

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD
LIGNINOLÍTICA Y CELULOLÍTICA A PARTIR DEL
CRECIMIENTO DEL HONGO *Lentinus edodes* (SHIITAKE) EN
ASERRÍN TROPICAL**

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

CARLA PATRICIA MOLINA DE LA CRUZ
krly_molina@hotmail.com

DIRECTORA: ING. NEYDA ESPÍN
neyda.espin@epn.edu.ec

Quito, junio 2013

© Escuela Politécnica Nacional (2013)

Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo Carla Patricia Molina De La Cruz, 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.

Carla Patricia Molina De La Cruz

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Carla Patricia Molina De La Cruz, bajo mi supervisión.

Ing. Neyda Espín
DIRECTORA DE PROYECTO

AGRADECIMIENTO

Agradezco de todo corazón:

A Dios por darme la vida y guiar siempre mi camino.

A mis papis Paty y José porque siempre han guiado mi camino con su profundo amor de padres, su comprensión y buen ejemplo.

A la Ing. Neyda Espín y al Ing. Bolívar Izurieta, por su completo apoyo, dedicación y guía tan acertada en la realización de este trabajo.

A Diego por su comprensión y apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A Don Rodri, Eli y Moni quienes me brindaron su amistad y compartieron conmigo el desarrollo de este trabajo.

A mis abuelitos Guillita, Amadorsito, Lucita y Gonzalito por su amor y apoyo.

A mis hermanos Caro y José por su cariño y ayuda.

A todos mis tíos y tías, quienes me apoyaron de una u otra manera no solo en el desarrollo de esta tesis, si no que me acompañaron desde el inicio de mis estudios universitarios. Un agradecimiento especial a mis tíos Napo, Maguita, Katy, Doris y Edwin, quienes me fortalecieron cuando más lo necesite.

A mi toda mi gran familia por mostrarme cada día que pase lo que pase siempre van a estar ahí para brindarme su apoyo y cariño.

A todos mis amigos y amigas, por haber compartido este camino conmigo y haberme brindado su amistad sincera.

DEDICATORIA

A mi papi José, por ser un hombre trabajador y de valores, pero más que nada por ser el mejor padre que una hija puede tener y regalarme esta gran herencia.

A mi mami Paty, por ser una mujer integra, trabajadora, por apoyarme y ayudarme siempre a alcanzar mis metas. Por ser el pilar fundamental de todos mis proyectos.

A mi abuelita Guillita, por ser una mujer ejemplo de trabajo, esfuerzo y de amor a toda su familia.

A Diego, por siempre tener una palabra de aliento que brindarme, por hacerme ver el lado positivo de las cosas y hacer que siempre confíe en mí mismo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
GLOSARIO	xvii
RESUMEN	xviii
INTRODUCCIÓN	xx
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Generalidades del <i>Lentinus edodes</i>	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Condiciones de cultivo	3
1.1.2.1. Sustrato	4
1.1.2.2. Temperatura	4
1.1.2.3. Humedad relativa	5
1.1.2.4. Concentración de CO ₂ y O ₂	5
1.1.2.5. Luz	5
1.1.2.6. Ph	5
1.1.3. Técnicas de cultivo	6
1.1.3.1. Cultivo en sustratos naturales	6
1.1.3.2. Cultivo en sustratos artificiales	6
1.1.4. Etapas de cultivo	7
1.1.4.1. Obtención de la semilla	7
1.1.4.2. Inoculación	8
1.1.4.3. Incubación	8
1.1.4.4. Inducción	9
1.1.4.5. Fructificación	9
1.1.4.6. Cosecha	9
1.1.5. Determinación de la eficiencia biológica	10
1.1.6. Enfermedades y plagas	10
1.2. La lignina y la celulosa	11
1.2.1. La lignina y su estructura	11
1.2.2. La celulosa y su estructura	14
1.3. Actividad enzimática y extractos enzimáticos	16
1.3.1. Actividad enzimática	16
1.3.2. Peroxidasas	17
1.3.2.1. Lignino peroxidasa (E.C.1.11.1.14) (LiP)	17
1.3.2.2. Manganeso peroxidasa (E.C.1.11.1.13) (MnP)	18
1.3.2.3. Mecanismo de acción enzimática	18
1.3.3. Celulasas	20
1.3.3.1. Endoglucanasas (1,4-β-D-glucan glucanohidrolasas, EC 3.2.14)	21
1.3.3.2. Exoglucanasas	21
1.3.3.3. B-glucosidasas (EC 3.2.1.21)	21
1.3.3.4. Mecanismo de acción enzimática	21
1.3.4. Determinación de la actividad enzimática	23
1.3.5. Estabilidad de extractos enzimáticos	24

1.3.5.1.	Cinética del deterioro de los alimentos, predicción de la vida útil y tiempo de vida media	25
1.3.5.2.	Reacción de orden cero	27
1.3.5.3.	Reacción de primer orden	28
1.3.5.4.	Dependencia de las constantes de velocidad (k) con la temperatura	29
1.4.	Biotecnología de desechos lignocelulósicos	30
1.4.1.	Enzimas como productos potenciales y sus aplicaciones	31
1.4.2.	Los microorganismos y la generación de enzimas lignocelulolíticas	32
2.	PARTE EXPERIMENTAL	34
2.1.	Objetivos	34
2.2.	Materiales	34
2.3.	Estrategia metodológica	37
2.4.	Caracterización físico-química del aserrín	38
2.5.	Preparación del inóculo del hongo <i>Lentinus edodes</i> (shiitake)	39
2.6.	Preparación del sustrato de aserrín e inoculación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	40
2.6.1.	Desarrollo del micelio	41
2.6.1.1.	Inducción	41
2.6.1.2.	División de las fundas	42
2.6.1.3.	Descripción de las cámaras	43
2.6.2.	Fructificación	44
2.6.3.	Muestreo y obtención de los extractos enzimáticos	44
2.6.4.	Determinación de la eficiencia biológica del <i>Lentinus edodes</i>	45
2.7.	Determinación del perfil de actividad celulolítica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín	46
2.8.	Determinación del perfil de actividad lignino peroxidásica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín	48
2.9.	Determinación del perfil de actividad manganeso peroxidásica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín	50
2.10.	Análisis global de la generación de enzimas celulolítica lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica	52
2.11.	Evaluación de la estabilidad de los extractos enzimáticos	53
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1.	Caracterización química del aserrín tropical utilizado en la fermentación	57

3.2.	Períodos de desarrollo y eficiencia biológica del hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	59
3.3.	Determinación del perfil de la actividad enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica del hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	62
3.3.1.	Determinación del perfil de actividad enzimática celulolítica del hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	63
3.3.2.	Determinación del perfil de actividad enzimática ligninoperoxidásica del hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	75
3.3.3.	Determinación del perfil de actividad enzimática manganesoperoxidásica del hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	87
3.4.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas	99
3.4.1.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas para la primera corrida del grupo 1	99
3.4.2.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas para la primera corrida del grupo 2	101
3.4.3.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas para la segunda corrida del grupo 1	103
3.4.4.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas para la segunda corrida del grupo 2	105
3.4.5.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas para la tercera corrida del grupo 1	106
3.4.6.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas para la tercera corrida del grupo 2	108
3.4.7.	Análisis y determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas de las tres corridas de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	110
3.4.8.	Análisis global de la generación de enzimas celulolítica ligninoperoxidásica y manganeso peroxidásica	114
3.5.	Determinación de la estabilidad de extractos con actividad enzimática celulolítica y manganeso peroxidásica producidos por el hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	116
3.5.1.	Determinación de la estabilidad de extractos con actividad enzimática celulolítica producidos por el hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	116
3.5.1.1.	Análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática celulolítica para un modelo de degradación de orden cero	118
3.5.1.2.	Análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática celulolítica para un modelo de degradación de primer orden	121
3.5.2.	Determinación de la estabilidad de extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica producidos por el hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	124

3.5.2.1. Análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica para un modelo de degradación de orden cero	126
3.5.2.2. Análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica para un modelo de degradación de primer orden	129
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	134
4.1. Conclusiones	134
4.2. Recomendaciones	135
BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXOS	148

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Producción anual estimada de champiñón (<i>Agaricus</i>) y shiitake en América Latina en el 2002	2
Tabla 2.1.	Materiales utilizados para el desarrollo de la parte experimental	35
Tabla 2.2.	Equipos utilizados para el desarrollo de la parte experimental	36
Tabla 2.3.	Reactivos utilizados para el desarrollo de la parte experimental	37
Tabla 3.1.	Datos de la caracterización química del aserrín original y después de las cosechas del hongo <i>Lentinus edodes</i> en base húmeda	57
Tabla 3.2.	Períodos de las etapas de crecimiento y cosechas del hongo <i>Lentinus edodes</i> para las tres corridas de fermentación	60
Tabla 3.3.	Datos promedio del peso del hongo fresco y de la eficiencia biológica promedio del hongo <i>Lentinus edodes</i> para las cosechas del grupo 1 y 2 de las tres corridas de fermentación	61
Tabla 3.4.	Datos de variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para la primera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	64
Tabla 3.5.	Datos de variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	65
Tabla 3.6.	Datos de variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	66
Tabla 3.7.	Datos de variación de la actividad enzimática celulolítica promedio y p-valor para las tres corridas	74
Tabla 3.8.	Datos de variación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica con el tiempo para la primera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	76
Tabla 3.9.	Datos de variación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	77

Tabla 3.10.	Datos de variación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	78
Tabla 3.11.	Datos de variación de la actividad enzimática lignino peroxidásica promedio y p-valor para las tres corridas	86
Tabla 3.12.	Datos de variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para la primera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	88
Tabla 3.13.	Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	89
Tabla 3.14.	Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	90
Tabla 3.15.	Datos de variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica promedio y p-valor para las tres corridas	98
Tabla 3.16.	Tiempos y valores de máxima generación enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica para las tres corridas de fermentación del grupo 1 del hongo <i>Lentinus edodes</i>	110
Tabla 3.17.	Tiempos y valores de máxima generación enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica para las tres corridas de fermentación del grupo 2 del hongo <i>Lentinus edodes</i>	111
Tabla 3.18.	Variación de la actividad enzimática celulolítica en función del tiempo de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C	117
Tabla 3.19.	Datos de la actividad enzimática celulolítica inicial y final, de la constante k y del t_{50} de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C	119
Tabla 3.20.	Datos de ln de la constante de reacción, el inverso de la temperatura y del valor de la energía de activación para reacciones ajustadas a un modelo de orden cero	120
Tabla 3.21.	Datos del ln de la actividad enzimática celulolítica inicial y final, de la constante de reacción y del t_{50} de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C	122
Tabla 3.22.	Datos de ln de la constante de reacción, el inverso de la temperatura y del valor de la energía de activación para reacciones ajustadas a un modelo de primer orden	123

Tabla 3.23.	Datos de la constante de reacción, el coeficiente de regresión lineal y la energía de activación para reacciones ajustadas a un modelo de orden cero y primer orden	124
Tabla 3.24.	Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C	125
Tabla 3.25.	Datos la actividad enzimática manganeso peroxidásica inicial y final, de la constante y del t_{50} de los extractos almacenados a temperatura de 15,5 °C, 3 °C y -14°C	127
Tabla 3.26.	Datos de \ln de la constante de reacción, el inverso de la temperatura y del valor de la energía de activación para un modelo de degradación de orden cero	129
Tabla 3.27.	Datos de \ln de la actividad enzimática manganeso peroxidásica inicial y final, de la constante y del t_{50} de los extractos almacenados a temperatura de 15,5 °C, 3 °C y -14 °C	131
Tabla 3.28.	Datos del logaritmo natural de la constante de reacción, el inverso de la temperatura y del valor de la energía de activación para un modelo de primer orden	132
Tabla 3.29.	Datos de la constante de reacción, el coeficiente de regresión lineal y la energía de activación para reacciones ajustadas a un modelo de orden cero y primer orden	132
Tabla AVI. 1.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática celulolítica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la primera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	166
Tabla AVI.2.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática celulolítica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la segunda corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	167
Tabla AVI. 3.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática celulolítica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la tercera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	168
Tabla AVI.4.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la primera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	169

Tabla AVI.5.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la segunda corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	170
Tabla AVI.6.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la tercera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	171
Tabla AVI.7.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la primera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	172
Tabla AVI.8.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la segunda corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	173
Tabla AVI.9.	Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la tercera corrida de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i>	174
Tabla AVII.1.	Pesos inicial y final del aserrín húmedo	175
Tabla AVII.2.	Porcentaje de humedad de las muestras de aserrín	175
Tabla AVIII.1.	Concentración de los estándares utilizados para la obtención de la curva de calibración de glucosa	176
Tabla AXII. 1.	Datos de actividad en enzimática celulolítica de los días seleccionados para las tres corridas y los dos grupos	180
Tabla AXII. 2.	Datos de actividad en enzimática lignino peroxidásica de los días seleccionados para las tres corridas y los dos grupos	181
Tabla AXII. 3.	Datos de actividad en enzimática manganeso peroxidásica de los días seleccionados para las tres corridas y los dos grupos	182
Tabla AXII. 4.	Datos promedio y desviación estándar para los nueve días de análisis relacionados con el crecimiento del hongo <i>Lentinus edodes</i>	183
Tabla AXIV. 1.	Datos de variación del ln (UI) con el tiempo de los extractos con actividad enzimática celulolítica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C	189

Tabla AXIV. 2. Datos de variación del ln (UI) con el tiempo de los extractos con actividad manganeso peroxidásica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1.	Shiitake fructificado en ladrillos moldeados de aserrín	3
Figura 1.2.	Estructura de Lignina	12
Figura 1.3.	Degradación de la lignina por hongos basidiomicetos	14
Figura 1.4.	Enlace β -1,4-glucosídico de las unidades adyacentes de azúcar de la celulosa	15
Figura 1.5.	Ciclo catalítico de las peroxidasas	19
Figura 1.6.	Degradación enzimática de la celulosa	22
Figura 2.1.	Proceso de crecimiento del hongo <i>Lentinus edodes</i> en tubos, cajas Petri y frascos de vidrio	40
Figura 2.2.	Esquema de las cámaras donde se realizó el proceso de fermentación	43
Figura 2.3.	Diagrama de proceso para la determinación del perfil de actividad celulolítica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín	47
Figura 2.4.	Diagrama de proceso para la determinación del perfil de actividad lignino peroxidásica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín	49
Figura 2.5.	Diagrama de proceso para la determinación del perfil de actividad manganeso peroxidásica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín	51
Figura 3.1.	Variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para las tres corridas de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i> del grupo 1	67
Figura 3.2.	Variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para las tres corridas de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i> del grupo 2	69
Figura 3.3.	Valores medios de actividad enzimática celulolítica en el día inicial para las tres corridas y los dos grupos	71
Figura 3.4.	Valores medios de actividad enzimática celulolítica para el día de población completa del micelio de las tres corridas y los dos grupos	72
Figura 3.5.	Valores medios de actividad enzimática celulolítica para el día de primera cosecha para las tres corridas y los dos grupos	72

Figura 3.6.	Valores medios de actividad enzimática celulolítica para el día de post. inducción para las tres corridas y los dos grupos	73
Figura 3.7.	Valores medios de actividad enzimática celulolítica del último día de fermentación para las tres corridas y los dos grupos	74
Figura 3.8.	Variación de la actividad enzimática ligninolítica con el tiempo las tres corridas de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i> del grupo 1	79
Figura 3.9.	Variación de la actividad enzimática ligninolítica con el tiempo para las tres corridas de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i> del grupo 2	81
Figura 3.10.	Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica en el día inicial para las tres corridas y los dos grupos	83
Figura 3.11.	Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica para el día de población completa del micelio de las tres corridas y los dos grupos	83
Figura 3.12.	Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica para el día de primera cosecha para las tres corridas y los dos grupos	84
Figura 3.13.	Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica para el día de post. inducción para las tres corridas y los dos grupos	85
Figura 3.14.	Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica del último día de fermentación para las tres corridas y los dos grupos	86
Figura 3.15.	Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para las tres corridas de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i> para el grupo 1	91
Figura 3.16.	Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo de las tres corridas de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i> para el grupo 2	93
Figura 3.17.	Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica en el día inicial para las tres corridas y los dos grupos	95
Figura 3.18.	Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica para el día de población completa del micelio para las tres corridas y los dos grupos	95

Figura 3.19.	Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica para el día de primera cosecha para las tres corridas y los dos grupos	96
Figura 3.20.	Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica para el día de post. inducción para las tres corridas y los dos grupos	97
Figura 3.21.	Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica del último día de fermentación para las tres corridas y los dos grupos	98
Figura 3.22.	Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), lignino peroxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo de la primera corrida de fermentación del grupo 1 del hongo <i>Lentinus edodes</i>	100
Figura 3.23.	Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), lignino peroxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo de la primera corrida de fermentación del grupo 2 del hongo <i>Lentinus edodes</i>	102
Figura 3.24.	Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), ligninoperoxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del grupo 1 del hongo <i>Lentinus edodes</i>	104
Figura 3.25.	Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), ligninoperoxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del grupo 2 del hongo <i>Lentinus edodes</i>	105
Figura 3.26.	Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), ligninoperoxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del grupo 1 del hongo <i>Lentinus edodes</i>	107
Figura 3.27.	Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), ligninoperoxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del grupo 2 del hongo <i>Lentinus edodes</i>	109
Figura 3.28.	Variación de las actividades enzimáticas celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica para nueve días principales de crecimiento del <i>Lentinus edodes</i>	115
Figura 3.29.	Variación de la actividad enzimática celulolítica de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C de temperatura en función del tiempo y líneas de tendencia	118
Figura 3.30.	Variación del ln (k) con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos	120

Figura 3.31.	Variación del ln (UI) de los extractos con actividad celulolítica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C en función del tiempo y líneas de tendencia	121
Figura 3.32.	Variación del ln (k) con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos	123
Figura 3.33.	Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C con respecto al tiempo	127
Figura 3.34.	Variación del ln (k) con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos	128
Figura 3.35.	Variación del ln (UI) de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C con respecto al tiempo	130
Figura 3.36.	Variación del ln (k) con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos	131
Figura AIV. 1.	Crecimiento de <i>Lentinus edodes</i> en tubos con agar	155
Figura AIV. 2.	Crecimiento de <i>Lentinus edodes</i> en caja Petri	155
Figura AIV. 3.	Crecimiento de <i>Lentinus edodes</i> en tubos y cajas Petri en la incubadora a 28 °C	156
Figura AIV. 4.	Crecimiento de <i>Lentinus edodes</i> en frascos de vidrio de 250 mL con trigo y relación de humedad 1:1,2	156
Figura AIV. 5.	Desarrollo del micelio de <i>Lentinus edodes</i> en frascos de vidrio de 250 mL con trigo y relación de humedad 1:1,2	157
Figura AV. 1.	Inoculación del Hongo <i>Lentinus edodes</i> en las fundas con aserrín esterilizado	158
Figura AV. 2.	Fundas de 300 g de aserrín inoculadas con <i>Lentinus edodes</i>	159
Figura AV. 3.	Crecimiento del micelio del <i>Lentinus edodes</i> en las fundas con aserrín de maderas tropicales	159
Figura AV. 4.	Fortificación del micelio del <i>Lentinus edodes</i> en las fundas con aserrín de maderas tropicales	160
Figura AV. 5.	Aparecimiento de los primordios de <i>Lentinus edodes</i> en las fundas con aserrín de maderas tropicales	160
Figura AV. 6.	Fortalecimiento del micelio del <i>Lentinus edodes</i> , después de haber retirado las fundas	161
Figura AV. 7.	Inducción de la salida y desarrollo de los primordios de <i>Lentinus edodes</i>	161

Figura AV. 8.	Separación de las fundas según el desarrollo del micelio de <i>Lentinus edodes</i> en la cámara clara-obscura en dos grupos	162
Figura AV. 9.	Separación de las fundas según el desarrollo del micelio de <i>Lentinus edodes</i> en la cámara clara-obscura en dos grupos	162
Figura AV. 10.	Crecimiento de los primordios de <i>Lentinus edodes</i> en la cámara clara oscura	163
Figura AV. 11.	Cuerpos fructíferos de <i>Lentinus edodes</i> en primera corrida	163
Figura AV. 12.	Cuerpos fructíferos de <i>Lentinus edodes</i> en la segunda corrida	164
Figura AV. 13.	Cuerpos fructíferos de <i>Lentinus edodes</i> en la tercera corrida	164
Figura AXIII. 1.	Actividad enzimática celulolítica con respecto al tiempo para las temperaturas de 15,5 °C, 3 °C y -14 °C	184
Figura AXIII. 2.	Ln (k) con respecto al inverso de las temperaturas 288,5 °K, 276 °K y 259 °K	186
Figura AXIII. 1.	Actividad enzimática celulolítica con respecto al tiempo para las temperaturas de 15,5 °C, 3 °C y -14 °C	184
Figura AXIII. 2.	Ln (k) con respecto al inverso de las temperaturas 288,5 °K, 276 °K y 259 °K	186

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I Determinación de resinas, ceras y grasas	149
ANEXO II Determinación de Celulosa	151
ANEXO III Determinación de Lignina	153
ANEXO IV Proceso de obtención del inóculo del hongo <i>Lentinus edodes</i>	155
ANEXO V Desarrollo del hongo <i>Lentinus edodes</i> en fundas de aserrín de maderas tropicales	158
ANEXO VI Datos de variación de la absorbancia para las tres corridas de fermentación del hongo <i>Lentinus edodes</i> en aserrín tropical	165
ANEXO VII Determinación del contenido de humedad del aserrín después de la esterilización	175
ANEXO VIII Obtención de la curva de calibración de D-Glucosa	176
ANEXO IX Determinación de la actividad celulolítica de los extractos	177
ANEXO X Determinación de la actividad ligninoperoxidásica de los extractos	178
ANEXO XI Determinación de la actividad manganeso peroxidásica de los extractos	179
ANEXO XII Análisis global de la generación de enzimas celulolítica, lignino- peroxidásica y manganeso peroxidásica	180

ANEXO XIII

Determinación del tiempo de vida media de los extractos con actividad Enzimática ajustados a un modelo de orden cero	184
--	-----

ANEXO XIV

Determinación del tiempo de vida media de los extractos con actividad Enzimática ajustados a un modelo de primer orden	188
--	-----

ANEXO XV

Resultado del análisis del aserrín	194
------------------------------------	-----

GLOSARIO

Basidiomiceto: Clase de hongos que producen cuerpos fructíferos (Espasa-Calve S.A, 2005).

Cuerpos fructíferos: Estructura reproductora del hongo, cuya función es dispersar las esporas. En el caso de hongos comestibles, el cuerpo fructífero es lo que un individuo ingiere (Inbio, 2009, p. 1).

Enzimas Exocelulares: catalizadores orgánicos que ejercen sus funciones fuera de la célula que las produjo (Verdu, 1987, p.100).

Esporas: Pequeña unidad de reproducción, puede ser unicelular o pluricelular, asexual o sexual, cuyas funciones son comparables con las de una semilla (Inbio, 2009, p. 1).

Hifa: Filamento tubular que representa la unidad estructural de ciertos hongos (Inbio, 2009, p. 1).

Micelio: Estructura algodonosa y compacta, generalmente de color blanco formado por el conjunto de hifas que se han desarrollado sobre un sustrato (López, 2007, p.5).

