011, p. 8).

1.3.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las técnicas para determinar la actividad catalítica de las enzimas son más sencillas que las de concentración de las mismas y desde el punto de vista biológico son más importantes, por lo que se prefiere medir la actividad enzimática y no la cantidad existente. En este proceso, una cantidad limitada de moléculas enzimáticas actúan sobre una cantidad de sustrato que se encuentra presente en exceso; la acción enzimática se desarrolla bajo condiciones definidas y por un tiempo determinado (Brandan et al., 2008, p. 2).

Por concentración enzimática se entiende el peso de enzima que existe por unidad de referencia ya sea gramo o litro (Sapag y Schmidt, 2011, p. 1).

Según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM), la actividad enzimática se expresa en Unidad Internacional UI, que se define como “la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato o la formación de 1 μmol de producto por minuto, bajo condiciones definidas”. La UIBBM introdujo en 1999 una nueva unidad de actividad catalítica llamada KATAL (kat), que se define como “la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mol de sustrato por segundo”. La actividad enzimática de un extracto impuro se expresa en UI/mL de solución, UI/mL de gel, UI/mL de suspensión, entre otras. También puede expresarse de

manera más específica por unidad de masa de la enzima, por ejemplo, en UI/mg de proteína (Racker, 1958, p. 19; Sapag y Schmidt, 2011, p. 1).

En un determinado extracto, la actividad enzimática se mide a través de estimaciones químicas de la concentración del sustrato o de un producto formado durante la reacción. Cuando las reacciones son complejas, se debe medir la actividad enzimática en función de la desaparición del sustrato. Existen algunos tipos de ensayos para la determinación de la actividad enzimática. Uno de los más comunes es el ensayo espectrofotométrico, por su alta sensibilidad y simplicidad (Alonso, Calvo y Rizo, 2011, p. 6).

En la Figura 1.13 se resumen los principios de la espectrofotometría.

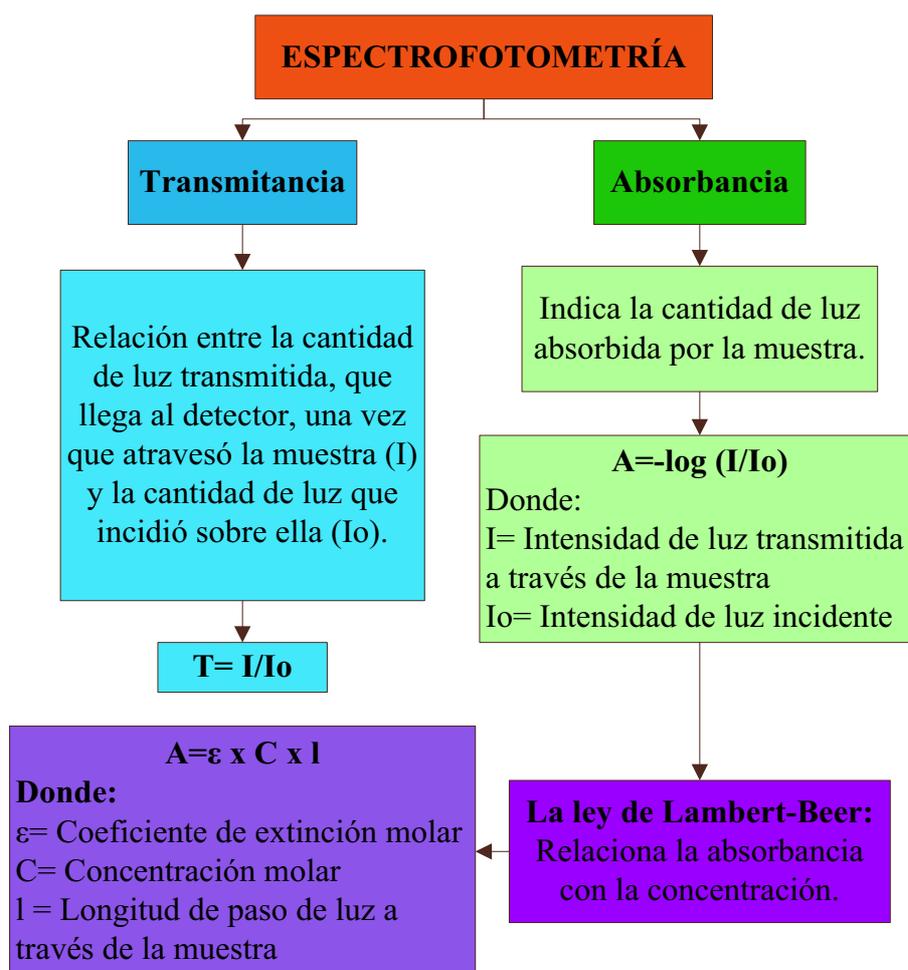


Figura 1.13. Principios de la Espectrofotometría
(Daleth, 2006, pp. 59-69)

Mediante la espectrofotometría se puede seguir el curso de la reacción a través del cambio de la luz absorbida por la solución. Para utilizar este método debe existir entre los sustratos o los productos solo un compuesto que absorba la luz, a una determinada longitud de onda, de esta forma se observa el incremento o decremento de la absorbancia en esa longitud de onda. La espectroscopia aplicada a enzimas se basa en la capacidad que tienen las moléculas para absorber radiaciones dentro del espectro UV-Visible. Las longitudes de onda a las que las moléculas pueden absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio, es por eso que la medición de la actividad enzimática se realiza a una temperatura fija y 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. (Abril et al., 2006, p. 3; Chávez, Díaz, Pérez y Delfín, 1990, p. 84; Daleth, 2006, p. 75).

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, depende de la distancia que recorre la luz a través de la muestra y del coeficiente de extinción molar, que es una constante de proporcionalidad específica de cada compuesto. Como la absorbancia es adimensional, las dimensiones de ϵ dependen de C y de l. La longitud se expresa en cm; mientras que, la concentración se expresa en concentración molar M, con lo que las dimensiones de ϵ son $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. La ley de Lambert-Beer es válida para longitudes de onda (λ) en el rango de luz visible de 400 a 700 nm y en el rango ultravioleta de 200 a 400 nm y se cumple para soluciones diluidas (Abril et al., 2006, p. 4).

1.3.3. MANEJO Y MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La síntesis de enzimas está sujeta a mecanismos de regulación, ya que no se producen de modo constante, sino que su síntesis es inducida por el sustrato adecuado y es reprimida por azúcares, como la glucosa. El inductor más eficiente es el polímero-sustrato de las enzimas que serán sintetizadas, estos polímeros no pueden penetrar por la pared celular a la célula para ejercer su efecto, debido a

su elevado peso molecular. Sin embargo, los bajos niveles enzimáticos degradan una pequeña porción del polímero y hacen que algún producto soluble de la hidrólisis sea incorporado a la célula y así se induzca la síntesis enzimática (Chávez et al., 1990, p. 85).

En las reacciones catalizadas por enzimas, las velocidades de reacción, así como los mecanismos, se ven afectados por cambios en la concentración, el pH y la temperatura. Las enzimas presentan su mayor actividad en condiciones óptimas, es por eso que los ensayos para su determinación tienen diferentes parámetros de temperatura y pH que son los adecuados para mantener la estabilidad de los extractos enzimáticos (Fuentes y Díaz, 2011, p. 7).

Dos factores limitan la aplicación a gran escala de las enzimas: su actividad y su estabilidad en condiciones de proceso. La actividad de las enzimas se ve alterada por la desnaturalización, la inactivación del sitio catalítico y la proteólisis. Los mecanismos de reacción de las enzimas son complejos, ya que se incluyen interacciones complicadas entre varios grupos de las moléculas de la enzima y el sustrato. Las enzimas exocelulares, en general, son más estables que las intracelulares, ya que operan en un ambiente más hostil, son más pequeñas y se encuentran en mayor concentración (Fuentes y Díaz, 2011, p. 7).

Las celulasas presentan gran estabilidad; mientras que, las peroxidasas y las hemoproteínas se inactivan en presencia de un exceso de sustrato, peróxido de hidrógeno, manganeso, entre otros. Esto ocasiona que se rompa el ciclo catalítico de la enzima, lo que afecta a la cantidad de biomasa fúngica y al crecimiento del micelio del hongo (Chávez et al., 1990, p. 85; Gómez et al., 2005, p. 38).

La inactivación de los sitios catalíticos se debe a cambios químicos de los residuos de los aminoácidos ubicados en los centros activos o a la pérdida de los cofactores y grupos prostéticos disociables. La degradación proteolítica es producida por las proteasas, que se encuentran en las mismas células, y pueden interferir en la determinación de otras enzimas (Chávez et al., 1990, p. 86; Pérez et al., 2006, p. 23).

Pese a los inconvenientes citados anteriormente, en la actualidad existen tres estrategias que pueden resolver estas limitaciones: la bioprospección, la evolución dirigida de enzimas y la modificación sobre diseño, estos métodos permiten obtener biocatalizadores estables a las condiciones de reacción y de proceso (Tinoco y Vázquez, 2007, p. 357).

1.4. APLICACIONES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y LIGNINOLÍTICAS

Tanto las enzimas con actividad celulolítica y ligninolítica tienen importantes aplicaciones en el sector industrial, a continuación se detallan algunas de ellas.

1.4.1. APLICACIONES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Los microorganismos que degradan la celulosa juegan un papel importante en la biosfera, como recicladores de este polímero. Existe una gran variedad de preparados comerciales que contienen actividad celulolítica, los cuales se han aplicado, con éxito, en varios sectores industriales para facilitar y aumentar la liberación de productos de interés y para mejorar los procesos tecnológicos (ArgenBio, 2007, p. 4; Ovando y Waliszewski, 2005, p. 115).

Debido a que los extractos celulolíticos realizan una pre-digestión de la pared celular de los tejidos vegetales se utilizan en algunos procesos industriales, por ejemplo en la extracción de aceites esenciales y comestibles, la producción de jugos de frutas y la extracción de pigmentos, saborizantes y aromas; en estos casos, los extractos enzimáticos ayudan a incrementar la eficiencia de la extracción (Ovando y Waliszewski, 2005, pp. 115-120).

En la Tabla 1.3 se indica el uso de las celulasas en la elaboración de diferentes alimentos.

Tabla 1.3. Aplicaciones de las enzimas celulolíticas en la industria alimenticia

Extracción de	Enzimas utilizadas	Acción enzimática
Jugos, a partir de naranja, zanahoria y otros vegetales	Celulasas y pectinasas	Aumentan el porcentaje de extracción y mejoran el sabor del jugo
Leche de coco	Pectinasas, celulasas, α -amilasas, amiloglucosidasas, proteasas	Degradan los polisacáridos del coco, que libera la leche que está retenida en el residuo del fruto extraído, para obtener un jugo más dulce por acción de la glucosa
Aceites de oleaginosas	Celulasa, hemicelulasa, quitinasa, xilanasas, pectinasa y proteasa	Incrementan el contenido de aceite extraído y aumentan la velocidad de extracción del aceite, así como también reduce la rancidez del aceite
Colorantes de flores de caléndula	Celulasa, hemicelulasa y pectinasa	Degradan los componentes de la pared celular, lo que aumenta la extracción del colorante natural (luteína)
Antioxidantes de vid	Pectinasa, celulasa y hemicelulasa	Producen la liberación selectiva de los fenoles antioxidantes por medio de la degradación de los polisacáridos de la pared celular de la cáscara de uva y mejoran su actividad

(ArgenBio, 2007, p. 6)

Por otro lado, en la industria textil, las enzimas celulolíticas se utilizan para remover el color azul índigo de los jeans que ocasiona la apariencia de desteñido en la tela. Las industrias de detergentes de ropa agregan celulasas a sus productos, para que puedan degradar las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, con lo que se proporciona una superficie suave y la prenda mantiene su color original (ArgenBio, 2007, p. 7).

Existe un marcado interés por el desarrollo de procesos que permitan emplear los extractos enzimáticos para la degradación de materiales y desechos lignocelulósicos, con el fin de obtener glucosa y otros azúcares fermentables. La hidrólisis enzimática aplicada a la producción de biocombustible permitiría reemplazar el maíz o la remolacha, que se utilizan actualmente como materia prima, por desechos agrícolas o plantas sin valor nutritivo ni comercial. De esta forma, los residuos agrícolas pasarían de ser un desecho que se acumula y provoca problemas de contaminación a ser una materia prima de un producto con alto valor agregado (Rojas y Cabanillas, 2008, pp. 5-6).

1.4.2. APLICACIONES DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Los hongos de pudrición blanca, responsables de la degradación de la lignina, tienen un alto potencial para transformar compuestos contaminantes y xenobióticos, mediante una batería de enzimas de baja especificidad, propia de estos microorganismos (Tinoco y Vázquez, 2007, p. 347).

Algunas de las aplicaciones más importantes de estas enzimas son (Téllez, Maqueda, Mercado, Anducho y Arana, 2009, p. 1; Tinoco y Vázquez, 2007, pp. 353-360):

- Oxidación de efluentes derivados del blanqueo del papel, con la ayuda de la enzima manganeso peroxidasa;
- Mineralización completa de los contaminantes recalcitrantes a dióxido de carbono (CO₂) como los bifenilos policlorados, explosivos aromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas clorados y organofosforados;
- En la industria de papel, el primer paso constituye la degradación de la lignina, para lo cual se puede usar los extractos con actividad ligninolítica y así se evitan los métodos térmicos, mecánicos y químicos que son procesos costosos y producen efluentes altamente contaminantes;
- Obtención de alimento de fácil digestión para rumiantes, ya que al eliminar la lignina, la celulosa es más digerible;
- En el tratamiento de derrames petroleros, los hongos de pudrición blanca son capaces de degradar algunos hidrocarburos tóxicos, como tolueno o benceno;
- En la preparación del vino, se puede controlar la cantidad de fenol presente, el cual brinda al vino propiedades organolépticas características;
- En el tratamiento de aguas residuales, en especial de las industrias textiles que producen aguas coloreadas con compuestos fenólicos, con ayuda de las peroxidases se pueden decolorar estos compuestos.

Por la importancia de todas las aplicaciones mencionadas anteriormente, se ha puesto mucho énfasis en la obtención de estas enzimas con actividad celulolítica

y ligninolítica, así nacen nuevas alternativas que involucran periodos de obtención cortos y propiedades bioquímicas adecuadas, que conllevan la obtención de microorganismos mejorados genéticamente, para la hiperproducción de enzimas (ArgenBio, 2007, p. 8).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar, a escala de laboratorio, la generación de enzimas con actividad celulolítica y ligninolítica en extractos obtenidos durante el crecimiento de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 en rastrojo de maíz.

2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los cuerpos fructíferos de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.
- Determinar la generación de enzimas con actividad celulolítica, en los extractos obtenidos de la fermentación en rastrojo de maíz.
- Determinar la generación de enzimas con actividad ligninoperoxidásica y/o mangesoperoxidásica, en los extractos obtenidos de la fermentación en rastrojo de maíz.

2.2. MATERIALES

Se utilizó como sustrato rastrojo de maíz proveniente de la ciudad de Latacunga, ubicada en la provincia de Cotopaxi. Se utilizaron las cepas 202 y 896 del hongo *Pleurotus ostreatus*, propiedad del Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional.

Los equipos y reactivos utilizados en la parte experimental se especifican en la Tabla 2.1 y 2.2, respectivamente. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Tabla 2.1. Equipos requeridos para el desarrollo de la parte experimental

Equipo	Marca	Modelo	Equipo	Marca	Modelo
Balanza	OHAUS-Scout	SP202	Mufla	Heraeus	RT 360
	OHAUS-Trooper	TR3RS-M	pH metro	Hanna Instruments	HI 98128
Balanza analítica	Boeco Germany	BBL62	Autoclave	New Brunswick Scientific	B-4019
Espectro-fotómetro	Labomed, Inc. Spectro UV-VIS	UVD 3500	Secador	Heraeus Langenselbold	0-63505
Computador	ARI	INTEL CORE I3	Plancha de calentamiento	Barnstead Thermolyne Cimarec	S46725
Cámara de flujo laminar	Cabina de flujo horizontal 85 H	10 C IFV	Agitador	New Brunswick Scientific	I 2000
Termómetro de temperatura máxima y mínima	Taylor	5460	Triturador Eléctrico de Forraje	Trapp	TRF-300
Baño María	Cole Parmer	1200-00	Incubadora	Boeckel Industries INC	132000
	Julabo	SW22	Caldero	Beaucoup	2 UR

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

Reactivo	Marca	Reactivo	Marca	Reactivo	Marca
Alcohol veratrílico	Aldrich	Agua oxigenada	Merck	Ácido sulfúrico	Fisher Scientific
Bisulfito de sodio	Fisher Scientific	Ácido tartárico	BDH Laboratories	Tartrato de sodio	Sigma
Ácido acético	Riel De Haen ag seelza hannover	Tartrato de sodio y potasio	Fisher Scientific	Fosfato potásico	BDH Chemicals Ltd.
Acetato de sodio	Merck	Benceno	Fisher Scientific	Alcohol etílico	J. T. Baker Inc
Metabisulfito de sodio	Fisher Scientific	Sulfato de manganeso	Mallinckrodt	Fenol	BDH Laboratories
Carboximetil-celulosa	HiMedia Laboratories	Ácido 3,5-dinitrosalicílico	Sigma	Albúmina	J. T. Baker Inc
Malta agar	J. T. Baker Inc	Glucosa	Merck	Ácido cítrico	J. T. Baker Inc
Hidróxido de sodio	Merck	Ácido clorhídrico	J. T. Baker Inc	Sulfito de sodio	Baker Analyzed

2.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE LOS HONGOS *Pleurotus ostreatus* 202 Y 896

Se replicaron las cepas 202 y 896 del hongo *Pleurotus ostreatus* en tubos de ensayo con malta agar, una vez que el micelio del hongo se desarrolló por completo en la superficie del medio de cultivo se prepararon cajas Petri con malta agar y se inocularon con los hongos procedentes de los tubos de ensayo. Tanto para el crecimiento del microorganismo en tubos de ensayo, como en cajas Petri, se trabajó con una estufa a 25 °C.

Se prepararon frascos de vidrio de capacidad 500 mL, con 120 g de trigo seco y 240 mL de agua, por cada frasco. Posteriormente, se taparon y esterilizaron los frascos en un autoclave a 121 °C, por 15 min. Una vez que la presión y la temperatura del autoclave bajaron a 0 psi y 40 °C, respectivamente, se sacaron los frascos; se agitaron individualmente, para evitar la aglomeración del trigo húmedo; y, se dejaron enfriar. Se llevaron los frascos a la cámara de flujo laminar, donde fueron inoculados en forma individual, con un cuarto del micelio crecido en las cajas Petri. Se cerró cada frasco sin hermeticidad, para permitir la entrada de aire al sistema. Los frascos se incubaron 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 en las fundas con rastrojo de maíz. En el Anexo I se observan las fotografías del desarrollo del hongo *Pleurotus ostreatus*.

2.4. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO E INOCULACIÓN DE LOS HONGOS *Pleurotus ostreatus* 202 Y 896

2.4.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL RASTROJO DE MAÍZ UTILIZADO EN LA FERMENTACIÓN

En el rastrojo de maíz se determinó el porcentaje de los siguientes compuestos, en base seca: el contenido de resinas, ceras y grasas según la metodología

descrita en la norma TAPPI T 6 os-59 indicada en el Anexo II, el contenido de celulosa mediante la norma TAPPI T 17 m-55 detallada en el Anexo III y el contenido de lignina mediante la norma TAPPI T 13 os-54 que se encuentra en el Anexo IV. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional.

Los resultados de estos análisis se cambiaron a base húmeda, para trabajar con una base de 100 % y comparar con los resultados obtenidos de los análisis del sustrato resultante de la primera y segunda cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 como se indica en el acápite 2.4.4.

2.4.2. PRODUCCIÓN DEL HONGO COMESTIBLE

Para la obtención de los cuerpos fructíferos de las cepas 202 y 896 del hongo *Pleurotus ostreatus* se utilizó la metodología descrita en el Manual del cultivador de hongos (MushWorld, 2005, pp. 57-59) y aplicada por Pazos (2004, pp. 31-33), Riofrío (2007, pp. 15-18) y Vaca (2011, pp. 23-25).

2.4.2.1. Esterilización del sustrato e inoculación

El rastrojo de maíz fue picado, para obtener fracciones entre 3 y 5 cm. Se esterilizó el sustrato, en costales cerrados, en un autoclave abierto, por un período de 1 h, en agua a ebullición a 90 °C. Se drenó el exceso de agua de los costales y se dejó enfriar. El rastrojo fue extendido en una mesa metálica limpia y desinfectada con cloro, sablón y alcohol antiséptico, de donde se procedió a tomar una muestra de 100 g de rastrojo esterilizado, para la determinación del contenido de humedad, como se indica en el Anexo V.

Para la siembra del hongo *Pleurotus ostreatus* se utilizaron fundas plásticas de 7 por 10 pulgadas. Se llenaron las fundas con capas alternadas de rastrojo de maíz esterilizado y de trigo inoculado. Se mantuvo una relación del inóculo igual al 10

% del peso total del sustrato contenido en la funda. El peso de cada funda fue de aproximadamente 0,25 kg. Finalmente, las fundas se cerraron con cinta adhesiva.

2.4.2.2. Desarrollo del micelio

Las fundas fueron llevadas a una cámara oscura. El día después de la siembra se realizó una perforación en forma de cruz de 2 × 2 cm, en el centro y a cada lado de la funda. Desde este día se procedió a la ventilación y humidificación de la cámara, con una frecuencia de 2 veces por día, para esto se utilizó un ventilador y las boquillas aspersoras de agua, que se encuentran dentro de la cámara.

El proceso se desarrolló a temperatura ambiente, por lo que se registró el máximo y mínimo valor de temperatura alcanzado durante el día, para reportar el valor promedio en cada corrida. Las fundas permanecieron en esta cámara hasta el desarrollo completo del micelio y la aparición de los primordios.

2.4.2.3. Fructificación y cosecha

Para la etapa de fructificación, las fundas fueron trasladadas a la cámara clara–oscura. La ventilación y humidificación se realizó de la misma manera como se indicó en el ítem 2.4.2.2. De igual forma, se registraron los valores máximos y mínimos de la temperatura ambiental.

Una vez que los primordios se desarrollaron completamente, en cuerpos fructíferos, se procedió a cosecharlos por primera vez; para esto se desprendió el hongo del sustrato y se registró el peso del mismo, como el valor promedio y la desviación estándar para las fundas cosechadas en cada corrida.

El sustrato restante permaneció en la cámara clara-oscura, hasta obtener la segunda cosecha. Se determinó el rendimiento biológico en porcentaje, mediante la división del peso del hongo cosechado de cada funda, para el peso de rastrojo

de maíz seco en esa funda y se registró como el porcentaje promedio de las fundas cosechadas en cada corrida. En la Figura 2.1 se indica el proceso para la obtención de hongos.

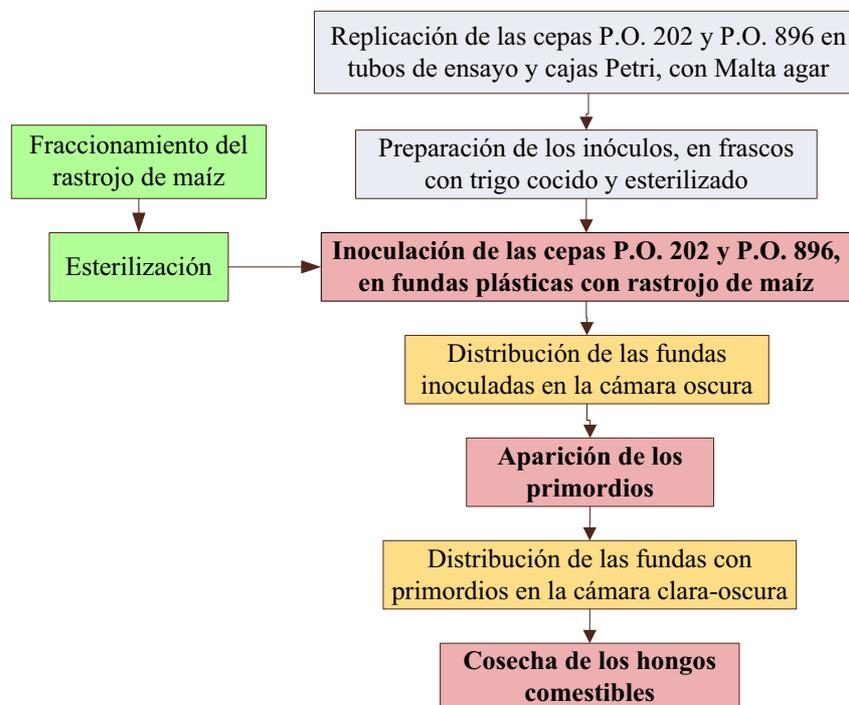


Figura 2.1. Proceso para la obtención de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

2.4.3. MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

El muestreo se realizó desde la siembra hasta la segunda cosecha. En este periodo o corrida de fermentación se muestrearon dos fundas, para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202 y dos fundas para la cepa 896, con una frecuencia de dos veces por semana. Se realizaron tres corridas de fermentación.