Primordio: Estado rudimentario de un órgano que empieza a formarse (Inbio, 2009, p. 1).

Saprotitos: Plantas o microorganismos que se alimentan de materias orgánicas en descomposición (Espasa-Calve S.A, 2005).

Sitio activo: Lugar de la molécula de enzima donde se fija el sustrato (Espasa-Calve S.A, 2005).

RESUMEN

El presente trabajo fue orientado a determinar el perfil de generación de actividades enzimáticas celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica en los extractos obtenidos durante la fermentación en aserrín tropical del hongo *Lentinus edodes*; así como, a la determinación de los períodos de mayor generación de cada una de las actividades enzimáticas ya especificadas. Otro de los propósitos de este trabajo fue analizar la estabilidad de los extractos enzimáticos a tres temperaturas de almacenamiento.

Se utilizó el hongo *Lentinus edodes* y se hizo crecer en aserrín. Durante todo el período de fermentación del hongo en el aserrín, se determinaron las actividades enzimáticas de los extractos mediante métodos espectrofotométricos. Se realizaron tres corridas de fermentación de los hongos *Lentinus edodes* en aserrín tropical. La actividad celulolítica fue determinada por el método del reactivo DNS, la actividad lignino peroxidásica se determinó por el método de oxidación del alcohol veratrílico y por último la actividad manganeso peroxidásica se determinó por el método del rojo fenol. Con base en los resultados obtenidos de actividad enzimática durante las fases de crecimiento del hongo, se determinaron los períodos de mayor generación de actividad enzimática.

Los extractos presentaron mayor actividad enzimática celulolítica, que lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica. La actividad enzimática celulolítica presentó un valor máximo de 0,666 UI en la tercera corrida en el día de primera cosecha (día 56). La actividad lignino peroxidásica presentó una tendencia con valores cercanos a cero durante el tiempo de fermentación de las tres corridas. La actividad manganeso peroxidásica presentó picos de producción enzimática en los períodos de inducción, el máximo valor alcanzado fue de $8,08 \times 10^{-2}$ UI.

Se analizó el contenido de lignina, celulosa, humedad, ceras, grasas y resinas del aserrín de maderas tropicales original y del aserrín fermentado después de las cosechas del hongo y se evidenció una disminución y/o variación del contenido de estas sustancias de acuerdo al tiempo de fermentación del aserrín.

De los extractos con mayor actividad celulolítica y manganeso peroxidásica se realizó el análisis de estabilidad de la actividad enzimática. Se almacenaron los extractos a 3 temperaturas: ambiente promedio de (15,5 °C), a 3 °C y a -14 °C. A - 14 °C para la actividad celulolítica en los extractos se tuvo un t_{50} de 71,5 días. Para la actividad manganeso peroxidásica la mejor temperatura de almacenamiento fue a - 14 °C y a esta temperatura se obtuvo un t_{50} de 36,7 días.

INTRODUCCIÓN

Los hongos de podredumbre blanca son aquellos que crecen en sustratos lignocelulósicos como la madera y la paja, y secretan una mezcla de enzimas hidrolíticas y oxidativas que despolimerizan los componentes de sustratos celulósicos. La bioconversión de desechos agroindustriales lignocelulósicos mediante el cultivo de hongos ofrece la posibilidad de convertir estos desechos en alimentos ricos en proteínas aceptables para otros organismos, lo que reduce el impacto ambiental de los residuos (Morais, Ramos, Matos y Santos, 2000, p. 125).

Uno de los principales papeles de los hongos en los ecosistemas es el de descomposición, que es efectuado por los micelios. Estos segregan enzimas extracelulares y ácidos que sirven para degradar la lignina y la celulosa, los dos componentes principales de la pared celular de las células de plantas. La estructura química de la lignina y la celulosa son muy similares a las de muchos contaminantes actuales. Lo fundamental en la microrremediación es identificar la cepa de hongos más apropiada para tratar cada tipo específico de contaminante (Lynd, Weimer, Zyl y Pretorius, 2002, p. 521).

Debido a la capacidad del *Lentinus edodes* de degradar componentes de la madera como la lignina, que es difícil de romper en la naturaleza, se han desarrollado estudios sobre este hongo, como un organismo de biorremediación de contaminantes recalcitrantes y como un agente biológico para la obtención de enzimas celulolíticas (Couto y Herrera, 2006, p. 505).

El uso de microorganismos para remediar ambientes dañados, no es la única aplicación biotecnológica para ellos. La obtención de metabolitos y específicamente de enzimas tiene un interés preponderante en muchas industrias. Por ejemplo, las celulasas se emplean en la industria de alimentos para mejorar procesos de despulpado, en la industria textil se emplea en los detergentes para degradar las microfibrillas y dar una superficie suave a una prenda textil, y para tratar las telas de jean y dar una apariencia de desteñido (Abadulla, Tzanov,

Costa, Robra, Cavaco-Paulo, y Gübitz, 2000, p. 3359; Riu, Schönsee, y Barcelo, 1998, p. 658). Asimismo, se emplean enzimas celulolíticas para degradar materiales y desechos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles (Gaitán y Pérez, 2008, p. 10).

Las tendencias actuales de producción mundial, están encaminadas a ser más amigables con el ambiente. El desarrollo de tecnologías limpias, que aprovechen al máximo los beneficios de los productos principales y de los subproductos es el reto que todas las industrias y procesos productivos tienen que enfrentar. Los procesos biotecnológicos no se quedan fuera de este contexto. Por esta razón, el estudio del aprovechamiento de todos los beneficios del cultivo de hongos cobra importancia. La obtención de hongos comestibles no solamente es una alternativa de uso de desechos agroindustriales que da como beneficios un producto alimenticio, el hongo, y un sustrato degradado que puede emplearse como abono; adicionalmente, el recuperar las enzimas generadas por los hongos durante el proceso fermentativo resultaría en un beneficio adicional del cultivo de hongos, al tener un producto de alto valor agregado.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. GENERALIDADES DEL *Lentinus edodes*

1.1.1. GENERALIDADES

El hongo *Lentinus edodes* es un basidiomiceto que pertenece a la familia *Tricholomataceae* y es originario de Asia. Son hongos saprofitos de pudrición blanca, que degradan sustratos leñosos (Chen, 2005, p. 1).

El hongo *Lentinus edodes* es comúnmente llamado por su nombre japonés Shiitake y este proviene de la palabra shii, que es el nombre de un árbol asiático y take, que es la palabra japonesa para referirse a los hongos (Davis, 2008, p. 1).

Los hongos *Lentinus edodes* crecen en climas templados de forma individual o en racimos sobre maderas duras en descomposición (Chen, 2005, p. 2). El cultivo de hongos *Lentinus edodes* en ambientes naturales comenzó en China hace aproximadamente mil años y desde entonces se ha investigado más profundamente como cultivar mejor los hongos comestibles en ambientes artificiales (Chang y Miles, 1989, p. 202).

El *Lentinus edodes* ocupa el segundo lugar del total de la producción mundial de hongos, el primero lo ocupa el champiñón. Entre 1946 y 1986 se dio el mayor incremento en la producción de *Lentinus edodes*, en 1946 se tuvo una producción de 10 000 Tm y en 1986 de 30 000 Tm (Chang, 1987, p. 118; Singer, 1961, p. 137).

El cultivo de hongos comestibles *Lentinus edodes* se ha incrementado en los últimos años, debido al conocimiento acerca de sus propiedades para mantener una buena salud y de los beneficios medicinales que presenta (Yamanaka y Kasuji, 1997, p. 331). América Latina presenta un continuo incremento en la producción de hongos, en el 2002 en América del sur se produjo

aproximadamente 94% del shiitake producido en América Latina, estos datos se muestran en la Tabla 1.1 (Lahman y Rinker, 2004, p. 683).

Tabla 1.1. Producción anual estimada de champiñón (*Agaricus*) y shiitake en América Latina en el 2002

País	Champiñón (ton)	Shiitake (ton)
América del Sur		
Argentina	1 500	8
Bolivia	10	2
Brasil	6 885	800
Chile	4 872	0
Colombia	6 312	3,6
Ecuador	625	0
Perú	750	0
Venezuela	1 320	0
Subtotal	22 274	813,6
América Central		
Costa Rica	90	3
Guatemala	80	30
Subtotal	170	33
América del Norte		
México	37 230	30
Total	59 674	876,6

(Lahman y Rinker, 2004, p. 683)

Debido al incremento en la producción del hongo comestible *Lentinus edodes*, se han presentado nuevos retos en su producción y cultivo, siendo el principal reto la reducción del precio en el mercado, para lo cual se debe optimizar el proceso con la disminución de los tiempos entre cosechas, la reducción de costos de producción y el incremento de la eficiencia biológica (Royse, 2001, p. 6).

1.1.2. CONDICIONES DE CULTIVO

El crecimiento del *Lentinus edodes* está influenciado por ciertas condiciones del ambiente en el cual se desarrollará como: la temperatura, la humedad tanto del ambiente como del sustrato, el pH, las concentraciones de CO₂ y O₂, y la luz. Además, los hongos al no tener piel se ven afectados cuando se modifican las condiciones de crecimiento. Las condiciones óptimas de crecimiento sobre todo de temperatura, cambian de acuerdo con la etapa de crecimiento en la que se encuentre el hongo. Para asegurar el buen desarrollo de los hongos es necesario definir las variables antes mencionadas (Chang y Miles, 1984, p. 360; Silva, Fritz, Cubillos y Díaz, 2010, p. 9). En la Figura 1.1 se observa cuerpos fructíferos de hongos shiitake cultivados en ladrillos de aserrín.



Figura 1.1. Shiitake fructificado en ladrillos moldeados de aserrín

(Fan *et al*, 2005, p. 192)

1.1.2.1. Sustrato

Algunos requerimientos para el cultivo de *Lentinus edodes* son carbohidratos, nitrógeno y una pequeña cantidad de minerales y vitaminas, estos requerimientos deben ser provistos por la sustancia orgánica que se escoja como sustrato para el crecimiento del *Lentinus edodes*. El sustrato puede ser aserrín, bagazo de caña de azúcar, tallos de maíz, cascarilla de algodón, mazorcas de maíz y tallos de frijoles. Al sustrato principal es importante añadirle una fuente de nitrógeno como la úrea y una fuente de minerales como el carbonato de calcio, en porcentaje del 20% y 1% respectivamente (Fan, L., Pan, H., y Wu, Y, 2005, p. 193).

En Asia, una de las formas más comunes de cultivar el *Lentinus edodes* es en troncos de maderas duras. El aserrín de madera dura es el sustrato base más popularmente utilizado en el mundo para formular sustratos sintéticos (Smith, 1997, p. 5). El cultivo de *Lentinus edodes* a gran escala, se realiza en sustratos artificiales compuestos de cualquier aserrín o residuo agrícola disponible localmente (Chen, Arrol y Stamets, 2000, p. 773).

El *Lentinus edodes* puede crecer en diferentes tipos de maderas como son: cedro, pino, ciprés, aliso, laurel, nogal, balsa, sauce, entre otros. De acuerdo a la disponibilidad del tipo de madera, se deberá formular el sustrato. Para favorecer el crecimiento homogéneo de los hongos, se debe dar una densidad determinada al sustrato, la cual facilite el intercambio de gases con el medio ambiente (Silva. *et al*, 2010, p. 17).

1.1.2.2. Temperatura

Los hongos *Lentinus edodes* son organismos mesófilos que pueden crecer a temperaturas entre 10 a 40 °C. La temperatura óptima está alrededor de 23 °C; sin embargo varía según la especie y etapa de crecimiento en la que se encuentre el hongo (Zadrazil y Kutman, 1982, p. 283).

1.1.2.3. Humedad relativa

Es importante mantener una humedad relativa óptima del aire, la más adecuada para el desarrollo de los hongos se encuentra entre 50% y 85%, las más bajas se recomiendan para la etapa de crecimiento del micelio y las más altas para la etapa de fructificación (Chen, 2005, p. 8; Zadrazil y Kutman, 1982, p. 284).

1.1.2.4. Concentración de CO₂ y O₂

Es indispensable proveer oxígeno a los hongos *Lentinus edodes*, pues son microorganismos aerobios. Es necesaria la alimentación de aire fresco en especial durante la etapa de fructificación, pues concentraciones mayores al 1% de CO₂ inhiben el apareamiento de los cuerpos fructíferos (Kozak y Krawczyk, 1989, p. 17).

1.1.2.5. Luz

La luz es una fuente de energía para los hongos, para el desarrollo del micelio se recomienda aplicar luz difusa débil. Una mayor intensidad luminosa es indispensable para iniciar la fructificación. Durante el período de fructificación se alternan los períodos de luz con oscuridad. La luz también ayuda a desarrollar el color característico de estos hongos (Chen, 2005, p. 8; Silva *et al*, 2010, p. 26).

1.1.2.6. pH

Los hongos crecen mejor en medios ácidos, pues degradan más rápidamente los sustratos. Sin embargo; los hongos pueden crecer en un amplio rango de pH que va de 3 a 7, el rango óptimo esta entre 4,5 y 5,5 (Kozak y Krawczyk, 1989, p. 15; Silva *et al*, 2010, p. 27).

1.1.3. TÉCNICAS DE CULTIVO

El *Lentinus edodes* se cultiva de forma natural en ambientes abiertos y de forma artificial en ambientes creados. Los rendimientos son mayores cuando se cultiva los hongos en ambientes creados, ya que se puede tener cosechas durante todo el año, mientras que en los hábitats naturales las cosechas solo se presentan en primavera y otoño debido a las temperaturas bajas de estas estaciones (Ikegaya, 1997, p. 338).

1.1.3.1. Cultivo en sustratos naturales

El cultivo de *Lentinus edodes* en sustratos naturales se realiza en troncos y ramas de varias especies de árboles. Los troncos por lo general no reciben tratamientos previos de esterilización pues su corteza sirve como barrera física y química contra posibles hongos contaminantes (Silva *et al*, 2010, p. 17). Los troncos se cortan generalmente en el invierno, porque en esta época tienen mayor contenido de azúcares.

Los troncos se colocan horizontalmente durante la etapa de crecimiento del micelio, que puede tardar de 6 meses a 2 años. Cuando esta etapa ha finalizado, la fructificación se induce al colocar los troncos de forma vertical y poniéndolos en contacto con agua (Zadrazil y Kutman, 1982, p. 281).

1.1.3.2. Cultivo en sustratos artificiales

El cultivo artificial del *Lentinus edodes* se realiza de diferentes maneras entre las cuales se tiene, el cultivo sobre camas o fundas de aserrín, el cultivo en bloques de aserrín de 5 y 6 kg de peso, y en placas de sustrato de aserrín de 15 kg (López, Valencia y Chang, 2004, p. 309).

La mayoría de productores de hongos de *Lentinus edodes* cultivan a los hongos en fundas de un peso que va desde 1 kg hasta 6 kg. Para este tipo de cultivos se escoge el aserrín que esté disponible en la región y que sea económicamente rentable, se añaden aditivos como carbonato de calcio y fungicidas en bajas concentraciones, de tal manera que se provea al hongo de los nutrientes necesarios para su crecimiento y se eviten contaminaciones (Royse, 2001, p. 6; Silva *et al*, 2010, p. 30).

Para realizar el cultivo en fundas se debe esterilizar el material que se va a utilizar como sustrato, luego de este proceso se verifican las condiciones de humedad y se inocula el microorganismo en fundas plásticas, se realiza la siembra en capas de sustrato e inóculo, hasta llegar al peso deseado. Las fundas se cierran y se trasladan a las cámaras oscuras, hasta que el micelio poble todo el sustrato, se remueve la protección y se sumergen en agua. Para que se dé la fructificación se les expone a la luz, bajo estas condiciones permanecen hasta la cosecha (Chen, 2005, p. 10; Royse, 2001, p. 7).

1.1.4. ETAPAS DE CULTIVO

El *Lentinus edodes* empieza su vida como una red invisible de hilos, que degradan el tejido muerto de varias maderas duras como el roble (*Bursera simaruba*), el haya (*Fagus sylvatica*), el castaño (*Castanea sativa*), o el árbol shii (*Castanopsis sieboldii*), el micelio digiere la madera y forma los hongos, los cuales llegada su etapa de madurez producen esporas y estas son arrastradas por el viento y se depositan sobre la corteza de los árboles. Así se da inicio a un nuevo ciclo de vida del *Lentinus edodes* (Royse, 2001, p. 8).

1.1.4.1. Obtención de la semilla

El micelio al estar constituido por hifas, líneas de interconexión individual, es muy frágil (Komatsu y Tokimoto, 1982, p. 107). La semilla es el vehículo de transporte

del micelio desde el medio de cultivo “in vitro” hasta el sustrato definitivo donde crecerá el hongo. La conservación de la cepa se realiza en tubos y cajas petri con agar. Existen varios medios para reproducir la semilla, se puede pasar el micelio que se encuentra en agar a frascos de aserrín, frascos de trigo o medio líquido (García, 2003, p. 23).

La esterilización del sustrato para obtener la semilla se realiza al colocar el sustrato en frascos, luego se llevan los frascos a autoclaves y se esteriliza el sustrato a una temperatura de 121 °C durante 20 a 30 minutos con una humedad cercana al 45%. Los frascos son enfriados a temperatura ambiente dejándolos dentro del equipo de esterilización o llevándolos a la sala de inoculación (France, Cañumir, y Cortéz, 2000, p. 19).

1.1.4.2. Inoculación

El proceso de inoculación debe hacerse bajo una campana de flujo laminar desinfectada. La inoculación consiste en extraer una porción de la semilla con hongo, para ser introducido en el aserrín esterilizado y enfriado (Lizuka y Takeuchi, 1978, p. 3).

1.1.4.3. Incubación

Esta etapa se desarrolla en una cámara oscura en la que se debe controlar las condiciones ambientales. Durante la fase de colonización el micelio crece y pobla el sustrato, a la vez que desarrolla los recursos necesarios para la fructificación, el tiempo de colonización dependerá de las características de la cepa y del sustrato. La temperatura debe estar entre 20 y 25 °C y la humedad relativa entre 60 y 80% (Cook y Flegg, 1962, p. 171).

1.1.4.4. Inducción

Finalizado el proceso de incubación, por lo general, se remueven las fundas plásticas, o se realizan perforaciones y se trasladan las bolsas a la nevera con el propósito de dar un choque térmico, de tal manera que se induzca la fructificación (Lizuka y Takeuchi, 1978, p. 4).

Otro método de inducción consiste en sumergir los bloques colonizados en agua, por un tiempo de dos días, este tiempo será menor o mayor dependiendo de la diferencia de temperatura entre el agua y el aire (Royse, 2001, p. 7).

1.1.4.5. Fructificación

El inicio de la fructificación se da con el cambio de color del micelio que se encuentra sobre el sustrato. El micelio cambia de un color blanco a un color café claro y luego a un color café oscuro debido a la acción de la luz y el aire. Se da el apareamiento de los primordios y en esta etapa es importante mantener la temperatura entre 20-25 °C, el riego no es necesario, ni tampoco la ventilación, ya que los primordios son muy sensibles. Al cabo de unos días los primordios dan origen a los cuerpos fructíferos (Fan *et al*, 2005, p. 127).

1.1.4.6. Cosecha

Si no existen cambios bruscos en las condiciones ambientales los primeros carpóforos se cosechan 14 días después de la inducción. El tamaño de los carpóforos suele ser variado, los sombreros alcanzan diámetros entre 2 y 20 cm. La cosecha se realiza con un cuchillo estéril o con la mano, el corte debe ser lo más próximo al sustrato (García, 2003, p. 29).

En granjas bien manejadas se obtienen entre 6 y 8 cosechas en un período de 10 meses, desde la primera cosecha. El rendimiento biológico se encuentra entre 40 y 60% (Fan *et al*, 2005, p. 127).

1.1.5. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA BIOLÓGICA

Una estimación práctica de la capacidad de los hongos para convertir un sustrato en cuerpos fructíferos se denomina eficiencia biológica. La eficiencia biológica se calcula dividiendo el peso fresco total de hongos cosechados en un cultivo, por el total de peso seco de sustrato y se suele expresar como porcentaje, como se establece en la ecuación 1.1. Con esto se establece la relación porcentual que existe entre el peso fresco de los hongos producidos y el peso seco del sustrato. En algunos casos la eficiencia biológica puede ser mayor que 100% (Chang y Miles, 1989, p. 248).

$$Eficiencia\ Biológica = \frac{Peso\ total\ de\ hongos\ frescos}{Peso\ del\ sustrato\ seco} \times 100 \quad [1.1]$$

1.1.6. ENFERMEDADES Y PLAGAS

El riesgo de contaminación en los hongos de *Lentinus edodes* es considerablemente alto, a pesar de manejar una adecuada inoculación. Las consideraciones principales para prevenir las plagas son conservar la asepsia en todos los pasos de cultivo del hongo, tener una cantidad adecuada de inóculo en el sustrato, evitar contacto con el suelo y conservar las condiciones ambientales dentro de los rangos óptimos. Los tiempos prolongados de siembra hacen que el sustrato se contamine, incluso antes de ser inoculado. Se debe descartar los sustratos que tengan presencia de algún tipo de contaminación (Silva *et al*, 2010, pp. 31-32).

Es usual que aún en cultivos de *Lentinus edodes* bien llevados aparezcan contaminaciones superficiales, principalmente de mohos, o procesos incipientes

de contaminación bacteriana de olor nauseabundo característico. Los principales microorganismos que contaminan los cultivos de *Lentinus edodes* o compiten por los nutrientes y el agua contenida en el sustrato son el *Tricoderma*, más conocido como hongo verde y el *Hypoxyton*, conocido como moho negro. Para controlar la presencia del moho verde, se debe regar los hongos solo cuando sea necesario, y eliminar y quemar los hongos contaminados. Para prevenir la aparición del moho negro, no se debe usar los árboles muy viejos (Tan y Moore, 1992, p. 1081).

Durante la etapa de colonización del micelio existe el más alto riesgo de contaminación de los cultivos, por lo que se aconseja mantener el aserrín húmedo y no exponer las bolsas a la luz solar directa. Los insectos que pueden ser un problema son las termitas (*Reticulitermes lucifugus*), escarabajos de corteza (*Hilastes ater*), y colémbolos (*Collembola*); causan graves daños al alimentarse de los primordios y el micelio que cubre el aserrín (Davis, 2008, p. 2).

1.2. LA LIGNINA Y LA CELULOSA

La lignina y la celulosa son los constituyentes principales de las paredes celulares de las plantas. Las paredes celulares de las plantas en la madera están formadas por celulosa y hemicelulosa enlazadas mediante lignina (Casey, 1990, p. 31).

1.2.1. LA LIGNINA Y SU ESTRUCTURA

La lignina está presente únicamente en las plantas vasculares que crean tejidos que se especializan en funciones como el transporte de soluciones acuosas y apoyo mecánico; por lo tanto, las plantas primitivas no poseen lignina (Niladevi, 2009, p. 398).

La polimerización de la lignina se lleva a cabo luego de la deposición de los polisacáridos y se inicia por oxidación enzimática de los precursores a radicales fenoxi. Estos radicales libres pueden reaccionar unos con otros en una gran

variedad de formas y esto hace que la lignina no tenga una estructura única. En la Figura 1.2, se observa la polimerización al azar de unidades de radicales de alcohol sinpílico, p-cumarílico y coniferílico (Casey, 1990, pp. 76-84).