Para la obtención de los extractos enzimáticos, se pesaron 45 g de sustrato fermentado, previamente homogeneizado, y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL, con 75 mL de la solución amortiguadora específica para la enzima a extraer. Posteriormente, se taparon los erlenmeyer y se colocaron en el agitador, por 30 min. Luego se filtró el sustrato para obtener el extracto, el cual se utilizó para determinar las actividades enzimáticas (Vaca, 2011, p. 25).

Para el extracto enzimático de las celulasas se utilizó una solución amortiguadora de citrato de sodio 0,05 M pH 4,8; mientras que, para la lignina peroxidásica fue necesario la solución amortiguadora de tartrato de sodio 0,15 M pH 3,0 y para la manganeso peroxidasa se ocupó la solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1 M pH 4,5 (Vaca, 2011, p. 25).

2.4.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL RASTROJO DE MAÍZ DESPUÉS DE LA PRIMERA Y SEGUNDA COSECHA DEL HONGO *Pleurotus Ostreatus* 202 Y 896

El rastrojo de maíz se encontraba húmedo después de cada cosecha, así que se colocaron las muestras en el secador por 24 h; y posteriormente, se molieron al tamaño de partícula requerido por la metodología para determinar el contenido de: lignina, celulosa, resinas, ceras y grasas del sustrato resultante de la primera y segunda cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 como se describe en el acápite 2.4.1.

Los resultados de estos análisis se cambiaron de base seca a base húmeda, para determinar el porcentaje de variación de los componentes del sustrato producto de la primera y segunda cosecha, con respecto al contenido inicial de estos compuestos en el rastrojo de maíz sin fermentar.

2.5. DETERMINACIÓN DE LA GENERACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

Mediante el método de Miller, indicado en Ghose (1987), se determinó la actividad celulolítica (pp. 264-265).

En la Figura 2.2 se resume el proceso para la determinación de la actividad celulolítica de los extractos enzimáticos.

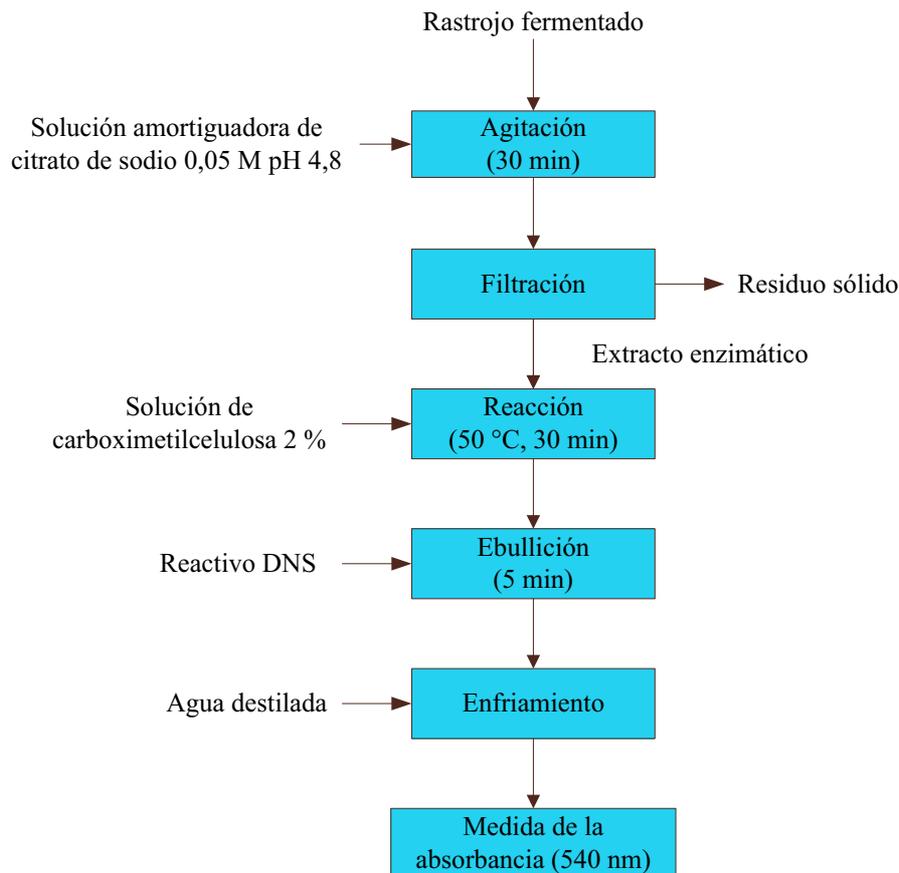


Figura 2.2. Proceso para la determinación de la actividad celulolítica de los extractos enzimáticos
(Ghose, 1987, pp. 264-265)

Se empleó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa, al 2 %, en solución amortiguadora de citrato de sodio 0,05 M pH 4,8.

En tubos de ensayo de 50 mL se agregaron 0,5 mL de la solución de sustrato más 0,5 mL de extracto enzimático y se colocaron en un baño maría a 50 °C, por 30 min. Posteriormente, se adicionaron 3,0 mL de reactivo DNS y se pusieron los tubos en agua en ebullición por 5 min. Después de hervir, se enfriaron con agua para detener la reacción. Se agregaron 20 mL de agua destilada en cada tubo y se homogeneizaron las mezclas.

Se realizó el mismo procedimiento para el blanco de reactivos, pero se utilizaron 0,5 mL de solución amortiguadora de citrato de sodio 0,05 M pH 4,8 en lugar de 0,5 mL de extracto enzimático.

Para el blanco de cada muestra se colocaron 0,5 mL de la solución sustrato. El extracto enzimático se agregó después del reactivo DNS para corregir los azúcares presentes en el extracto enzimático.

En un espectrofotómetro, se midió la absorbancia a 540 nm del blanco de reactivos, blanco de muestra, la muestra de extracto enzimático y su paralela correspondiente.

Se elaboró la curva de calibración como se indica en el Anexo VI, para calcular la concentración de azúcares reductores a partir de la ecuación de regresión lineal de la curva patrón con D-glucosa anhidra.

Finalmente, se obtuvo la actividad enzimática en Unidades Internacionales por g de rastrojo seco ($UI \cdot g^{-1}$). UI se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de D-glucosa por min, en las condiciones de la reacción (Sapag y Schmidt, 2011, p. 1). El ejemplo de cálculo de la actividad celulolítica se encuentra en el Anexo VII.

2.6. DETERMINACIÓN DE LA GENERACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD LIGNINOPEROXIDÁSICA Y/O MANGANESOPEROXIDÁSICA

2.6.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNINO PEROXIDÁSICA

Para determinar la actividad lignino peroxidásica se utilizó la metodología descrita en Tien y Kirk (1984, p. 2280) y Villa (2007, p. 41).

En tubos de ensayo de 10 mL se agregaron: 9,4 mL de una solución de tartrato de sodio 0,15 M pH 3,0; 0,5 mL de extracto enzimático; 0,1 mL de una solución de Tween 80 al 10 % en volumen; 0,015 mL de una solución de alcohol veratrílico al 20 % en volumen; y, se inició la reacción al añadir 0,02 mL de una solución de

peróxido de hidrógeno al 10 % en volumen. Para el blanco de reactivos se realizó el mismo procedimiento, pero en lugar de adicionar 0,5 mL de extracto enzimático, se colocaron 0,5 mL de una solución de tartrato de sodio 0,15 M pH 3,0. Para el caso del blanco de las muestras no se adicionó el peróxido de hidrógeno. Una vez que se prepararon todas las mezclas, se colocaron en un baño maría a 30 °C, por un tiempo de reacción de 60 min. Finalmente, se leyó la absorbancia del blanco de reactivos, blanco de muestra, la muestra de extracto enzimático y su paralela correspondiente a 310 nm.

Mediante la ley de Lambert-Beer se determinó la concentración de sustrato oxidado con un $\epsilon = 9\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad enzimática se indicó en Unidades Internacionales por g de rastrojo seco ($\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$). UI se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de sustrato por min, en las condiciones de la reacción (Tien y Kirk, 1984, p. 2280). El ejemplo de cálculo de la actividad lignino peroxidásica se encuentra en el Anexo VIII. En la Figura 2.3 se indica el proceso para determinar la actividad lignino peroxidásica en extractos enzimáticos.

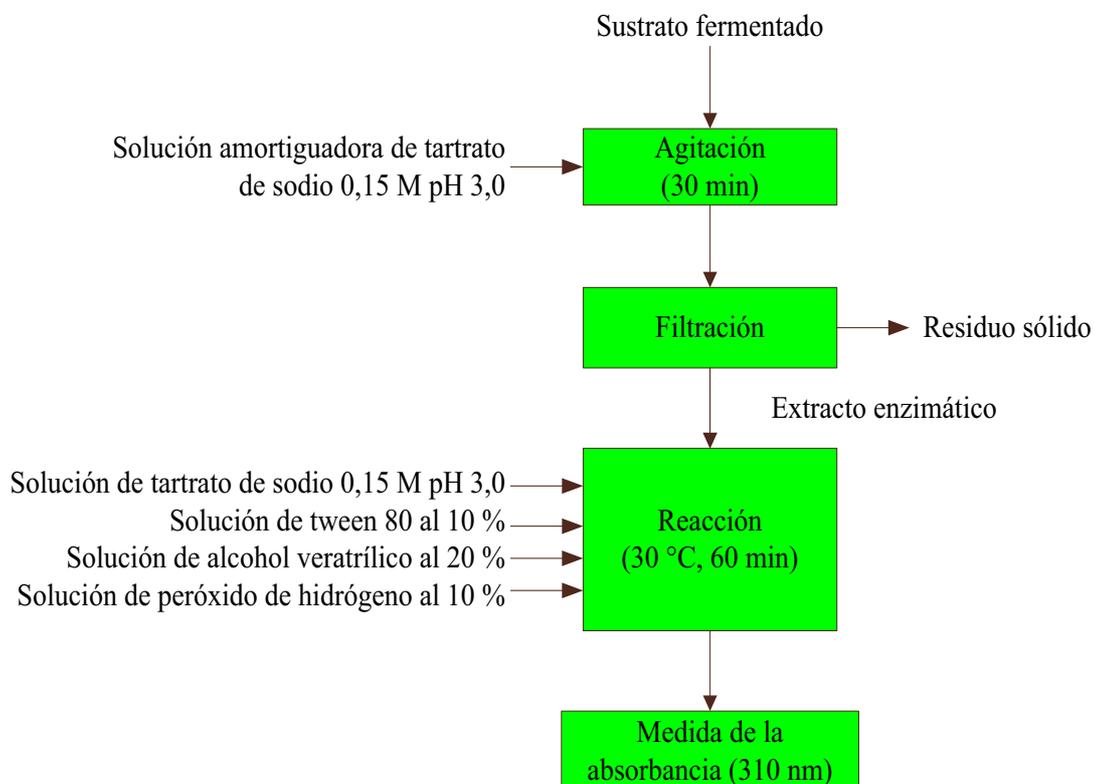


Figura 2.3. Proceso para la determinación de la actividad lignino peroxidásica (Tien y Kirk, 1984, p. 2280; Villa, 2007, p. 41)

2.6.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA

Se utilizó la metodología descrita por Lopes, Teixeira, Nunes y Durrant (2009) para determinar la actividad manganeso peroxidásica (p. 819).

En un tubo de ensayo de 10 mL se colocaron: 0,1 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1 M pH 4,5; 0,05 mL de una solución de sulfato de manganeso 2 Mm; 0,20 mL de una solución de albúmina, al 0,5 %; 0,1 mL de una solución de rojo fenol, al 0,1 %; 0,5 mL de extracto enzimático; y, 0,05 mL de una solución de peróxido de hidrógeno 2 mM, en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,2 M pH 8,0. Las mezclas se dejaron reaccionar en un baño maría a 30 °C, por 10 min. La reacción se detuvo por adición de 0,04 mL de una solución de hidróxido de sodio 2 N.

Se realizó el mismo procedimiento para el blanco de reactivos, pero se utilizaron 0,5 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1 M pH 4,5 en lugar de 0,5 mL de extracto enzimático.

Para el blanco de cada muestra se colocaron 0,05 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio 0,1 M pH 4,5 en lugar de 0,05 mL de la solución de peróxido de hidrógeno 2 mM.

Finalmente, del blanco de reactivos, blanco de muestra, la muestra de extracto enzimático y su paralela correspondiente se leyó la absorbancia a 610 nm.

La concentración de sustrato oxidado se determinó mediante la ley de Lambert-Beer con un $\epsilon = 22\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales por g de rastrojo seco ($\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$), UI se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de sustrato por min en las condiciones de la reacción (Lopes, et al., 2009, p. 819).

El ejemplo de cálculo de la actividad manganeso peroxidásica se encuentra en el Anexo IX.

En la Figura 2.4 se indica el proceso para determinar la actividad manganoso peroxidásica en extractos enzimáticos.

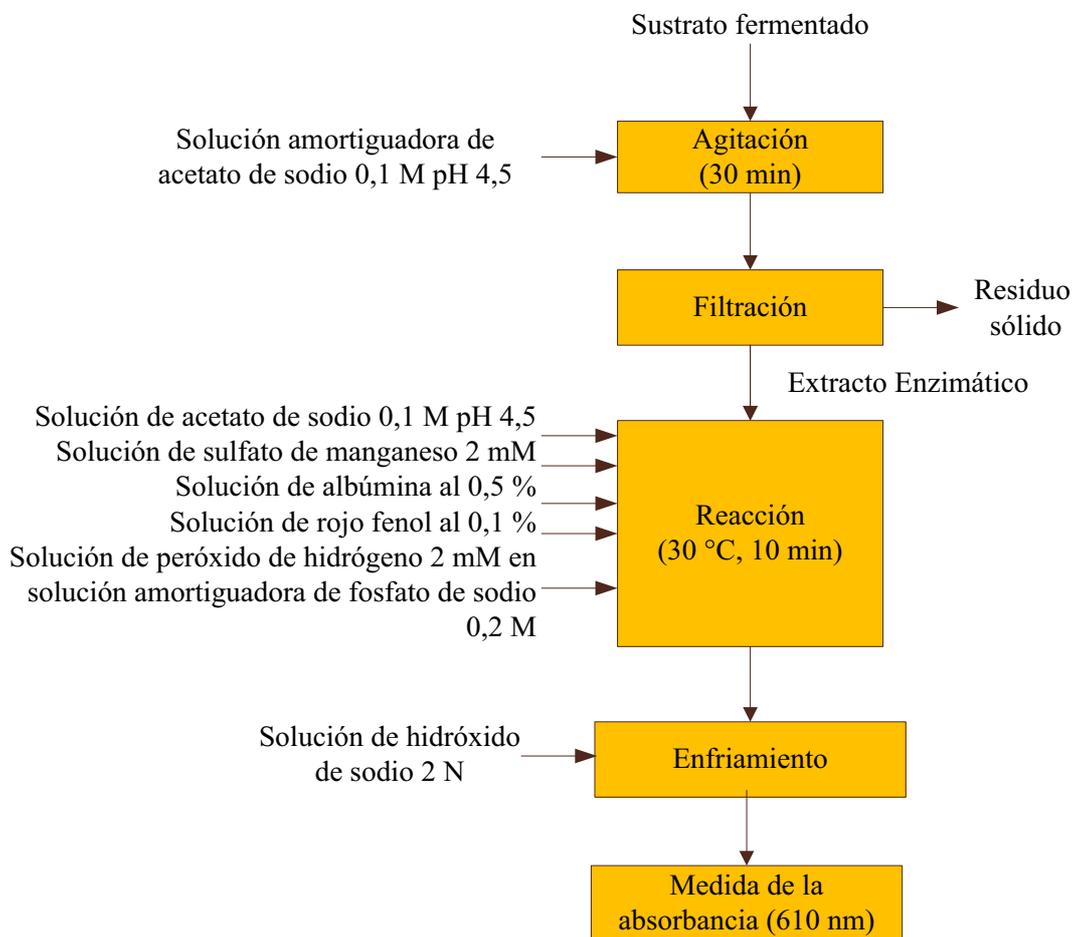


Figura 2.4. Proceso para la determinación de la actividad manganoso peroxidásica (Lopes, et al., 2009, p. 819)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

En la Tabla 3.1 se indican los resultados de la caracterización química del rastrojo de maíz inicial utilizado en la fermentación. El informe emitido por el laboratorio se encuentra en el Anexo X.

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

Analito	Base seca (%)	Base húmeda (%)
Humedad para análisis	7,94	7,36
Solubilidad en alcohol-benceno	11,30	10,47
Celulosa	41,52	38,47
Lignina	20,24	18,75
Otros componentes	26,93	24,95

Se observa claramente que el contenido de celulosa equivale al doble del contenido de lignina, y juntos constituyen los componentes mayoritarios del rastrojo de maíz, por lo que es considerado un desecho agroindustrial lignocelulósico adecuado para el desarrollo y crecimiento del hongo.

Estudios anteriores demostraron que el *Pleurotus ostreatus* crece favorablemente en materiales con estos porcentajes de celulosa y lignina, por ejemplo Riofrío (2007) indica, en base seca, que el rastrojo de maíz de su trabajo tenía un 49,40 % de celulosa y 25,65 % de lignina (p. 22). Vaca (2011) obtiene valores de celulosa y lignina, en base seca, de 41,60 % y 18,44 %, respectivamente (p. 30).

Rodríguez y Torres (1994) indican que además de la celulosa y la lignina el rastrojo de maíz tiene elementos minoritarios como: resinas, ceras, grasas, colorantes y aminoácidos, los cuales son solubles en alcohol-benceno. En el porcentaje de otros componentes se encuentran taninos, glúcidos, proteínas simples, pentosanos, hexosanos, fragmentos de lignina, biomasa y cenizas.

Todos estos compuestos, junto con el contenido de agua, constituyen el 100 % de la composición del rastrojo de maíz en base húmeda (p. 47).

El porcentaje de humedad de la muestra corresponde al rastrojo seco; debido a este bajo porcentaje de humedad el rastrojo de maíz necesitó hidratación, ya que para el crecimiento adecuado del hongo *Pleurotus ostreatus* se requiere un contenido de humedad entre 50 y 80 % (Garzón y Cuervo, 2008, p. 127).

En la Tabla 3.2 se indica el peso de rastrojo de maíz seco por cada 100 g de rastrojo húmedo, obtenido después de ser sometido al proceso de esterilización, en cada corrida de fermentación.

Tabla 3.2. Porcentaje de humedad del rastrojo de maíz en cada corrida de fermentación

	g de rastrojo seco / 100 g de rastrojo total
PRIMERA CORRIDA	69,89
SEGUNDA CORRIDA	68,64
TERCERA CORRIDA	70,23

Se observa que en las tres corridas de fermentación los valores se encuentran dentro del rango de humedad esperado, debido a que las condiciones de esterilización en cada corrida son las mismas, es decir, 1 h a ebullición (90 °C), la diferencia entre los valores radica principalmente en la capacidad de absorber agua que tienen las cañas y las hojas del rastrojo de maíz.

3.2. PERÍODOS DE DESARROLLO Y COSECHA DEL HONGO COMESTIBLE

En las Tablas 3.3 y 3.4 se indican los períodos de crecimiento del micelio y los días de cosecha de las dos cepas del hongo *Pleurotus ostreatus* en las tres corridas de fermentación.

Tabla 3.3. Periodos de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 y tiempos de cosecha obtenidos en las tres corridas de fermentación

PARÁMETRO	Tiempo		
	Primera Corrida	Segunda Corrida	Tercera Corrida
Periodo de crecimiento del micelio	14 días	15 días	14 días
Primera cosecha	día 27	día 25	día 24
Segunda cosecha	día 34	día 31	día 31
Tercera cosecha	día 51	---	día 55

Tabla 3.4. Periodos de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 896 y tiempos de cosecha obtenidos en las tres corridas de fermentación

PARÁMETRO	Tiempo		
	Primera Corrida	Segunda Corrida	Tercera Corrida
Periodo de crecimiento del micelio	25 días	25 días	24 días
Primera cosecha	día 31	día 31	día 28
Segunda cosecha	día 55	día 52	día 52

El crecimiento del micelio de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 se realizó en la cámara oscura; el micelio de la cepa 202 se demoró aproximadamente 15 días en cubrir totalmente la superficie del sustrato, 10 días menos que la cepa 896. Esto indica que el hongo de la cepa 202 se adaptó más rápidamente al medio y a las condiciones ambientales de la cámara de cultivo.

Una vez que el micelio se desarrolló por completo, se formaron los primordios, lo cual indicó que era momento de cambiar las fundas a la cámara clara-oscura para dar paso al período de fructificación; para la cepa 202, este periodo duró de 10 a 13 días, en cambio para la cepa 896 tuvo una duración de 4 a 6 días. Transcurrido este tiempo se realizó la primera cosecha.

Para la segunda cosecha de la cepa 202 se esperó de 6 a 7 días, y de 21 a 24 días, para la cepa 896. La primera y segunda cosecha se obtienen en menor tiempo para la cepa 202 que para la cepa 896; es decir, la cepa 202 desarrolló de una manera más rápida los cuerpos fructíferos.

En la Figura 3.1 se observan los cuerpos fructíferos de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.



Figura 3.1. Crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 en la cámara de fructificación clara-oscuro

En cada corrida de fermentación se observa que los períodos de crecimiento del micelio tienen, prácticamente, igual tiempo de duración, y que los días de cosecha son aproximadamente los mismos, con una diferencia de 2 a 3 días. Este comportamiento se presentó en ambas cepas.

Los pesos recogidos en las tres corridas de fermentación en la primera y segunda cosecha se indican en el Anexo XI.

En las Tablas 3.5 y 3.6 se indican los porcentajes promedio de rendimientos biológicos de ambas cepas del hongo *Pleurotus ostreatus*, el valor promedio del peso del hongo, con su respectiva desviación estándar, y el número de fundas cosechadas en cada corrida.

Tanto en la primera y segunda cosecha, la cepa 896 presenta un mayor rendimiento biológico en las tres corridas de fermentación con respecto a la cepa

202. En la primera cosecha el rendimiento biológico de la cepa 202 es menor en un 7,65 % y en la segunda cosecha en un 6,43 %, por lo que los rendimientos de ambas cepas son similares.