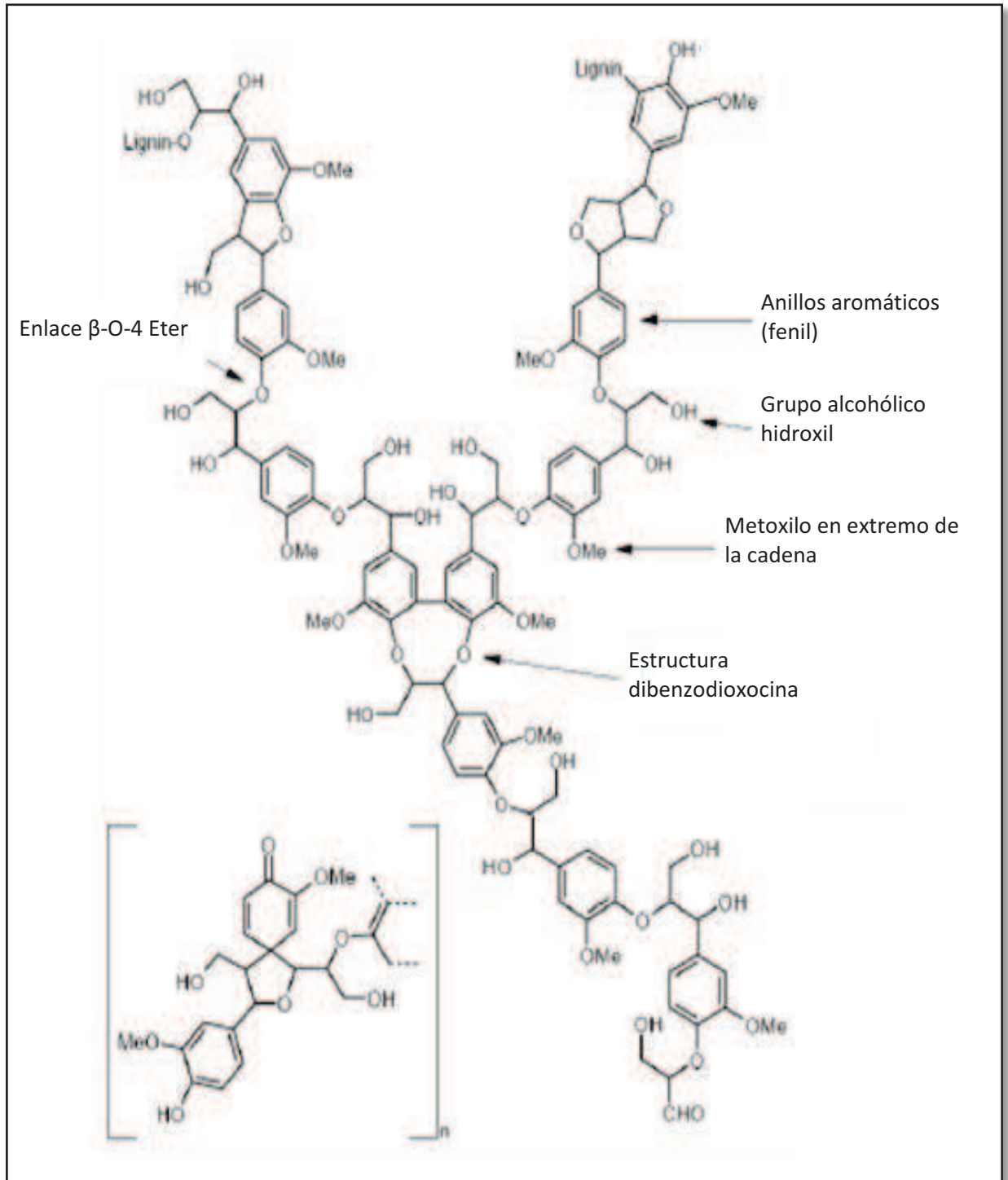


Figura 1.2. Estructura de Lignina

(Bommarius y Riebel, 2004, p. 431)

Mientras que la celulosa es una molécula lineal con cierta cristalinidad e hidrofiliidad, la lignina es un polímero con estructura ramificada tridimensional (Delfín y Durán, 2003, p. 37).

A pesar de los extensos estudios sobre la composición de la madera, la estructura molecular de la lignina no se encuentra claramente definida. Se puede decir que la lignina es un polímero polifenólico con una red ramificada tridimensional (Carrillo, 2003, p. 12; Niladevi, 2009, p. 400).

Los componentes de la lignina y carbohidratos existen en la madera estrechamente asociados. Los polisacáridos presentes en la madera forman enlaces cruzados covalentes con la lignina y dan como resultado una estructura de escalera con propiedades físicas únicas y que le atribuyen el soporte mecánico necesario a las plantas (Bommarius y Riebel, 2004, p. 432).

La compleja estructura de la lignina hace que para degradar las moléculas que la conforman, se sucedan múltiples reacciones bioquímicas, las que inician con la división de los vínculos intersticiales entre monómeros, después se dan desmetilaciones y a su vez se producen hidroxilaciones, con lo que se modifica la cadena lateral y se da la fisión del anillo aromático, seguido por la disimilación de los metabolitos alifáticos producidos. La masa molecular de la lignina es alta, se encuentra en valores aproximados a 100 kDa, esto imposibilita su absorción dentro de la célula microbiana. La degradación biológica de la lignina macromolecular se da debido a la actividad de enzimas extracelulares (Niladevi, 2009, pp. 399-400).

La degradación de la lignina por acción enzimática debido a la presencia de hongos, se inicia con una oxidación fenólica inducida por oxidasas fenólicas como son la laccasa y/o la peroxidasa. Este ataque da como resultado la polimerización, la despolimerización, la desmetilación y la formación de quinona. La degradación subsecuente ocurre por la acción de otra enzima, la celobiasa: quinona oxidoreductasa, la que requiere la celobiosa como cosustrato (Casey, 1990, p.

119). En la Figura 1.3 se ilustra las principales reacciones que se producen en la lignina debido a la acción enzimática derivada del crecimiento de hongos.

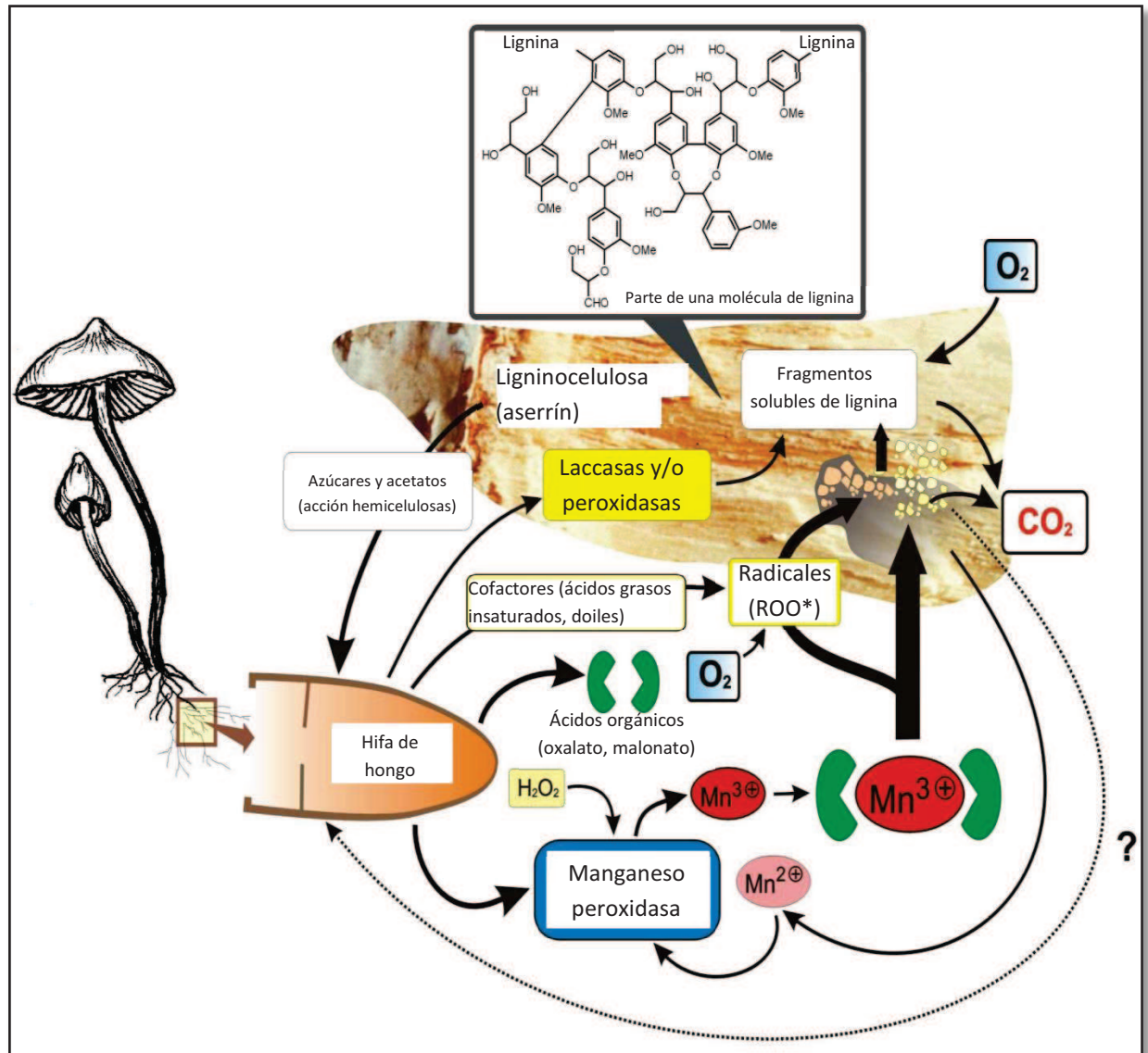


Figura 1.3. Degradación de la lignina por hongos basidiomicetos
(Hofrichter, 2000, p. 198)

1.2.2. LA CELULOSA Y SU ESTRUCTURA

La celulosa es un polisacárido lineal formado por unidades de anhidro-D-glucopiranosas enlazadas entre las posiciones 1 y 4 de las unidades adyacentes

del azúcar mediante un enlace β , como se observa en la Figura 1.4 (Carbajal y Flores, 2011, p. 2).

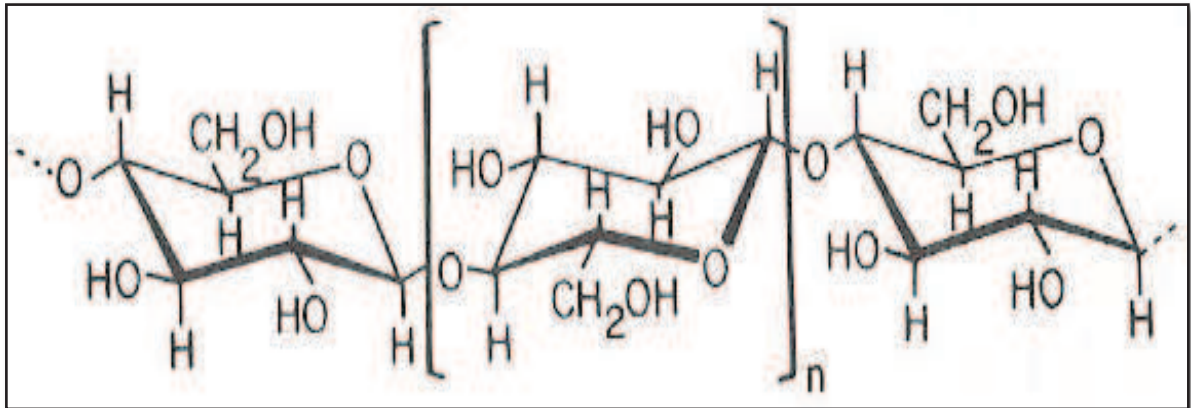


Figura 1.4. Enlace β -1,4-glucosídico de las unidades adyacentes de azúcar de la celulosa
(Casey, 1990, p. 34)

La celulosa es el componente estructural de las paredes celulares de las plantas, se encuentra en forma de fibras largas y filamentosas, llamadas microfibrillas. Las microfibrillas están en las células de la madera madura y se encuentran envueltas en una matriz compuesta principalmente de hemicelulosa y lignina. Entre las células existe una región denominada lamela intermedia la cual está compuesta por lignina y sustancias pécticas. Las microfibrillas, en combinación con los restantes materiales de la matriz, suministran rigidez y resistencia mecánica a las plantas (Álvarez, 2003, p. 5).

“La síntesis de la celulosa se produce fuera del citoplasma en la membrana y en la interfase de la pared celular” (Casey, 1990, p. 45).

La celulosa se degrada bajo diferentes circunstancias y este hecho hace posible la aplicación de un tipo de degradación según el material de interés. Es posible tener diferentes tipos de degradación como: la hidrolítica, oxidante, alcalina, térmica, microbiológica y mecánica (Carrillo, 2003, p. 13).

La degradación microbiológica de la celulosa se produce por la acción de enzimas presentes en hongos, bacterias, plantas y animales, estas enzimas causan la

descomposición hidrolítica de la celulosa y la hemicelulosa. Las enzimas que hidrolizan la celulosa se las denomina celulasas. Las celulasas catabolizan la celulosa y tienen un papel muy importante, ya que equilibran el ciclo de carbono (Carvajal y Flores, 2011, p. 3).

Las celulasas producidas por hongos tienen un gran potencial ambiental y económico. Cuando una espore de hongo germina en la madera, se produce una disolución de la pared primaria, ocasionada por hifas que segregan enzimas al penetrar en la pared celular por perforaciones o huecos presentes en la madera. Los factores más importantes que impiden la degradación enzimática de la madera suelen ser la presencia de lignina y el carácter cristalino de la celulosa (Casey, 1990, pp. 54-55).

1.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

1.3.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

A la cantidad de enzima activa presente en una preparación con base en su concentración se la conoce como actividad enzimática; la actividad enzimática expresa la cantidad de sustrato que reacciona por unidad de tiempo cuando las condiciones de la reacción están definidas (Braverman, 1990, p. 32).

Se define la unidad de actividad enzimática (UI) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de $1\mu\text{mol}$ de sustrato por minuto, bajo condiciones de reacción establecidas (Braverman, 1990, p. 32).

En algunas reacciones enzimáticas es necesaria la intervención de cofactores. Los cofactores son moléculas no proteicas relativamente pequeñas que se requieren en determinadas reacciones, para mejorar la eficiencia catalítica de las enzimas (Kirk y Farrel, 1987, p. 489).

La actividad enzimática se mide a una temperatura fija, con concentraciones saturantes tanto de los sustratos como de los cofactores, de manera que el valor represente la velocidad máxima de la reacción enzimática (Chávez, Brito, Pérez, y Delfín, 1990, p. 37).

Las enzimas exocelulares son más estables que las intracelulares porque realizan sus funciones en ambientes más hostiles. La actividad de las enzimas está constantemente amenazada por la desnaturalización provocada por factores externos como la temperatura, el pH y agentes desnaturalizantes químicos como los alcoholes y/o físicos como las radiaciones (Braverman, 1990, pp. 37-41, Chávez, Brito, Pérez, y Delfín, 1990, p. 37).

1.3.2. PEROXIDASAS

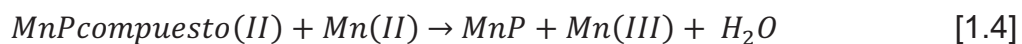
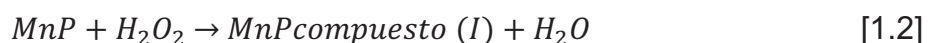
Los sistemas de degradación de la molécula de lignina son complejos sistemas enzimáticos extracelulares que involucran tres enzimas oxidativas como: la lignino peroxidasa, la manganeso peroxidasa y la laccasa (Dávila y Vásquez-Duhalt, 2006, p. 37).

1.3.2.1. Lignino peroxidasa (E.C.1.11.1.14) (LiP)

La lignino peroxidasa es una de las enzimas más comunes presentes en la degradación de la lignina. La lignino peroxidasa tiene un relativo alto potencial redox, lo cual le permite oxidar compuestos fenólicos como no fenólicos. Esta enzima actúa sobre los radicales químicos libres de la cadena de propilo para producir subestructuras de lignina y también para poder depolimerizar la lignina. El alcohol veratrílico es un sustrato excelente para la lignino peroxidasa, este es un buen mediador para la oxidación de otros compuestos, porque previene la inactivación de la enzima (Niladevi, 2009, p. 401).

1.3.2.2. Manganeso Peroxidasa (E.C.1.11.1.13) (MnP)

La manganeso peroxidasa, otra de las enzimas más importantes producidas por organismos degradadores de lignina, por lo general se produce junto a la lignino peroxidasa y laccasa. Esta es una hemo peroxidasa y necesita de H_2O_2 para su actividad. El potencial redox de esta enzima es menor que el de la lignino peroxidasa y habitualmente no oxida los compuestos no fenólicos. La manganeso peroxidasa oxida el Mn^{+2} a Mn^{+3} , que se estabiliza con la presencia de ácidos orgánicos principalmente el oxalato, malonato y quelantes. Estos ácidos facilitan la liberación del Mn^{+3} desde el sitio activo de la enzima. La reacción para pasar de Mn^{+2} a Mn^{+3} , es una reacción de pasos múltiples que se describe en las ecuaciones 1.2, 1.3 y 1.4 (Braverman, 1990, pp. 40, Niladevi, 2009, p.401).



1.3.2.3. Mecanismo de acción enzimática

Las peroxidases oxidan una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos y catalizan procesos de peroxidación según las reacciones que se muestran en la Figura 1.5.

En la Figura 1.5 se observa que el ciclo catalítico de las peroxidases comienza con la reacción entre el sitio activo de la enzima nativa y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Después de producirse esta reacción de óxido-reducción se tiene como productos peróxido de hidrógeno (H_2O_2) reducido a agua (H_2O) y un Compuesto I que se forma debido a la oxidación de dos electrones de la proteína férrica. El Compuesto I es un producto intermediario que posee dos equivalentes reductores, un centro oxiferril ($Fe^{+4} = O$) y un radical π -catiónico. Este compuesto

se reduce gracias al electrón de una molécula del sustrato reductor (AH) y se tiene como resultado un radical del sustrato (A^{\bullet}) y un Compuesto II, en el cual el radical catiónico ha sido reducido al estado nativo. Por último, el $Fe^{IV} = O$ del Compuesto II es reducido a la forma férrica (Fe^{+3}) de la enzima nativa mediante la sustracción de un electrón de una segunda molécula de sustrato reductor (Dávila y Vásquez-Duhalt, 2006, p. 30; Ruiz, 1998, p. 6).

Las peroxididasas ligninolíticas difieren en los sustratos (AH) que son oxidados por la transferencia de un electrón a los compuestos I y II. La LiP no es específica en sus sustratos reductores; mientras que la MnP es específica en sus sustratos reductores ya que solo el Mn^{+2} puede completar eficientemente su ciclo catalítico (Carrillo, 2003, p. 13).

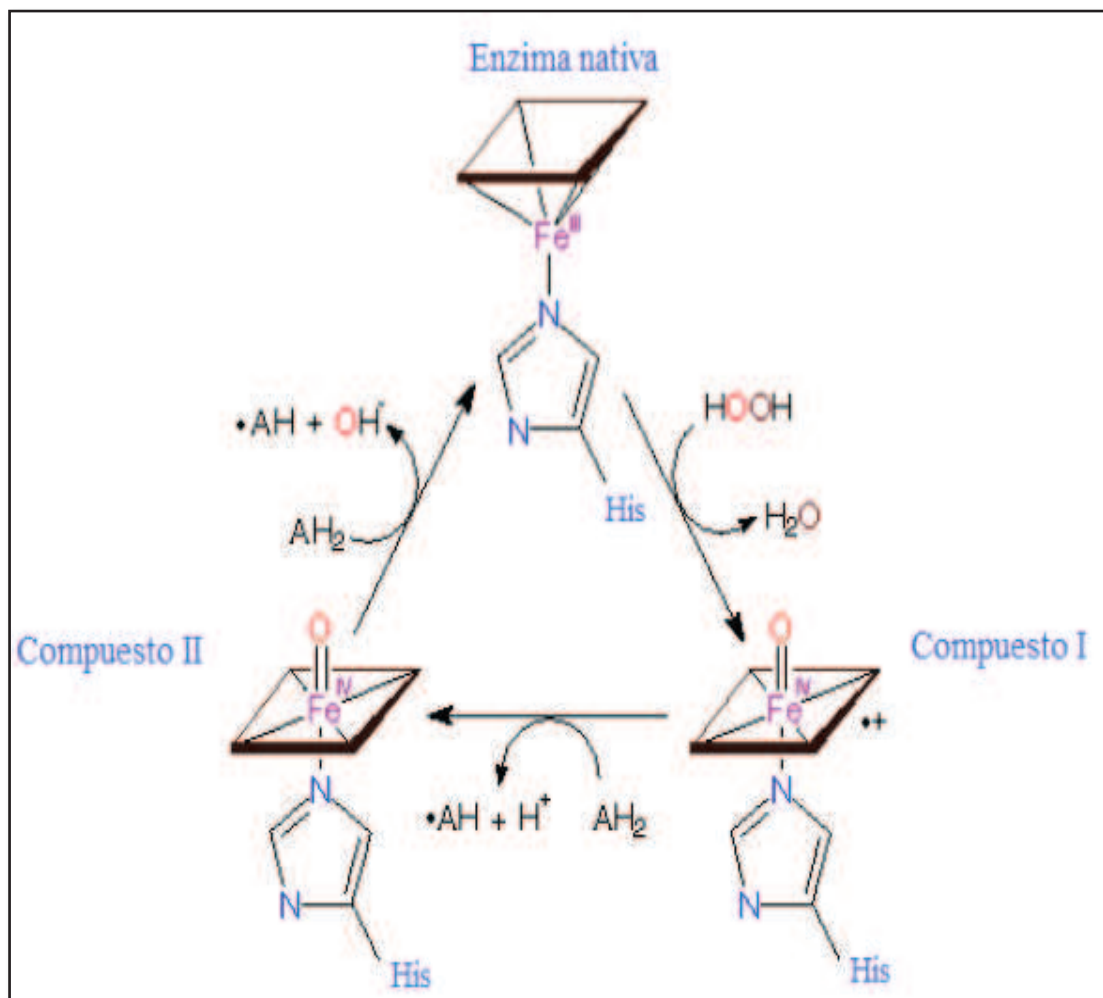


Figura 1.5. Ciclo catalítico de las peroxididasas
(Dawson, 1988, p.435)

Al ser el Mn^{+3} una especie altamente oxidante e inestable en medio acuoso, los hongos lignocelulósicos secretan ácidos dicarboxílicos, principalmente el ácido oxálico y otros ácidos como el malónico, que forman complejos estables con el Mn^{+3} capaces de difundirse a través de la pared celular vegetal y que actúan como oxidantes de compuestos fenólicos (Dávila y Vásquez-Duhalt, 2006, p. 31; Dawson, 1988, p. 435).

Las diferencias catalíticas entre LiP y MnP probablemente son debidas a la existencia de diferentes sitios de unión para el sustrato en estas enzimas homólogas (Dávila y Vásquez-Duhalt, 2006, p. 31).