Tabla 3.5. Porcentaje promedio del rendimiento biológico, valor promedio del peso y número de fundas cosechadas del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 en las tres corridas de fermentación

		Primera Corrida	Segunda Corrida	Tercera Corrida
Primera cosecha	Porcentaje promedio del rendimiento biológico	34,03 %	40,32 %	45,57 %
	Valor promedio del peso de los hongos	50,70 g ± 13,83 g	56,96 g ± 13,73 g	61,26 g ± 12,96 g
	Número de fundas	n = 24	n = 8	n = 22
Segunda cosecha	Porcentaje promedio del rendimiento biológico	26,63 %	25,46 %	29,60 %
	Valor promedio del peso de los hongos	23,56 g ± 4,65 g	25,03 g ± 6,64 g	25,30 g ± 4,55 g
	Número de fundas	n = 20	n = 4	n = 18

Tabla 3.6. Porcentaje promedio del rendimiento biológico, valor promedio del peso y número de fundas cosechadas del hongo *Pleurotus ostreatus* 896 en las tres corridas de fermentación

		Primera Corrida	Segunda Corrida	Tercera Corrida
Primera cosecha	Porcentaje promedio del rendimiento biológico	37,62 %	41,49 %	50,72 %
	Valor promedio del peso de los hongos	53,06 g ± 12,17 g	58,71 g ± 12,47 g	62,79 g ± 12,14 g
	Número de fundas	n = 22	n = 10	n = 22
Segunda cosecha	Porcentaje promedio del rendimiento biológico	26,88 %	29,65 %	30,77 %
	Valor promedio del peso de los hongos	24,23 g ± 4,51 g	26,16 g ± 3,75 g	26,47 g ± 3,08 g
	Número de fundas	n = 17	n = 4	n = 10

No se encontraron estudios anteriores realizados con la cepa 896; sin embargo, para la cepa 202, Riofrío (2007) encontró rendimientos biológicos de 21,95 y 18,33 % para la primera cosecha, después de 24 días de fermentación y un valor promedio del peso de los hongos de 23,93 g ± 2,45 g. (p. 21). Estos porcentajes son inferiores a los que se encontraron en el presente trabajo, debido a que el

valor promedio del peso de los hongos fue de $61,26 \text{ g} \pm 12,96 \text{ g}$, y este parámetro influye directamente en el rendimiento biológico.

Oei y Nieuwenhuijzen (2005) indican que el hongo, durante su crecimiento, consume el sustrato, por lo que los nutrientes paulatinamente desaparecen del medio; esta limitación origina que el hongo disminuya su velocidad de crecimiento y se formen cuerpos fructíferos de menor peso para la segunda cosecha, esto se ve reflejado en el rendimiento biológico obtenido en este estudio, el cual para la cepa 202 tiene un valor de 29,60 % y para la cepa 896 es de 30,77 %, ambos valores obtenidos en la tercera corrida (p. 10).

Con excepción de la segunda corrida de la cepa 202, que se analizó por 34 días debido a un problema de contaminación, ambas cepas se analizaron durante un periodo de 55 días, por lo tanto después del día de la segunda cosecha de la cepa 202 (día 31 ó 34) quedan alrededor de 20 días más de crecimiento de dicha cepa, por lo que se obtuvo hasta una tercera cosecha de la cepa 202; sin embargo, los hongos formados eran pequeños, por lo que el peso fue menor con respecto a las cosechas anteriores por lo cual no se indican los valores de dicha cosecha.

El tiempo de fermentación y el rendimiento biológico de las cepas dependen de varios factores como: la composición del sustrato, las condiciones de temperatura y humedad de la cámara de cultivo, el tamaño de las fundas y de la cepa de *Pleurotus ostreatus*, como lo indican Garzón y Cuervo (2008, p. 127).

Ya que el rastrojo de maíz y el tamaño de las fundas no cambiaron en las tres corridas de fermentación, y que la temperatura de las cámaras de cultivo se encontraron entre 10 y 20 °C, para obtener los primordios, y para la formación de cuerpos fructíferos, entre 13 y 16 °C, las diferencias se deben a la cepa de hongo utilizada, por lo que los tiempos de fermentación y rendimientos son propios de cada cepa. En la Tabla 3.7 se indican los valores promedios de la temperatura máxima y mínima de las cámaras de crecimiento (oscura) y fructificación (clara – oscura) durante las tres corridas de fermentación

Tabla 3.7. Valor promedio de la temperatura máxima y mínima de las cámaras oscura y clara-oscura durante las tres corridas de fermentación

		Temperatura mínima promedio (°C)	Temperatura máxima promedio (°C)
Primera corrida	Cámara oscura	17	19
	Cámara clara - oscura	16	18
Segunda corrida	Cámara oscura	17	20
	Cámara clara - oscura	17	19
Tercera corrida	Cámara oscura	18	20
	Cámara clara - oscura	15	17

Los días de cosecha y el rendimiento biológico para cada cepa varían en cada corrida de fermentación; sin embargo, en todos los casos se observa que el menor tiempo y máximo rendimiento biológico se obtiene en la tercera corrida, esto se debe a que conforme se realizan las replicaciones y las siembras del microorganismo, el inóculo formado se fortalece y se adapta al medio en el que se desarrolla, con lo cual se acelera el crecimiento (MushWorld, 2005, p. 54).

3.3. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

En los Anexos XII, XIII y XIV se indican los resultados de las absorbancias medidas en los tres ensayos realizados, estos valores se utilizaron para calcular la actividad enzimática, la cual fue expresada en UI (Unidades Internacionales), definidas como un μmol de producto generado o de sustrato oxidado por min y por g de rastrojo de maíz seco. Los resultados de las actividades celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica de este estudio se presentan en los Anexos XV, XVI y XVII, respectivamente.

3.3.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

En la Figura 3.2 se presentan los valores de actividad celulolítica, obtenidos para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202 durante las tres corridas de fermentación.

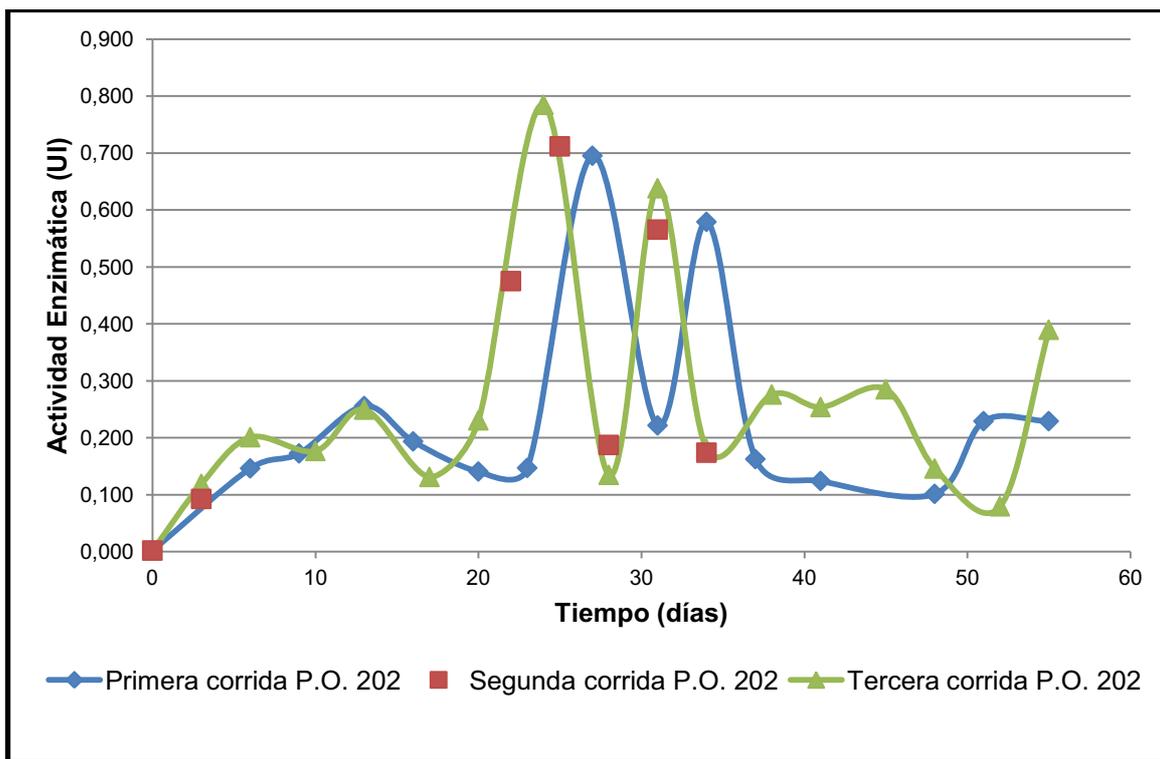


Figura 3.2. Actividad celulolítica durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 202

Se observa que los valores de actividad celulolítica de las tres corridas de fermentación se encuentran dentro de los mismos rangos. La tendencia es creciente durante el periodo de crecimiento del micelio hasta llegar al día de la primera cosecha en donde se encuentra un pico máximo de actividad celulolítica; a partir de este punto existe una disminución de la actividad hasta el día de la segunda cosecha donde también se presenta un pico con menor valor al obtenido en la primera cosecha.

En la primera cosecha, para las tres corridas de fermentación, se obtuvieron valores similares de actividad enzimática, en la primera corrida se obtuvo un máximo valor de actividad de 0,695 UI en el día 27; en la segunda corrida fue de 0,712 UI en el día 25; y en la tercera corrida de 0,785 UI en el día 24.

En los días de la segunda cosecha, para las tres corridas de fermentación, también se presentaron valores altos de actividad celulolítica de 0,579 UI, 0,565 UI y 0,638 UI, respectivamente. Es decir que en los días en los que se cosecha el

hongo comestible se obtienen valores de actividad elevados. Es así que en el día 51 de la primera corrida y 55 de la tercera corrida se presenta otro pico de actividad de 0,229 UI y 0,390 UI, respectivamente, debido a que se obtuvo una tercera cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* 202.

En la Figura 3.3 se presentan los valores de actividad celulolítica, obtenidos para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896 durante las tres corridas de fermentación.

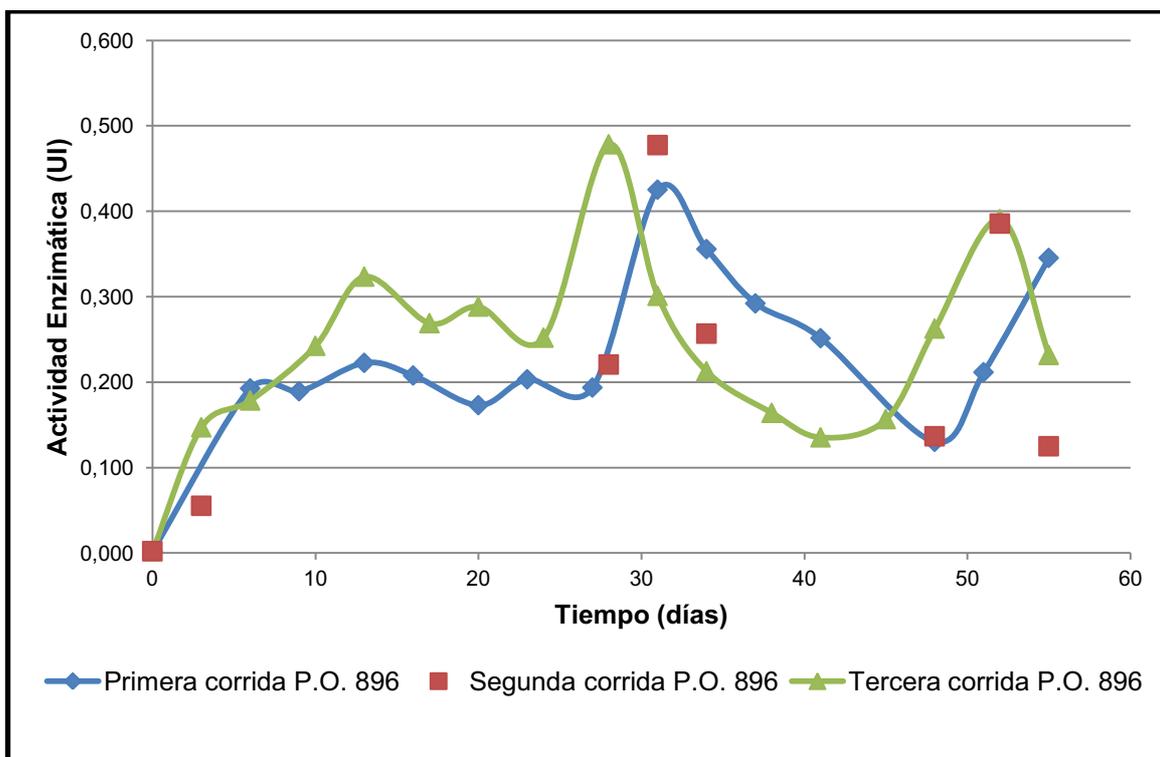


Figura 3.3. Actividad celulolítica durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 896

En la etapa inicial de desarrollo del micelio, se observa una tendencia creciente de la actividad celulolítica hasta llegar a un pico máximo en el día de la primera cosecha; posteriormente, existe una tendencia decreciente de la actividad celulolítica hasta el día de la segunda cosecha en el que se obtiene un valor de actividad elevado, pero menor al encontrado en la primera cosecha. En la primera corrida se obtuvo un máximo valor de actividad de 0,425 UI en el día 31; en la segunda corrida el mayor valor encontrado fue de 0,477 UI en el día 31; y en la tercera corrida se obtuvo un máximo de 0,478 UI en el día 28.

En los días de la segunda cosecha, para las tres corridas de fermentación, también se presentaron valores altos de actividad de 0,345 UI, 0,385 UI y 0,391 UI, respectivamente. Tanto para la cepa 202 y 896 se obtuvo el mayor valor de actividad en la primera cosecha de la tercera corrida; se observa también, en ambas cepas, que existe actividad celulolítica durante todo el desarrollo del hongo ya que no se presentaron valores de cero o negativos en ninguna de las corridas de fermentación.

Estudios realizados por Márquez, Mendoza, González, Buntinx y Loera (2007) sobre la actividad fibrolítica producida por *Trametes* SP. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida, encontraron un valor máximo de actividad celulolítica entre los 14 y 19 días de fermentación en bagazo de caña de azúcar, periodo en el cual se cosecharon los hongos (p. 782).

Ghosh, Mukherjee y Nandi (1998) utilizaron biomasa lignocelulósica como sustrato para la fermentación en medio sólido, y encontraron que la máxima actividad lignocelulolítica en *Pleurotus* se produce entre los días 16 y 24 de fermentación y en el periodo de cosecha (p. 243); mientras que, Khalil, Hoque, Basunia, Alam y Khan (2011, p. 336) y Kurt y Buyukalaca (2010, p. 3167) realizaron un estudio para el cultivo de los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor-caju* en varios sustratos como bagazo de caña, paja de trigo y madera, en ambos casos, los autores reportan un pico máximo de generación de celulasas en el décimo día de fermentación en medio sólido previo a la cosecha.

Luna et al. (2007) realizaron un estudio de la acción de enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* sobre rastrojo de cebada, se encontró que el máximo pico de celulasas se presenta en el octavo día de fermentación con un posterior descenso de la actividad hasta alcanzar un segundo pico de actividad en el día 20 de fermentación y cosecha (p. 33).

Vaca (2011) realizó un estudio de los extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica del *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 en rastrojo de maíz,

en el cual indicó que la actividad celulolítica presenta sus máximos valores en los días de la cosecha, con el pico máximo el día de la primera cosecha (p. 54).

En los estudios citados anteriormente y en el de Chaparro et al. (2009) quienes estudiaron el aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera, se reporta una tendencia creciente de la actividad celulolítica conforme avanza el proceso de fermentación, hasta alcanzar un valor máximo en los días de cosecha o cercanos a ella y una posterior disminución de la actividad celulolítica (p. 241).

Los resultados expuestos en este trabajo presentan la misma tendencia creciente de actividad celulolítica conforme avanza el proceso de fermentación, hasta llegar a un máximo valor y una posterior disminución de la actividad enzimática, esto se observa en ambas cepas de *Pleurotus ostreatus*, con la única diferencia de que los días de máxima actividad enzimática varían.

Con base en los estudios citados anteriormente, se puede inferir que la generación de la actividad celulolítica no es arbitraria y está relacionada con el crecimiento y desarrollo del hongo; es decir, que se genera en períodos específicos durante la fermentación con una tendencia determinada, por lo que los tiempos de fermentación en los que se obtienen los máximos valores de actividad enzimática dependen principalmente del sustrato utilizado y de la cepa de hongo escogida.

3.3.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD LIGNINO PEROXIDÁSICA

En la Figura 3.4 se presentan los valores de actividad lignino peroxidásica, obtenidos para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202 durante las tres corridas de fermentación. En este caso, se observa un incremento de la actividad ligninoperoxidásica durante el crecimiento del micelio; para la primera corrida la actividad aumenta hasta el día 13 con un valor de $9,15 \times 10^{-3}$ UI y hasta el día 10 para la tercera corrida con una actividad de $1,08 \times 10^{-2}$ UI. Posteriormente, se

observa una disminución de la actividad hasta valores cercanos a cero, y un incremento mínimo en el día 41 de la primera y tercera corrida de $1,79 \times 10^{-3}$ UI y $3,57 \times 10^{-3}$ UI, respectivamente. Los valores de actividad lignino peroxidásica de las tres corridas de fermentación se encuentran dentro de los mismos rangos.

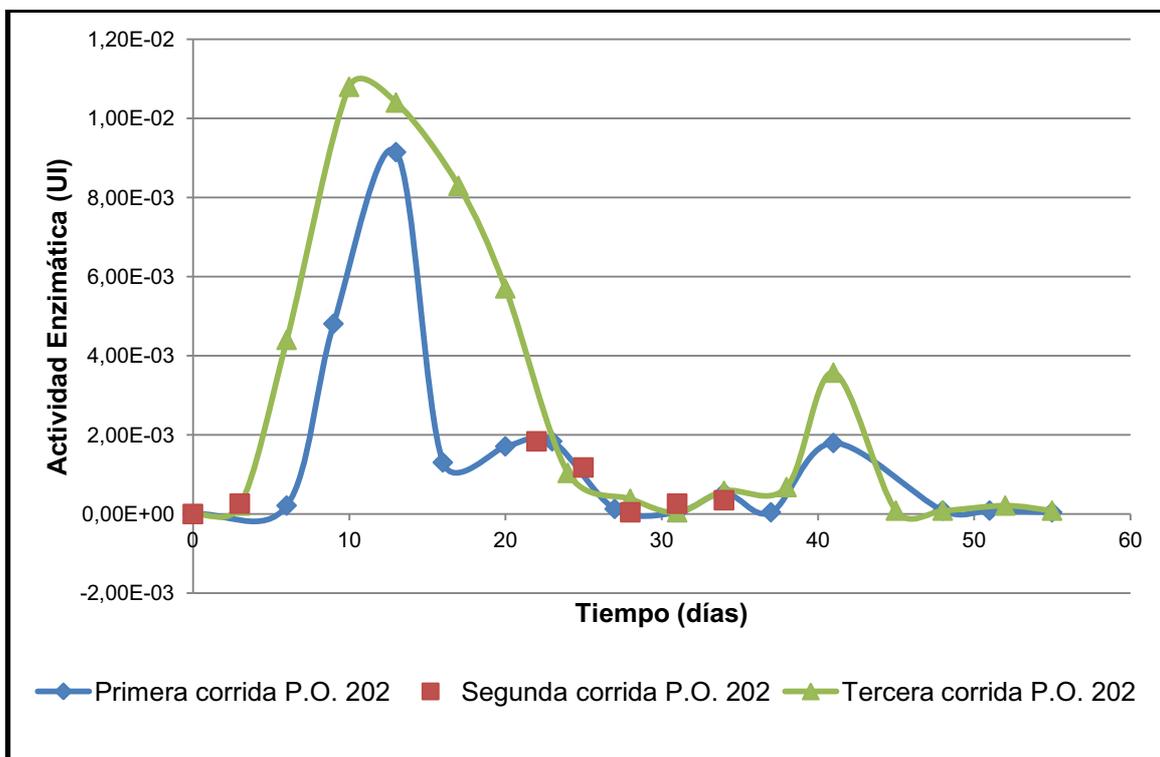


Figura 3.4. Actividad lignino peroxidasa durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 202

En la Figura 3.5 se indican los valores de actividad lignino peroxidásica, obtenidos para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896 durante las tres corridas de fermentación.

Los valores de la actividad ligninoperoxidásica aumentan durante el crecimiento del micelio; en la primera corrida el incremento se da hasta el día 16 y hasta el día 13 en la tercera corrida con valores de actividad de $2,95 \times 10^{-3}$ UI y $2,68 \times 10^{-3}$ UI, respectivamente.

Después se observa una disminución de la actividad hasta valores cercanos a cero, y un incremento en el día 41 de la primera corrida de $1,58 \times 10^{-3}$ UI y en el día 45 de la tercera corrida con un valor de $1,85 \times 10^{-3}$ UI. Los valores de actividad

lignino peroxidásica en las tres corridas de fermentación se encuentran dentro de los mismos rangos.

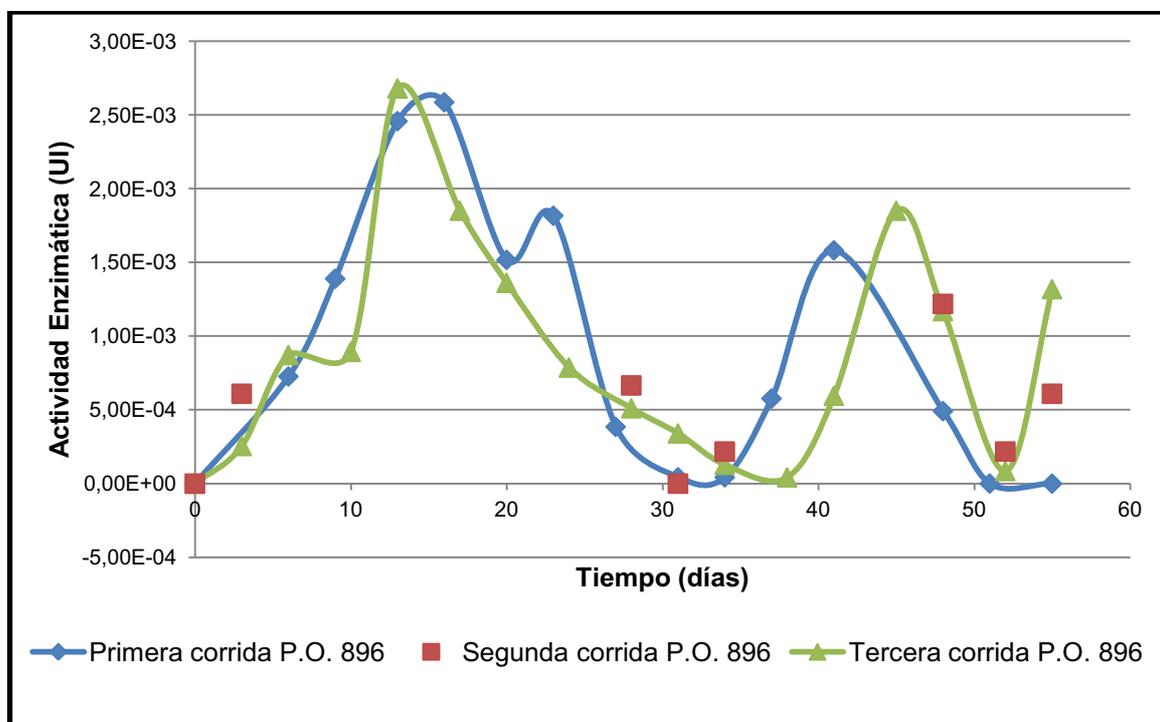


Figura 3.5. Actividad lignino peroxidasa durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 896

García y Torres (2003) estudiaron la producción de enzimas ligninolíticas por *Basidiomycetes* mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido, en su trabajo indicaron que muchos hongos de pudrición blanca, degradadores de lignina, llevan a cabo la degradación de dicho polímero con una baja expresión de la actividad ligninasa (p. 61); de la misma manera Eaton y Hale (1993) indicaron que el grado de actividad ligninolítica no es universal entre los hongos de pudrición blanca (p. 247).

Quintero, Feijoo y Lema (2006) en su estudio de producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos, encontraron un incremento de la actividad lignino peroxidasa hasta el octavo día de fermentación después del cual se da un descenso hasta valores cercanos a cero (p. 64). Vaca (2011) reportó para las cepas 404 y 2171 de *Pleurotus ostreatus*, valores de actividad cercanos e iguales a cero (p. 55).

Tanto para la cepa 202 y 896 de *Pleurotus ostreatus*, los picos de actividad lignino peroxidásica obtenidos no tienen relación con los días de cosecha de los hongos y los valores obtenidos son muy bajos con respecto a los encontrados en los ensayos de actividad celulolítica y manganeso peroxidásica.

3.3.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA

En la Figura 3.6 se presentan los valores de actividad manganeso peroxidásica, obtenidos para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202

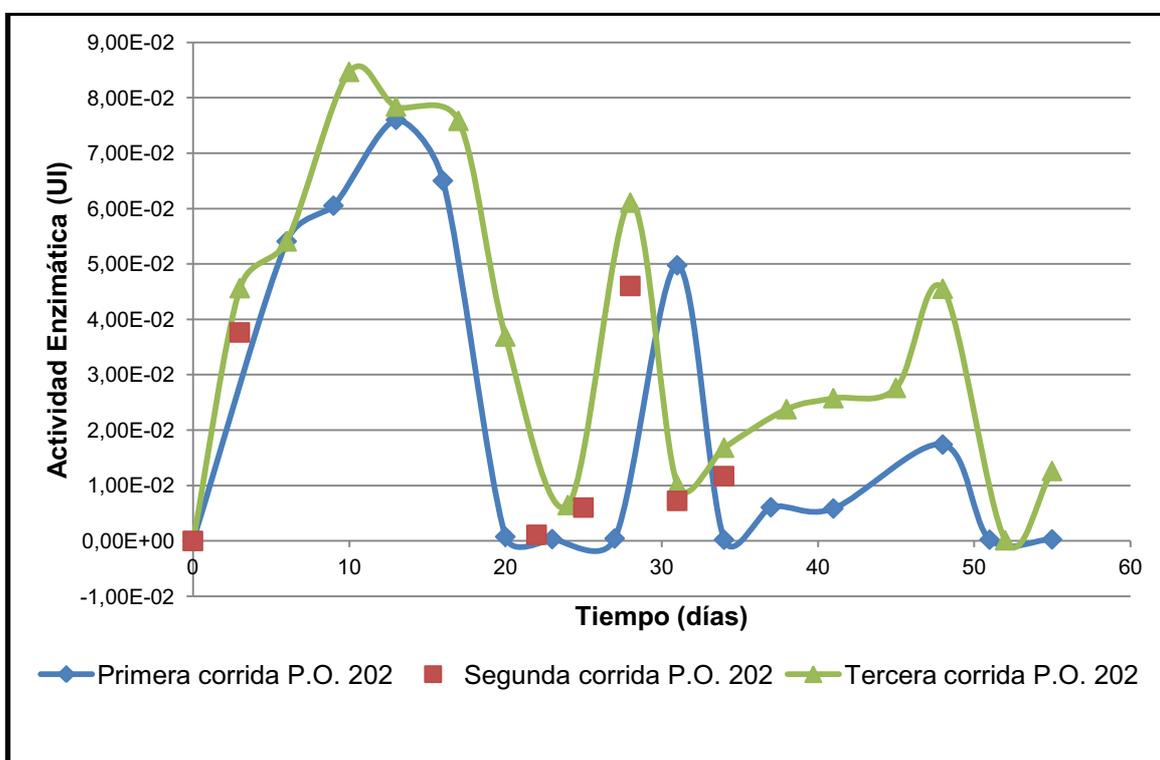


Figura 3.6. Actividad manganeso peroxidasa durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 202

Durante el periodo de crecimiento del micelio, la tendencia para la primera corrida es creciente hasta el día 13, en el cual se obtiene un máximo valor de actividad de $7,60 \times 10^{-2}$ UI; mientras que, para la tercera corrida se tiene una tendencia creciente de la actividad manganeso peroxidásica hasta el día 10 de fermentación, con un valor máximo de actividad de $8,47 \times 10^{-2}$ UI.

Se observa que los valores de actividad manganeso peroxidásica en las tres corridas de fermentación se encuentran dentro de los mismos rangos.

Los valores de la actividad enzimática se mantienen elevados hasta días posteriores al inicio del periodo de fructificación, es decir hasta el día 16 en la primera corrida, y hasta el día 20 en la tercera corrida; y una vez que se produce la primera cosecha de los hongos la actividad disminuye a valores cercanos a cero, así para la primera corrida en el día 27 se tiene un valor de $4,34 \times 10^{-4}$ UI, para la segunda corrida el valor es de $6,02 \times 10^{-3}$ UI en el día 25 y para la tercera corrida, en el día 24, el valor de actividad es de $6,47 \times 10^{-3}$ UI. Posteriormente, la actividad enzimática empieza a incrementarse hasta días antes de la segunda cosecha; así, en la primera corrida se obtiene un máximo de $4,98 \times 10^{-2}$ UI en el día 31 de fermentación, en el día 28 de la segunda corrida, se tiene un valor de $4,60 \times 10^{-2}$ UI, y en la tercera corrida la actividad es de $6,11 \times 10^{-2}$ UI en el día 28 de fermentación.

A continuación, los valores de actividad vuelven a disminuir debido a que se produce la segunda cosecha del hongo comestible, se alcanza un valor de actividad de $2,17 \times 10^{-4}$ UI en el día 34 de la primera corrida, para la segunda corrida se tiene un valor de actividad de $7,23 \times 10^{-3}$ UI en el día 31 y en la tercera corrida el valor que se alcanza, en el día 31, es de $1,01 \times 10^{-2}$ UI. Finalmente, se observa que los valores de actividad enzimática vuelven a incrementarse hasta días previos a la tercera cosecha.

En la Figura 3.7 se presentan los valores de actividad manganeso peroxidásica, obtenidos para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896 durante las tres corridas de fermentación.

Se observa una tendencia creciente de la actividad manganeso peroxidásica en la primera corrida hasta el día 6, con incrementos y decrementos de actividad hasta el día 23; sin embargo, estos altos y bajos valores se mantienen elevados con un mínimo de $6,50 \times 10^{-2}$ UI en el día 9 y un máximo valor de $7,75 \times 10^{-2}$ UI en el día 20. Para el caso de la tercera corrida la tendencia creciente de actividad se

mantiene hasta el día 17 con un máximo valor de $7,89 \times 10^{-2}$ UI. A partir de este punto se presenta una disminución de la actividad hasta alcanzar valores cercanos a cero en los días de la segunda cosecha, este fenómeno se presenta en las tres corridas de fermentación.

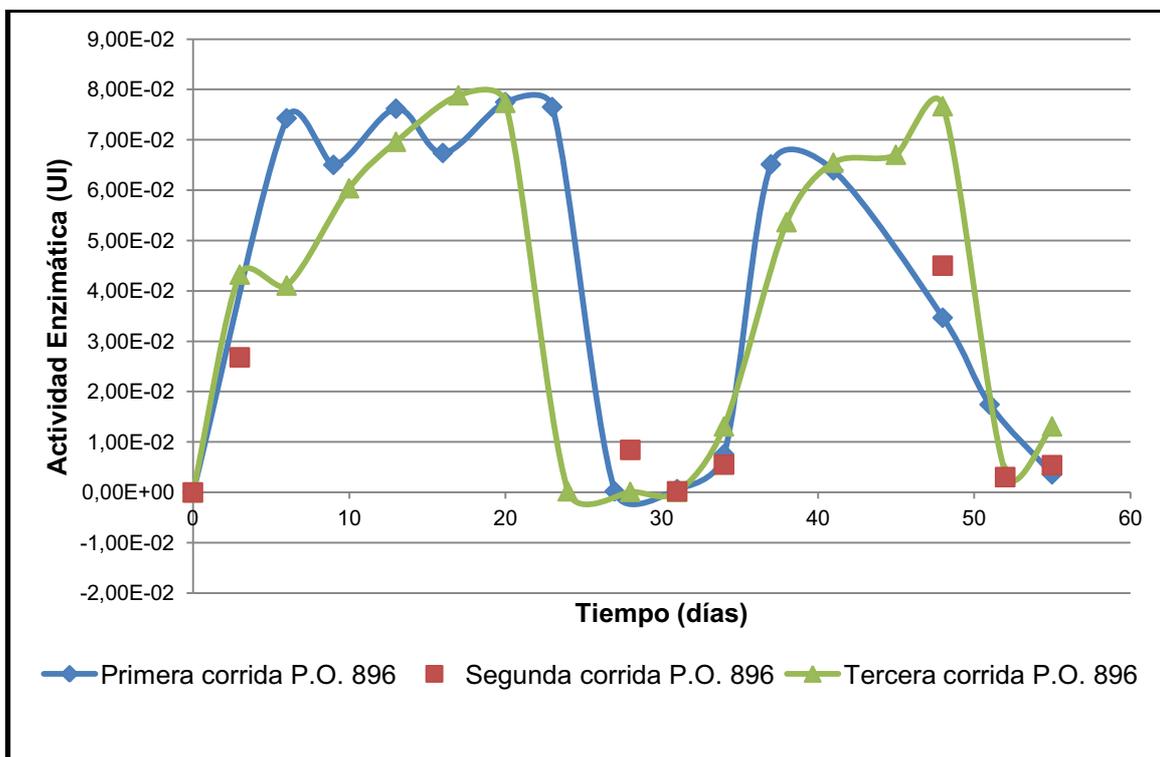


Figura 3.7. Actividad manganeso peroxidasa durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 896

Posteriormente, existe un incremento de actividad hasta el día 37 en la primera corrida, con un valor de $6,51 \times 10^{-2}$ UI; mientras que, en la tercera corrida se detecta un incremento hasta el día 48, con un máximo valor de $7,67 \times 10^{-2}$ UI.

Finalmente, cuando se produce la segunda cosecha, se tiene una disminución de la actividad; para la primera corrida en el día 55 se tiene un valor mínimo de $3,58 \times 10^{-3}$ UI, para la segunda corrida un valor de $3,04 \times 10^{-3}$ UI a los 52 días y en la tercera corrida un valor de $3,83 \times 10^{-3}$ UI a los 52 días.

Vaca (2011) indicó que la actividad manganeso peroxidásica aumenta y se mantiene en los máximos valores hasta los días de la cosecha, durante los que se

produce una disminución de la actividad casi hasta a cero. Posteriormente, se obtiene un nuevo incremento de la actividad 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. Además, señaló que la actividad manganeso peroxidásica para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 muestran un pico máximo de actividad en el día 12 de fermentación (p. 55).

El trabajo con extractos acuosos de paja de trigo y la producción de enzimas ligninolíticas de *Pleurotus ostreatus* realizado por Redin (2010) determinó que la actividad manganeso peroxidasa se mantiene creciente hasta alcanzar el máximo valor el día 19 y luego decae a cero al día 24 de fermentación (p. 58).

Sherief, Tanash y Temraz (2010) estudiaron las enzimas ligninolíticas durante el crecimiento y fructificación del hongo *Pleurotus ostreatus* en diferentes desechos sólidos, y determinaron que la actividad MnP se incrementa gradualmente durante el periodo de crecimiento del micelio hasta llegar a un valor máximo a los 40 días de fermentación, tanto en paja de arroz como en aserrín; y posteriormente, presenta un descenso en los días de cosecha del hongo comestible (p. 26).

Gupte, Gupte y Patel (2007) indicaron que se obtiene el máximo valor de actividad enzimática en el día 10 de fermentación en medio sólido con paja de trigo como sustrato para el hongo *Pleurotus ostreatus* (p. 612).

Entonces, se puede inferir, con base en los estudios anteriores y el presente estudio, que se obtienen tendencias similares de actividad manganeso peroxidásica en los extractos a partir de cualquier tipo de sustrato, ya que esta actividad tiene su principal aporte en la degradación de la lignina durante la etapa micelar. La única variación se observa en el tiempo de fermentación, el mismo que depende del tipo de hongo utilizado.

3.4. ANÁLISIS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN LAS TRES CORRIDAS DE FERMENTACIÓN

3.4.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA PRIMERA CORRIDA DE FERMENTACIÓN

En la Figura 3.8 se muestran los valores de las actividades enzimáticas obtenidas durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 202.

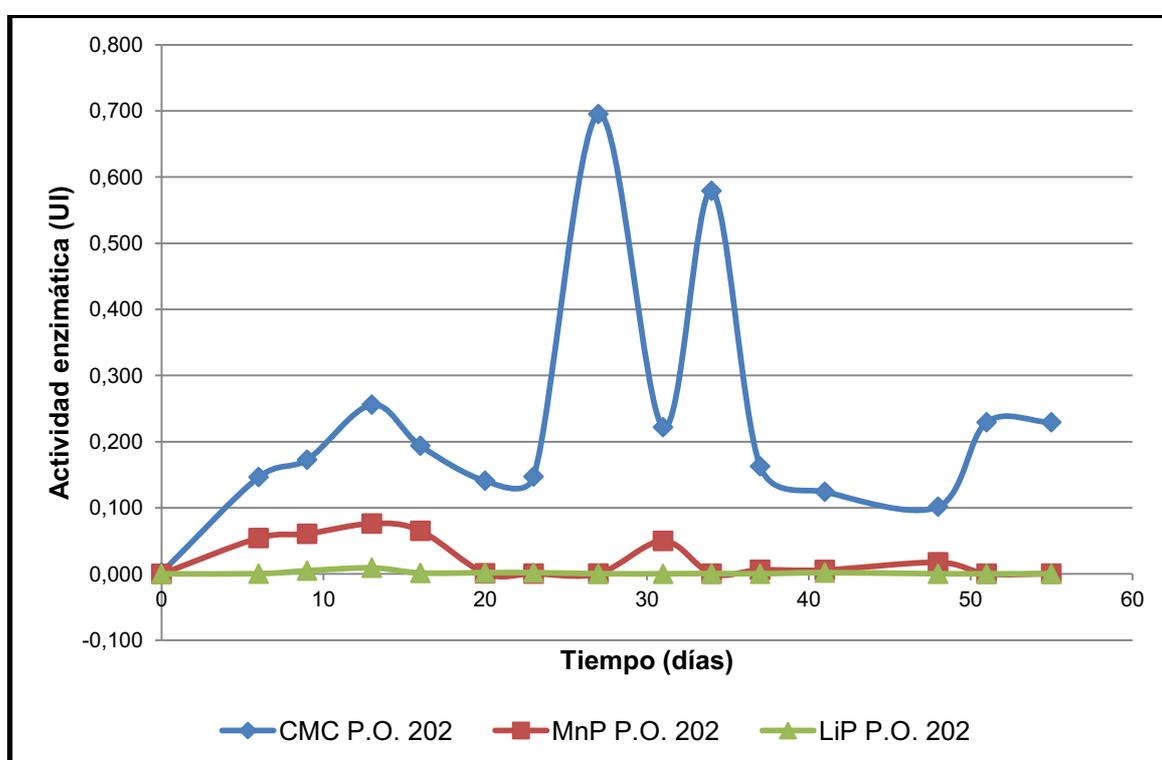


Figura 3.8. Actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202

Se observa claramente que la actividad celulolítica presenta valores más altos con respecto a la actividad manganeso peroxidásica. La actividad lignino peroxidásica es prácticamente nula a lo largo de la fermentación.

La corrida de fermentación inicia con valores de actividad enzimática igual a cero, conforme el micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 crece, la actividad

celulolítica y manganeso peroxidásica empieza a incrementar hasta el día 13, en donde alcanza valores de actividad de 0,256 UI y $7,60 \times 10^{-2}$ UI, respectivamente. La actividad manganeso peroxidásica se mantiene en valores de actividad similares desde el día 6 al 16; mientras que, la actividad celulolítica sí presenta variaciones en los valores de actividad.

Cuando inicia el periodo de fructificación con la aparición de los primordios, empieza un descenso en ambas actividades; sin embargo, la actividad celulolítica alcanza un mínimo valor de 0,141 UI en el día 20; mientras que, la actividad manganeso peroxidásica se mantiene en valores cercanos a cero desde el día 20 al 27 de fermentación.

El día 27 fue la primera cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* 202, es en este punto donde la actividad celulolítica alcanza su máximo valor igual a 0,695 UI; posteriormente, presenta una disminución de la actividad celulolítica hasta un valor de 0,222 UI en el día 31; en ese mismo día la actividad manganeso peroxidásica presenta un pico actividad de $4,98 \times 10^{-2}$ UI.

La segunda cosecha se produjo el día 34, para este punto, se observa que la actividad celulolítica alcanza un pico de 0,579 UI; y posteriormente, disminuye hasta un mínimo valor de 0,102 UI en el día 48 y a partir de aquí se mantiene en un valor de 0,229 UI que indica una tercera cosecha.

Por otro lado, la actividad manganeso peroxidásica presenta una disminución a partir del día 34 a valores cercanos a cero, valor que se mantiene hasta que se termina la corrida, con un leve incremento de actividad en el día 48 antes de la tercera cosecha.

En la Figura 3.9 se muestran los valores de las actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 896 en la primera corrida de fermentación.

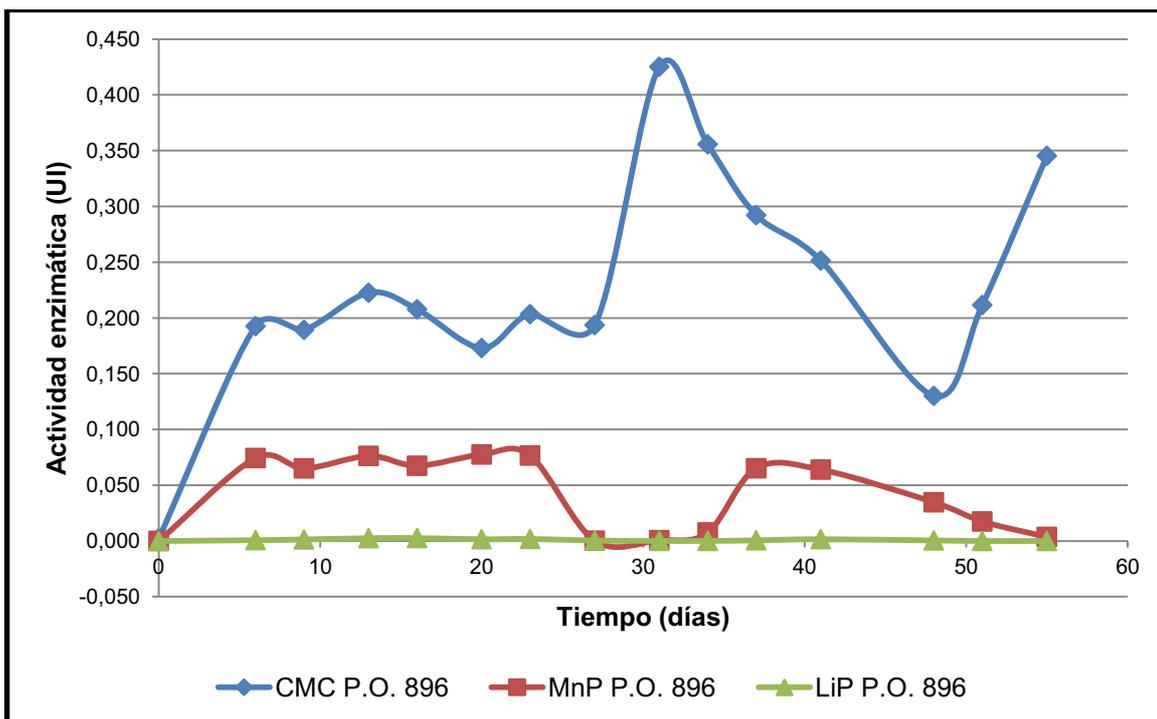


Figura 3.9. Actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896

Al igual que en la cepa 202, la actividad celulolítica presenta valores más altos con respecto a la actividad manganeso peroxidásica y no se observa la presencia de actividad lignino peroxidásica, ni variaciones apreciables durante el tiempo de fermentación.

Una vez que empieza el proceso de fermentación con el crecimiento del micelio, se observa que tanto la actividad celulolítica como manganeso peroxidásica se mantienen en valores oscilantes sobre cero hasta el día 23. Para el caso de la actividad celulolítica los valores de actividad se encuentran alrededor de 0,200 UI; mientras que, para la actividad manganeso peroxidásica los valores se encuentran próximos a 0,070 UI.

Del día 27 al 34 los valores de actividad manganeso peroxidásica son prácticamente nulos; mientras que, la actividad celulolítica presenta su máximo valor de 0,425 UI el día 31, que corresponde a la primera cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* 896.

En el día 37 la actividad manganeso peroxidásica incrementa su valor hasta $6,51 \times 10^{-2}$ UI y nuevamente disminuye hasta alcanzar el valor de cero en el día de la segunda cosecha. La actividad celulolítica también disminuye después de la primera cosecha, este fenómeno se da hasta el día 48 en el que se obtiene un mínimo de 0,130 UI; y después se incrementa hasta el día de la segunda cosecha con un máximo valor de 0,345 UI en el día 55.

Con los resultados analizados, se tiene que la cepa 202 presenta una actividad celulolítica máxima de 0,695 UI el día 27 y un valor mínimo de 0,102 UI en el día 48; mientras que, la cepa 896 tiene un valor máximo de 0,425 UI en el día 31 y un mínimo valor de 0,130 UI en el día 48 de fermentación. Para ambas cepas, los valores de actividad celulolítica siempre se mantienen sobre 0,100 UI; mientras que, las otras actividades se mantienen bajo este valor, e incluso llegan a valores de cero.

Para la actividad manganeso peroxidásica, se encontró un máximo valor de $7,60 \times 10^{-2}$ UI en el día 13 para la cepa 202 y para la cepa 896, $7,75 \times 10^{-2}$ UI en el día 20. El mínimo valor de actividad fue de $2,17 \times 10^{-4}$ UI para ambas cepas con la diferencia de que para la cepa 202 ocurrió en el día 34 y para la cepa 896 en el día 27 de fermentación.

Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202, los valores de actividad lignino peroxidásica varían entre $4,27 \times 10^{-5}$ UI hasta el máximo de $9,15 \times 10^{-3}$ UI en el día 13 de fermentación. Para la cepa 896 el valor mínimo de actividad enzimática fue 0,000 UI y el valor máximo obtenido fue de $2,59 \times 10^{-3}$ UI en el día 26 de fermentación.

3.4.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA SEGUNDA CORRIDA DE FERMENTACIÓN

Los valores determinados en esta corrida son dispersos y no presentan una tendencia definida; sin embargo, estos son similares a los obtenidos en los

acápites 3.3.1, 3.3.2 y 3.3.3 para los mismos días en que se realizaron los análisis.

En la Figura 3.10 se indican las actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 en la segunda corrida de fermentación.

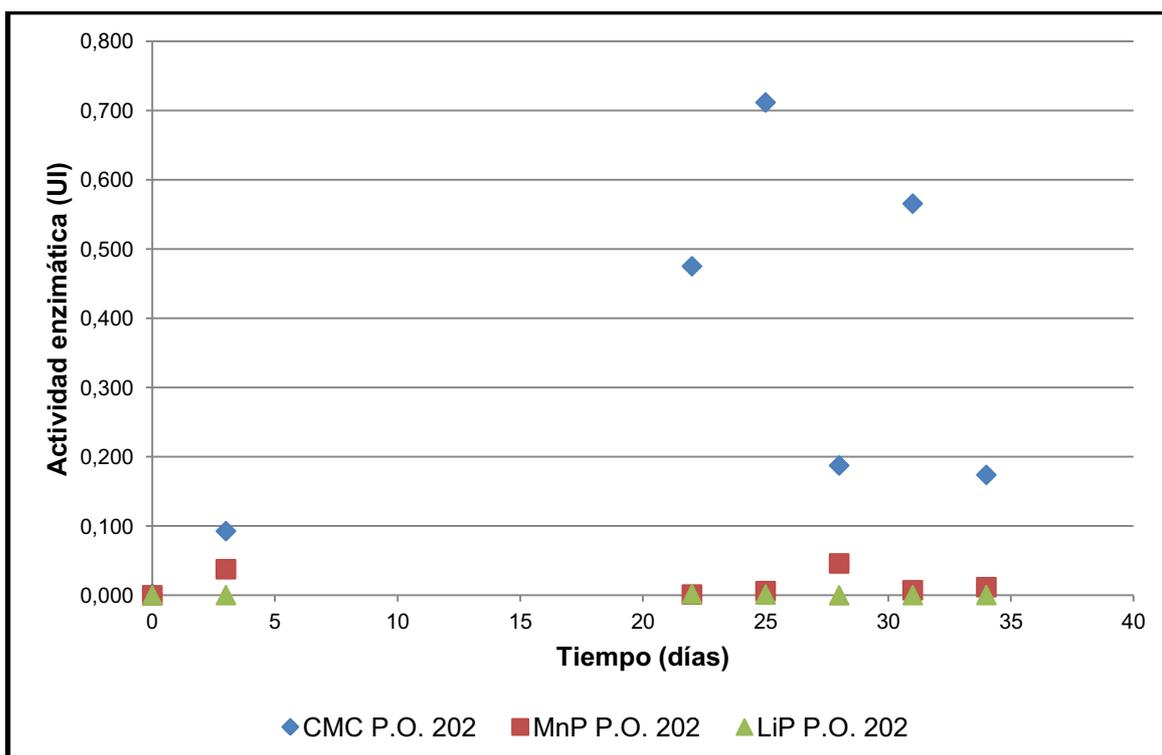


Figura 3.10. Actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202

Al igual que en la primera corrida, se observa que la actividad celulolítica presenta valores más altos con respecto a la actividad manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica, esta última se mantiene en valores cercanos o iguales a cero.