1.3.3. CELULASAS

Las celulasas o enzimas celulolíticas son las terceras más importantes enzimas utilizadas en la industria. Estas enzimas se utilizan en las industrias de producción de etanol, en la industria de pulpa y papel, y en la producción de detergentes entre otros usos (Carrillo, 2003, p. 3; Shinghania, 2009, p. 372).

La enzima celulolítica es un complejo formado por tres tipos de enzimas celulolíticas que son: las celobiasas, las endoglucanasas y las exoglucanasas, las cuales actúan conjuntamente para originar productos primarios como glucosa, celobiosa y oligosacáridos (Shinghania, R; 2009; p. 373).

Las celulasas son sintetizadas por una variedad de microorganismos entre los cuales se tienen los hongos y las bacterias. Los hongos celulolíticos de mayor eficiencia son los que pertenecen al género *Trichoderma*. También existen otros hongos celulolíticos como: *Aspergillus*, *Clasdosporium*, *Penicilium* y hongos comestibles como *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea* y *Pleurotus sp* (Vilchez, 2000, p. 9).

1.3.3.1. Endoglucanasas (1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas, EC 3.2.14)

Las enzimas Endoglucanasas rompen los enlaces β -glucosídicos en el interior de las moléculas de celulosa aleatoriamente, y se generan sitios accesibles para el posterior ataque de las exoglucanasas. Después de esta acción se tiene una disminución del tamaño de las cadenas y un crecimiento módico de los grupos reductores (Béguin y Lemaire, 1996, p. 202).

1.3.3.2. Exoglucanasas

Las Exo- β -glucanasas atacan las moléculas de celulosa desde los terminales no reductores y produce subunidades de celobiosa. Atacan el extremo no reductor y subunidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado. Tienen limitada acción sobre la carboximetilcelulosa e hidroximetilcelulosa (Shinghania, 2009, p. 372; Béguin y Lemaire, 1996, p. 202).

1.3.3.3. β -glucosidasas (EC 3.2.1.21)

Las β -glucosidasas son capaces de hidrolizar celobiosa en glucosa. La glucosa es el resultado final de la acción degradante del complejo celulolítico sobre la celulosa (Vilchez, 2000, p. 7).

1.3.3.4. Mecanismo de acción enzimática

El ataque a la celulosa inicialmente se da por la endoglucanasa, esta enzima actúa en las regiones amorfas de la celulosa, se liga al azar sobre las microfibrillas, provoca la hidrólisis de los enlaces β -1,4-glucosídicos y genera múltiples sitios de ataque para la acción de las exo-1,4- β -D-glucanasas, las cuales actúan sobre los extremos no reductores de la cadena, y liberan una unidad de celobiosa. Finalmente, la β -glucosidasa junto con las endoglucanasas y

las exoglucanasas, intervienen sobre la celobiosa y los pequeños oligómeros de la celulosa y producen moléculas de glucosa. La acción de estas tres enzimas produce la degradación de la celulosa y esto se observa en la Figura 1.6 (Braverman, 1990, pp. 36-37; Montoya, 2008, p. 28).

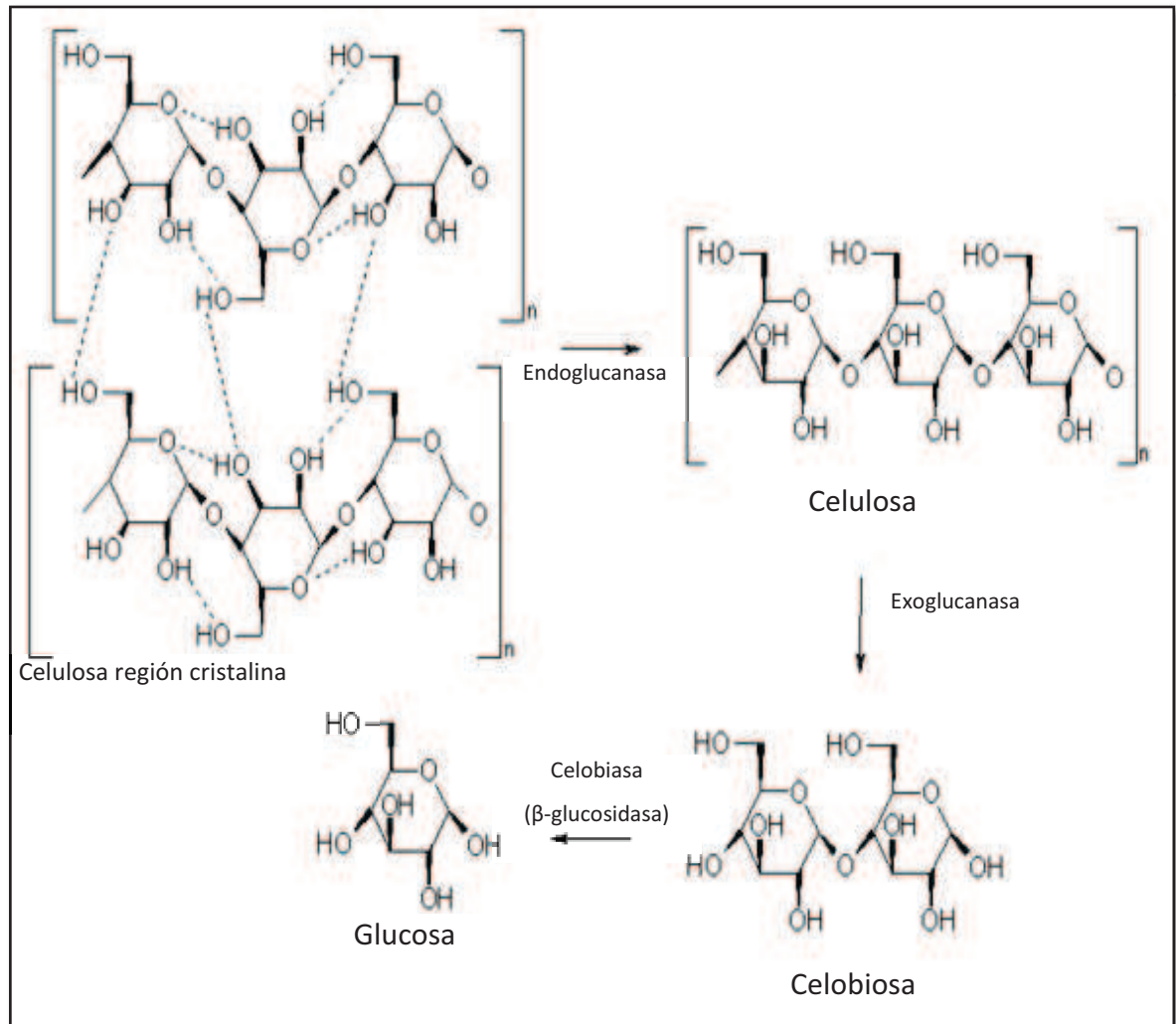


Figura 1.6. Degradación enzimática de la celulosa
(Ovando y Waliszewski, 2005, p. 114)

El modelo presentado es una simplificación de las reacciones que se dan durante la degradación biológica de la celulosa, ya que no se tiene presente las actividades oxidativas auxiliares. En los hongos de pudrición blanca se ha observado un número de actividades enzimáticas oxidativas auxiliares, las cuales no son fundamentales para la hidrólisis de la celulosa pero podrían intervenir en la degradación del polímero, al realizar transformaciones útiles como oxidaciones o

remoción de productos finales que pueden causar represión catabólica o inhibición de la actividad de los grupos principales de las enzimas celulolíticas (Markham, 1998, p. 1097).

1.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La medición de la actividad enzimática en soluciones líquidas suele hacerse con métodos de espectrofotometría de absorción para determinar la concentración del sustrato (Díaz *et al*, 2005, p. 4).

La absorbancia es la cantidad de luz que absorbe una muestra. La absorbancia es el inverso de la transmitancia. La expresión matemática que se utiliza para calcular la absorbancia se presenta en la ecuación 1.5.

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) \quad [1.5]$$

Donde P_0 es la intensidad de luz incidente y P es la intensidad de luz transmitida. La absorbancia se relaciona con la concentración a través de la Ley de Lambert y Beer, la cual se expresa en la ecuación 1.6 (Avery y Shaw, 1987, p.73; Harris, 2007, p. 411).

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad [1.6]$$

Donde:

- ε es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$)
- c es la concentración molar (M)
- l es la longitud del paso de luz a través de la muestra (cm)

El valor de ε se llama absortividad molar y es el parámetro que indica cuanta luz absorbe una sustancia a una determinada longitud de onda (Avery y Shaw, 1987, p. 73).

La Ley de Lambert y Beer es el fundamento de la espectrofotometría y es una de las ecuaciones más utilizadas en la química analítica. La ley de Lambert y Beer afirma que la absorbancia es proporcional a la concentración de la sustancia absorbente, pero esto se cumple únicamente para soluciones diluidas. Para soluciones concentradas las moléculas interactúan entre sí y cambian sus propiedades. Para medir la absorbancia se necesita de un espectrofotómetro y es válido para longitudes de onda en el rango de luz visible (400-700 nm) y en el rango de luz ultravioleta (200-400 nm) (Díaz et. al, 2005, p. 4; Harris, 2007, p. 414).

1.3.5. ESTABILIDAD DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

La temperatura es el factor más crítico para la extensión de la vida útil de las enzimas, pues la temperatura de refrigeración disminuye la velocidad de crecimiento de los microorganismos y es efectiva para reducir la actividad enzimática (King y Bolin, 1989, p.136).

Tradicionalmente los procesos de deterioro de la calidad de los alimentos almacenados bajo condiciones ambientales son de orden cero o primer orden (Taoukis, Labuza, y Saguy, 1997, p. 368).

Para describir los modelos que siguen los procesos de deterioro de soluciones enzimáticas es necesario revisar la cinética de las reacciones químicas. Para una determinada sustancia existe un período de tiempo en el cual sus características organolépticas se conservan, este período se conoce como tiempo de vida útil (Singh, 1994, p. 7).

1.3.5.1. Cinética del deterioro de los alimentos, predicción de la vida útil y tiempo de vida media

El estudio de las reacciones químicas implica el conocimiento de las constantes y de los mecanismos por los cuales una especie química se convierte en otra (Casp y Abril, 2003, p. 55; Singh, 1994, p. 8).

Si se considera la reacción química de la ecuación 1.7, se tiene:



Donde

A y B	reactantes
C y D	productos de la reacción
a, b, c, y d	coeficientes estequiométricos
k_f y k_b	constantes de velocidad

Las constantes de velocidad de reacción se pueden determinar al controlar cómo varía la concentración de cada uno de los productos.

La naturaleza compleja de algunos sistemas hace difícil determinar los mecanismos de las reacciones intermedias que llevan a un cambio en particular de la calidad. En la práctica, la degradación de los alimentos y en consecuencia la pérdida de vida útil está representada por la pérdida de los factores de calidad deseados (Q_d), o por la formación de factores de calidad indeseables (Q_i); (Saguy y Karel, 1980, p. 80) entonces la formación de Q_d y Q_i se expresan en las ecuaciones 1.8 y 1.9, así:

$$-\frac{d[Q_d]}{dt} = k[Q_i]^n \quad [1.8]$$

$$-\frac{d[Q_d]}{dt} = k'[Q_i]^n \quad [1.9]$$

Donde

$[Q_d]$ y $[Q_i]$ parámetros químicos, físicos, microbiológicos o sensoriales cuantificables de un sistema concreto
 k y k' son las constantes aparentes de velocidad de reacción
 n y n' son los órdenes aparentes de la reacción

Los órdenes y las constantes aparentes de velocidad de reacción se determinan experimentalmente, para lo que se miden las variaciones de $[Q_d]$ y $[Q_i]$ con respecto al tiempo (Casp y Abril, 2003, p. 57; Singh, 1994, p. 10).

Para analizar un atributo Q se utiliza la ecuación 1.10:

$$\pm \frac{dQ}{dt} = kQ^n \quad [1.10]$$

Donde \pm se refiere al incremento o disminución del valor del atributo Q, k es la pseudo constante de velocidad de reacción cuando esta se desplaza a la derecha y n es el orden aparente de esta reacción. Se asume que los factores ambientales tales como temperatura, humedad y luz así como las concentraciones de los otros componentes permanecen constantes (Taoukis, 1997, p. 369).

Si el atributo disminuye con el tiempo la ecuación 1.10 se expresa como se muestra en la ecuación 1.11.

$$-\frac{dQ}{dt} = kQ^n \quad [1.11]$$

Un concepto que permite determinar la estabilidad de compuestos enzimáticos es el tiempo de vida media. El tiempo de vida media de una enzima está definido como el tiempo necesario para que una enzima pierda la mitad de su actividad inicial. El tiempo de vida media suele expresarse mediante la ecuación 1.12 (Sadana, 1991, p. 204).

$$t_{50} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad [1.12]$$

Donde :

k_d constante de la reacción

1.3.5.2. Reacción de orden cero

Se considera Q como un atributo de calidad que disminuye de forma lineal durante el periodo de almacenamiento (Labuza y Riboh, 1982, p. 68; Taoukis, 1997, p. 369).

Una disminución lineal del atributo implica que su variación con respecto al tiempo es constante, entonces la pérdida de dicho atributo no depende de su concentración. La relación lineal entre atributo y tiempo se obtiene cuando la reacción es de orden cero, por lo tanto si en la ecuación 1.11 $n = 0$, se tiene la ecuación 1.13:

$$-\frac{dQ}{dt} = k \quad [1.13]$$

Al integrar la ecuación 1.13 se tiene la ecuación 1.14:

$$Q = Q_0 - kt_u \quad [1.14]$$

Donde

Q_0 Valor inicial del atributo de calidad

Q Valor que toma dicho atributo después de transcurrido el tiempo t.

El final de la vida útil (t_u), se alcanza cuando el atributo de calidad toma un cierto valor, llamado Q_f , el cual se tiene en la ecuación 1.15:

$$Q_f = Q_0 - kt_u \quad [1.15]$$

Y la vida útil quedará expresada como se muestra en la ecuación 1.16:

$$t_u = \frac{Q_0 - Q_f}{k} \quad [1.16]$$

La ecuación 1.13 de orden cero es útil en la descripción de procesos como la degradación enzimática, el pardeamiento enzimático y la oxidación de lípidos (Casp y Abril, 2003, p. 57).

1.3.5.3. Reacción de primer orden

Cuando el atributo es dependiente de la concentración inicial del mismo, presentará una disminución de forma exponencial con el tiempo, entonces a medida que el tiempo avanza y la calidad el atributo disminuye, la velocidad de reacción es cada vez menor. La relación exponencial entre el atributo de calidad y el tiempo se puede representar con una ecuación de primer orden, $n=1$, donde la ecuación 1.11 queda representada por la ecuación 1.17 (Labuza y Riboh, 1982, p. 69; Singh, 1994, p. 8).

$$-\frac{dQ}{dt} = kQ \quad [1.17]$$

Al integrar la ecuación 1.17 se tiene la ecuación 1.18

$$\ln \frac{Q}{Q_0} = -kt \quad [1.18]$$

Donde

Q Cantidad de atributo que queda en el tiempo (t).

Y si se expresa la ecuación 1.18 de forma lineal se tiene la ecuación 1.19.

$$\ln Q = \ln Q_0 - kt \quad [1.19]$$

La ecuación 1.11 expresada de manera exponencial queda como se describe en la ecuación 1.20:

$$Q = Q_0 e^{-kt} \quad [1.20]$$

El final de la vida útil se alcanzará cuando el atributo de calidad tome el valor de Q_f , por lo que se tiene la ecuación 1.21:

$$\ln Q_f = \ln Q_0 - kt_u \quad [1.21]$$

$$t_u = \frac{\ln Q_0 - \ln Q_f}{k} \quad [1.22]$$

Los fenómenos que se representan por medio de reacciones de primer orden son la pérdida de vitaminas, proteínas y el crecimiento microbiano (Casp y Abril, 2003, p. 59).

1.3.5.4. Dependencia de las constantes de velocidad (k) con la temperatura

Un modelo cinético completo de pérdida de vida útil debe considerar la cantidad inicial de la sustancia y las condiciones ambientales en las que se conserva. Dentro del modelo cinético se deben incluir aquellos factores ambientales que afecten forzosamente a las constantes de velocidad de reacción y que sean más susceptibles de sufrir variaciones durante la vida útil de las enzimas. Los principales factores ambientales que inciden sobre la conservación de alimentos y otras sustancias son la temperatura, la humedad relativa, presión, luz. Debido a que la temperatura afecta significativamente las constantes de velocidad de las reacciones, esta es la variable que se incluye en los modelos matemáticos para el cálculo de la vida útil (Saguy y Karel, 1980, p. 81; Taoukis, 1997, p. 369).

De la representación gráfica de la variación de un atributo con respecto al tiempo a diferentes temperaturas se puede obtener el valor de las constantes de velocidad de reacción para cada temperatura a través de la ecuación 1.23, que corresponde a la ecuación desarrollada por Svante Arrhenius.

$$k = k_0 \exp \left[-\frac{E_A}{RT} \right] \quad [1.23]$$

Donde:

k_0 = factor pre-exponencial

E_A = energía de activación ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

R = constante de los gases perfectos ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)

T = temperatura en la escala absoluta ($^{\circ}\text{K}$)

La energía de activación es la mínima energía que deben poseer las moléculas antes de que se dé la reacción y el término exponencial es la fracción de moléculas que poseen energía mínima.

Al expresar la ecuación 1.23 de forma logarítmica, se tiene la ecuación 1.24.

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_A}{R} \frac{1}{T} \quad [1.24]$$

De la ecuación 1.24 se tiene una relación lineal entre la constante de velocidad y la inversa de la temperatura absoluta.

1.4. BIOTECNOLOGÍA DE DESECHOS LIGNOCELULÓSICOS

Los materiales lignocelulósicos son los compuestos más abundantes en la biosfera (Shoji y Kitamoto, 1997, p. 466).

Los principales desechos lignocelulósicos son los sustratos leñosos, como la madera dura y blanda, los residuos agrícolas como la paja, las cáscaras de semillas, rastrojos que en su mayoría provienen del cultivo y procesamiento de cereales como el arroz, la cebada, el trigo, el maíz. También provienen del procesamiento de legumbres, frutas, obtención de aceites y residuos alimenticios caseros (Chandel y Singh, 2010, p. 1298).

La lignocelulosa está presente en la mayoría de plantas y está compuesta de tres biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. La estructura compleja y difícil de la lignocelulosa disminuye la disponibilidad de este material como materia prima para diferentes usos comerciales (Shoji y Kitamoto, 1997, p. 466). La bioconversión de residuos orgánicos produce un gran impacto ambiental porque se elimina la acumulación de basura.

1.4.1. ENZIMAS COMO PRODUCTOS POTENCIALES Y SUS APLICACIONES

Los hongos son los primeros agentes de desintegración del material orgánico, pues degradan la pared celular de las plantas y de esta manera se obtiene la biomasa rica en proteínas para consumo humano y animal, y para aplicaciones en biorremediación ambiental (Gaitán, Esqueda, Gutiérrez, Sánchez y Mata, 2005, p. 435).

Los hongos secretan una o más de tres enzimas extracelulares como: lignino peroxidasa (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) y laccasa (EC 1.10.3.2). Estas enzimas ligninocelulolíticas de los basidiomicetos son de gran importancia para el mejoramiento de la eficiencia de la bioconversión de desechos residuales e intervienen en una gran variedad de aplicaciones tecnológicas. La aplicación de enzimas ligninocelulolíticas en la industria y el ambiente, requiere cantidades considerables de enzimas a un bajo costo (Kamm y Kamm, 2006, p. 185; Niladevi, 2009, p. 398).

Las enzimas degradadoras de lignina se han utilizado para combatir la contaminación de los efluentes industriales, producida por compuestos como tintes, fenoles y demás sustancias cenobíticas. El rol de estas enzimas en los textiles es actuar sobre la decoloración de las tintas y la degradación de compuestos fenólicos y no fenólicos. En la industria del papel se requieren estas enzimas para que descompongan y degraden la lignina presente en la pulpa de madera. Las enzimas ligninolíticas tienen también su aplicación en la

estabilización del vino y jugo de frutas, en la industria cosmética y biosensores (Niladevi, 2009, p. 398).

Las celulasas son las enzimas más comercializadas después de las enzimas de amilasa y proteasas. Sus principales aplicaciones comerciales son en la industria de los detergentes, de los textiles, en pulpa y papel y en la producción de biocombustibles (Kamm y Kamm, 2006, p. 186; Singhanía, 2009, pp. 377-378).

La producción de etanol a partir de biomasa con contenido ligninocelulósico está estudiándose como una de las más importantes tecnologías sustentables para producir combustibles renovables (Singhanía, 2009, pp. 378).

1.4.2. LOS MICROORGANISMOS Y LA GENERACIÓN DE ENZIMAS LIGNINO CELULOLÍTICAS

La aplicación biotecnológica de microorganismos u organismos saprofitos ha llegado a ser cada vez más y más importante, tanto para los propósitos alimenticios, industriales, como para el tratamiento y transformación de materiales orgánicos de desechos ricos en materia orgánica que son muy resistentes a la degradación natural y no tienen un valor nutritivo (López, 1986, p. 52).

Los materiales lignocelulósicos son los principales sustratos para la producción de hongos. La mayoría de los hongos excretan enzimas que pueden descomponer compuestos celulósicos en glucosa, y utilizar la glucosa como fuente de carbono para su desarrollo. Los hongos basidiomicetos producen celulasas cuando se cultivan en óptimas condiciones. La generación de la enzima laccasa se da durante el proceso de colonización y disminuye cuando comienza la fructificación. La producción de la enzima endocelulasa está directamente relacionada con las cosechas. La lignina es altamente resistente a la biodegradación, pero los hongos de pudrición blanca logran una eficaz degradación de la lignina, presente en los sustratos (Shoji, y Kitamoto, 1997, p. 467).

Dependiendo de las enzimas involucradas en el proceso de pudrición, los hongos pueden ser Lignívoros, si degradan la Lignina a través de enzimas llamadas genéricamente Ligninasas, que ocasionan una pudrición del tipo “Blanca”, o pueden ser Celulolíticos, si degradan Celulosa con la ayuda de un conjunto de enzimas conocidas como Celulasas, y que dan una pudrición del tipo Café (Silva et. al, 2010, p. 19).

El *Lentinus edodes* es un tipo de hongo de pudrición blanca que es capaz de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. OBJETIVOS

- a) Determinar el perfil de actividad celulolítica durante el proceso de fermentación del aserrín por el hongo *Lentinus edodes*.
- b) Determinar el perfil de actividad ligninoperoxidásica durante el proceso de fermentación del aserrín por el hongo *Lentinus edodes*.
- c) Determinar el perfil de actividad manganoperoxidásica durante el proceso de fermentación del aserrín por el hongo *Lentinus edodes*.
- d) Evaluar la estabilidad de los extractos enzimáticos.

2.2. MATERIALES

Se utilizó una cepa de *Lentinus edodes* proporcionada por el Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional.

El trigo utilizado fue trigo seco sin cáscara, el cual se adquirió en el mercado de Santa Clara de la ciudad de Quito.

El aserrín de maderas tropicales utilizado, fue un producto de desecho de la producción de tableros de madera que fabrica la empresa ENDESA-BOTROSA.

Para el desarrollo de los hongos en el aserrín se utilizaron dos cámaras ubicadas en el segundo piso del Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional.

En la Tabla 2.1 se muestran los materiales utilizados para el desarrollo de la parte experimental de este proyecto.