La actividad manganeso peroxidásica presenta dos valores diferentes de cero, en el tercer día de $3,76 \times 10^{-2}$ UI y en el día 28 de $4,60 \times 10^{-2}$ UI.

La actividad celulolítica siempre presenta valores sobre 0,100 UI, y alcanza su máximo valor de 0,712 UI en el día 25 que corresponde al día de la primera

cosecha en la segunda corrida. También se presenta un valor elevado de 0,565 UI en el día 31, en donde se produjo la segunda cosecha.

En la Figura 3.11 se indican las actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 896 en la segunda corrida.

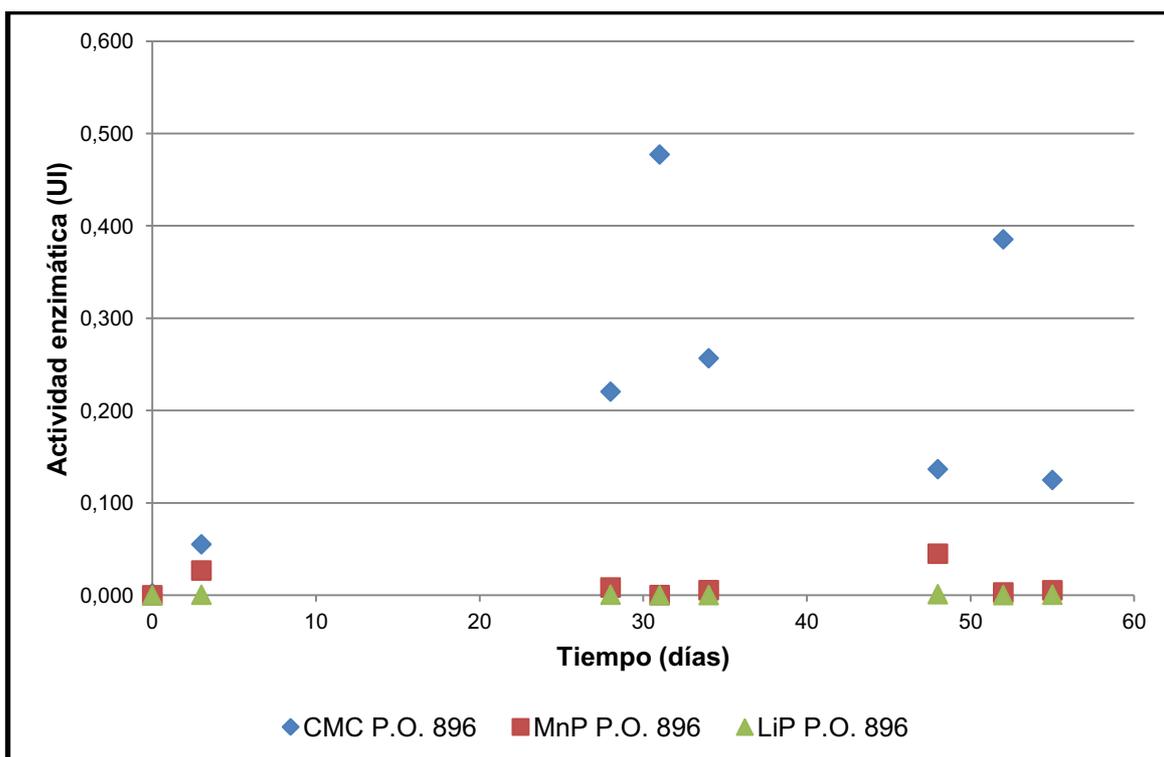


Figura 3.11. Actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896

Al igual que en la cepa 202, la actividad celulolítica presenta valores más altos con respecto a la actividad manganeso peroxidásica y la actividad lignino peroxidásica se mantiene en valores cercanos a cero a lo largo del periodo de fermentación.

La actividad celulolítica alcanza su máximo valor de 0,477 UI en el día 31 que corresponde al día de la primera cosecha en la segunda corrida. En la segunda cosecha, día 52, también se obtiene un valor elevado e igual a 0,385 UI.

La actividad manganeso peroxidásica se presenta en el tercer día con un valor de $2,68 \times 10^{-2}$ UI y en el día 48 de $4,50 \times 10^{-2}$ UI.

En resumen, la cepa 202 presenta una actividad celulolítica máxima de 0,712 UI el día 25 y un valor mínimo de 0,093 UI en el tercer día; mientras que, la cepa 896 tiene un valor máximo de 0,477 UI en el día 31 y un mínimo valor de 0,055 UI en el tercer día de fermentación. Tanto los valores de actividad celulolítica y los días en los que se obtienen dichos valores son similares con los encontrados en la primera corrida.

Para la actividad manganeso peroxidásica, en el día 28, se encontró como el máximo valor $4,60 \times 10^{-2}$ UI para la cepa 202; y para la cepa 896 el máximo fue de $4,50 \times 10^{-2}$ UI en el día 48. El mínimo valor de actividad fue de $1,10 \times 10^{-3}$ UI para la cepa 202 y de $2,21 \times 10^{-4}$ UI para la cepa 896, en los días 22 y 31, respectivamente.

Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202, los valores de actividad lignino peroxidásica varían entre $4,35 \times 10^{-5}$ UI hasta el máximo de $1,84 \times 10^{-3}$ UI en el día 22 de fermentación. Para la cepa 896 el valor mínimo de actividad enzimática es 0,000 UI y el valor máximo obtenido es de $1,22 \times 10^{-3}$ UI en el día 48 de fermentación.

Los máximos y mínimos valores de actividad manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica de la segunda corrida no coinciden con lo encontrado en la primera corrida, esto podría deberse a que el análisis en esta corrida solo se realizó en días cercanos a la cosecha y en días de cosecha por lo que no se evaluaron todos los puntos durante la fermentación; sin embargo, si se compara al mismo tiempo, en ambas corridas, los valores se encuentran dentro de los mismos rangos.

3.4.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA TERCERA CORRIDA DE FERMENTACIÓN

En la Figura 3.12 se muestran las actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 en la tercera corrida de fermentación.

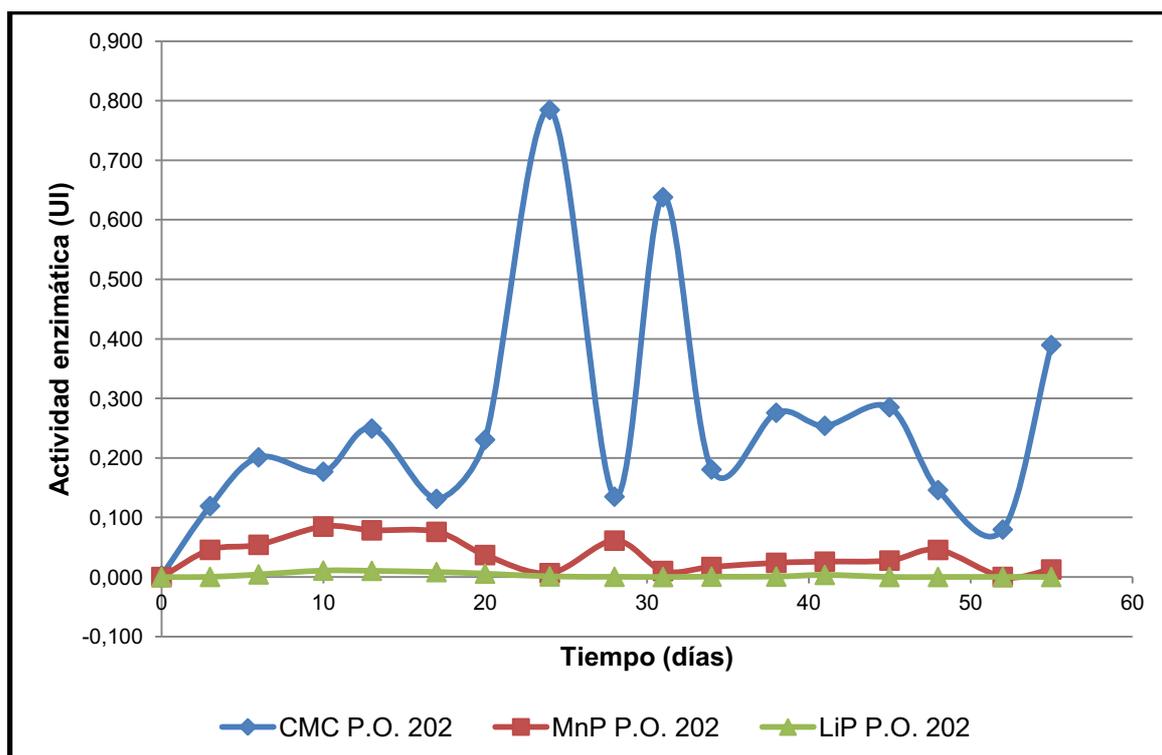


Figura 3.12. Actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202

Se observa que la actividad celulolítica es la que presenta mayores valores, seguida de la actividad manganeso peroxidásica; mientras que, la actividad lignino peroxidásica es prácticamente nula.

Durante el período de crecimiento del micelio, la actividad celulolítica presenta dos picos claramente definidos, con 0,785 UI el día 24 correspondiente a la primera cosecha. El segundo pico se observa en el día de la segunda cosecha, el día 31, con un valor de 0,638 UI.

A partir del día 38 la actividad celulolítica se mantiene alrededor del valor de 0,270 UI con un decremento en el día 52 y un nuevo pico de 0,390 UI en el día 55 que corresponde a la tercera cosecha.

La actividad manganeso peroxidásica presenta sus máximos valores entre los días 10 y 17, el valor máximo que alcanza en esta etapa es de $8,47 \times 10^{-2}$ UI en el decimo día, y se mantiene sobre valores de cero hasta el día 24, en donde alcanza un valor mínimo de $6,47 \times 10^{-3}$ UI, la actividad vuelve a incrementar en el día 28 a $6,11 \times 10^{-2}$ UI y en el día 48 a $4,55 \times 10^{-2}$ UI, el resto de días de la fermentación los valores de esta actividad permanecen próximos a cero.

En la Figura 3.13 se indican las actividades enzimáticas obtenidas durante el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 896.

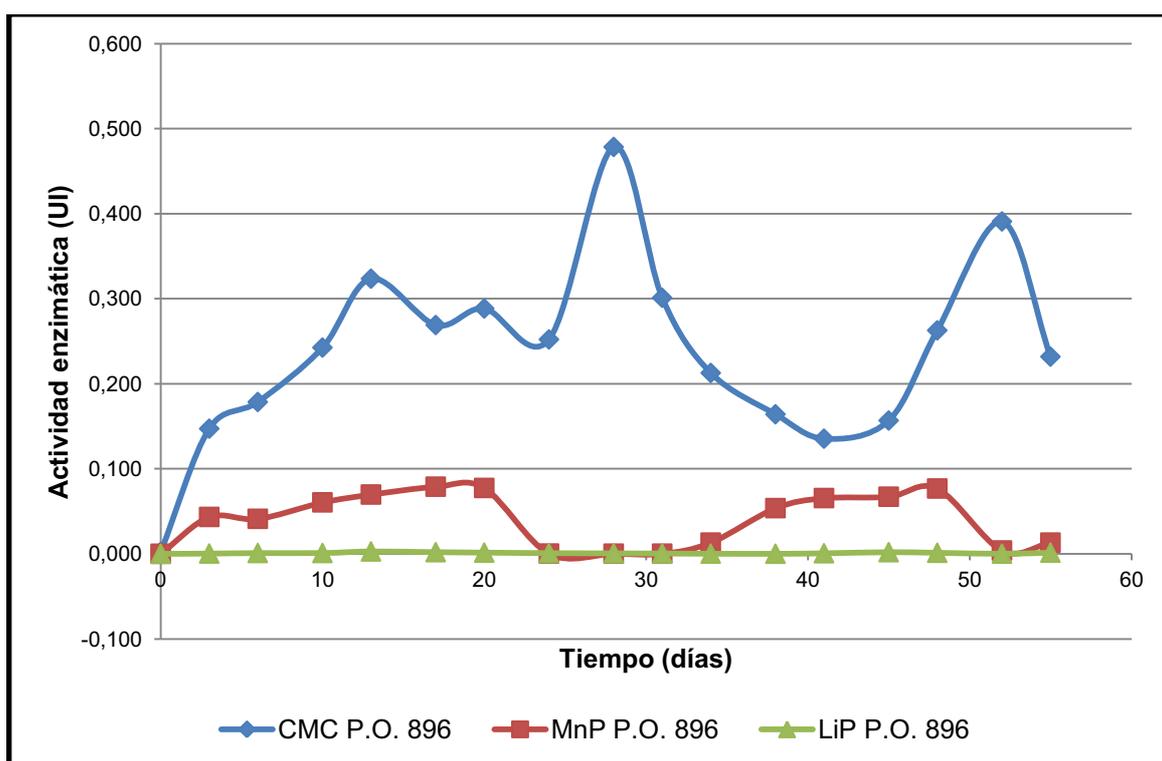


Figura 3.13. Actividades celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896

Una vez más, se comprueba que la máxima actividad enzimática es la actividad celulolítica, seguida de la actividad manganeso peroxidásica. Para este caso tampoco se muestra una actividad lignino peroxidásica considerable.

La actividad celulolítica presenta una tendencia creciente desde el inicio de la fermentación hasta el día 13, en el cual la actividad presenta un valor de 0,323 UI; a continuación, este valor disminuye hasta 0,252 UI en el día 24. Una vez que se da la primera cosecha en el día 28, se origina un pico máximo de actividad celulolítica con un valor de 0,478 UI; posteriormente, la actividad disminuye hasta un valor de 0,135 UI en el día 41. Finalmente, se incrementa en el día 52, que corresponde a la segunda cosecha del hongo, y alcanza un valor de 0,391 UI.

La actividad manganeso peroxidásica va en aumento hasta el día 20, y alcanza su máximo valor de $7,89 \times 10^{-2}$ UI en el día 17. Durante los días 24 y 31 no se presenta actividad. A partir del día 38 hasta el 48 se incrementa hasta alcanzar un valor de $7,67 \times 10^{-2}$ UI; finalmente, los valores vuelven a disminuir y la actividad tiende a cero para el final de la fermentación.

La actividad celulolítica máxima que se encontró para la cepa 202 tiene un valor de 0,785 UI el día 24 y un valor mínimo de 0,080 UI en el día 52; mientras que, la cepa 896 tiene un valor máximo de 0,478 UI en el día 28 y un mínimo valor de 0,135 UI en el día 41 de fermentación.

Para la actividad manganeso peroxidásica se encontró que el máximo valor alcanzado fue de $8,47 \times 10^{-2}$ UI en el día 10 para la cepa 202 y para la cepa 896 fue de $7,89 \times 10^{-2}$ UI en el día 17. El mínimo valor de actividad fue de $1,08 \times 10^{-4}$ UI, para ambas cepas, con la diferencia de que para la cepa 202 fue en el día 52 y para la cepa 896 en el día 28 de fermentación.

Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202 los valores de actividad lignino peroxidásica varían entre $4,25 \times 10^{-5}$ UI hasta el máximo de $1,08 \times 10^{-2}$ UI en el día 10 de fermentación. Para la cepa 896 el valor mínimo de actividad enzimática es $4,25 \times 10^{-5}$ UI y el valor máximo obtenido es de $2,68 \times 10^{-3}$ UI en el día 13 de

fermentación. Para ambas cepas, los valores de actividad celulolítica siempre se mantienen sobre 0,100 UI; mientras que, las otras actividades se mantienen debajo de este valor e incluso llegan a valores de cero.

Martínez et al. (2005) indicaron que el hongo *Pleurotus ostreatus* tiene dos mecanismos de degradación de los materiales lignocelulósicos, los cuales depende de la cepa que se utilice. En el primer mecanismo se degrada la lignina, celulosa y hemicelulosa al mismo tiempo; mientras que, en el segundo mecanismo se degrada primero la lignina y hemicelulosa presentes en el sustrato, para, posteriormente, permitir la degradación de la celulosa (p. 197).

Para este estudio se comprueba que ambas cepas utilizan el segundo mecanismo de degradación, es decir, en la primera etapa de crecimiento del hongo se degrada la lignina; y, una vez que esta barrera se retira, las enzimas pueden acceder al material celulósico para que el hongo pueda obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Es por eso, que en la primera y tercera corrida de fermentación se observa que la actividad manganeso peroxidásica, de las dos cepas, aumenta en el período de crecimiento del micelio y se mantiene en sus máximos valores hasta que se acerca al período de fructificación y cosecha. En este punto, la actividad manganeso peroxidásica disminuye y se acerca a cero; mientras que, la actividad celulolítica presenta sus máximos valores en los días de la cosecha; esto se debe a que en esta etapa el hongo requiere más nutrientes y fuentes de carbono para desarrollar el cuerpo fructífero.

Después de la primera cosecha, la actividad manganeso peroxidásica aumenta nuevamente y la actividad celulolítica disminuye, hasta la segunda cosecha, en donde se obtiene un segundo valor máximo en la actividad celulolítica; mientras que, la actividad manganeso peroxidásica disminuye hasta valores cercanos a cero; esto indica que nuevamente empieza el proceso de degradación de la lignina presente en el sustrato para degradar posteriormente el resto de materiales como la celulosa.

Es decir, que tanto para la cepa 202 y 896, los períodos de mayor generación de la actividad manganeso peroxidásica coinciden con los de menor generación de la actividad celulolítica, y viceversa. La diferencia entre las cepas radica en que la etapa de cosecha del *Pleurotus ostreatus* 896 se produce días después de la cosecha del hongo 202, por lo que los períodos de máxima y mínima generación de actividades enzimáticas se dan más tarde en la cepa 896.

Sánchez, Meneses, Miranda, Santellano y Alarcón (2001) realizaron un estudio sobre las enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* (IE8) en cultivo sólido sobre bagazo de caña de azúcar, en el que determinaron una actividad celulolítica de 0,550 UI en el séptimo día (p. 1).

En el presente estudio se obtuvo un valor mínimo de actividad celulolítica para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896 de 0,425 UI a los 31 días de fermentación y un máximo valor para la cepa 202 de 0,785 UI en el día 24, esto demuestra una vez más que los valores de actividad enzimática dependen del tipo de hongo utilizado y del sustrato en el que crece.

No se detectó actividad lignino peroxidásica en ninguna de las corridas de fermentación. En trabajos realizados por Vyas y Molitoris (1995, p. 3919), Guillén, Márquez y Sánchez (1998, p. 302) y Vaca (2011, p. 55) no se registraron actividad lignino peroxidásica para el hongo *Pleurotus ostreatus* en ninguna de las condiciones, en los tres trabajos citados la actividad lignino peroxidásica se midió por el método de Tien y Kirk (1984, p. 2280).

La ausencia de actividad lignino peroxidásica indicaría que existen otras enzimas responsables de la degradación de la lignina, como es el caso de la enzima Lacasa, la cual ha sido ampliamente estudiada en distintos hongos de pudrición blanca (Gómez et al., 2005, p. 38).

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

En las Tablas 3.8 y 3.9 se indican los tiempos y valores de máxima generación de actividad enzimática para las tres corridas de fermentación del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 y 896, respectivamente.

Tabla 3.8. Tiempos y valores de máxima generación enzimática para las tres corridas de fermentación del hongo *Pleurotus ostreatus* 202

PARÁMETRO	PRIMERA CORRIDA	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Máxima actividad celulolítica	0,695 UI	0,712 UI	0,785 UI
	27 días	25 días	24 días
Máxima actividad manganeso peroxidásica	$7,60 \times 10^{-2}$ UI	$4,60 \times 10^{-2}$ UI	$8,47 \times 10^{-2}$ UI
	13 días	28 días	10 días
Máxima actividad lignino peroxidásica	$9,15 \times 10^{-3}$ UI	$1,84 \times 10^{-3}$ UI	$1,08 \times 10^{-2}$ UI
	13 días	22 días	10 días

Tabla 3.9. Tiempos y valores de máxima generación enzimática para las tres corridas de fermentación del hongo *Pleurotus ostreatus* 896

PARÁMETRO	PRIMERA CORRIDA	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Máxima actividad celulolítica	0,425 UI	0,477 UI	0,478 UI
	31 días	31 días	28 días
Máxima actividad manganeso peroxidásica	$7,75 \times 10^{-2}$ UI	$4,50 \times 10^{-2}$ UI	$7,89 \times 10^{-2}$ UI
	20 días	48 días	17 días
Máxima actividad lignino peroxidásica	$2,59 \times 10^{-3}$ UI	$1,22 \times 10^{-3}$ UI	$2,68 \times 10^{-3}$ UI
	16 días	48 días	13 días

La primera cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 se da entre los 24 a 27 días posteriores a la siembra, en los cuales se obtuvieron los máximos valores de actividad celulolítica. Se encontró un valor máximo de 0,785 UI a los 24 días de la tercera corrida. Las diferencias entre los valores de actividad celulolítica de la

primera y segunda cosecha con respecto al máximo valor encontrado en la tercera cosecha apenas son del 11,46 % y 9,30 %, respectivamente.

La primera cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* 896 se da entre los 28 a 31 días posteriores a la siembra, en los cuales se obtuvieron los máximos valores de actividad celulolítica. Se encontró un valor máximo de 0,478 UI a los 28 días de la tercera corrida.

Las diferencias entre los valores de actividad celulolítica de la primera y segunda cosecha con respecto al máximo valor encontrado en la tercera cosecha apenas son del 11,09 % y 0,20 %, respectivamente.

Para la actividad manganeso peroxidásica, la cepa 202 presenta su mayor valor en la tercera corrida y es de $8,47 \times 10^{-2}$ UI, esto sucede en el día 10 que se encuentra dentro del periodo de desarrollo del micelio. El valor máximo difiere del valor de la primera corrida en un 10,27 %.

La cepa 896 también presenta su mayor valor de actividad manganeso peroxidásica en la tercera corrida y es de $7,89 \times 10^{-2}$ UI, esto sucede en el día 17 que se encuentra dentro del periodo de desarrollo del micelio. El valor máximo difiere del valor de la primera corrida en un 1,77 %.

Para la actividad lignino peroxidásica de la cepa 202 se observa que presenta un valor máximo de $1,08 \times 10^{-2}$ UI en la tercera corrida a los 10 días de fermentación, tiempo que se encuentra dentro del periodo establecido para el desarrollo del micelio, este valor difiere del obtenido en la primera cosecha en un 15.31 %.

En el caso de la cepa 896 se obtuvo un máximo valor de actividad lignino peroxidásica a los 13 días de fermentación con un valor de $2,68 \times 10^{-3}$ UI en la tercera corrida, valor que difiere en un 3,36 % con respecto al de la primera cosecha, de igual forma los valores máximo se obtienen en la etapa de desarrollo del micelio.

Los valores máximos de la actividad manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica obtenidos durante la segunda corrida de fermentación, para ambas cepas, no se pueden comparar con la primera y tercera corrida debido a que no se obtuvieron los datos en los días que presentan mayor actividad en las otras corridas, es por eso que los valores máximos presentan diferencias considerables tanto en los valores de actividad enzimática como en los días en los que se detectaron dichos valores.