Tabla 2.1. Materiales utilizados para el desarrollo de la parte experimental

Material	Cantidad	Capacidad
Vasos de precipitación	15	50 mL
	2	100 mL
	2	500 mL
	4	1 000 mL
Embudo Buchner	1	---
Kitasato	1	250 mL
Tubos de vidrio con tapa rosca	45	10 mL
Tubos plásticos para centrífuga	12	10 mL
Balones de vidrio aforados	3	1 000 mL
	2	500 mL
	5	250 mL
	5	100 mL
	2	50 mL
Embudos	6	---
Gradillas	3	72 tubos
Termómetros	3	0-130 °C
Frascos de vidrio con tapa	40	250 mL
Celda de vidrio	1	4 mL
Celda de vidrio	1	1 mL
Celda de cuarzo	1	4 mL
Papel filtro	---	---

En la Tabla 2.2 se muestran los equipos utilizados para el desarrollo de la parte experimental de este proyecto. Los medios de cultivo (Malta agar, Plate count agar) y los reactivos utilizados con sus respectivas marcas se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.2. Equipos utilizados para el desarrollo de la parte experimental

Equipo	Marca	Modelo	Capacidad	Sensibilidad
Agitador con calentamiento	BI Barnstead/Thermolyne	CIMABEC	1200 rpm - 540°C	100 rpm - 1°C
Autoclave	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO.		75 L	
Balanza	OHAUS	Scout	200 g	0,001 g
	OHAUS	Trooper	6 kg	0,001 g
	TAWANKA	TWP	20 kg	0,1 g
Balanza analítica	Boeco Germany		200 g	0,1 mg
Baño María	Cole Parmer Polysad	1200-00 Circulator	90 °C	0,1 °C
	Julabo	SW22	99,9 °C	0,1 °C
Bomba de vacío	MRC	CVP-14	- 760 mmHg	25 mmHg
Calderín	Sussman	MB9L		
Cámara de Flujo Laminar	Laminar Cabina flow 85 H Flujo horizontal	10C IFV Industries	250 L	
Centrífuga	THERMO	IEC HN SII	9 000 rpm	2 rpm
Computador	ARI			
Datalogger	OAKTON	RH/TempoLog	100 %RH - 50°C	0,1 %RH - 0,1 °C
Espectrofotómetro	Labomed. Inc. Double Beam	UVD 3500		0,001
Incubadora	Boekel Industries INC.	132000	100 °C - 10 L	5 °C
	W.C. Heraeus	Heraeus GMBH	250 °C - 10 L	10 °C
	MMMGrap	Ecocell	310 °C - 111 L	0,1 °C
pH metro	HANNA	pHep		0,1
Refrigeradora	General electric	Smart Fresh		
	DUREX			
	Kelvinator			
Termohigrómetro	EXTECH	RH520A	100 %RH - 60°C	0,1 %RH - 0,1 °C
Termómetro de temperatura máxima y mínima	Taylor		40-50 °C	2 °C
	Braman		40-50 °C	2 °C
Shaker	NEW BRUNSWICK N.J.	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC N.B.S.	600 rpm	5 rpm
Micropipetas	Fine Care Corporation	Accumax	10-100 µl	0,1 µl
	Labonet	BioPette	100-1000 µl	2 µl
Ventilador	Capital	CVF-20 JAPAN		

Tabla 2.3. Reactivos utilizados para el desarrollo de la parte experimental

Reactivo	Marca	Pureza
Acetato de Sodio	Merk	Analítico-99%
Ácido Acético	Riel De Haen ag seelza Hannover	Analítico-99%
Ácido Cítrico	J.T. Baker Inc	Técnico-99%
Ácido Tartárico	BDH Laboratories	Analítico-99%
Agua Oxigenada	Merk	Analítico-30%
Albúmina	J.T. Baker Inc	Técnico
Alcohol veratrílico	Aldrich	Analítico-99%
Bisulfito de Sodio	Fisher Scientific	Analítico-99%
Carboximetilcelulosa	HiMedia Laboratories	Técnico-67%
DNS	Sigma	Analítico-99%
Fenol	BDH Laboratories	Analítico-99%
Hidróxido de Sodio	Merk	Analítico-99%
Malta Agar	Difco TM	Analítico
Plate Count Agar	Difco TM	Analítico
Tartrato de Sodio	Sigma	Analítico-99%
Tartrato de Sodio y Potasio	Fisher Scientific	Analítico-99%

2.3. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

Para la determinación de los perfiles de actividad enzimática celulolítica, ligninolítica y manganeso peroxidásica durante el proceso de fermentación del aserrín por el hongo *Lentinus edodes*, se realizó la replicación del hongo *Lentinus edodes* en tubos de ensayo, cajas petri y frascos de vidrio, hasta que se obtuvo la cantidad suficiente de inóculo para cada corrida. Para cada corrida se emplearon aproximadamente 20 frascos de trigo con inóculo y se inocularon 140 fundas plásticas con aserrín de maderas tropicales. Se realizaron tres corridas. El proceso de fermentación se llevó a cabo en dos cámaras, la cámara oscura sirvió para el desarrollo del micelio y la cámara clara-oscura sirvió para el desarrollo de

la etapa de fructificación hasta la cosecha. En cada corrida se dividieron las fundas en dos grupos en los días cercanos al proceso de inducción. El grupo 1 correspondió a aquellas fundas que fructificaron primero y el grupo 2 correspondió a las fundas que tardaron más tiempo en fructificar. Durante todo el proceso de fermentación desde el día de la inoculación hasta la cosecha, se muestrearon al azar dos fundas por día, dos veces por semana para obtener los extractos enzimáticos y determinar la actividad de las enzimas de la celulasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, por métodos espectrofotométricos.

Para evaluar la estabilidad de los extractos enzimáticos se elaboró una muestra compuesta de los extractos con actividad enzimática, la cual se obtuvo en los días de mayor actividad enzimática, y se distribuyó esta muestra en porciones iguales en tubos de vidrio con tapa rosca. Los tubos se almacenaron a tres temperaturas diferentes, las cuales fueron temperatura ambiente promedio (15,5 °C), temperatura de refrigeración (3 °C) y temperatura de congelación (- 14 °C). El almacenamiento se realizó por 30 días y cada dos días se realizó la determinación de las actividades enzimáticas.

2.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL ASERRÍN

Se determinó el contenido de celulosa, lignina, resinas, ceras y grasas del aserrín utilizado en la fermentación. Se analizaron 4 muestras de aserrín correspondientes a la muestra original, el aserrín fermentado de la primera cosecha del hongo *Lentinus edodes* para el grupo 1, el aserrín fermentado de segunda cosecha del hongo para el grupo 1 y el aserrín fermentado después de la primera cosecha del hongo del grupo 2. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional. Se siguió la metodología descrita en el Manual sobre la Fabricación de Pulpa y Papel de Grant y las normas TAPPI. Los procedimientos de las normas utilizadas se describen en los anexos I, II y III respectivamente.

2.5. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DEL HONGO *Lentinus edodes* (Shiitake)

Para la preparación del inóculo del hongo *Lentinus edodes* se siguieron tres pasos principales, que fueron: el cultivo en tubos de ensayo, la duplicación en cajas Petri y el cultivo en frascos de vidrio.

En tubos de ensayo, el desarrollo del hongo *Lentinus edodes* se realizó con Malta Agar como medio de cultivo. Estos tubos con un aproximado de 10 mL de Malta Agar y hongo inoculado en estría, se colocaron en la estufa durante 20 días a 28 °C hasta que el micelio cubrió en su totalidad la superficie del medio.

La duplicación en cajas Petri se realizó una vez que el microorganismo cubrió todo el medio de cultivo de los tubos, se utilizó malta agar como medio de cultivo. Las cajas petri inoculadas se llevaron a una estufa en la cual se dejó por 30 días a 28 °C, hasta que el micelio cubra todo el medio de la caja (Carrión, 2000, p. 48).

Para el cultivo del hongo *Lentinus edodes* en los frascos, se prepararon frascos de vidrio de una capacidad de 250 mL, en los que se colocó 110 g de trigo seco y 132 mL de agua cumpliendo así con una relación 1:1,2. Se taparon y esterilizaron en el autoclave a 121 °C por 20 minutos. Se sacaron los frascos del autoclave, se ajustaron las tapas, se agitaron para distribuir el trigo y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en la cámara de flujo laminar, la cual fue previamente limpiada, secada y esterilizada (Carrión, 2000, p. 48).

Cuando los frascos alcanzaron una temperatura aproximada de 30 °C, se inoculó cada uno con una porción equivalente a la mitad del micelio de una caja petri, para lo cual se dividió al agar de la caja Petri con *Lentinus edodes* en cuatro partes iguales, se seleccionó dos de estas partes y con ayuda de un aza estéril se colocó los pedazos dentro del frasco de tal manera que el hongo esté en contacto con el trigo. Se taparon sin ajustar completamente la tapa, permitiendo así la entrada de aire. Los frascos se llevaron a una estufa en la cual permanecieron por

30 días a 28 °C, hasta que el micelio cubrió todos los granos de trigo. Estos fueron los inóculos con los que se realizó la siembra en las fundas.

En la Figura 2.1 se esquematiza el proceso de desarrollo del hongo *Lentinus edodes* en los tubos de ensayo, en las cajas petri y en los frascos de vidrio.

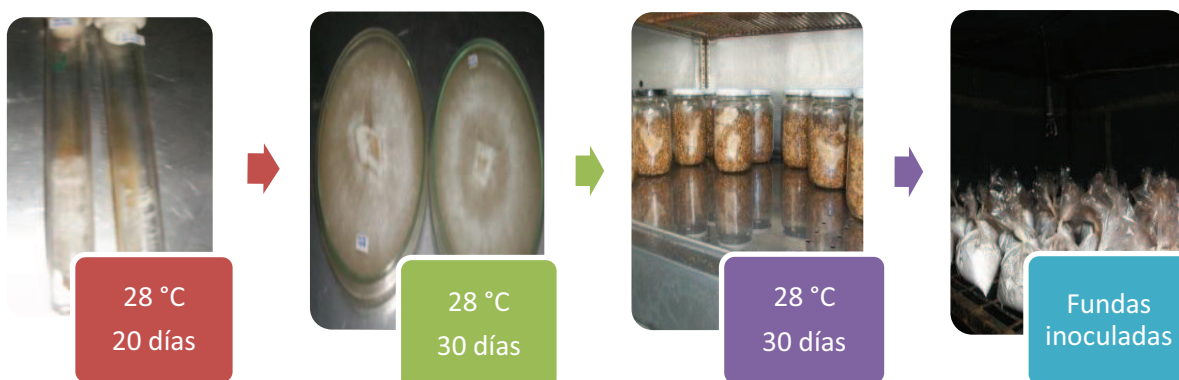


Figura 2.1. Proceso de crecimiento del hongo *Lentinus edodes* en tubos, cajas Petri y frascos de vidrio

Las fases de desarrollo del hongo *Lentinus edodes* desde el crecimiento en tubos hasta la obtención del inóculo para la siembra en fundas se pueden observar en el Anexo IV.

2.6. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO DE ASERRÍN E INOCULACIÓN DEL HONGO *Lentinus edodes*

El sustrato que se utilizó fue aserrín de maderas tropicales obtenido de la empresa Endesa-Botrosa. Se pesaron 4 costales con aproximadamente 3 kg de aserrín en cada saco y se colocaron, en 2 autoclaves. Se llevaron a ebullición en agua a 90 °C durante 4 horas, pasado este tiempo se escurrió el exceso de agua de los sacos, hasta que ya no se observó goteo y se dejaron enfriar al ambiente. El aserrín se colocó sobre una mesa de acero inoxidable, la cual fue previamente limpiada, secada y desinfectada.

Cuando el aserrín alcanzó aproximadamente 30 °C, fue introducido en las fundas junto con el inóculo del hongo. En las fundas se introdujeron de manera aleatoria el aserrín y el inóculo del hongo, hasta obtener un peso total de 300 gramos y una relación de 15% en peso de inóculo. Se utilizaron fundas plásticas de 17,78 × 25,40 cm (7 × 10 pulgadas). Las fundas se cerraron con cinta adhesiva. En cada corrida se inocularon alrededor de 140 fundas.

2.6.1. DESARROLLO DEL MICELIO

Las fundas inoculadas se llevaron a la cámara oscura donde estuvieron cerradas hasta el tercer día después de la siembra, en este día con la ayuda de un bisturí estéril se realizaron dos perforaciones de 2×2 cm en la parte superior de cada funda, una a cada lado. La aireación y humidificación de la cámara se realizó desde el primer día de estancia de las fundas en la cámara oscura. Para mantener la humedad sobre el 80% y una temperatura entre 16 y 20 °C, se regó la cámara durante 3 minutos, por 2 ocasiones al día. La aireación se realizó al mismo tiempo que el riego, para esto se encendieron los ventiladores por 5 minutos dos veces al día (Barba, 1998, p. 57).

Las fundas permanecieron en la cámara oscura hasta que el micelio se desarrolló por completo, cubrió todo el aserrín, se dio la inducción y aparecieron los primeros primordios. Las fundas que presentaron contaminaciones fueron retiradas de la cámara, esterilizadas y descartadas.

2.6.1.1. Inducción

Una vez que el micelio cubrió por completo el sustrato se retiró la funda plástica para favorecer el crecimiento de los cuerpos fructíferos. Una vez que fueron removidas las fundas plásticas se sumergieron los bloques en agua durante dos días (Barba, 1998, p. 57).

Para este procedimiento conocido como inducción, se utilizaron bandejas plásticas previamente desinfectadas, que contenían agua a temperatura ambiente hasta una altura aproximada de 5 cm.

El proceso de inducción también se realizó después de la primera cosecha, para inducir la aparición de nuevos primordios.

2.6.1.2. División de las fundas

Debido a que el crecimiento del hongo en las fundas fue disparejo, se dividió las fundas en dos grupos de acuerdo al crecimiento presentado en cada una de ellas.

La división de las fundas se realizó en los días cercanos al proceso de inducción, debido a que en este período de tiempo fue más fácil identificar la adaptación y crecimiento del hongo. El parámetro que se utilizó para realizar la división fue la presencia o ausencia de pequeñas protuberancias blancas, las cuales dieron origen a los primordios.

El grupo 1 de fundas estuvo formado por aquellas fundas que antes del proceso de inducción de cada corrida presentaron protuberancias blancas, y el grupo 2 estuvo formado por las fundas en las que no se observó presencia de dichas protuberancias al mismo tiempo; si no días después.

El grupo 1 de fundas, las fundas con protuberancias blancas, luego del proceso de inducción se llevaron a la cámara clara-oscura; mientras que las fundas del grupo 2, permanecieron en la cámara oscura bajo las mismas condiciones de aireación y riego, hasta que presentaron las protuberancias blancas y se siguió el mismo procedimiento descrito para las fundas del grupo 1.

2.6.1.3. Descripción de las cámaras

En la Figura 2.2 se observa el esquema de las cámaras en las que se realizó el proceso de fermentación del aserrín con el hongo *Lentinus edodes*. Las cámaras estuvieron provistas de un ventilador y tres aspersores en cada una. La cámara oscura consistió en un cuarto ubicado en un lugar oscuro y además estaba cubierta por un plástico negro que no permitió el ingreso de la luz solar al interior de la cámara. La cámara clara-oscura consistió en un cuarto ubicado en una zona donde existía acceso a la luz solar y estuvo cubierta por un plástico transparente que permitió el ingreso de la luz.



Figura 2.2. Esquema de las cámaras donde se realizó el proceso de fermentación

Además para controlar la temperatura y la humedad, en cada cámara se contó con un termómetro de máxima y mínima, y con un higrómetro electrónico (Datalogger).

2.6.2. FRUCTIFICACIÓN

Las fundas con los primordios se llevaron a la cámara clara-oscuro, para con la presencia de la luz solar, promover el crecimiento de los cuerpos fructíferos y obtener el hongo. Se continuó con el riego y la aireación diaria, para mantener condiciones de humedad superior al 80% y temperatura entre 16 y 20 °C.

Las fases de desarrollo del hongo *Lentinus edodes* desde la siembra en fundas hasta las cosechas se pueden observar en el Anexo V.

2.6.3. MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

Cada corrida de fermentación se dividió en dos grupos en función del desarrollo del micelio. El primer grupo correspondió a todas las fundas que presentaron primordios entre los días 17 y 25 según la corrida analizada. El segundo grupo correspondió a aquellas fundas que presentaron primordios entre los días 40 y 55 según el número de corrida de fermentación analizado.

Para cada grupo en cada corrida, desde el inicio del periodo de fermentación (siembra en fundas), hasta las cosechas de los hongos se muestrearon 2 fundas diarias, 2 veces por semana. Se escogieron las fundas al azar, y se homogenizó su contenido. Para la determinación de cada actividad enzimática se pesaron 45 g de sustrato fermentado homogenizado y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 75 mL de la solución buffer correspondiente a cada ensayo. Se colocaron los erlenmeyers en el shaker por 30 minutos, el contenido de cada erlenmeyer se filtró al vacío y se centrifugó a una velocidad de 1350×g. En el extracto obtenido se determinaron las actividades enzimáticas.

Para determinar la absorbancia de los extractos se realizó una paralela para cada ensayo de determinación de las actividades celulolítica, ligninoperoxidásica y manganeso peroxidásica, es decir se obtuvo en total dos datos de absorbancia para cada actividad por día de ensayo.

A partir de los datos promedio de absorbancia obtenidos para cada extracto, se calcularon las actividades enzimáticas y se expresaron en Unidades Internacionales. La fórmula que se utilizó para el cálculo de la actividad enzimática corresponde a la ecuación 2.1 que se describió en el primer capítulo de este trabajo.

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad [2.1]$$

Los datos de absorbancia medidos para los extractos con actividad enzimática celulolítica, ligninoperoxidásica y manganeso peroxidásica para las tres corridas de fermentación se presentan en el Anexo VI.

2.6.4. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA BIOLÓGICA DEL *Lentinus edodes*

Para la determinación de la eficiencia biológica se utilizó el valor del porcentaje de humedad del aserrín de maderas tropicales luego de la esterilización. Para determinar el porcentaje de humedad del aserrín utilizado, se siguió el procedimiento descrito en el Anexo VII.

Adicionalmente se pesaron los cuerpos fructíferos del hongo *Lentinus edodes* que se cosecharon en cada corrida de fermentación y se empleó la ecuación 2.2.

$$Eficiencia\ Biológica = \frac{Peso\ total\ de\ hongos\ frescos}{Peso\ del\ sustrato\ seco} \times 100 \quad [2.2]$$

La eficiencia biológica se expresó en porcentaje y representa el peso del hongo fresco en gramos sobre el peso de aserrín seco.

2.7. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA FERMENTACIÓN DE ASERRÍN

La actividad celulolítica se determinó según el método de Miller (Ghose, 1987, p. 259). Se utilizó como sustrato una solución de Carboximetilcelulosa al 2% en buffer de citrato de sodio 0,05 M y pH de 4,8. Sobre 5 mL de esta solución, se agregó 0,5 mL de extracto enzimático en un tubo de ensayo de 25 mL de capacidad y se colocó en un baño María a 50 °C, durante 30 minutos. Se agregó 3,0 mL de reactivo DNS y se colocaron tanto el blanco de reactivos, como el blanco de muestra y las muestras de extractos en agua hirviendo por 5 minutos. Para detener la reacción se enfriaron los tubos colocándolos bajo agua fría. Se agregaron 20 mL de agua destilada y se mezcló el reaccionante con el agua destilada.

Para preparar el blanco de reactivos se sustituyeron 0,5 mL de extracto enzimático por 0,5 mL de solución buffer de citrato de sodio 0,05 M (pH 4,8). Para corregir los azúcares presentes en el extracto enzimático y preparar las muestras de blanco de muestra, después de agregar DNS se agregó el extracto enzimático.

De todas las muestras y sus respectivos blancos, más el blanco de reactivos, se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. La concentración de azúcares reductores se calculó mediante la ecuación de regresión, cuyos datos se obtuvieron de una curva patrón con D-glucosa anhidra. El método de obtención de la curva de calibración y los datos de la curva se presentan en el Anexo VIII.

La actividad enzimática se reportó en Unidades Internacionales (UI), la UI se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones de la reacción. Para cada corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes* la actividad se expresó en UI por gramos de materia seca ($\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ MS).

El proceso de determinación del perfil de actividad celulolítica de los extractos, descrito en los párrafos anteriores, se observa en la Figura 2.3.

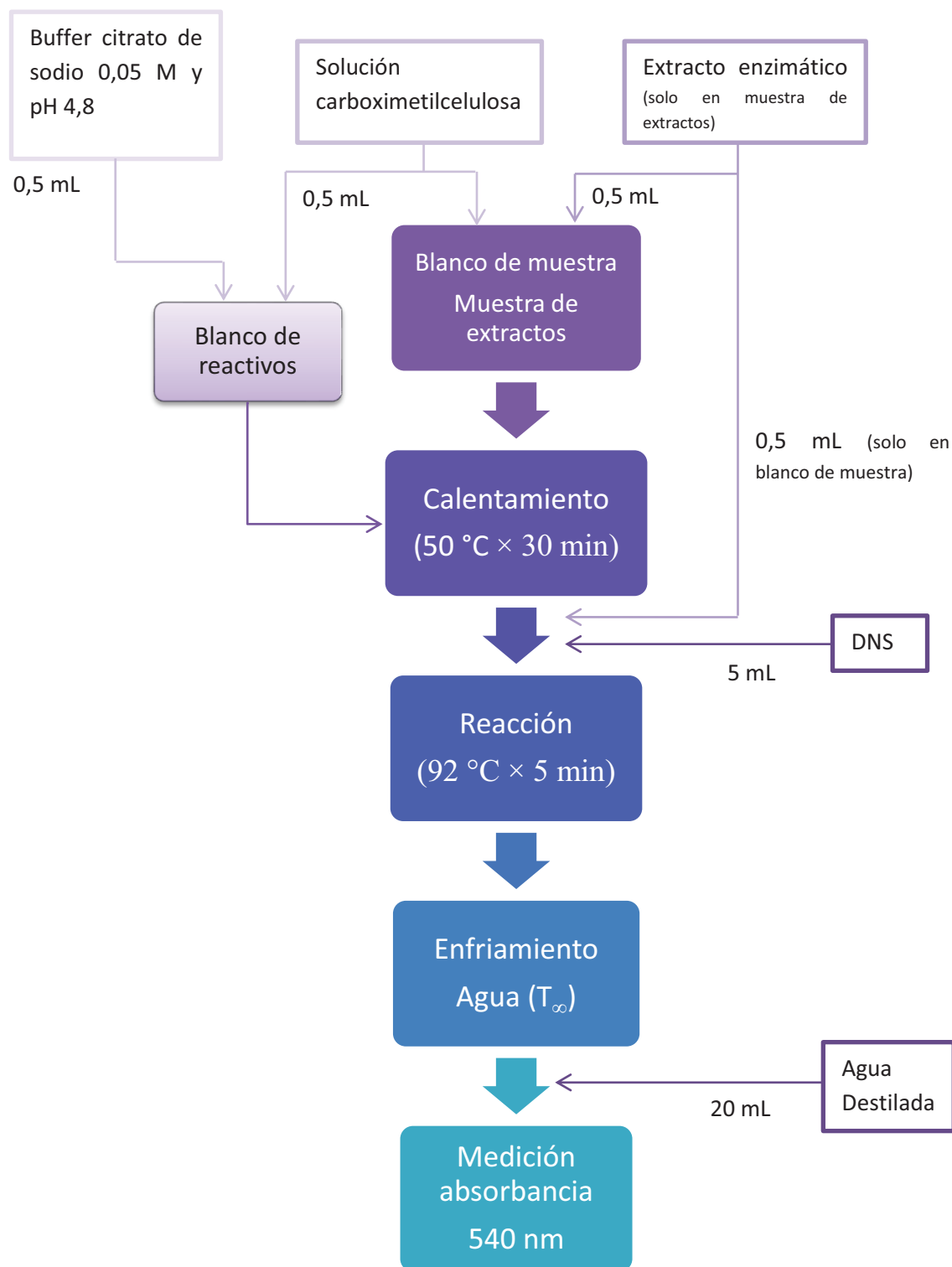


Figura 2.3. Diagrama de proceso para la determinación del perfil de actividad celulolítica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín

El valor de actividad enzimática celulolítica se obtuvo al seguir los pasos indicados en el Anexo IX.