Con lo expuesto anteriormente, se determinó que la cepa 202 produce una mayor actividad celulolítica y manganeso peroxidásica con respecto a la cepa 896; además, que los valores máximos de actividad enzimática obtenidos en cada corrida de fermentación difieren entre sí en porcentajes mínimos lo cual indica que son resultados reproducibles e indican repetibilidad.

Como se indicó en el subcapítulo 3.1, el contenido de celulosa del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación fue superior al contenido de lignina del mismo, por lo cual se esperaba una mayor generación de actividad celulolítica, en comparación con la actividad manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica que son específicas en la degradación de la lignina, esto se cumplió para ambas cepas de *Pleurotus ostreatus* utilizadas en este estudio, cuyos valores de actividad celulolítica superan a los valores máximos de actividad lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica alcanzados.

Vaca (2011) indicó que las cepas 2171 y 404 del hongo *Pleurotus ostreatus* generan mayor actividad celulolítica, en comparación con la actividad manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica; por lo que, en general el hongo *Pleurotus ostreatus* es esencialmente un hongo celulolítico (p. 53). Por lo tanto, la celulasa sería la enzima que puede tener una aplicación comercial ya que su máxima generación se da en el período de cosecha del hongo, de esta manera se obtiene tanto los cuerpos fructíferos como los extractos enzimáticos y aprovechar totalmente el proceso fermentativo.

3.6. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL RASTROJO DE MAÍZ DESPUÉS DE LA PRIMERA Y SEGUNDA COSECHA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* 202 Y 896.

En la Tabla 3.10 y 3.11 se indican los resultados obtenidos de la caracterización del rastrojo de maíz después de la primera y segunda cosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 de la tercera corrida de fermentación, en base seca y base húmeda, respectivamente.

Tabla 3.10. Resultados en base seca de la caracterización del rastrojo de maíz después de la primera y segunda cosecha

Muestra	Humedad (%)	Solubilidad en alcohol-benceno (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Otros (%)
Sin fermentar	7,94	11,30	41,52	20,24	26,93
1 ^{ra} Cosecha P.O. 202	8,32	7,24	33,57	16,45	42,74
2 ^{da} Cosecha P.O. 202	9,14	7,27	32,25	17,95	42,53
1 ^{ra} Cosecha P.O. 896	8,29	6,85	35,31	16,72	41,11
2 ^{da} Cosecha P.O. 896	8,71	6,24	33,17	18,62	41,97

Tabla 3.11. Resultados en base húmeda de la caracterización del rastrojo de maíz después de la primera y segunda cosecha

Muestra	Humedad (%)	Solubilidad alcohol-benceno (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Otros (%)
Sin fermentar	7,36	10,47	38,47	18,75	24,95
1 ^{ra} Cosecha P.O. 202	7,68	6,68	30,99	15,19	39,46
2 ^{da} Cosecha P.O. 202	8,37	6,66	29,55	16,45	38,97
1 ^{ra} Cosecha P.O. 896	7,66	6,33	32,61	15,44	37,96
2 ^{da} Cosecha P.O. 896	8,01	5,74	30,51	17,13	38,61

En la Tabla 3.12 se indican los porcentajes de variación de los componentes del rastrojo de maíz en la primera y segunda cosecha de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 con respecto al rastrojo de maíz sin fermentar.

Tabla 3.12. Porcentaje de variación de los componentes del rastrojo de maíz en base húmeda de la primera y segunda cosecha de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 con respecto al rastrojo de maíz sin fermentar

Muestra	Solubilidad alcohol-benceno (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Otros (% taninos, glúcidos, proteínas simples, pectinas, pentosanos, hexosanos, fragmentos de lignina, biomasa y cenizas)
1 ^{ra} Cosecha P.O. 202	-36,20	-19,44	-18,99	+ 58,16
2 ^{da} Cosecha P.O. 202	-36,39	-23,19	-12,27	+ 56,19
1 ^{ra} Cosecha P.O. 896	-39,54	-15,23	-17,65	+ 52,14
2 ^{da} Cosecha P.O. 896	-45,18	-20,69	-8,64	+ 54,75

Durante el desarrollo del proceso fermentativo, el hongo consume los nutrientes del sustrato; es por este motivo que mientras los porcentajes de celulosa, lignina y componentes solubles en benceno disminuyen, el porcentaje de los otros compuestos del rastrojo de maíz incrementan.

Se observa que los porcentajes de los componentes solubles en alcohol-benceno, tanto en la primera como en la segunda cosecha, se reducen con respecto al porcentaje inicial del sustrato sin fermentar. Si bien, la cepa 896 degradó un mayor porcentaje de estos compuestos, esta permaneció alrededor de 52 días en el proceso fermentativo para reducir un 45,18 %; mientras que, la cepa 202 en 31 días ya degradó estos componentes en un 36,20 %.

Si se analiza en la segunda cosecha de la cepa 202, día 31, y la primera cosecha de la cepa 896, día 28, se tiene que la cepa 202 degradó los compuestos solubles en benceno en un 36,39 %; mientras que, la cepa 896 al mismo tiempo degradó estos componentes en un 39,54 %. Por lo tanto, el hongo 202 consume más rápidamente los compuestos del sustrato, por lo que desarrolló los cuerpos fructíferos en menor tiempo que la cepa 896.

En cuanto al componente mayoritario y más importante del rastrojo de maíz que es la celulosa, se puede inferir que la cepa 202 redujo el contenido de este compuesto en la segunda cosecha de 38,47 % a 29,55 % y la cepa 896 de 38,47

% a 30,51 %; esto indica que las dos cepas son eficientes degradadoras de celulosa.

Sin embargo, la cepa 202 redujo el contenido de celulosa en un 23,19 %; mientras que, la cepa 896 logró una reducción de 20,69 %, ambos porcentajes analizados en la segunda cosecha, por lo que la cepa 202 presenta mayor afinidad a la degradación de la celulosa, lo cual se refleja en la cantidad de actividad celulolítica, indicada en el subcapítulo 3.5, de 0,785 UI; la cual supera al valor encontrado para la cepa 896 de 0,478 UI.

Al analizar en un mismo periodo de tiempo también se comprueba lo dicho anteriormente, ya que en la primera cosecha de la cepa 896, día 28, se registra una reducción de 15,23 %, este porcentaje es menor al que presenta la cepa 202 de 23,19 % al día 31, es decir, que la cepa 202 degrada más celulosa y se desarrolla más rápido que la cepa 896.

Con respecto a la lignina que forma parte del rastrojo de maíz, inicialmente se determinó un contenido de 18,75 %, el cual se redujo en la segunda cosecha a 16,45 % para la cepa 202 y a 17,13 % en la cepa 896, esto indica que la degradación de este componente es menor en relación a la celulosa, ya que la cepa 202 reduce el 12,27 % de lignina; mientras que, la cepa 896 alcanza a reducir un 8,64 %.

Todo lo descrito anteriormente indica, una vez más, que el hongo *Pleurotus ostreatus* tiene más afinidad con la celulosa que con la lignina, como se ha determinado en el estudio realizado por Vaca (2011) y en el presente trabajo a lo largo de los análisis de las diferentes actividades enzimáticas (p. 53).

Debido a la degradación de la celulosa en moléculas simples, de la lignina en fragmentos pequeños, presencia de residuos de biomasa fúngica y compuestos productos de la fermentación, el porcentaje de los otros componentes del rastrojo de maíz incrementa en más del 50 %.

En la Figura 3.14 se indica la variación de los porcentajes de celulosa y lignina con respecto al tiempo para las cepas 202 y 896 del hongo *Pleurotus ostreatus*.

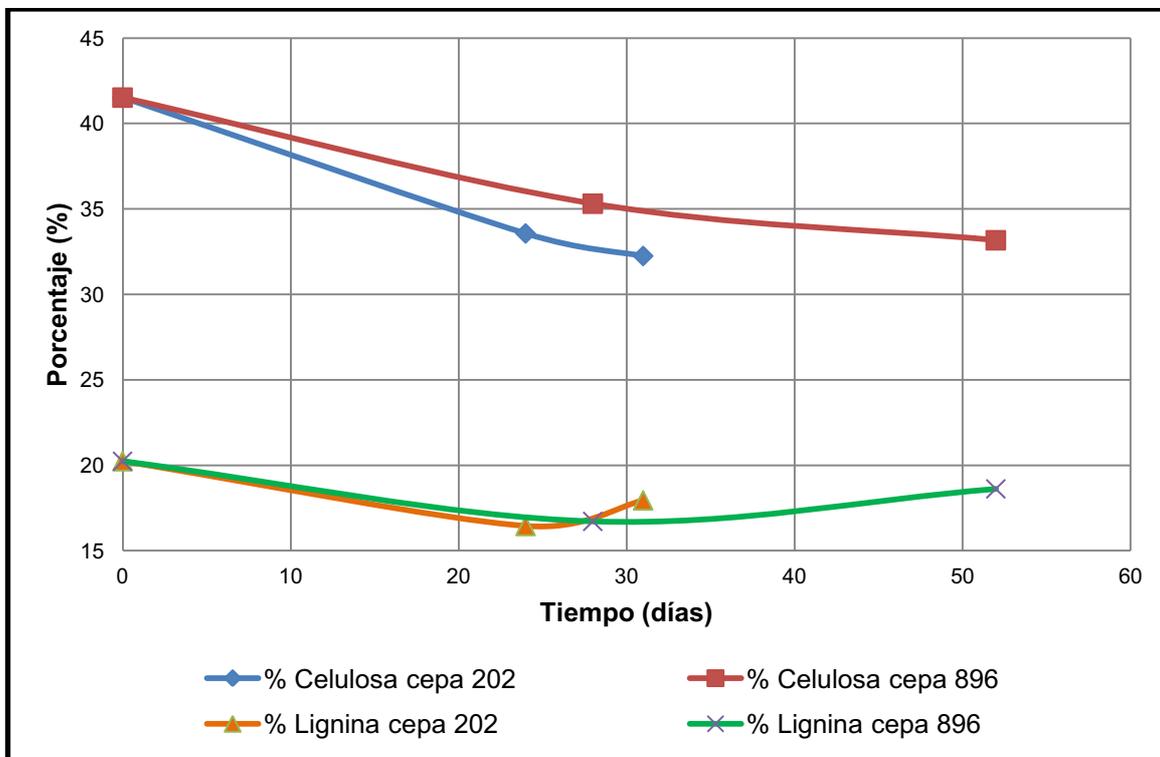


Figura 3.14. Variación de los porcentajes de celulosa y lignina con respecto al tiempo para las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Para el caso de la celulosa se evidencia, nuevamente, que la cepa 202 disminuye la cantidad de celulosa presente en el sustrato en menor tiempo que la cepa 896, y conforme avanza el tiempo se tiene una tendencia decreciente lo cual indica que los hongos seguirán con la degradación de este biopolímero hasta que cese su crecimiento. A diferencia de la tendencia decreciente que presenta la celulosa; la lignina no presenta una tendencia definida, esto se debe a que cada funda muestreada para el análisis tiene una velocidad de crecimiento diferente y de acuerdo al periodo en el que se encuentre presenta un mayor o menor porcentaje de degradación; sin embargo, es claro que el contenido de lignina disminuye en todos los casos con respecto al porcentaje inicial.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- El hongo *Pleurotus ostreatus* 202 se adaptó más fácilmente al medio de fermentación y a las condiciones ambientales de la cámara de cultivo, por lo que el crecimiento y desarrollo de los cuerpos fructíferos ocurrió en menor tiempo, con respecto a la cepa 896.
- En cada corrida de fermentación se observó que los períodos de crecimiento del micelio tienen, prácticamente, igual tiempo de duración, y que los días de cosecha son aproximadamente los mismos, con una diferencia de 2 a 3 días. Este comportamiento se presentó en ambas cepas.
- Tanto en la primera y segunda cosecha, la cepa 896 presentó un mayor rendimiento biológico en las tres corridas de fermentación con respecto a la cepa 202. En la primera cosecha el rendimiento biológico de la cepa 202 es menor en un 7,65 % y en la segunda cosecha en un 6,43 %, por lo que los rendimientos de ambas cepas son similares
- Se obtuvo hasta una tercera cosecha de la cepa 202, pero los hongos eran pequeños y de menor peso con respecto a las cosechas anteriores.
- Para ambas cepas, la mayor actividad enzimática fue la actividad celulolítica, seguida de la actividad manganeso peroxidásica y por último la lignino peroxidásica, por lo que estos hongos tienen más afinidad por la celulosa.
- La cepa 202 produjo una mayor actividad enzimática de los tres tipos de enzimas analizadas con respecto a la cepa 896, los valores más altos de actividad enzimática se obtuvieron en la tercera corrida de fermentación.

- La actividad manganeso peroxidásica aumentó en el período de crecimiento del micelio y se mantuvo en sus máximos valores hasta el período de fructificación y cosecha, en donde disminuyó a valores cercanos a cero; mientras que, la actividad celulolítica presentó sus máximos valores en los días de la cosecha.
- Para las dos cepas los períodos de mayor generación de la actividad manganeso peroxidásica coincidieron con los de menor generación de la actividad celulolítica, y viceversa.
- La actividad celulolítica se mantuvo durante todo el desarrollo del hongo ya que no se presentaron valores de cero en las tres corridas de fermentación para ambas cepas de *Pleurotus ostreatus*. Esto no sucede para las otras actividades enzimáticas analizadas en este estudio.
- La actividad celulolítica máxima alcanzada por la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202 se presentó en la tercera corrida, un pico máximo de absorbancia de 0,532, correspondiente a una actividad celulolítica de 0,785 UI, alcanzada en el día 24 de fermentación.
- La actividad celulolítica máxima alcanzada por la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896 se presentó en la tercera corrida, con un pico máximo de absorbancia de 0,324, correspondiente a una actividad celulolítica de 0,478 UI, alcanzada en el día 28 de fermentación.
- La máxima actividad manganeso peroxidásica alcanzada por la cepa de *Pleurotus ostreatus* 202 se presentó en la tercera corrida, con un pico máximo de absorbancia de 0,393, correspondiente a una actividad manganeso peroxidásica de $8,47 \times 10^{-2}$ UI, en el día 10 de fermentación.
- La máxima actividad manganeso peroxidásica alcanzada por la cepa de *Pleurotus ostreatus* 896 se presentó en la tercera corrida, con un pico

máximo de absorbancia de 0,366, correspondiente a una actividad manganeso peroxidásica de $7,89 \times 10^{-2}$ UI, en el día 17 de fermentación.

- Los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 son eficientes degradadores de celulosa y lignina, ya que en la segunda cosecha redujeron el contenido inicial de celulosa en el rastrojo de maíz de 38,47 % a 29,55 % y 30,51 %, respectivamente y para la lignina se encontró que el contenido inicial de 18,75 % se redujo a 16,45 % para la cepa 202 y a 17,13 % en la cepa 896.

4.2. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de la influencia que tiene el método de extracción en la actividad enzimática con las mismas cepas de este trabajo, estos métodos podrían ser filtración al vacío o mediante el uso de prensas.
- Determinar la influencia que tiene el tamaño del bioreactor (funda 7 × 10 pulgadas) en la cantidad de actividad enzimática generada durante el crecimiento de los hongos.
- Obtener a escala de laboratorio enzimas nativas, a partir de la purificación de los extractos enzimáticos obtenidos durante el proceso de fermentación, como alternativa a las enzimas comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abril, N., Bárcena, J., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Meléndez, F. y Túnez, I. (2006). *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Recuperado de http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf (Marzo, 2012)
2. Alonso, S., Calvo, J. y Rizo, A. (2011). *Técnicas ópticas de análisis*. Recuperado de http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/alim/CUR_SO0607/trabajos/trabajo%202.pdf (Marzo, 2012)
3. Álvarez, E. (2003). *Aprovechando los residuos madereros*. Recuperado de http://www.ecoportel.net/Temas_Especiales/Educacion_Ambiental/Aprovechando_los_Residuos_Madereros (Febrero, 2012)
4. ArgenBio. (2007). *¿Por qué biotecnología?*. Recuperado de <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php> (Febrero, 2012)
5. Béguin, P. y Lemaire, M. (1996). The Cellulosome – an excocellular multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Critical Reviews and Biochemical & Molecular Biology*, 31 (1), 201-236.
6. Brandan, N., Llanos, C., Barrios, B. y Ruiz, D. (2008). *Enzimas*. Recuperado de <http://www.med.unne.edu.ar/cátedras/bioquímica/pdf/enzimas.pdf> (Febrero, 2012)
7. Carabajal, P. y Flores, D. (2011). *Pared Celular, generalidades*. Recuperado de <http://www.agro.unlpam.edu.ar/> (Marzo, 2012)
8. Carranza, M., Luzuriaga, G. y Mejía, M. (2009). *Proyecto de producción y exportación de hongos ostra orgánicos al mercado europeo*.

Recuperado de <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/958/1/1845.pdf> (Febrero, 2012)

9. Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola: Actividad microbiana*. San Antonio de Jujuy, Argentina: Alberdi.
10. Carvajal, J. (2010). *La biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos: un caso de estudio en Ecuador*. Recuperado de <http://www.biologia.puce.edu.ec/natura.php?c=780> (Marzo, 2012)
11. Chang, S. (2008). *Training manual on mushroom cultivation technology*. Recuperado de <http://www.unapcaem.org/publication/TM-Mushroom.pdf> (Febrero, 2012)
12. Chaparro, D., Rosas, D. y Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26 (4), 238-243.
13. Chávez M., Díaz, J., Pérez, U. y Delfín, J. (1990). *Temas de enzimología*. (2da. ed.). La Habana, República de Cuba: La Habana
14. Cruz, L., Rivera, J., Cruz, M., Téllez, A. y Arana, A. (2010). *Determinación de la capacidad ligninolítica de hongos aislados de Huejutla Hidalgo*. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Hidalgo, México, Recuperado de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_IV/CIV-42.pdf (Febrero, 2012)
15. Daleth, G. (2006). *Fundamentos de espectrofotometría*. Recuperado de <http://www.wiziq.com/tutorial/43806-Espectrofotometria> (Febrero, 2012)
16. Dávila, G. y Vázquez, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*, 30 (1), 29-55.

17. Delfín, I. y Durán, C. (2003). Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por *Pleurotus*. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 19 (1), 37-45.
18. Eaton, R. y Hale, M. (1993). *Wood. Decay. Pests and Protection*. Londres, Inglaterra: Editorial Chapman Hall.
19. Fuentes, S. y Díaz, G. (2011). *Catalizadores. La piedra filosofal del siglo XX*. Recuperado de <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/059/htm/cataliza.htm> (Marzo, 2012)
20. García, A. y Torres G. (2003). Producción de enzimas ligninolíticas por *Basidiomycetes* mediante la técnica de fermentación en sustrato solido. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5 (1), 56-64.
21. 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), 126-140.
22. Gea, F. (2011). *Cultivo de hongos comestibles*. Recuperado de <http://www.amivall.com/documentos/ponencias/ponencia%20III%20jornadas.pdf> (Febrero, 2012)
23. Ghose, T. (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Applied Chemistry*, 59 (2), 257-268.
24. Ghosh, M., Mukherjee, R. y Nandi, B. (1998). Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acta Biotechnologica*, 18 (1), 243-254.
25. Gómez, C., Martínez, M., Nieto, D., Pedrosa, A., Rodríguez, R. y Rosas, J. (2005). Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-peroxidasa y Lacasa producidas

por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Universitas Scientiarum*, 10 (2), 37-45.

26. Guillén, G., Márquez, F. y Sánchez, J. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15 (1), 302-306.
27. 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 (1), 611-614.
28. 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 (1), 333-341.
29. 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 (1), 3164-3169.
30. 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 (1), 818-826
31. Luna, L., Loera, O., Montalvo, C., Mendoza, G., Megías, M., Martínez, A. y Meneses, M. (2007). Acción de enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* sobre rastrojo de cebada. *Interciencia*, 32 (11), 33-39.
32. Márquez, A., Mendoza, G., González, S., Buntinx, S. y Loera, O. (2007). Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* SP. EUM1,

Pleurotus ostreatus IE8 y *Aspergillus niger* AD96.4 en fermentación sólida. *Interciencia*, 32 (11), 780-785

33. Martínez, A., Speranza, M., Ruiz, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M., Gutiérrez, A. y Río, J. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8 (1), 195-204
34. Mateos, P. (2011). *Producción industrial de enzimas*. Recuperado de www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r43523.PDF (Abril, 2012)
35. MushWorld. (2005). *Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation*. Seoul, República de Corea: Seoul.
36. Oei, P. y Nieuwenhuijzen, B. (2005). *Small-scale mushroom cultivation: Oyster, shiitake and wood ear mushrooms*. Wageningen, Holanda: Digigrafe
37. Ovando, S. y Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21 (42), 113-122.
38. Papinutti, V., Dorio, L. y Forchiassin, 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 (1), 16-20
39. Pazos, D. (2004). *Estudio de la Influencia del tamaño del reactor en el crecimiento del hongo Pleurotus ostreatus 2191 sobre rastrojo de maíz*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

40. Pérez, A., Carvajal, C., Torres, M., Martín, M., Pina, D., Trujillo, R., Lorenzo, J., Natalucci, C. y Hernández, M. (2006). Actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia Bromeliaceae. *Rev. Cubana Plant Med*, 11 (2). 23-33.
41. Quintero, J., Feijoo, C. y Lema, J. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, 13 (2), 61-67.
42. Racker, E. (1958). International Unit of Enzyme Activity. *Science*, 128 (1), 19-25.
43. Redin, A. (2010). *Efecto de la inducción con extractos acuosos de paja de trigo sobre la producción de enzimas ligninolíticas en Pleurotus ostreatus*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Técnico Agrícola en industrias agrarias y alimentarias no publicado). Universidad Pública de Navarra, Navarra, España.
44. Riofrío, M. (2007). *Estudio de la generación de cuerpos fructíferos de hongos Pleurotus ostreatus en desechos lignocelulósicos de la producción del gusano de seda*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
45. Ríos, M., Hoyos, J. y Mosquera, S. (2010). Evaluación de los parámetros productivos de la semilla de *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8 (20), 86-94.
46. Rodríguez, S. y Torres, M. (1994). Análisis cuantitativo de componentes principales y secundarios en la corteza de diversas especies nativas y exóticas de la provincia de Llanquihue, X Región, Chile. *Bosque*, 15 (2), 45-48.

47. Rojas, R. y Cabanillas, J. (2008). Producción de alcohol de residuos lignocelulósicos-cascaras de arroz (*Oriza Sativa*). *Revista Virtual de REDESMA*, 7 (1), 1-13.
48. Romero, O., Huerta, M., Damián, M., Macías, A., Tapia, A., Parraguirre, J. y Juárez, J. (2010). Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hoja de plátano (*Musa paradisiaca* L., CV. Roatan) deshidratada, en relación con otros sustratos agrícolas. *Agronomía Costarricense*, 34 (1), 53-63.
49. Royse, D. (2003). *Cultivation of oyster mushrooms*. Recuperado de <http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/ul207.pdf> (Febrero, 2012)
50. Sánchez, A., Esqueda, M., Gaitán, R., Córdova, A. y Coronado, M. (2008). Uso del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología*, 28 (1), 17-24.
51. Sánchez, L. (2009). *Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma real*. (Tesis Doctoral de Ingeniería Química no publicada). Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
52. Sánchez, P., Meneses, M., Miranda, A., Santellano, E. y Alarcón, B. (2001). *Enzimas fibrolíticas de Pleurotus ostreatus (IE8) y Trametes sp. (EUM1) en cultivo sólido sobre bagazo de caña de azúcar*. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Chihuahua, México. Recuperado de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_VIII/CVIII-06.pdf (Abril, 2012)
53. Sapag, M. y Schmidt, H. (2011). *Generalidades sobre enzimas*. Recuperado de http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/parte02/01.html (Marzo, 2012)

54. Sherief, A., Tanash, A. y Temraz, A. (2010). Lignocellulolytic enzymes and substrate utilization during growth and fruiting of *Pleurotus ostreatus* on some solid wastes. *Journal of Environmental Science and Technology*, 3 (1), 18-34
55. Téllez, A., Maqueda, A., Mercado, Y., Anducho, M. y Arana, A. (2009). *Hongos de podredumbre blanca y biotecnología*. Recuperado de <http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/229/Articulos/Hongos/Hongos3.html> (Marzo, 2012)
56. Tien, M. y Kirk, K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanaerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81 (1), 2280-2284
57. Tinoco, R. y Vázquez, R. (2007). Biocatálisis ambiental. *Biotecnología*, 14 (3), 347-360.
58. Torres, M. (2003). Potencial de la microbiota nativa comestible y medicinal en el municipio de Quibdó. *Universitas Scientiarum*, 8 (2), 115-121.
59. Vaca, M. (2011). *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 de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
60. 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*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

61. Vyas, B. y Molitoris, H. (1995). Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization on remazol brilliant blue. *R. Appl. Envirom. Microbiol*, 61 (1), 3019-3927.

ANEXOS

ANEXO I
RESUMEN FOTOGRÁFICO DEL DESARROLLO DEL HONGO
COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus*

A continuación se indican las fotografías del crecimiento y desarrollo de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.

En las Figuras AI.1, AI.2 y AI.3 se observa el crecimiento del micelio hasta la obtención de la semilla de los hongos; en las Figuras AI.4, AI.5 y AI.6 se indica el crecimiento de los hongos en la cámara oscura hasta la aparición de los primordios. Finalmente, en las Figuras AI.7 y AI.8 se visualizan los cuerpos fructíferos de ambas cepas en la cámara clara oscura.

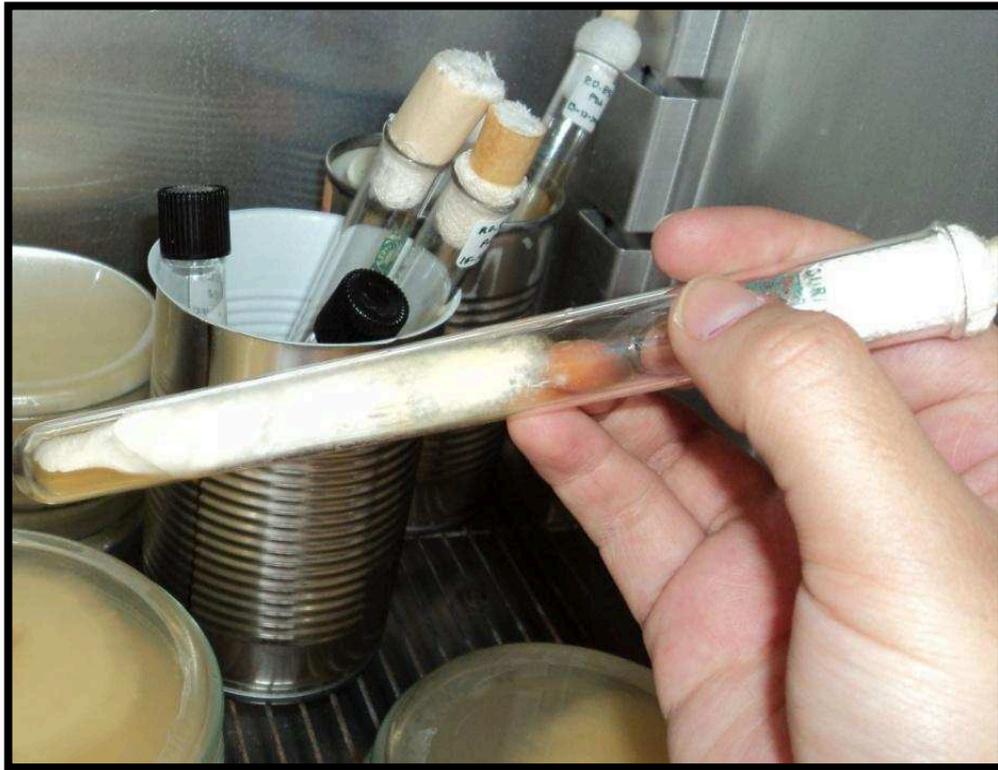


Figura AI.1. Desarrollo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en tubos de ensayo con malta agar

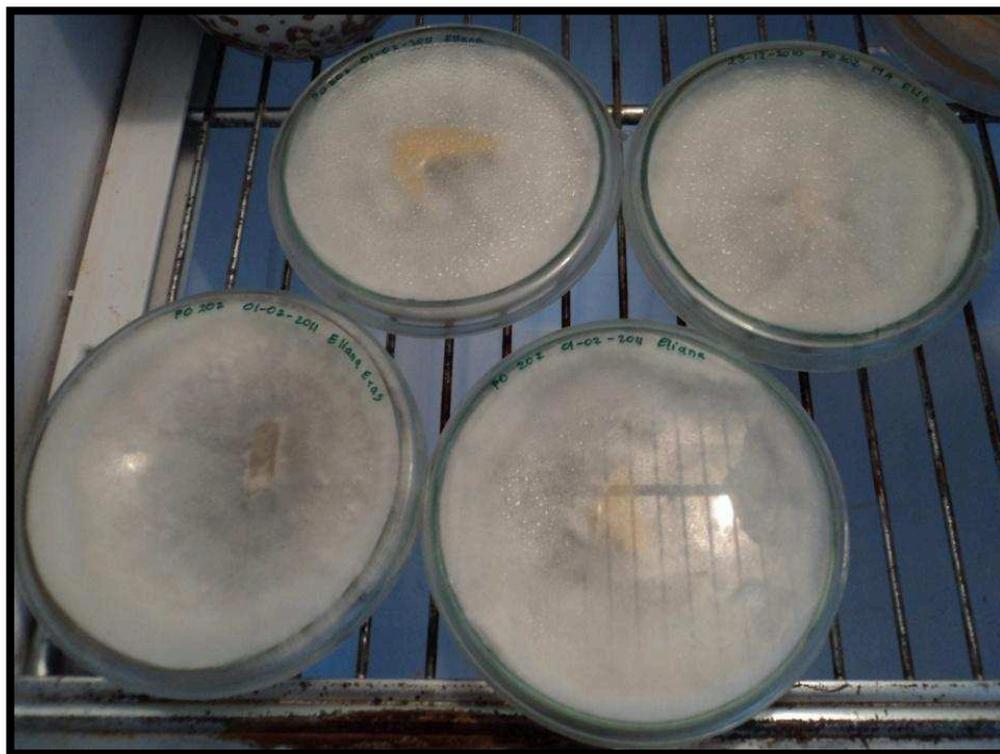


Figura AI.2. Crecimiento del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en cajas petri con malta agar



Figura AI.3. Crecimiento del micelio del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en granos de trigo



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



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



Figura AI.6. Aparición de los primordios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en la cámara oscura



Figura AI.7. Cuerpo fructífero del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cepa 202



Figura AI.8. Cuerpo fructífero del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cepa 896

ANEXO II

DETERMINACIÓN DE RESINAS, GRASAS Y CERAS

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

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 muestra 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 a través de los tamices # 40 y 60. La fracción recolectada del tamiz # 60 es la requerida para los análisis.

Posteriormente, se determina la humedad del análisis, para este procedimiento se pesa 2 g de la muestra molida y tamizada y se coloca en la estufa a 105°C

durante 12 h, se deja enfriar la muestra en el desecador y luego se pesa; el contenido de humedad se calcula con la ecuación [1]:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Masa}_{\text{inicial}} - \text{Masa}_{\text{final}}}{\text{Masa}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad [1]$$

Método

Para determinar tanto celulosa como lignina es necesario realizar la extracción de ceras, grasas y resinas, para lo cual inicialmente se pesa el balón del soxhlet, limpio y seco en una balanza analítica de hasta cuatro cifras decimales, también se pesa 5 g de muestra tamizada, esta muestra se coloca 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 equipo y se lo coloca 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. La temperatura del baño debe permanecer a 80°C por lo que se debe mantener el nivel del agua del baño en las $\frac{3}{4}$ partes y se debe verificar constantemente la adecuada circulación del agua por los refrigerantes.

Los capuchones se deben 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 dejarlo enfriar en el desecador. Finalmente, se pesa el balón y se halla el contenido de ceras, grasas y resinas con la ecuación [2]:

$$\% \text{ Grasas} = \frac{\text{Masa}_{\text{balón inicial}} - \text{Masa}_{\text{balón final}}}{\text{Masa}_{\text{thimble inicial}} \times (1 - H_{\text{análisis}})} \times 100 \quad [2]$$

ANEXO III

DETERMINACIÓN DE CELULOSA

Este método está descrito en la norma T 17 m-55 de las TAPPI. Esta determinación se realiza con base en que por clorinación de la muestra, se aísla la fracción de celulosa.

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, grasas y ceras como se indicó en el Anexo II. 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 durante 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 periodo 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 ecuación [3]:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{Masa crisol}_{\text{inicial}} - \text{Masa crisol}_{\text{final}}}{\text{Masa muestra}_{\text{inicial}} \times (1 - H^*)} \times 100 \quad [3]$$

H^* es igual a cero, ya que al sacar la muestra de la estufa y colocarla inmediatamente en el desecador, no se incrementa la humedad de la muestra.

ANEXO IV

DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Se utilizó la norma TAPPI T13 os-54, cuyo principio es 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 como se indicó en el Anexo II. Se coloca la muestra en un erlenmeyer de 125 mL y se agrega 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. La muestra se transfiere a un balón de 1 L 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 lapso de 4 h. Se deja enfriar y sedimentar la muestra contenida en el balón.

Posteriormente, 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. Finalmente, se coloca el crisol en el desecador hasta que se enfríe y se pesa. La cantidad de lignina se determina con la ecuación [4]:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Masa crisol}_{\text{inicial}} - \text{Masa crisol}_{\text{final}}}{\text{Masa muestra}_{\text{inicial}} \times (1 - H^*)} \times 100 \quad [4]$$

H^* es igual a cero, ya que al sacar la muestra de la estufa y colocarla inmediatamente en el desecador, no se incrementa la humedad de la muestra.

ANEXO V

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

Una vez concluida la esterilización del rastrojo de maíz, se separaron dos muestras, las cuales se pesaron en crisoles previamente tarados. Estas muestras se secaron en una estufa a 100 °C durante 24 h, y después se enfriaron en un desecador por 4 h. Una vez terminado el proceso de secado se registró el peso final de cada uno de los crisoles.

En las Tablas AV.1, AV.2 y A.V.3 se indican los pesos de las muestras de rastrojo de maíz en los crisoles, antes y después del proceso de secado, para las tres corridas de fermentación.

Tabla AV.1. Pesos de las muestras de rastrojo de maíz húmedo en la primera corrida

Crisol	Peso inicial (g)	Peso final (g)
1	22,93	16,07
2	22,84	15,92
Promedio	22,89	16,00

Tabla AV.2. Pesos de las muestras de rastrojo de maíz húmedo en la segunda corrida

Crisol	Peso inicial (g)	Peso final (g)
1	22,94	15,05
2	22,06	15,84
Promedio	22,50	15,45

Tabla AV.3. Pesos de las muestras de rastrojo de maíz húmedo en la tercera corrida

Crisol	Peso inicial (g)	Peso final (g)
1	24,31	17,00
2	23,45	16,54
Promedio	23,88	16,77

Se determinó la humedad del rastrojo utilizado para la siembra del hongo *Pleurotus ostreatus* con la ecuación [5]:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso}_{\text{inicial}} - \text{Peso}_{\text{final}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad [5]$$

En la Tabla AV.4 se indican los porcentajes de humedad del rastrojo de maíz esterilizado en cada corrida de fermentación.

Tabla AV.4. Porcentaje de humedad del rastrojo de maíz esterilizado

	Porcentaje de Humedad
Primera corrida	30,11 %
Segunda corrida	31,36 %
Tercera corrida	29,77 %

ANEXO VI

OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE D-GLUCOSA

Para elaborar la curva de calibración se preparó una solución de glucosa de 2 g/L y diluciones en solución amortiguadora de citrato 0,05 M pH 4,8 como se indica en la Tabla AVI.1.

Tabla AVI.1. Diluciones y concentraciones de los estándares utilizados

N°	DILUCIÓN DEL ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN (g/L)
1	Sin dilución	2,00
2	2 mL de solución de glucosa + 1 mL de tampón	1,33
3	2 mL de solución de glucosa + 2 mL de tampón	1,00
4	2 mL de solución de glucosa + 6 mL de tampón	0,50
5	2 mL de solución de glucosa + 8 mL de tampón	0,40
6	2 mL de solución de glucosa + 14 mL de tampón	0,25
7	2 mL de solución de glucosa + 18 mL de tampón	0,20
8	2 mL de solución de glucosa + 38 mL de tampón	0,10

Se realizó la misma metodología descrita en el subcapítulo 2.5 con la diferencia de que los estándares ocupan el lugar de los extractos enzimáticos.

Se empleó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa, al 2 %, en solución amortiguadora de citrato de sodio 0,05 M pH 4,8.

En tubos de ensayo de 50 mL se agregaron 0,5 mL de la solución de sustrato más 0,5 mL de estándar y se colocaron en un baño maría a 50 °C, por 30 min. Posteriormente, se adicionaron 3,0 mL de reactivo DNS y se pusieron los tubos en agua en ebullición por 5 min. Después de hervir, se enfriaron con agua para detener la reacción. Se agregaron 20 mL de agua destilada en cada tubo y se homogeneizaron las mezclas.

Se realizó el mismo procedimiento para el blanco de reactivos, pero se utilizaron 0,5 mL de solución amortiguadora de citrato de sodio 0,05 M pH 4,8 en lugar de 0,5 mL de estándar.

En un espectrofotómetro, se midió la absorbancia a 540 nm del blanco y la muestra de estándar. La curva de calibración se observa en la Figura AVI.1.

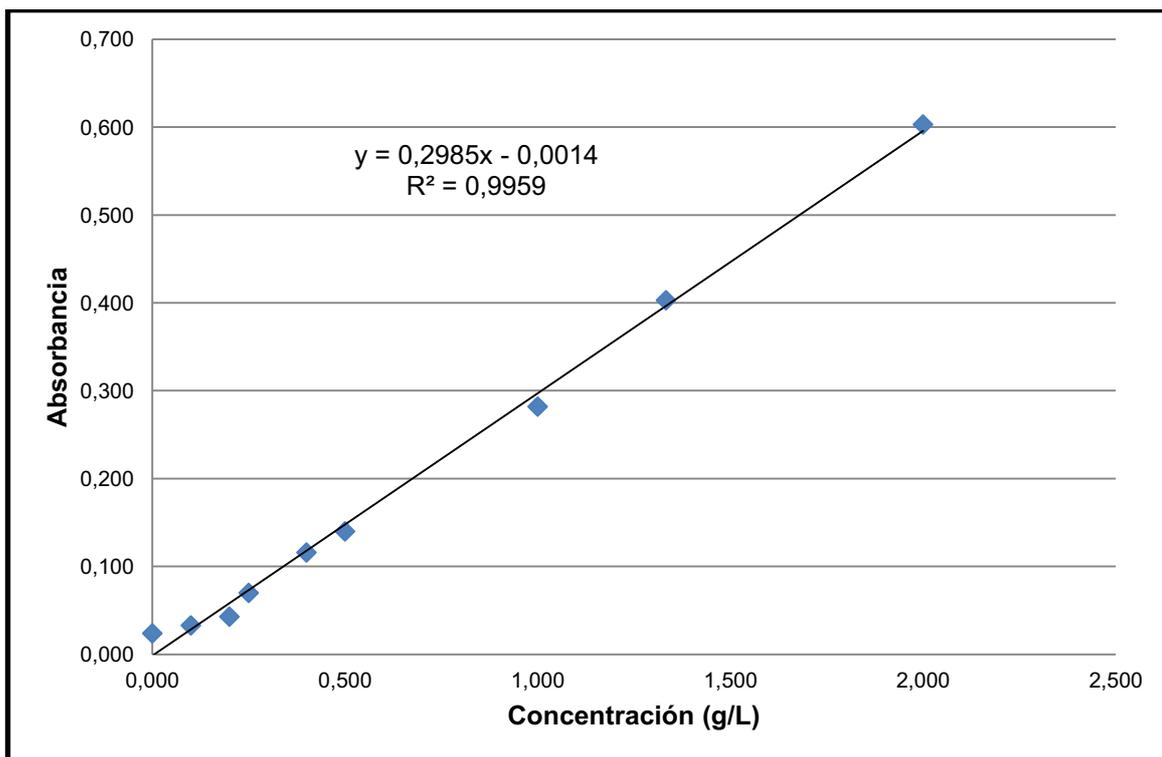


Figura AVI.1. Curva de Calibración de D-Glucosa

ANEXO VII

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

Para calcular la actividad celulolítica a partir de los datos de absorbancia obtenidos en las corridas experimentales, primero se requiere la ecuación [6] de la curva de calibración de la Figura AVI.1 es la siguiente:

$$A = 0,2985 C - 0,0014 \quad [6]$$

Donde:

A = Absorbancia medida a 540 nm

C= Concentración (mg glucosa / mL de extracto)

Con la ecuación [6] se determinó la concentración de las muestras del ensayo de actividad celulolítica, después se realizó la transformación de unidades respectivas, de tal manera que las unidades sean las correspondientes a las de actividad enzimática ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco).

Para ejemplificar la manera de realizar los cálculos se elige la absorbancia promedio de la cepa 202 en la primera corrida de fermentación cuyo valor al sexto día es de 0,098.

$$C = \frac{A + 0,0014}{0,2985} = \frac{0,098 + 0,0014}{0,2985} = \frac{0,333 \text{ mg glucosa}}{\text{mL extracto}}$$

$$\text{UI} = \frac{0,333 \text{ mg glucosa}}{\text{mL extracto}} * \frac{75 \text{ mL extracto}}{45 \text{ g rastrojo total}} * \frac{100 \text{ g rastrojo total}}{69,89 \text{ g rastrojo seco}}$$

$$* \frac{1 \text{ mmol glucosa}}{180 \text{ mg glucosa}} * \frac{1000 \mu\text{mol glucosa}}{1 \text{ mmol glucosa}} * \frac{1}{30 \text{ min de reacción}} = \frac{0,146 \mu\text{mol}}{\text{g rastrojo seco} * \text{min}}$$

Se debe tomar en cuenta que el rastrojo de cada corrida tiene su propio porcentaje de humedad como se indicó en la Tabla 3.2.

ANEXO VIII

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD LIGNINO PEROXIDÁSICA

La concentración de sustrato oxidado se determinó mediante la ley de Lambert-Beer con un $\epsilon = 9\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y la ecuación [7].

$$A = \epsilon * C * l \quad [7]$$

Donde:

A = Absorbancia medida a 310 nm

ϵ = Coeficiente de extinción molar

C= Concentración molar

l = Longitud de paso de luz a través de la muestra

Posteriormente, se realizó la transformación de unidades de tal manera que las unidades sean las correspondientes a las de actividad enzimática ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco). Para ejemplificar la manera de realizar los cálculos se elige la absorbancia promedio de la cepa 202 en la primera corrida de fermentación cuyo valor al sexto día es de 0,003. Se debe tomar en cuenta que el rastrojo de cada corrida tiene su propio porcentaje de humedad como se indicó en la Tabla 3.2.

$$C = \frac{A}{\epsilon * l} = \frac{0,003}{9\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} * 1\text{ cm}} = \frac{2,688\text{ E} - 07\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}}$$

$$\text{UI} = \frac{2,688\text{ E} - 07\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}} * \frac{1\text{ L mezcla de reacción}}{1000\text{ mL mezcla de reacción}} * \frac{75\text{ mL extracto}}{45\text{ g rastrojo total}}$$

$$* \frac{100\text{ g rastrojo total}}{69,89\text{ g rastrojo seco}} * \frac{10\text{ mL mezcla de reacción}}{0,5\text{ mL de extracto}} * \frac{10^6\ \mu\text{mol}}{1\text{ mol}}$$

$$* \frac{1}{60\text{ min de reacción}} = \frac{2,14\text{ E} - 04\ \mu\text{mol}}{\text{g rastrojo seco} * \text{min}}$$

ANEXO IX

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA

La concentración de sustrato oxidado se determinó mediante la ley de Lambert-Beer con un $\epsilon = 22\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y la ecuación [8].

$$A = \epsilon * C * l \quad [8]$$

Donde:

A = Absorbancia medida a 610 nm

ϵ = Coeficiente de extinción molar

C= Concentración molar

l = Longitud de paso de luz a través de la muestra

Posteriormente, se realizó la transformación de unidades de tal manera que las unidades sean las correspondientes a las de actividad enzimática ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco). Para ejemplificar la manera de realizar los cálculos se elige la absorbancia promedio de la cepa 202 en la primera corrida de fermentación cuyo valor al sexto día es de 0,250. Se debe tomar en cuenta que el rastrojo de cada corrida tiene su propio porcentaje de humedad como se indicó en la Tabla 3.2.

$$C = \frac{A}{\epsilon * l} = \frac{0,250}{22\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} * 1\text{ cm}} = \frac{1,136\text{ E} - 05\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}}$$

$$UI = \frac{1,136\text{ E} - 05\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}} * \frac{1\text{ L mezcla de reacción}}{1000\text{ mL mezcla de reacción}} * \frac{75\text{ mL extracto}}{45\text{ g rastrojo total}}$$

$$* \frac{100\text{ g rastrojo total}}{69,89\text{ g rastrojo seco}} * \frac{10\text{ mL mezcla de reacción}}{0,5\text{ mL de extracto}} * \frac{10^6\ \mu\text{mol}}{1\text{ mol}}$$

$$* \frac{1}{10\text{ min de reacción}} = \frac{5,41\text{ E} - 02\ \mu\text{mol}}{\text{g rastrojo seco} * \text{min}}$$

ANEXO X

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL RASTROJO DE MAÍZ

Se analizó el contenido de lignina y celulosa inicial del rastrojo de maíz (sin fermentar), estos análisis también se llevaron a cabo para el rastrojo de maíz fermentado después de la primera y segunda cosecha, tanto para la cepa 202 como para la cepa 896.

En la Figura AX.1 se indica el informe de resultados otorgado por el Laboratorio de Pulpa y Papel del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Biotecnología (DECAB) de la Escuela Politécnica Nacional, en donde se realizaron los análisis correspondientes según las normas indicadas en los Anexos II, III, IV.



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA (DECAB)

Campus Politécnico José Rubén Orellana Ricaurte
 Direc.: Pasaje Andalucía E12-A y Alfredo Mena Caamaño . Telf.: 2507 138
 Personas de Contacto: Dra. Irma Paredes. Telf. : 2507 144 ext. 2490 e-mail: irma.paredes@epn.edu.ec
 Tlga. Elisabeth Venegas . Telf.: 2507 144 ext. 2272 . e-mail: elisabeth.venegas@epn.edu.ec
 Quito- Ecuador



INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS O TRABAJO

ORDEN: DC-OTI 0003-2012

Cliente: PROYECTO TITULACIÓN, Eliana Eras

IDENTIFICACIÓN DE LA(S) MUESTRA(S) Y SERVICIO (S)

No. muestra	Muestra	Servicio/Analito /En todas las muestras)	Laboratorio
1	Rastrojo de maíz sin fermentar	Humedad para análisis; solubilidad alcohol- benceno; celulosa lignina	Pulpa y papel
1	Rastrojo de maíz fermentado 1 ^{ra} cosecha PO202		
1	Rastrojo de maíz fermentado 1 ^{ra} cosecha PO896		
1	Rastrojo de maíz fermentado 2 ^{ta} cosecha PO202		
1	Rastrojo de maíz fermentado 2 ^{ta} cosecha PO896		

RESULTADOS

Muestra	Humedad(%)	Solubilidad alcohol-benceno (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)
Rastrojo sin ferm	7,94	11,30	41,52	20,24
PO202 1 ^{ra} cosec	8,32	7,24	33,57	16,45
PO896 1 ^{ra} cosec	8,29	6,85	35,31	16,72
PO202 2 ^{ta} cosec	9,14	7,27	32,25	17,95
PO896 2 ^{ta} cosec	8,71	6,24	33,17	18,62

COMENTARIOS:

PROFESIONAL RESPONSABLE
 DEL ANÁLISIS O TRABAJO

Ing. Oswaldo Acuña G

Figura AX.1. Informe de los análisis realizados en el rastrojo de maíz por parte del Laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional

ANEXO XI

RENDIMIENTOS BIOLÓGICOS

En las Tablas AXI.1 y AXI.2 se indican los pesos de los hongos comestibles obtenidos durante la primera y segunda cosecha de la primera corrida, así como el peso promedio de los hongos con su respectiva desviación estándar.