2.8. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ACTIVIDAD LIGNINO PEROXIDÁSICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA FERMENTACIÓN DE ASERRÍN

La actividad lignino peroxidásica fue medida espectrofotométricamente (Tien y Kirk, 1983, pp. 2281; Villa, 2007, p. 41). En un tubo de ensayo con rosca de 10 mL de capacidad se colocaron: 1 mM de una solución de tartrato de sodio con pH de 3,0, 0,5 mL del extracto enzimático, 2 mM de alcohol veratrílico, 0,1% de Tween 80 y 4 mM de peróxido de hidrógeno. El volumen final fue de 10 mL y la mezcla contenida en los tubos se dejó reaccionar en un baño María a 30 °C por 60 minutos.

Se preparó un blanco de muestra sin adicionar peróxido de hidrógeno. Para el blanco de reactivos, el blanco de muestra y las respectivas muestras de extractos se leyó la absorbancia a 310 nm. La actividad enzimática se reportó en Unidades Internacionales (UI), la UI se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones de la reacción. La actividad se expresó en UI por gramos de materia seca ($\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) para cada una de las corridas de fermentación.

En la Figura 2.4, se observa el esquema para el proceso de determinación del perfil de actividad lignino peroxidásica de los extractos descrito en los párrafos anteriores.

Para la determinación del período de mayor generación de la actividad lignino peroxidásica, se analizaron los valores de generación de la actividad lignino peroxidásica durante las diferentes fases de crecimiento del hongo, desde el día

de la siembra hasta las cosechas, y se lograron determinar los valores máximos de generación de la enzima.

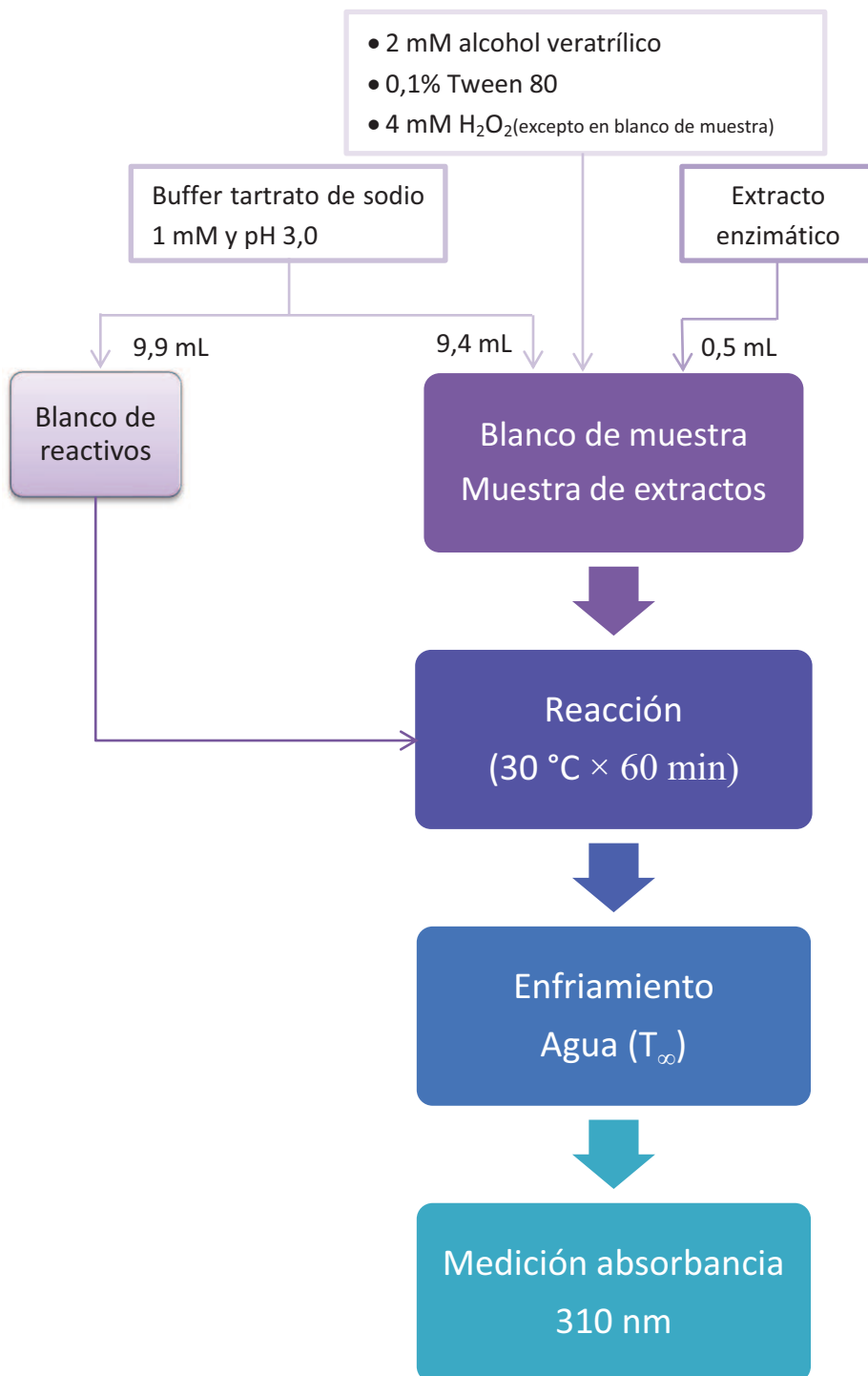


Figura 2.4. Diagrama de proceso para la determinación del perfil de actividad lignino peroxidásica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín

El valor de actividad enzimática lignino peroxidásica se obtuvo al seguir los pasos indicados en el Anexo X.

2.9. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA FERMENTACIÓN DE ASERRÍN

La actividad manganeso peroxidásica se determinó mediante el procedimiento espectrofotométrico basado en (Lopes, Teixeira, Nunes, y Durrant, 2009, p. 820; Montoya, 2008, p. 40). En un tubo de ensayo con rosca de 10 mL se colocó: 0,1 mL de buffer acetato de sodio (pH 4,5), 0,05 mL de una solución de 2 nM de $MnSO_4$, 0,2 mL de una solución de albúmina al 0,5% y 0,05 mL de una solución 2 mM de H_2O_2 en buffer fosfato de sodio 0,2 M (pH 8,0). La mezcla se dejó reaccionar a 30 °C por 10 minutos en un baño María. Se añadieron 0,04 mL de una solución NaOH 2N y se detuvo la reacción. Cada muestra fue preparada con su respectivo blanco de muestra, al cual no se le añadió la solución de peróxido de hidrógeno.

Para los blancos y sus respectivas muestras se leyó la absorbancia a 610 nm. La actividad enzimática se reportó en Unidades Internacionales (UI), donde la UI es la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones de la reacción. La actividad se expresó en UI por gramos de materia seca ($UI \cdot g^{-1}$ MS) para cada corrida.

Para la determinación del período de mayor generación de la actividad manganeso peroxidásica, se analizaron los valores de generación de la actividad manganeso peroxidásica durante las diferentes fases de crecimiento del hongo desde el día de la siembra, hasta las cosechas, y se lograron determinar los valores máximos de generación de la enzima.

En la Figura 2.5, se observa el esquema para el proceso de determinación del perfil de actividad manganeso peroxidásica de los extractos descrito en los párrafos anteriores.

El valor de actividad enzimática manganeso peroxidásica se obtuvo al seguir los pasos indicados en el Anexo XI.

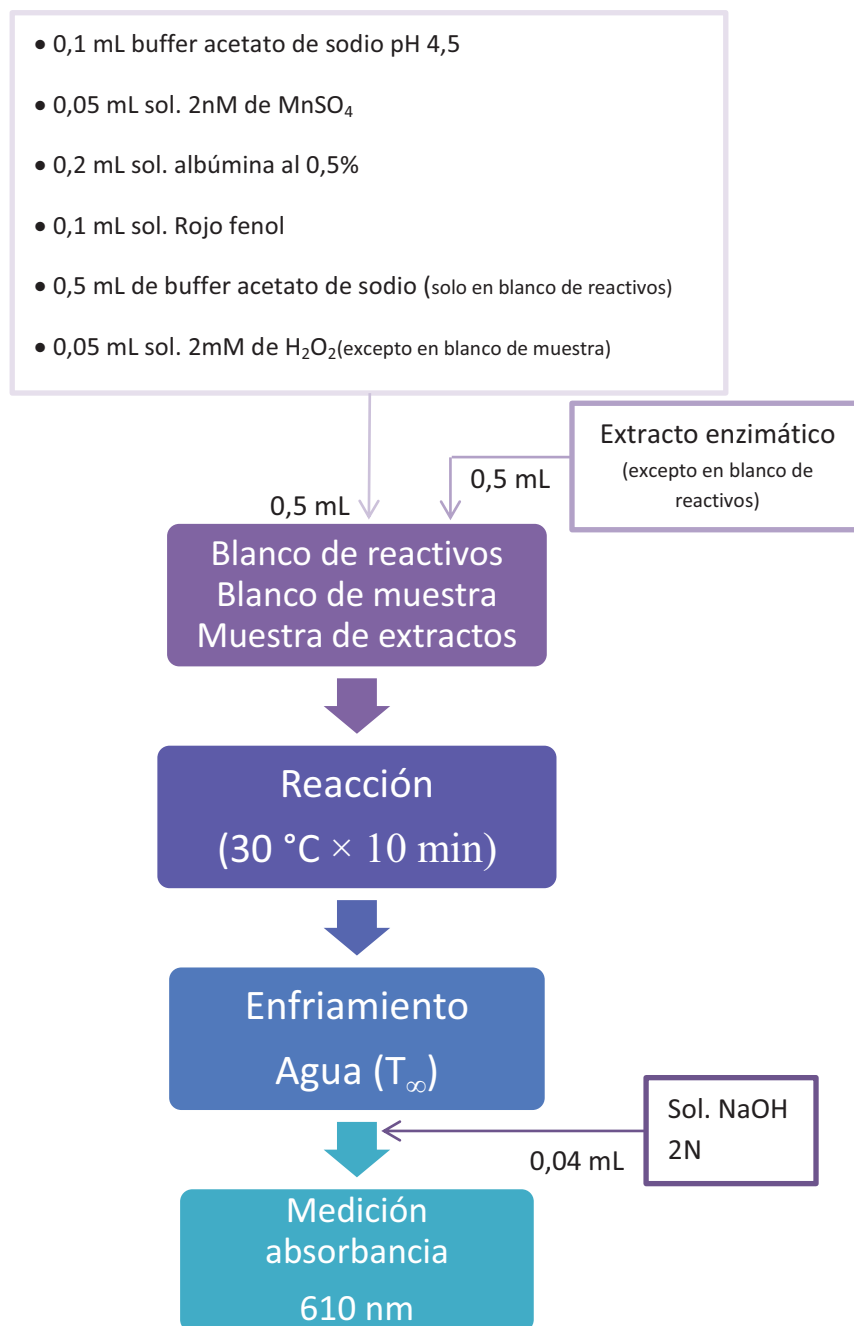


Figura 2.5. Diagrama de proceso para la determinación del perfil de actividad manganeso peroxidásica de los extractos obtenidos de la fermentación de aserrín

2.10. ANÁLISIS GLOBAL DE LA GENERACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICA LIGNINO PEROXIDÁSICA Y MANGANESO PEROXIDÁSICA

Para el análisis estadístico de los resultados de actividad enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica, se utilizó el programa Statgraphics. Se realizó un análisis de varianza de la actividad enzimática con un nivel de significancia del 95%. Se compararon las actividades enzimáticas para 5 días específicos asociados al crecimiento del hongo *Lentinus edodes* obtenidos en las tres corridas de fermentación realizadas. Los días de análisis fueron:

- El día inicial
- Día de completa población del micelio en el sustrato
- Día de primera cosecha
- Día de post. inducción
- Último día de corrida (día de segunda cosecha)

Adicionalmente, con los valores promedio de actividad enzimática, se obtuvo un gráfico global de la generación de actividad enzimática asociada a las etapas del crecimiento del hongo *Lentinus edodes*. Las etapas empleadas como eje X del gráfico fueron:

- Inoculación o siembra
- Finalización de la fase de adaptación
- Cobertura del micelio en el sustrato
- Post. inducción 1
- Primera cosecha
- Inducción 2
- Post. inducción 2
- Aparición de segundos primordios
- Segunda cosecha

Las tablas de datos y el procedimiento seguido para la obtención de dichas curvas se observa en el Anexo XII.

2.11. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

Para evaluar la estabilidad de los extractos enzimáticos con actividad enzimática celulolítica, se preparó una muestra compuesta formada por los extractos obtenidos en los días 45 y 49 de la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. En los días 45 y 49 a más del extracto necesario para el análisis de la variación de actividad enzimática de los extractos, se extrajo un mayor volumen de extracto para lo cual se seleccionó una funda más de aserrín fermentado cada día. Los dos días se pesaron 45 g de sustrato fermentado y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL con 75 mL de la solución buffer correspondiente a cada ensayo. Se colocaron los erlenmeyer en el shaker por 30 minutos, el contenido de cada erlenmeyer se filtró al vacío y se centrifugó a una velocidad de $1350 \times g$.

La cantidad aproximada de extracto con actividad enzimática obtenida de cada erlenmeyer fue de 25 mL. El día 45 se obtuvieron 48 mL de extracto y el día 49 se obtuvieron 95 mL, las dos partes de extracto se mezclaron, y se obtuvo un volumen total aproximado de 140 mL de extracto con actividad enzimática celulolítica.

El volumen total de extracto compuesto bien mezclado fue distribuido en tubos de vidrio de 10 mL de capacidad, en cada tubo se colocaron 3 mL del extracto. Se elaboró un total de 45 tubos para el análisis de estabilidad enzimática celulolítica. Los 45 tubos con extracto compuesto con actividad enzimática celulolítica fueron distribuidos de la siguiente manera, 15 tubos se colocaron a temperatura ambiente promedio de (15,5 °C), 15 tubos se colocaron a temperatura de

refrigeración (3 °C) y los otros 15 se colocaron a temperatura de congelación (-14 °C).

Para evaluar la estabilidad de los extractos enzimáticos con actividad enzimática manganeso peroxidásica, de igual manera, se preparó una muestra compuesta de los extractos obtenidos los días 17 y 21 de la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. El procedimiento seguido fue exactamente igual al descrito en el párrafo anterior para el análisis de los extractos con actividad enzimática celulolítica. El día 17 se obtuvieron 46 mL de extracto con actividad enzimática manganeso peroxidásica y el día 21 se obtuvieron 98 mL de extracto con actividad enzimática manganeso peroxidásica; el volumen total que se repartió en los tubos fue de 138 mL aproximadamente. De igual manera con el volumen de extracto total, bien mezclado, se elaboraron un total de 45 tubos para el análisis de estabilidad enzimática manganeso peroxidásica, cada tubo con un contenido de 3 mL de extracto. Los 45 tubos con extracto compuesto con actividad enzimática manganeso peroxidásica fueron distribuidos de la siguiente manera, 15 tubos se colocaron a temperatura ambiente promedio de (15,5 °C), 15 tubos se colocaron a temperatura de refrigeración (3 °C) y los otros 15 tubos se colocaron a temperatura de congelación (-14 °C).

Cada 2 días se realizó el análisis de la estabilidad de las enzimas, para esto se dejaron los tubos a temperatura ambiente hasta que se descongeló su contenido y se filtró, luego se siguió el procedimiento descrito en los subcapítulos 2.7, 2.8 y 2.9 de este proyecto, con lo cual se determinó la absorbancia de los extractos almacenados a diferentes temperaturas. Este procedimiento se realizó por 30 días.

Para determinar la estabilidad enzimática de los extractos, se siguió el mismo procedimiento de determinación de los perfiles de actividad enzimática, por lo tanto, se obtuvieron dos valores de absorbancia por cada muestra analizada y para el cálculo de la actividad enzimática se obtuvo la media de dichos valores. La actividad enzimática se reportó en Unidades Internacionales (UI), donde la UI es la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de sustrato por minuto bajo

las condiciones de la reacción. Para cada temperatura de almacenamiento se reportó la actividad en UI por gramos de materia seca ($UI \cdot g^{-1}$ MS). Además el parámetro utilizado para el análisis de estabilidad enzimática celulolítica y manganeso peroxidásica fue el tiempo de vida media o t_{50} ; es decir que se calculó el tiempo que se demoró en perder el 50% de la actividad enzimática inicial, para esto se utilizó la ecuación 2.3.

$$t_{50} = \frac{UI_0 - UI_f}{k} \quad [2.3]$$

Donde:

UI_f = Concentración enzimática final

UI_0 = Concentración enzimática inicial

k = Constante de degradación enzimática

No se realizó el análisis de estabilidad de los extractos con actividad ligninoperoxidásica ya que como se observará en el siguiente capítulo los datos presentados para la actividad ligninoperoxidásica fueron casi nulos para las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes*.

Para determinar la estabilidad de los extractos, se emplearon 2 modelos matemáticos: cinética de degradación de orden cero y cinética de degradación de orden uno; que según lo expresado por Labuza y Riboh (1982) los órdenes cero y uno son los que se producen en la mayoría de procesos relacionados con la estabilidad de sustancias contenidas en sustratos líquidos (p. 70).

Para el modelo de degradación de orden cero; expresado en la ecuación 2.4 se tuvo:

$$UI_f = UI_0 - kt \quad [2.4]$$

Donde:

UI_f = Concentración enzimática final

UI_0 = Concentración enzimática inicial

k = Constante de degradación enzimática

Se graficaron los datos de UI con el tiempo; y se encontró la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión.

Para el modelo de degradación de orden uno se utilizó la ecuación 2.5.

$$\ln(UI_f) = \ln(UI_o) - kt \quad [2.5]$$

Donde:

UI_f = Concentración enzimática final

UI_o = Concentración enzimática inicial

k = Constante de degradación enzimática

Se graficaron los datos de $\ln(UI)$ con el tiempo; y se encontró la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión.

Para los 2 modelos cinéticos, se determinó la influencia de la temperatura en la constante de degradación según la ecuación de Arrhenius.

$$k = k_o \cdot e^{\frac{-Ea}{RT}} \quad [2.6]$$

Con los datos obtenidos de la constante de degradación enzimática a cada temperatura, se obtuvo una ecuación de recta por regresión lineal a partir de la gráfica del $\ln(k)$ versus el inverso de la temperatura ($1/T$) expresado en grados Kelvin.

Los cálculos realizados para estos análisis se muestran en el Anexo XIII y XIV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ASERRÍN TROPICAL UTILIZADO EN LA FERMENTACIÓN

Los resultados de la caracterización química del aserrín tropical sin fermentar y después de los distintos períodos de fermentación se presentan en el Anexo XV. Estos resultados se obtuvieron en el laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional y fueron reportados en base seca.

En la Tabla 3.1 se presentan los resultados de los porcentajes de celulosa, lignina, agua, ceras, grasas, resinas y otros, en base húmeda, obtenidos a partir de los datos del Anexo XV.

Tabla 3.1. Datos de la caracterización química del aserrín original y después de las cosechas del hongo *Lentinus edodes* en base húmeda

Muestra	Humedad (%)	Resinas, ceras y grasas (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Otros (%)	Total (%)
Aserrín original	6,53±0,14	2,82±0,17 *	54,07±0,54 ***	22,86±0,14	13,71±0,60	100
Aserrín fermentado 1 ^{era} cosecha grupo 1	7,88±0,14	4,64±0,22 **	52,10±0,61	21,62±0,04	13,75±0,66	100
Aserrín fermentado 2 ^{da} cosecha del grupo 1	8,50±0,03	4,34±0,07 ***	49,49±0,72 **	20,44±0,37	17,23±0,82	100
Aserrín fermentado 1 ^{era} cosecha grupo 2	4,76±0,06	3,84±0,19 **	47,81±1,48 **	19,79±0,08	23,80±1,50	100

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2, n* = 7, n** = 4, n*** = 6)

Como se observa en la Tabla 3.1, el aserrín tropical utilizado como sustrato tuvo 54,07% de celulosa y un 22,86% de lignina. Estos porcentajes de celulosa y lignina son altos comparados con otros residuos ligninocelulósicos como la paja de trigo, arroz, hojas, pasto, entre otros, cuyos porcentajes de celulosa y lignina se encuentran entre 25-35 % y 12-18% respectivamente (Sun y Cheng, 2001, p.

5); es por esto que se seleccionó este aserrín como sustrato para el desarrollo del hongo *Lentinus edodes*, ya que es un material de desecho con un alto contenido ligninocelulósico.

También se puede observar que el contenido de celulosa y lignina disminuyó conforme el aserrín tuvo un mayor tiempo de fermentación. El aserrín original tuvo un valor de 54,07% de celulosa, el aserrín fermentado de primera cosecha del grupo 1 presentó un valor de 52,10%, el aserrín fermentado al tiempo de segunda cosecha tuvo 49,49% y el aserrín fermentado de primera cosecha del grupo 2 tuvo un valor de 47,81% de celulosa. Entonces, se notó que mientras más días de fermentación tiene el aserrín, el contenido de celulosa del aserrín es menor.

El contenido original de lignina es de 22,86%, el contenido para la primera cosecha del grupo 1 fue de 21,62%, para la segunda cosecha del grupo 1 fue de 20,44% y el contenido de lignina después de la primera cosecha del grupo 2 fue de 19,79%. Por lo tanto, se observó que al igual que el contenido de celulosa, el contenido de lignina fue menor mientras mayor fue el tiempo de fermentación del aserrín.

La disminución del contenido de celulosa y lignina probablemente se dio ya que el hongo creció y se desarrolló, y para esto se alimentó de todos los nutrientes contenidos en el aserrín, pero en especial de la celulosa (Miller y Jong, 1987, p. 424).

El contenido de resinas, grasas y ceras del aserrín original fue menor al contenido de los mismos compuestos para el aserrín fermentado en los diferentes tiempos de análisis, esto se observa debido a que por lo general los hongos no se alimentan de estos compuestos y conforme se da el proceso de fermentación, las resinas, grasas y ceras se concentran.