Tabla AXI.1. Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la primera corrida

Cepa 202		Cepa 896	
N° Funda	Peso Hongo (g)	N° Funda	Peso Hongo (g)
1	60,72	1	59,87
2	39,46	2	55,63
3	47,85	3	42,54
4	72,56	4	40,81
5	70,85	5	48,98
6	54,87	6	68,96
7	52,12	7	63,92
8	55,63	8	49,84
9	43,27	9	25,91
10	34,19	10	49,63
11	42,98	11	49,88
12	44,55	12	59,91
13	61,94	13	40,06
14	75,41	14	42,09
15	73,49	15	49,90
16	55,87	16	69,87
17	44,31	17	56,88
18	23,59	18	40,55
19	30,84	19	50,99
20	33,98	20	50,70
21	59,64	21	74,52
22	46,84	22	75,86
23	53,87	$\bar{x} \pm \sigma$	53,06 ± 12,17
24	37,96		
$\bar{x} \pm \sigma$	50,70 ± 13,83		

Donde:

\bar{x} = Promedio del peso de los hongos

σ = Desviación estándar

Tabla AXI.2. Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la primera corrida

Cepa 202		Cepa 896	
N° Funda	Peso Hongo (g)	N° Funda	Peso Hongo (g)
1	15,10	1	30,24
2	30,50	2	28,97
3	22,34	3	19,46
4	22,98	4	30,87
5	19,87	5	27,93
6	21,61	6	21,23
7	22,93	7	21,98
8	30,82	8	29,86
9	19,54	9	29,71
10	19,89	10	19,87
11	30,55	11	21,64
12	23,10	12	18,71
13	31,98	13	19,22
14	21,39	14	22,67
15	23,87	15	28,54
16	23,96	16	21,13
17	19,84	17	19,80
18	20,63	$\bar{x} \pm \sigma$	24,23 ± 4,51
19	19,74		
20	30,55		
$\bar{x} \pm \sigma$	23,56 ± 4,65		

En las Tablas AXI.3 y AXI.4 se indican los pesos de los hongos comestibles obtenidos durante la primera y segunda cosecha de la segunda corrida, así como el peso promedio de los hongos con su respectiva desviación estándar.

Tabla AXI.3. Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la segunda corrida

Cepa 202		Cepa 896	
Nº Funda	Peso Hongo (g)	Nº Funda	Peso Hongo (g)
1	69,94	1	59,54
2	45,61	2	69,47
3	52,28	3	63,13
4	48,39	4	70,96
5	76,37	5	30,82
6	39,83	6	41,94
7	47,46	7	69,78
8	75,81	8	55,41
$\bar{x} \pm \sigma$	56,96 ± 13,73	9	58,62
		10	67,41
		$\bar{x} \pm \sigma$	58,71 ± 12,47

Tabla AXI.4. Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la segunda corrida.

Cepa 202		Cepa 896	
Nº Funda	Peso Hongo (g)	Nº Funda	Peso Hongo (g)
1	30,56	1	31,07
2	13,98	2	24,75
3	29,87	3	20,94
4	25,69	4	27,88
$\bar{x} \pm \sigma$	25,03 ± 6,64	$\bar{x} \pm \sigma$	26,16 ± 3,75

En las Tablas AXI.5 y AXI.6 se indican los pesos de los hongos comestibles obtenidos durante la primera y segunda cosecha de la tercera corrida, así como el peso promedio de los hongos con su respectiva desviación estándar.

Tabla AXI.5. Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la tercera corrida

Cepa 202		Cepa 896	
N° Funda	Peso Hongo (g)	N° Funda	Peso Hongo (g)
1	62,94	1	69,87
2	55,61	2	59,71
3	52,28	3	63,52
4	58,39	4	60,96
5	75,87	5	60,21
6	48,92	6	61,84
7	42,69	7	56,35
8	74,15	8	78,87
9	75,98	9	63,58
10	70,85	10	47,95
11	43,51	11	70,23
12	37,74	12	69,81
13	73,59	13	37,55
14	50,88	14	71,26
15	75,41	15	76,71
16	70,96	16	30,63
17	68,67	17	47,65
18	74,82	18	75,22
19	38,65	19	68,11
20	72,74	20	67,82
21	55,22	21	73,97
22	67,84	22	69,66
$\bar{x} \pm \sigma$	61,26 ± 12,96	$\bar{x} \pm \sigma$	62,79 ± 12,14

Tabla AXI.6. Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la tercera corrida

Cepa 202		Cepa 896	
Nº Funda	Peso Hongo (g)	Nº Funda	Peso Hongo (g)
1	25,56	1	26,84
2	23,98	2	31,56
3	19,45	3	25,74
4	18,72	4	25,61
5	30,93	5	24,53
6	31,54	6	21,78
7	24,90	7	25,87
8	22,81	8	22,56
9	32,39	9	30,51
10	27,81	10	29,65
11	30,29	$\bar{x} \pm \sigma$	26,47 ± 3,08
12	30,85		
13	24,51		
14	25,87		
15	27,12		
16	20,44		
17	19,33		
18	18,94		
$\bar{x} \pm \sigma$	25,30 ± 4,55		

ANEXO XII

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

En las Tablas AXII.1, AXII.2 y AXII.3 se indican los valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para las tres corridas de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.

Tabla AXII.1. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la primera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,087	0,108	0,158	0,100	0,098	0,129
9	0,136	0,095	0,138	0,115	0,115	0,127
13	0,152	0,191	0,135	0,163	0,172	0,149
16	0,183	0,077	0,142	0,136	0,130	0,139
20	0,034	0,154	0,112	0,119	0,094	0,116
23	0,109	0,087	0,134	0,138	0,098	0,136
27	0,467	0,470	0,125	0,134	0,469	0,129
31	0,168	0,129	0,308	0,264	0,149	0,286
34	0,411	0,369	0,227	0,251	0,390	0,239
37	0,107	0,110	0,183	0,209	0,109	0,196
41	0,075	0,090	0,147	0,190	0,083	0,169
48	0,056	0,079	0,097	0,076	0,067	0,087
51	0,172	0,136	0,121	0,162	0,154	0,142
55	0,078	0,229	0,228	0,236	0,154	0,232

Tabla AXII.2. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la segunda corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,046	0,074	0,033	0,038	0,060	0,035
22	0,307	0,321			0,314	
25	0,480	0,462			0,471	
28	0,102	0,144	0,148	0,142	0,123	0,145
31	0,392	0,356	0,377	0,254	0,374	0,316
34	0,116	0,112	0,175	0,163	0,114	0,169
48			0,088	0,091		0,089
52			0,104	0,405		0,255
55			0,074	0,089		0,082

Tabla AXII.3. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la tercera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,127	0,033	0,106	0,091	0,080	0,099
6	0,152	0,118	0,124	0,116	0,135	0,120
10	0,065	0,173	0,144	0,183	0,119	0,163
13	0,149	0,188	0,223	0,213	0,168	0,218
17	0,061	0,115	0,187	0,175	0,088	0,181
20	0,247	0,064	0,182	0,207	0,155	0,194
24	0,641	0,423	0,105	0,235	0,532	0,170
28	0,091	0,090	0,342	0,305	0,090	0,324
31	0,457	0,407	0,212	0,194	0,432	0,203
34	0,158	0,085	0,152	0,134	0,121	0,143
38	0,132	0,240	0,103	0,117	0,186	0,110
41	0,191	0,151	0,098	0,083	0,171	0,091
45	0,155	0,230	0,109	0,101	0,192	0,105
48	0,063	0,133	0,152	0,202	0,098	0,177
52	0,066	0,040	0,278	0,250	0,053	0,264
55	0,239	0,288	0,153	0,159	0,263	0,156

ANEXO XIII

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

En las Tablas AXIII.1, AXIII.2 y AXIII.3 se indican los valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para las tres corridas de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.

Tabla AXIII.1. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la primera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,003	0,002	0,010	0,007	0,003	0,009
9	0,055	0,058	0,033	0,000	0,056	0,016
13	0,108	0,106	0,015	0,043	0,107	0,029
16	0,014	0,017	0,002	0,059	0,015	0,030
20	0,018	0,022	0,021	0,015	0,020	0,018
23	0,024	0,019	0,016	0,027	0,022	0,021
27	0,007	-0,004	0,004	0,005	0,002	0,005
31	0,003	-0,002	0,001	0,000	0,001	0,001
34	-0,010	0,023	-0,001	0,002	0,006	0,001
37	0,002	-0,001	0,017	-0,003	0,001	0,007
41	0,017	0,025	0,017	0,020	0,021	0,019
48	0,003	-0,001	0,003	0,009	0,001	0,006
51	0,004	-0,002	0,000	0,000	0,001	0,000
55	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000

Tabla AXIII.2. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la segunda corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,001	0,005	0,009	0,005	0,003	0,007
22	0,020	0,022			0,021	
25	0,018	0,009			0,014	
28	0,001	0,000	0,012	0,003	0,001	0,008
31	0,000	0,006	0,000	0,000	0,003	0,000
34	0,008	0,000	0,013	-0,008	0,004	0,003
48			0,013	0,015		0,014
52			0,005	0,000		0,003
55			0,008	0,006		0,007

Tabla AXIII.3. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la tercera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	-0,001	0,006	0,002	0,004	0,003	0,003
6	0,090	0,014	0,013	0,008	0,052	0,010
10	0,124	0,130	0,014	0,007	0,127	0,011
13	0,114	0,131	0,060	0,003	0,122	0,032
17	0,015	0,180	0,030	0,013	0,097	0,022
20	0,063	0,071	0,016	0,016	0,067	0,016
24	0,010	0,014	0,012	0,007	0,012	0,009
28	0,001	0,008	0,004	0,008	0,005	0,006
31	0,003	-0,002	0,003	0,005	0,001	0,004
34	0,012	0,002	0,003	0,000	0,007	0,002
38	0,002	0,014	-0,001	0,002	0,008	0,001
41	0,062	0,023	0,005	0,009	0,042	0,007
45	-0,003	0,005	0,019	0,025	0,001	0,022
48	0,000	0,002	0,011	0,017	0,001	0,014
52	0,007	-0,002	0,000	0,002	0,003	0,001
55	0,001	0,001	0,006	0,025	0,001	0,016

ANEXO XIV

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

En las Tablas AXIV.1, AXIV.2 y AXIV.3 se indican los valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para las tres corridas de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.

Tabla AXIV.1. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la primera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,264	0,235	0,358	0,327	0,250	0,343
9	0,302	0,256	0,301	0,299	0,279	0,300
13	0,330	0,371	0,344	0,359	0,351	0,352
16	0,316	0,284	0,310	0,312	0,300	0,311
20	0,002	0,005	0,360	0,355	0,004	0,358
23	-0,016	0,019	0,365	0,341	0,002	0,353
27	0,001	0,003	0,007	-0,005	0,002	0,001
31	0,231	0,228	0,003	0,003	0,230	0,003
34	-0,002	0,004	0,032	0,038	0,001	0,035
37	0,025	0,031	0,305	0,296	0,028	0,301
41	0,029	0,025	0,278	0,312	0,027	0,295
48	0,129	0,032	0,167	0,153	0,080	0,160
51	0,000	0,002	0,159	0,003	0,001	0,081
55	0,127	-0,125	-0,020	0,053	0,001	0,017

Tabla AXIV.2. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la segunda corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,168	0,173	0,207	0,037	0,171	0,122
22	0,006	0,004			0,005	
25	0,023	0,032			0,027	
28	0,211	0,206	0,055	0,022	0,209	0,038
31	0,008	0,058	0,003	-0,001	0,033	0,001
34	0,057	0,049	0,023	0,027	0,053	0,025
48			0,211	0,197		0,204
52			0,024	0,004		0,014
55			0,020	0,029		0,025

Tabla AXIV.3. Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la tercera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	Absorbancia				Absorbancia promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,220	0,203	0,198	0,203	0,212	0,201
6	0,261	0,240	0,203	0,177	0,251	0,190
10	0,405	0,380	0,298	0,262	0,393	0,280
13	0,386	0,341	0,326	0,320	0,363	0,323
17	0,375	0,329	0,375	0,356	0,352	0,366
20	0,168	0,174	0,361	0,356	0,171	0,359
24	0,047	0,013	-0,003	0,005	0,030	0,001
28	0,296	0,270	0,000	0,001	0,283	0,001
31	0,049	0,045	0,002	-0,001	0,047	0,001
34	0,074	0,082	0,039	0,083	0,078	0,061
38	0,106	0,115	0,478	0,020	0,110	0,249
41	0,118	0,121	0,308	0,299	0,119	0,304
45	0,132	0,124	0,315	0,307	0,128	0,311
48	0,213	0,209	0,368	0,343	0,211	0,356
52	0,000	0,001	0,001	0,034	0,001	0,018
55	0,050	0,067	-0,003	0,124	0,059	0,061

ANEXO XV

RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

En las Tablas AXV.1, AXV.2 y AXV.3 se indican los valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para las tres corridas de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.

Tabla AXV.1. Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
6	0,131	0,162	0,236	0,149	0,146	0,193
9	0,203	0,142	0,206	0,172	0,173	0,189
13	0,227	0,285	0,202	0,243	0,256	0,223
16	0,272	0,115	0,212	0,203	0,194	0,208
20	0,052	0,230	0,168	0,178	0,141	0,173
23	0,163	0,131	0,200	0,206	0,147	0,203
27	0,693	0,697	0,187	0,200	0,695	0,194
31	0,251	0,193	0,458	0,393	0,222	0,425
34	0,610	0,548	0,338	0,373	0,579	0,356
37	0,160	0,165	0,273	0,311	0,163	0,292
41	0,113	0,135	0,220	0,283	0,124	0,251
48	0,085	0,118	0,146	0,115	0,102	0,130
51	0,256	0,203	0,181	0,242	0,229	0,211
55	0,117	0,341	0,339	0,351	0,229	0,345

Tabla AXV.2. Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
3	0,071	0,114	0,051	0,059	0,093	0,055
22	0,465	0,486			0,475	
25	0,725	0,698			0,712	
28	0,156	0,219	0,225	0,216	0,187	0,221
31	0,593	0,538	0,570	0,385	0,565	0,477
34	0,177	0,171	0,266	0,248	0,174	0,257
48			0,135	0,138		0,137
52			0,159	0,612		0,385
55			0,114	0,136		0,125

Tabla AXV.3. Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
3	0,188	0,050	0,158	0,136	0,119	0,147
6	0,226	0,176	0,184	0,172	0,201	0,178
10	0,098	0,256	0,213	0,271	0,177	0,242
13	0,221	0,278	0,331	0,316	0,249	0,323
17	0,091	0,171	0,278	0,260	0,131	0,269
20	0,366	0,096	0,270	0,307	0,231	0,288
24	0,945	0,624	0,157	0,347	0,785	0,252
28	0,135	0,135	0,506	0,451	0,135	0,478
31	0,675	0,601	0,314	0,288	0,638	0,301
34	0,235	0,126	0,226	0,199	0,181	0,213
38	0,196	0,355	0,154	0,174	0,276	0,164
41	0,284	0,224	0,146	0,124	0,254	0,135
45	0,230	0,341	0,163	0,151	0,285	0,157
48	0,095	0,197	0,226	0,299	0,146	0,263
52	0,099	0,060	0,411	0,370	0,080	0,391
55	0,353	0,426	0,227	0,236	0,390	0,232

ANEXO XVI

RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD LIGNINO PEROXIDÁSICA

En las Tablas AXVI.1, AXVI.2 y AXVI.3 se indican los valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para las tres corridas de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.

Tabla AXVI.1. Valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6	2,56E-04	1,71E-04	8,55E-04	5,98E-04	2,14E-04	7,27E-04
9	4,70E-03	4,91E-03	2,78E-03	9,49E-18	4,81E-03	1,39E-03
13	9,23E-03	9,06E-03	1,24E-03	3,68E-03	9,15E-03	2,46E-03
16	1,20E-03	1,41E-03	1,28E-04	5,04E-03	1,30E-03	2,59E-03
20	1,54E-03	1,88E-03	1,75E-03	1,28E-03	1,71E-03	1,52E-03
23	2,05E-03	1,62E-03	1,37E-03	2,27E-03	1,84E-03	1,82E-03
27	5,98E-04	-3,42E-04	3,42E-04	4,27E-04	1,28E-04	3,85E-04
31	2,56E-04	-1,71E-04	8,55E-05	0,00E+00	4,27E-05	4,27E-05
34	-8,55E-04	1,92E-03	-8,55E-05	1,71E-04	5,34E-04	4,27E-05
37	1,71E-04	-8,55E-05	1,41E-03	-2,56E-04	4,27E-05	5,77E-04
41	1,45E-03	2,14E-03	1,45E-03	1,71E-03	1,79E-03	1,58E-03
48	2,56E-04	-8,55E-05	2,56E-04	7,27E-04	8,55E-05	4,91E-04
51	3,42E-04	-1,71E-04	0,00E+00	0,00E+00	8,55E-05	0,00E+00
55	8,55E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,27E-05	0,00E+00

Tabla AXVI.2. Valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3	8,70E-05	4,35E-04	7,83E-04	4,35E-04	2,61E-04	6,09E-04
22	1,78E-03	1,90E-03			1,84E-03	
25	1,57E-03	7,83E-04			1,17E-03	
28	8,70E-05	0,00E+00	1,07E-03	2,61E-04	4,35E-05	6,66E-04
31	0,00E+00	5,22E-04	0,00E+00	0,00E+00	2,61E-04	0,00E+00
34	6,96E-04	0,00E+00	1,13E-03	-6,96E-04	3,48E-04	2,18E-04
48			1,13E-03	1,31E-03		1,22E-03
52			4,35E-04	0,00E+00		2,18E-04
55			6,96E-04	5,22E-04		6,09E-04

Tabla AXVI.3. Valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3	-8,51E-05	5,10E-04	1,70E-04	3,40E-04	2,13E-04	2,55E-04
6	7,66E-03	1,15E-03	1,06E-03	6,80E-04	4,40E-03	8,72E-04
10	1,05E-02	1,10E-02	1,15E-03	6,38E-04	1,08E-02	8,93E-04
13	9,65E-03	1,11E-02	5,10E-03	2,55E-04	1,04E-02	2,68E-03
17	1,28E-03	1,53E-02	2,59E-03	1,11E-03	8,29E-03	1,85E-03
20	5,38E-03	6,02E-03	1,38E-03	1,34E-03	5,70E-03	1,36E-03
24	8,76E-04	1,20E-03	9,78E-04	5,95E-04	1,04E-03	7,87E-04
28	8,51E-05	6,80E-04	3,40E-04	6,80E-04	3,83E-04	5,10E-04
31	2,55E-04	-1,70E-04	2,55E-04	4,25E-04	4,25E-05	3,40E-04
34	1,04E-03	1,30E-04	2,55E-04	0,00E+00	5,84E-04	1,28E-04
38	1,70E-04	1,19E-03	-8,51E-05	1,70E-04	6,80E-04	4,25E-05
41	5,23E-03	1,91E-03	4,25E-04	7,66E-04	3,57E-03	5,95E-04
45	-2,55E-04	4,25E-04	1,62E-03	2,08E-03	8,51E-05	1,85E-03
48	0,00E+00	1,70E-04	9,36E-04	1,40E-03	8,51E-05	1,17E-03
52	5,95E-04	-1,70E-04	0,00E+00	1,70E-04	2,13E-04	8,51E-05
55	8,51E-05	8,51E-05	5,10E-04	2,13E-03	8,51E-05	1,32E-03

ANEXO XVII

RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA

En las Tablas AXVII.1, AXVII.2 y AXVII.3 se indican los valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para las tres corridas de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896.

Tabla AXVII.1. Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
6	5,72E-02	5,09E-02	7,77E-02	7,09E-02	5,41E-02	7,43E-02
9	6,55E-02	5,56E-02	6,53E-02	6,48E-02	6,05E-02	6,50E-02
13	6,85E-02	6,16E-02	7,80E-02	7,70E-02	7,60E-02	7,62E-02
16	7,15E-02	8,05E-02	7,91E-02	7,40E-02	6,50E-02	6,74E-02
20	4,34E-04	1,08E-03	6,71E-02	6,77E-02	7,59E-04	7,75E-02
23	-3,36E-03	4,01E-03	7,46E-02	7,78E-02	3,25E-04	7,65E-02
27	2,17E-04	6,50E-04	1,52E-03	-1,08E-03	4,34E-04	2,17E-04
31	5,01E-02	4,94E-02	6,50E-04	6,50E-04	4,98E-02	6,50E-04
34	-4,34E-04	8,67E-04	6,94E-03	8,24E-03	2,17E-04	7,59E-03
37	5,42E-03	6,72E-03	6,61E-02	6,42E-02	6,07E-03	6,51E-02
41	6,29E-03	5,42E-03	6,03E-02	6,76E-02	5,85E-03	6,40E-02
48	2,79E-02	6,94E-03	3,62E-02	3,32E-02	1,74E-02	3,47E-02
51	0,00E+00	4,34E-04	3,44E-02	5,42E-04	2,17E-04	1,75E-02
55	2,75E-02	-2,70E-02	-4,23E-03	1,14E-02	2,71E-04	3,58E-03

Tabla AXVII.2. Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3	3,71E-02	3,82E-02	4,56E-02	8,06E-03	3,76E-02	2,68E-02
22	1,32E-03	8,83E-04			1,10E-03	
25	5,08E-03	6,95E-03			6,02E-03	
28	4,66E-02	4,55E-02	1,21E-02	4,75E-03	4,60E-02	8,44E-03
31	1,66E-03	1,28E-02	6,62E-04	-2,21E-04	7,23E-03	2,21E-04
34	1,26E-02	1,08E-02	5,08E-03	5,96E-03	1,17E-02	5,52E-03
48			4,66E-02	4,35E-02		4,50E-02
52			5,30E-03	7,73E-04		3,04E-03
55			4,41E-03	6,40E-03		5,41E-03

Tabla AXVII.3. Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896

Día	UI ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ rastrojo seco)				UI promedio	
	202-1	202-2	896-1	896-2	202	896
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
3	4,75E-02	4,38E-02	4,27E-02	4,38E-02	4,56E-02	4,33E-02
6	5,64E-02	5,18E-02	4,39E-02	3,83E-02	5,41E-02	4,11E-02
10	8,08E-02	7,09E-02	6,44E-02	5,64E-02	8,47E-02	6,04E-02
13	8,32E-02	7,36E-02	7,02E-02	6,90E-02	7,84E-02	6,96E-02
17	8,74E-02	8,20E-02	8,09E-02	7,68E-02	7,58E-02	7,89E-02
20	3,62E-02	3,76E-02	7,79E-02	7,68E-02	3,69E-02	7,74E-02
24	1,01E-02	2,80E-03	-6,47E-04	1,08E-03	6,47E-03	2,16E-04
28	6,39E-02	5,82E-02	0,00E+00	2,16E-04	6,11E-02	1,08E-04
31	1,06E-02	9,71E-03	4,31E-04	-2,16E-04	1,01E-02	1,08E-04
34	1,60E-02	1,77E-02	8,41E-03	1,78E-02	1,68E-02	1,31E-02
38	2,29E-02	2,47E-02	1,03E-01	4,21E-03	2,38E-02	5,37E-02
41	2,55E-02	2,61E-02	6,64E-02	6,45E-02	2,58E-02	6,55E-02
45	2,85E-02	2,68E-02	6,79E-02	6,62E-02	2,76E-02	6,71E-02
48	4,60E-02	4,51E-02	7,94E-02	7,40E-02	4,55E-02	7,67E-02
52	0,00E+00	2,16E-04	3,24E-04	7,34E-03	1,08E-04	3,83E-03
55	1,08E-02	1,45E-02	-5,39E-04	2,68E-02	1,26E-02	1,31E-02