Se observa que el porcentaje de otros compuestos contenidos en el aserrín de maderas tropicales según lo expresado por Grant (1996) serían taninos, materias vegetales y compuestos carbohidratados (p. 35). El porcentaje de los otros

constituyentes de la madera también está tabulado en la Tabla 3.1 y como se puede observar, el contenido de estos componentes aumenta. El fenómeno observado puede deberse a que al disminuir el contenido de celulosa y lignina del aserrín, los demás componentes se concentran.

3.2. PERÍODOS DE DESARROLLO Y EFICIENCIA BIOLÓGICA DEL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

En la Tabla 3.2 se muestran los períodos de crecimiento y cosecha del hongo *Lentinus edodes* para las tres corridas. Como se puede observar, se especifican los períodos de crecimiento del hongo *Lentinus edodes*, se tiene la fase de desarrollo del micelio que inició una vez que se inoculó el sustrato (aserrín) y finalizó cuando el micelio del hongo cubrió por completo el aserrín; en este momento comenzó la etapa de fructificación, la cual terminó el último día de fermentación. No se tuvo segunda cosecha del grupo 2, por eso no se tabuló este valor.

La etapa de desarrollo del micelio duró prácticamente el mismo tiempo para cada corrida, el valor inicial fue de 25 días para la primera corrida, para la segunda corrida duró 20 días y finalmente para la tercera corrida esta etapa tuvo un periodo de 17 días.

La etapa de fructificación para el grupo 1 tuvo una duración de 40 días para la primera corrida y de 32 días para las corridas segunda y tercera. El tiempo de fructificación para el grupo 2 duró 38 días para la primera corrida, 48 días para la segunda corrida y 46 días para la tercera corrida. Los periodos de fructificación para el grupo 2 fueron mayores que los obtenidos por el grupo 1, esta diferencia concuerda con lo esperado ya que debido al crecimiento disperejo en las fundas desde la etapa de desarrollo del micelio se dividieron las fundas en grupos; siendo las fundas del grupo 2 las que se desarrollaron más lentamente.

Tabla 3.2. Períodos de las etapas de crecimiento y cosechas del hongo *Lentinus edodes* para las tres corridas de fermentación

Parámetro	Tiempo (días)					
	Primera Corrida		Segunda Corrida		Tercera Corrida	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Desarrollo del Micelio	1-25	1-25	1-20	1-20	1-17	1-17
Fructificación	25-69	25-63	20-52	20-69	17-49	17-63
Primera Cosecha	41	49	31	59	28	56
Segunda Cosecha	69		52		45	

Según los resultados obtenidos por Barba (1998) quien realizó estudios de fructificación del hongo *Lentinus edodes* en diferentes sustratos, obtuvo un período de crecimiento del micelio de 2 meses y un período de fructificación de 2 meses, en total se necesitaron alrededor de 120 días para obtener los cuerpos fructíferos; resultados que duplican los períodos obtenidos para llegar a cosechar los hongos en el presente estudio (p. 60).

Los valores correspondientes a los días de cosecha en este trabajo fueron los días 31 y 59, y estos son comparables con los días de cosecha obtenidos por Curvetto, Figlas, González y Delmastro (2004) quienes al cultivar los hongos *Lentinus edodes* en cáscaras de semilla de girasol obtuvieron las cosechas al día 35 y al día 55 (p. 131). Al realizar esta comparación se podría inferir que el tipo de sustrato no influiría en los días de cosecha.

Royse (2001), al sembrar *Lentinus edodes* en bolsas de aserrín de 1-3 kg tuvo de 20 a 25 días para el desarrollo del micelio, 4 semanas para el apareamiento de los primordios y entre 9 y 11 días para la cosecha de los cuerpos fructíferos; en total tuvo alrededor de 64 días para el completo desarrollo del hongo *Lentinus edodes* (p. 6). Al comparar los resultados de Royse con los obtenidos en este

proyecto, se observó que los períodos de desarrollo del hongo *Lentinus edodes* en fundas con 300 g de aserrín se encontraron dentro de los rangos de tiempo esperados según lo señala este autor y por lo tanto, se puede decir que el tamaño de las fundas parecería no influir en estas variables.

En la Tabla 3.3 se presentan los valores del promedio de peso fresco del hongo y del promedio de la eficiencia biológica obtenidos durante las cosechas de las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes*.

Tabla 3.3. Datos promedio del peso del hongo fresco y de la eficiencia biológica promedio del hongo *Lentinus edodes* para las cosechas del grupo 1 y 2 de las tres corridas de fermentación

	Primera Corrida		Segunda Corrida		Tercera Corrida	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Peso promedio hongo fresco (g)	40,3 ± 10,8	56,3 ± 6,7	38,2 ± 9,1	44,6 ± 8,8	16,3 ± 4,2	54,0 ± 13,9
	n = 6	n = 3	n = 5	n = 5	n = 4	n = 5
Eficiencia Biológica Promedio (%)	14,1 ± 5,8	24,6 ± 4,9	14,1 ± 3,2	17,0 ± 3,2	6,5 ± 2,0	41,0 ± 13,9
	n = 6	n = 3	n = 5	n = 5	n = 4	n = 5

$\bar{x} \pm \sigma$

Como se observa, el peso promedio de hongo fresco tiene un valor mínimo de 16,3 g, el cual se dio en la tercera corrida de fermentación para la cosecha del grupo 1 y el máximo valor promedio de peso fresco del hongo se tuvo en la cosecha del grupo 2.

Los valores de eficiencia biológica promedio se encuentran entre 6,5 y 41%. Al comparar los valores promedio de eficiencia biológica entre los grupos 1 y 2, se

obtuvo que los valores de eficiencia biológica promedio, fueron mayores para la cosecha del grupo 2 en las tres corridas de fermentación.

La eficiencia biológica máxima obtenida en el presente estudio fue de $41,0 \pm 13,9\%$, valores que están dentro de los rangos reportados por otros estudios; así los valores de eficiencia biológica reportados por Carrión (2000) fueron de $35,9 \pm 8,6\%$ (p. 55). Otro dato que coincide con este rango de valores de eficiencia biológica es el obtenido por Israilides y Philippoussis (2003) el cual fue de 50%, quienes mencionan que el desarrollo de los cuerpos fructíferos se ve fuertemente influenciado por la relación Carbono-Nitrógeno, parámetro que en el presente trabajo no fue controlado (p. 254). Finalmente, otro valor que se encontró dentro del rango de valores de eficiencia biológica obtenido en este trabajo, fue el resultado de Curvetto et. al (2004) quien obtuvo un valor 46% de eficiencia biológica al sembrar *Lentinus edodes* en semillas de girasol (p. 131).

3.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA, LIGNINO PEROXIDÁSICA Y MANGANESO PEROXIDÁSICA DEL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

Los datos de actividad enzimática se expresaron en Unidades internacionales (UI), las cuales se definen como un μmol de producto generado o de sustrato oxidado por minuto y por gramos de aserrín tropical seco. Los valores de actividad enzimática fueron calculados a partir de los datos de variación de la absorbancia respecto al tiempo.

Para la determinación del perfil de generación de actividad de las enzimas celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica, se analizaron las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes* en aserrín tropical. Los datos de absorbancia medidos para las tres corridas se tabularon en el Anexo VI.

3.3.1.DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA DEL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

En la Tabla 3.4, 3.5 y 3.6 se tabulan los valores de UI calculados para la actividad enzimática celulolítica del hongo *Lentinus edodes* para la primera, segunda y tercera corrida de fermentación respectivamente.

Como se observa en la Tabla 3.4, los valores de actividad enzimática son iguales para la primera cosecha del grupo 1 y para la primera cosecha del grupo 2, desde el inicio de la fermentación hasta el día 39. A partir del día 41 los datos variaron; pero, la tendencia tanto para el grupo 1 y el grupo 2 fue parecida durante la primera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*.

Tabla 3.4. Datos de variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para la primera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,192	0,103	0,192	0,103	0,147 ± 0,063	0,147 ± 0,063
3	0,088	0,067	0,088	0,067	0,077 ± 0,014	0,077 ± 0,014
7	0,060	0,034	0,060	0,034	0,047 ± 0,018	0,047 ± 0,018
11	0,030	0,060	0,030	0,060	0,045 ± 0,022	0,045 ± 0,022
14	0,050	0,117	0,050	0,117	0,083 ± 0,047	0,083 ± 0,047
18	0,069	0,101	0,069	0,101	0,085 ± 0,023	0,085 ± 0,023
21	0,086	0,180	0,086	0,180	0,133 ± 0,066	0,133 ± 0,066
25	0,150	0,142	0,150	0,142	0,146 ± 0,005	0,146 ± 0,005
28	0,038	0,054	0,038	0,054	0,046 ± 0,011	0,046 ± 0,011
32	0,051	0,035	0,051	0,035	0,043 ± 0,011	0,043 ± 0,011
35	0,031	0,082	0,031	0,082	0,056 ± 0,036	0,056 ± 0,036
39	0,077	0,110	0,077	0,110	0,093 ± 0,024	0,093 ± 0,024
41	0,224	0,108	0,125	0,106	0,166 ± 0,082	0,115 ± 0,014
46	0,101	0,129	0,074	0,112	0,115 ± 0,020	0,093 ± 0,027
49	0,088	0,097	0,237	0,213	0,092 ± 0,007	0,225 ± 0,017
53	0,143	0,307	0,096	0,097	0,225 ± 0,116	0,097 ± 0,001
63	0,103	0,071	0,156	0,162	0,087 ± 0,023	0,159 ± 0,004
67	0,138	0,109			0,124 ± 0,020	
69	0,240	0,251			0,246 ± 0,008	

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

En la Tabla 3.5 se observa que los valores de actividad enzimática son iguales para el grupo 1 y para el grupo 2, desde el inicio de la fermentación hasta el día 31.

Tabla 3.5. Datos de variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,076	0,348	0,076	0,348	0,212 ± 0,192	0,212 ± 0,192
3	0,099	0,053	0,099	0,053	0,076 ± 0,033	0,076 ± 0,033
6	0,103	0,141	0,103	0,141	0,122 ± 0,027	0,122 ± 0,027
10	0,108	0,091	0,108	0,091	0,100 ± 0,012	0,100 ± 0,012
13	0,156	0,073	0,156	0,073	0,115 ± 0,059	0,115 ± 0,059
17	0,151	0,105	0,151	0,105	0,128 ± 0,032	0,128 ± 0,032
20	0,140	0,129	0,140	0,129	0,134 ± 0,007	0,134 ± 0,007
24	0,101	0,098	0,101	0,098	0,099 ± 0,002	0,099 ± 0,002
27	0,088	0,096	0,088	0,096	0,092 ± 0,006	0,092 ± 0,006
31	0,134	0,217	0,134	0,217	0,175 ± 0,059	0,175 ± 0,059
34	0,099	0,093	0,084	0,122	0,096 ± 0,004	0,103 ± 0,027
38	0,140	0,106	0,099	0,169	0,123 ± 0,024	0,134 ± 0,050
41	0,077	0,087	0,118	0,093	0,082 ± 0,007	0,105 ± 0,017
45	0,078	0,076	0,075	0,120	0,077 ± 0,001	0,098 ± 0,032
48	0,181	0,129	0,135	0,137	0,155 ± 0,037	0,136 ± 0,002
52	0,187	0,194	0,233	0,235	0,191 ± 0,005	0,234 ± 0,001
55			0,264	0,265		0,264 ± 0,001
59			0,406	0,419		0,413 ± 0,009
62			0,349	0,302		0,325 ± 0,033
66			0,342	0,339		0,340 ± 0,002
69			0,341	0,369		0,355 ± 0,019

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

En la Tabla 3.6 se observa que los valores de actividad enzimática son iguales para el grupo 1 y para el grupo 2, desde el inicio de la fermentación hasta el día 21.

Tabla 3.6. Datos de variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,302	0,321	0,302	0,321	0,311 ± 0,013	0,311 ± 0,013
3	0,343	0,117	0,343	0,117	0,230 ± 0,160	0,230 ± 0,160
7	0,051	0,048	0,051	0,048	0,049 ± 0,002	0,049 ± 0,002
10	0,045	0,044	0,045	0,044	0,044 ± 0,001	0,044 ± 0,001
14	0,039	0,048	0,039	0,048	0,043 ± 0,006	0,043 ± 0,006
17	0,163	0,179	0,163	0,179	0,171 ± 0,011	0,171 ± 0,011
21	0,071	0,064	0,071	0,064	0,068 ± 0,005	0,068 ± 0,005
24	0,059	0,047	0,176	0,189	0,053 ± 0,009	0,183 ± 0,009
28	0,177	0,184	0,158	0,178	0,180 ± 0,005	0,168 ± 0,014
31	0,115	0,128	0,191	0,193	0,121 ± 0,009	0,192 ± 0,001
35	0,128	0,108	0,169	0,154	0,118 ± 0,014	0,161 ± 0,010
38	0,150	0,145	0,115	0,111	0,147 ± 0,004	0,113 ± 0,002
42	0,096	0,087	0,105	0,084	0,091 ± 0,006	0,094 ± 0,015
45	0,110	0,119	0,229	0,364	0,115 ± 0,006	0,297 ± 0,096
49	0,218	0,165	0,184	0,151	0,192 ± 0,037	0,167 ± 0,023
52			0,463	0,438		0,451 ± 0,018
56			0,657	0,674		0,666 ± 0,011
59			0,316	0,310		0,313 ± 0,005
63			0,503	0,497		0,500 ± 0,004

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

En la Figura 3.1 se presentan los datos de actividad enzimática celulolítica (UI) en función del tiempo, para las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. Para la primera corrida se tuvieron cuatro picos que coincidieron con las etapas de crecimiento en las cuales se esperaba tener mayor actividad enzimática celulolítica, debido a que esta enzimas son metabolitos primarios (Singhania, 2009, p. 375). El primer pico se dio el día 25, día en el cual el micelio había

cubierto todo el sustrato, el segundo pico se tuvo el día de la primera cosecha (día 41), el tercer pico se presentó en el día 53 y fue el día después de la segunda inducción y el cuarto pico se presentó el último día de fermentación de esta corrida (día 69). Los valores de dichos picos se observan en las tablas 3.4, 3.5 y 3.6 respectivamente.

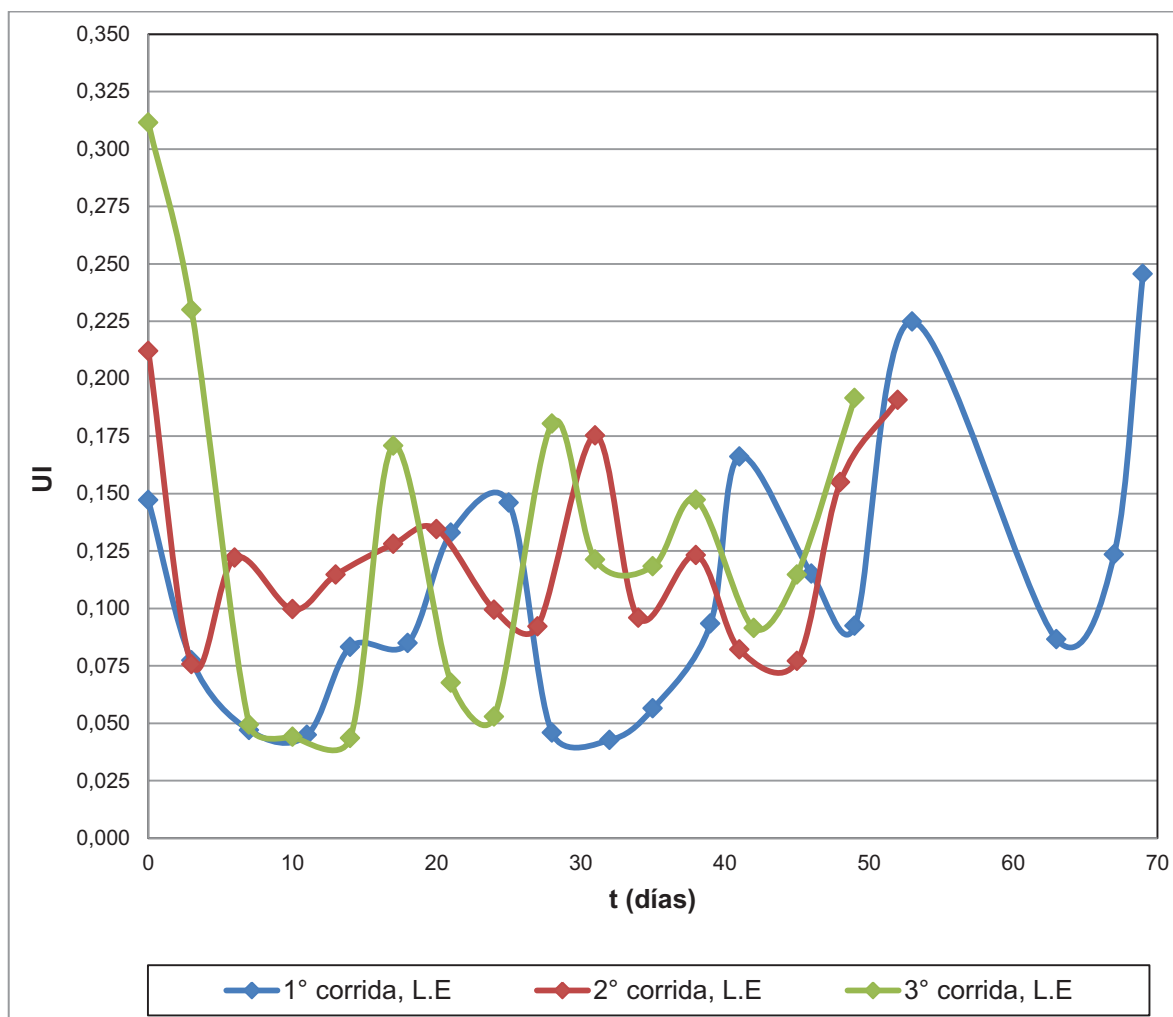


Figura 3.1. Variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes* del grupo 1

En la Figura 3.1 se observa que los datos de actividad enzimática de la segunda corrida presentaron varios picos; sin embargo cuatro fueron los más importantes: el pico correspondiente al día de en el que el micelio cubrió todo el sustrato (día 20), el día de primera cosecha (día 31), el día de aparecimiento de primordios o fortificación del micelio, el cual se dio después del proceso de inducción (día 38) y

el pico correspondiente al último día de fermentación de la segunda corrida. Estos picos presentaron, valores de 0,134 UI, 0,175 UI, 0,123 UI y 0,191 UI respectivamente.

También en esta figura se tiene la gráfica de la tercera corrida, cuyos picos se presentaron en los días 17, 28, 38 y 49 y tuvieron la misma correspondencia con el crecimiento del hongo, descrita para la primera y segunda corrida. Los valores de actividad enzimática de estos picos fueron: 0,171 UI, 0,180 UI, 0,147 UI y 0,192 UI respectivamente.

En la Figura 3.2 se presentan los datos de variación de actividad enzimática en función del tiempo para el grupo 2 en las tres corridas de fermentación. Se observa que la actividad enzimática en el día cero fue mayor que el primer pico en todas las corridas; y en la segunda y tercera corrida fue mayor que el valor de todos los picos de estas corridas; solo en la primera corrida la actividad en los días 51 y 69 fueron mayores a la inicial. El fenómeno anteriormente descrito podría deberse a las enzimas se generaron durante la obtención del inóculo en los frascos con trigo.

El máximo pico se presentó el día 49 con un valor de 0,225 UI y correspondió al día de la primera cosecha del grupo 2.

Para la segunda corrida se tuvo menos picos que sus correspondientes del grupo 1; sin embargo, los valores de actividad enzimática fueron mucho más altos que los valores de actividad enzimática obtenidos para el grupo 1. La diferencia fue notable a partir del día 52, día en el que para el grupo 1 se alcanzó un valor de 0,191 UI y para el grupo 2 se tuvo un valor de 0,234 UI, con lo que se obtuvo una diferencia de 0,043 UI. El pico más importante se presentó en el día 59 con un valor de 0,413 UI, día en el que coincide con la primera cosecha del grupo 2. Este valor difirió del máximo valor alcanzado para el grupo 1 en 0,222 UI.

La tercera corrida del grupo 2 presentó un mayor número de picos que los que se presentaron en la tercera corrida del grupo 1 y también un mayor número de picos

que para la primera y segunda corrida. Los valores de actividad enzimática celulolítica más altos se presentaron durante esta corrida. En el día de primera cosecha del grupo 2 (día 56), se presentó el máximo valor de actividad enzimática alcanzado y fue de 0,666 UI.

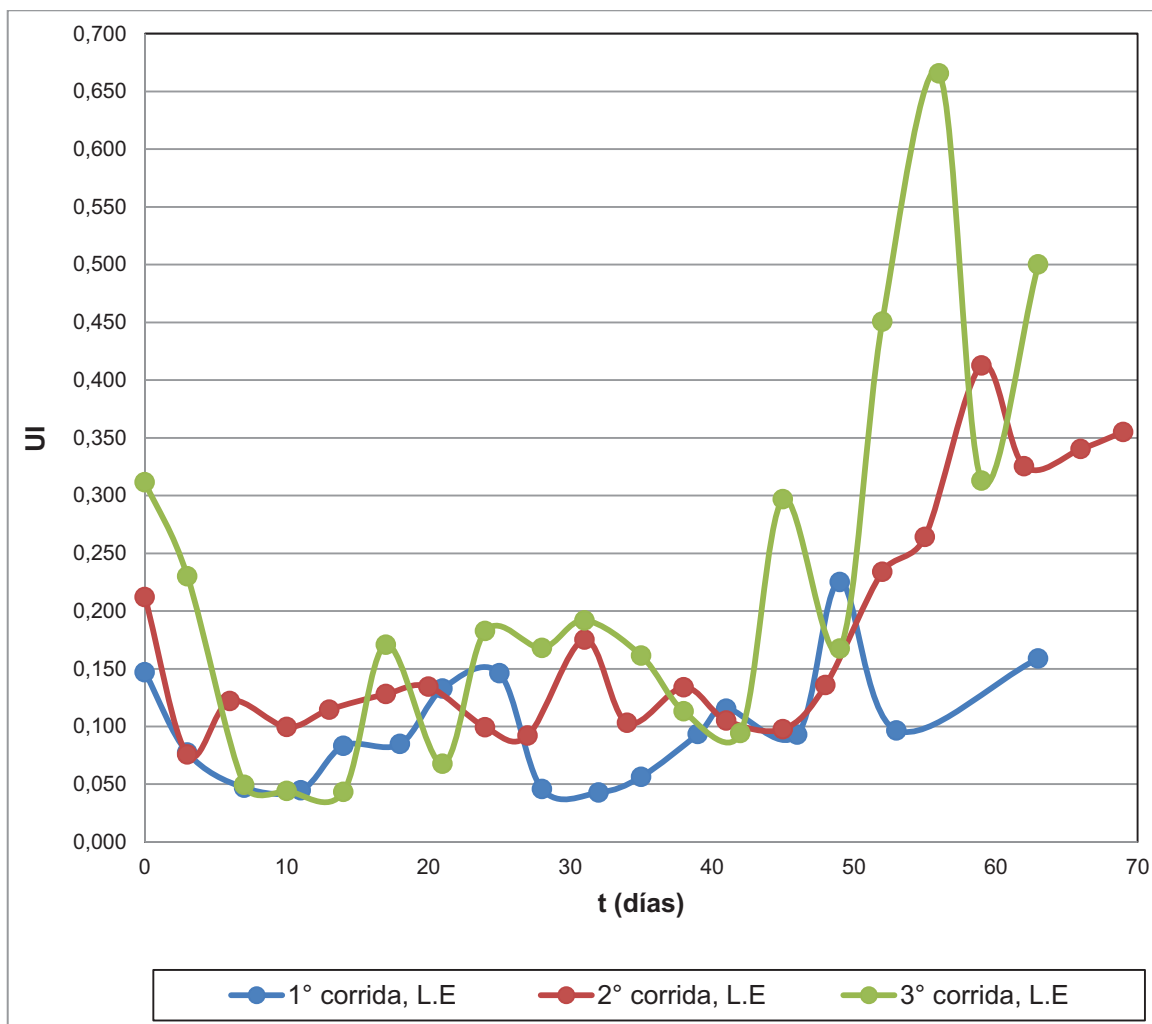


Figura 3.2. Variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes* del grupo 2

Al igual que en el grupo 1, se tuvo que en el día cero hasta el día 45 aproximadamente, la actividad enzimática fue alta y mayor que los picos que se presentaron en las tres corridas. Sin embargo, a diferencia del grupo 1, en este caso en las tres corridas se observa un pico con mayor actividad enzimática que la inicial, en los días 49, 59 y 56 en la primera, segunda y tercera corrida respectivamente.

Estas variaciones de la producción enzimática, para los dos grupos, podrían deberse a que el hongo *Lentinus edodes* produce enzimas celulolíticas desde que inicia el proceso de fermentación, sin embargo la máxima generación de enzimas celulolíticas se da una vez que el micelio crece y pobla todo el sustrato; es decir, después del período de incubación, el cual comprende una fase inicial de adaptación y el desarrollo miceliar (Béguin y Lemaire, 1996, p. 208).

La actividad enzimática celulolítica analizada para las tres cosechas, se relaciona con el modo de acción de las enzimas celulolíticas; la enzima endoglucanasa produce una disminución sobre el grado de polimerización de la celulosa en las secciones amorfas, lo cual debió haberse dado en los primeros días de fermentación de todas las corridas y es por esto que, se tiene actividad enzimática celulolítica en los primeros días de fermentación de las corridas. La producción de la enzima endoglucanasa tiende a disminuir en los días cercanos al aparecimiento de los primordios. En cambio; en las etapas de aparecimiento de los primordios y fructificación, la enzima celulolítica que se produce es la exoglucanasa, ya que esta enzima actúa sobre el extremo no reductor liberado de la molécula de celulosa y produce rupturas en cadena (Béguin y Lemaire, 1996, p. 208). Otra enzima celulolítica es la β -glucosidasa y la función de esta enzima es la de hidrolizar celobiosa y otros β -1,4-oligoglucósidos de cadena corta; entonces, siempre que exista producción de las endoglucanasas y las exoglucanasas la cantidad de celobiosa y otros β -1,4-oligoglucósidos estarán también presentes y con esto se incrementa la producción de la enzima β -glucosidasa (Moore, 1998, p.159). Por lo tanto, debido a la presencia de las exoglucanasas y de las β -glucosidasas en los días de aparecimiento de los primordios y fructificación, se presentaron las más altas actividades enzimáticas celulolíticas.

En la Figura 3.3 se observa una gráfica con los valores medios de actividad enzimática celulolítica y las desviaciones estándar del día inicial de las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. En esta figura se observa que los niveles de confianza se traslapan, lo que indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la producción de enzima celulolítica en estos días para las tres corridas. Otro dato que muestra que no existe

diferencia estadísticamente significativa en la producción de esta enzima en estos días es el valor p , el cual se tabuló en la Tabla 3.7.

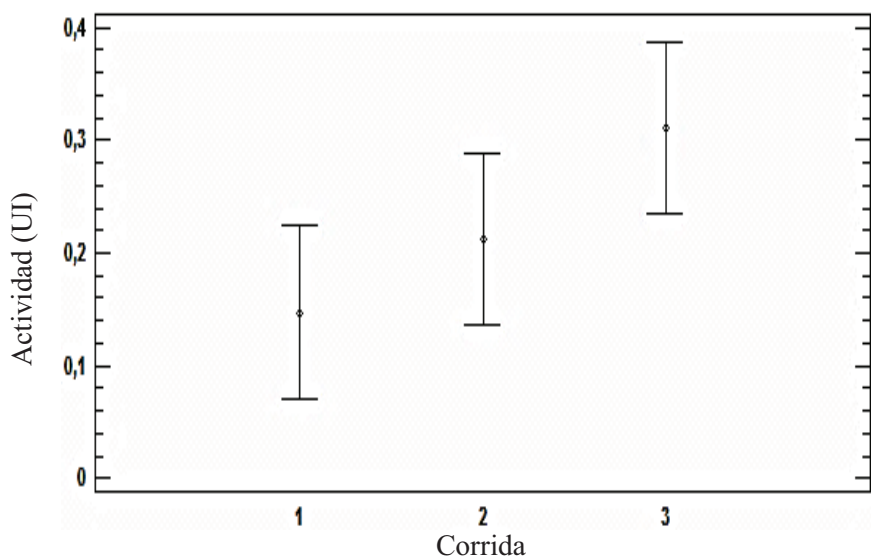


Figura 3.3. Valores medios de actividad enzimática celulolítica en el día inicial para las tres corridas y los dos grupos

En la Figura 3.4 que corresponde al análisis del valor medio y desviaciones estándar para el día de completa población del micelio en el sustrato se tuvo como resultado que si existe una variación significativa en la producción de la enzima celulolítica, sobre todo para la tercera corrida, en la cual el valor de la media es mucho mayor al de las dos corridas anteriores. Así mismo en la Tabla 3.7 se presenta el p -valor para este día y como se observa, dicho valor confirma que existe una diferencia estadística significativa entre la actividad enzimática celulolítica para las tres corridas.

En la Figura 3.5 se tiene la representación gráfica del valor medio de actividad enzimática celulolítica y la desviación estándar obtenidos para el día de la primera cosecha de las tres corridas y los dos grupos; como se observa en esta figura las líneas de confianza se traslapan, por lo que se tiene que no existe diferencia estadística significativa en la producción de esta enzima en los días de cosecha. Al analizar el valor de p presentado en la Tabla 3.7 también se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa en la producción de la enzima celulolítica.

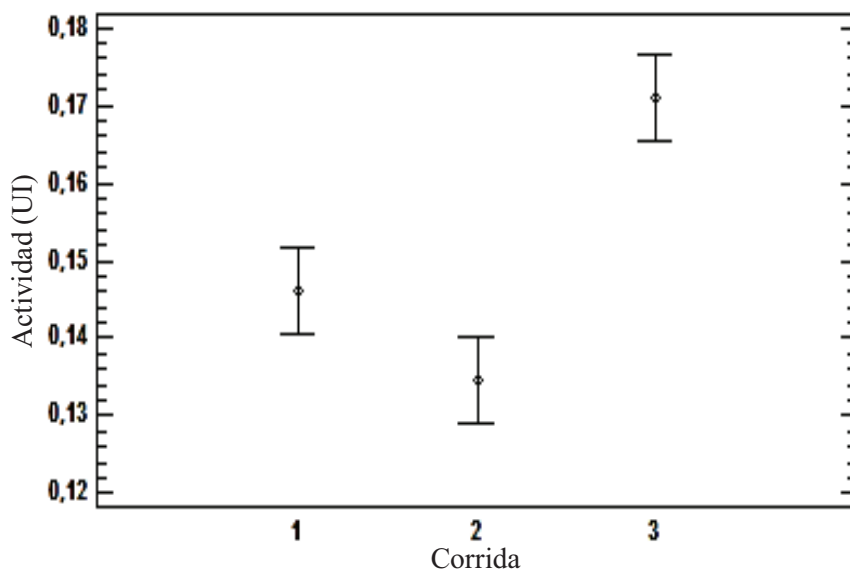


Figura 3.4. Valores medios de actividad enzimática celulolítica para el día de población completa del micelio de las tres corridas y los dos grupos

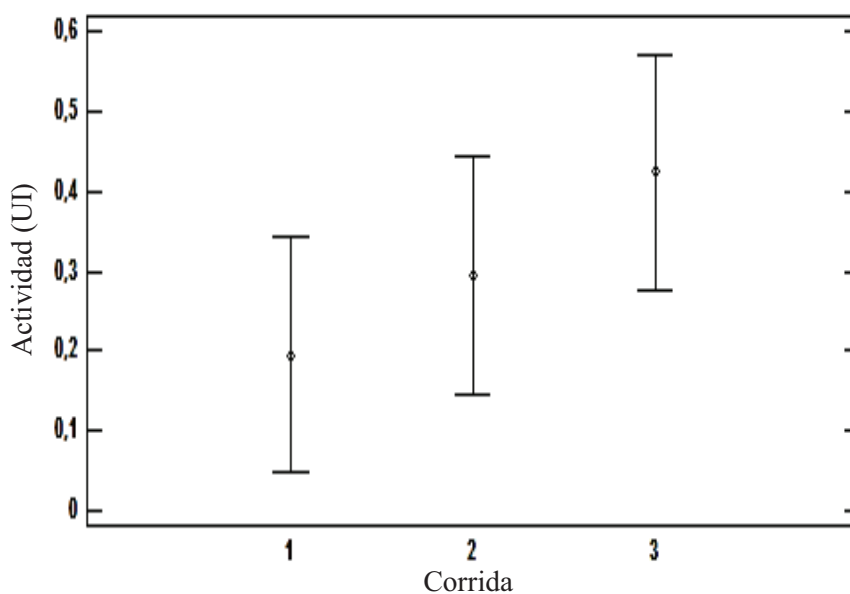


Figura 3.5. Valores medios de actividad enzimática celulolítica para el día de primera cosecha para las tres corridas y los dos grupos

En la Figura 3.6 se observa una gráfica con los valores medios de actividad enzimática celulolítica y las desviaciones estándar obtenidas para el día de post inducción de las tres corridas. En esta figura se observa que los niveles de confianza se traslapan, lo que indica que no existe una diferencia

estadísticamente significativa entre la producción de enzima celulolítica en estos días; además el valor p tabulado en la Tabla 3.7 confirma esto.

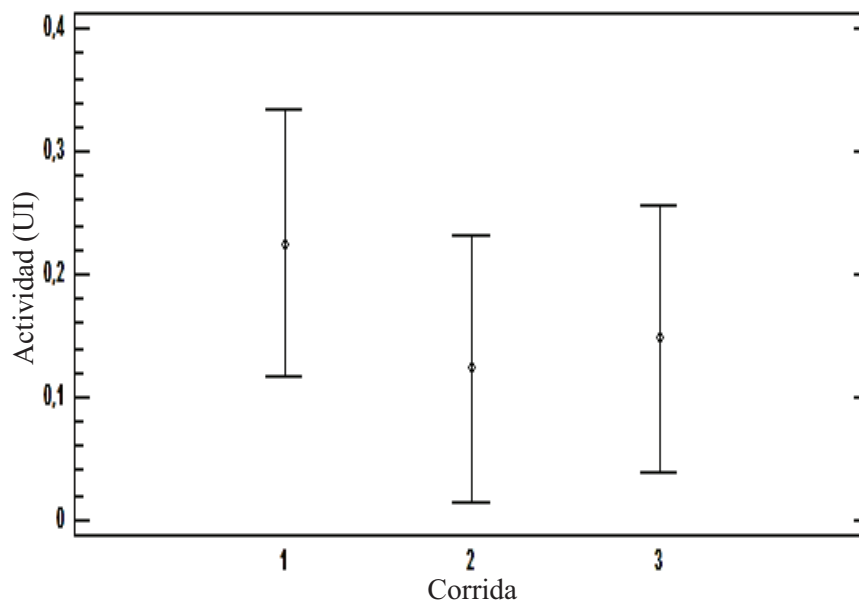


Figura 3.6. Valores medios de actividad enzimática celulolítica para el día de post. inducción para las tres corridas y los dos grupos

En la Figura 3.7 se tiene la representación gráfica del valor medio de actividad enzimática celulolítica y la desviación estándar obtenidos para el último día de fermentación de las tres corridas; como se observa en esta figura las líneas de confianza se solapan, entonces se tiene que no existe diferencia estadística significativa en la producción enzimática en los últimos días de las tres corridas. En la Tabla 3.7 se tiene el valor de p con el que se puede decir que no existe diferencia estadísticamente significativa en la producción enzimática en los últimos días de las corridas.

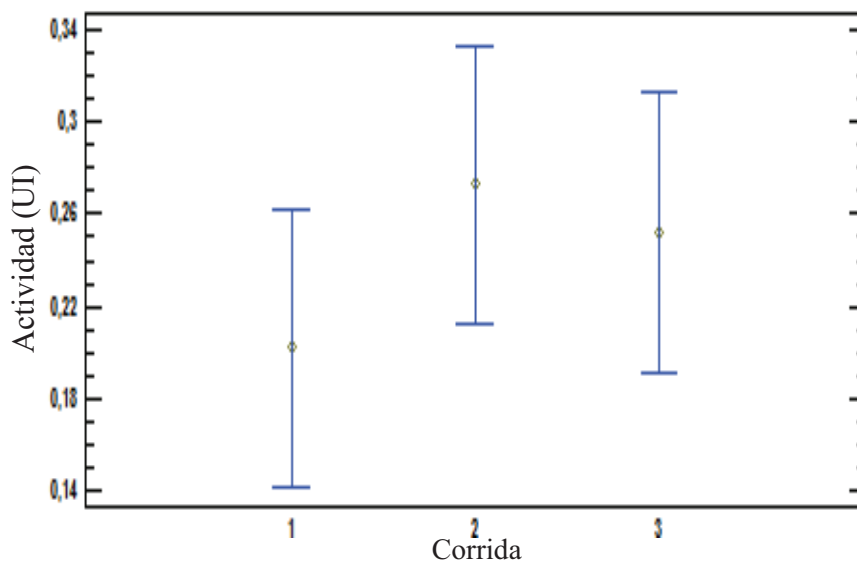


Figura 3.7. Valores medios de actividad enzimática celulolítica del último día de fermentación para las tres corridas y los dos grupos

En la Tabla 3.7 también se tienen los datos de actividad enzimática celulolítica promedio, si se comparan estos valores se tiene que el valor promedio de actividad enzimática celulolítica se presentó el día de la primera cosecha y el menor valor promedio de actividad enzimática celulolítica se obtuvo el día en el cual el micelio cubrió completamente el sustrato. Este resultado fue acorde a lo esperado pues como ya se mencionó anteriormente esta enzima se deriva de la actividad metabólica primaria de los microorganismos.

Tabla 3.7. Datos de variación de la actividad enzimática celulolítica promedio y p-valor para las tres corridas

Día de análisis	p-valor	Actividad enzimática celulolítica promedio (UI)
Día Inicial	0,1012	0,2237
Día de crecimiento del micelio	0,0001	0,1505
Día de primera cosecha	0,2673	0,3042
Día post. inducción	0,4114	0,1652
Último día de corrida	0,4314	0,2424

3.3.2.DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINOPEROXIDÁSICA DEL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

En la Tabla 3.8, 3.9 y 3.10 se tabulan los valores de UI calculados para la actividad enzimática ligninolítica del hongo *Lentinus edodes* para la primera, segunda y tercera corrida de fermentación respectivamente. Como se observa en estas tablas la variación de actividad enzimática está entre valores de 1×10^{-2} y 1×10^{-4} UI; es decir los valores de actividad para esta enzima son valores cercanos a cero.

Tabla 3.8. Datos de variación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica con el tiempo para la primera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Grupo 1	Grupo 2
0	3,38E-03	4,73E-03	3,38E-03	4,73E-03	4,05E-03 ± 9,55E-04	4,05E-03 ± 9,55E-04
3	3,15E-03	2,48E-03	3,15E-03	2,48E-03	2,81E-03 ± 4,78E-04	2,81E-03 ± 4,78E-04
7	6,53E-03	2,25E-03	6,53E-03	2,25E-03	4,39E-03 ± 3,02E-03	4,39E-03 ± 3,02E-03
11	6,98E-03	4,50E-03	6,98E-03	4,50E-03	5,74E-03 ± 1,75E-03	5,74E-03 ± 1,75E-03
14	3,60E-03	4,95E-03	3,60E-03	4,95E-03	4,28E-03 ± 9,55E-04	4,28E-03 ± 9,55E-04
18	5,63E-03	7,20E-03	5,63E-03	7,20E-03	6,42E-03 ± 1,11E-03	6,42E-03 ± 1,11E-03
21	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
25	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
28	0,00E+00	4,50E-04	0,00E+00	4,50E-04	2,25E-04 ± 3,18E-04	2,25E-04 ± 3,18E-04
32	3,60E-03	6,53E-03	3,60E-03	6,53E-03	5,07E-03 ± 2,07E-03	5,07E-03 ± 2,07E-03
35	5,63E-03	2,93E-03	5,63E-03	2,93E-03	4,28E-03 ± 1,91E-03	4,28E-03 ± 1,91E-03
39	1,17E-02	4,73E-03	1,17E-02	4,73E-03	8,22E-03 ± 4,93E-03	8,22E-03 ± 4,93E-03
41	0,00E+00	1,06E-03	4,95E-03	2,25E-03	5,29E-04 ± 7,48E-04	3,60E-03 ± 1,91E-03
46	6,75E-04	6,53E-03	0,00E+00	0,00E+00	3,60E-03 ± 4,14E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00
49	0,00E+00	0,00E+00	8,55E-03	1,13E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00	4,84E-03 ± 5,25E-03
53	8,55E-03	1,13E-03	1,80E-03	9,00E-04	4,84E-03 ± 5,25E-03	1,35E-03 ± 6,37E-04
63	1,13E-03	0,00E+00	9,00E-04	4,50E-04	5,63E-04 ± 7,96E-04	6,75E-04 ± 3,18E-04
67	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00 ± 0,00E+00	
69	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00 ± 2,64E+00	

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

Tabla 3.9. Datos de variación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Grupo 1	Grupo 2
0	3,38E-03	6,30E-03	3,38E-03	6,30E-03	4,84E-03 ± 2,07E-03	4,84E-03 ± 2,07E-03
3	5,85E-03	1,35E-03	5,85E-03	1,35E-03	3,60E-03 ± 3,18E-03	3,60E-03 ± 3,18E-03
6	4,50E-04	9,00E-04	4,50E-04	9,00E-04	6,75E-04 ± 3,18E-04	6,75E-04 ± 3,18E-04
10	4,95E-03	0,00E+00	4,95E-03	0,00E+00	2,48E-03 ± 3,50E-03	2,48E-03 ± 3,50E-03
13	7,20E-03	9,23E-03	7,20E-03	9,23E-03	8,22E-03 ± 1,43E-03	8,22E-03 ± 1,43E-03
17	9,90E-03	0,00E+00	9,90E-03	0,00E+00	4,95E-03 ± 7,00E-03	4,95E-03 ± 7,00E-03
20	2,14E-02	4,95E-03	2,14E-02	4,95E-03	1,32E-02 ± 1,16E-02	1,32E-02 ± 1,16E-02
24	4,28E-03	4,50E-03	4,28E-03	4,50E-03	4,39E-03 ± 1,59E-04	4,39E-03 ± 1,59E-04
27	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
31	0,00E+00	0,00E+00	6,30E-03	3,60E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00	4,95E-03 ± 1,91E-03
34	0,00E+00	0,00E+00	2,70E-03	4,05E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00	3,38E-03 ± 9,55E-04
38	0,00E+00	0,00E+00	5,40E-03	7,65E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00	6,53E-03 ± 1,59E-03
41	0,00E+00	0,00E+00	7,20E-03	6,75E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00	6,98E-03 ± 3,18E-04
45	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
48	6,75E-03	4,05E-03	1,40E-02	1,22E-02	5,40E-03 ± 1,91E-03	1,31E-02 ± 1,27E-03
52	1,35E-03	3,15E-03	3,60E-03	4,50E-04	2,25E-03 ± 1,27E-03	2,03E-03 ± 2,23E-03
55			1,85E-02	1,40E-02		1,62E-02 ± 3,18E-03
59			0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00 ± 0,00E+00
62			1,31E-02	1,13E-02		1,22E-02 ± 1,27E-03
66			1,22E-02	1,98E-02		1,60E-02 ± 5,41E-03
69			6,75E-03	9,45E-03		8,10E-03 ± 1,91E-03

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

Tabla 3.10. Datos de variación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Cosecha Grupo 1	Cosecha Grupo 2
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
3	3,38E-03	2,70E-03	3,38E-03	2,70E-03	3,04E-03 ± 4,78E-04	3,04E-03 ± 4,78E-04
7	9,90E-03	9,45E-03	9,90E-03	9,45E-03	9,68E-03 ± 3,18E-04	9,68E-03 ± 3,18E-04
10	1,13E-03	6,53E-03	1,13E-03	6,53E-03	3,83E-03 ± 3,82E-03	3,83E-03 ± 3,82E-03
14	1,31E-02	3,15E-03	1,31E-02	3,15E-03	8,10E-03 ± 7,00E-03	8,10E-03 ± 7,00E-03
17	5,63E-03	3,38E-03	5,63E-03	3,38E-03	4,50E-03 ± 1,59E-03	4,50E-03 ± 1,59E-03
21	4,50E-03	3,60E-03	4,50E-03	3,60E-03	4,05E-03 ± 6,37E-04	4,05E-03 ± 6,37E-04
24	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
28	0,00E+00	0,00E+00	2,70E-03	3,15E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00	2,93E-03 ± 3,18E-04
31	1,26E-02	1,22E-02	5,85E-03	6,30E-03	1,24E-02 ± 3,18E-04	6,08E-03 ± 3,18E-04
35	3,83E-03	4,50E-03	7,20E-03	6,30E-03	4,16E-03 ± 4,78E-04	6,75E-03 ± 6,37E-04
38	1,80E-03	9,00E-04	3,60E-03	3,15E-03	1,35E-03 ± 6,37E-04	3,38E-03 ± 3,18E-04
42	1,08E-02	1,13E-02	1,42E-02	1,40E-02	1,10E-02 ± 3,18E-04	1,41E-02 ± 1,59E-04
45	1,31E-02	1,35E-02	1,08E-02	1,13E-02	1,33E-02 ± 3,18E-04	1,10E-02 ± 3,18E-04
49	2,43E-02	2,39E-02	1,80E-02	1,98E-02	2,41E-02 ± 3,18E-04	1,89E-02 ± 1,27E-03
52			4,95E-03	2,27E-02		1,38E-02 ± 1,26E-02
56			1,89E-02	1,89E-02		1,89E-02 ± 6,37E-08
59			6,93E-03	7,43E-03		7,18E-03 ± 3,50E-04
63			3,11E-02	3,33E-02		3,22E-02 ± 1,56E-03

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

En la Figura 3.8 se presentan los datos de actividad enzimática ligninolítica (UI) en función del tiempo, para las tres corridas de fermentación del grupo 1 del hongo *Lentinus edodes*.

Para la primera corrida se presenta variabilidad en los datos. El pico más alto se obtuvo en el día 39 con un valor de $8,22 \times 10^{-3}$ UI. En el día de la primera cosecha (día 41), el valor de actividad enzimática lignino peroxidásica fue de $5,29 \times 10^{-4}$ UI, es decir el valor fue cercano a cero; mientras que, el último día de fermentación (día 49) se tuvo que el valor de actividad enzimática fue de 0,00 UI.

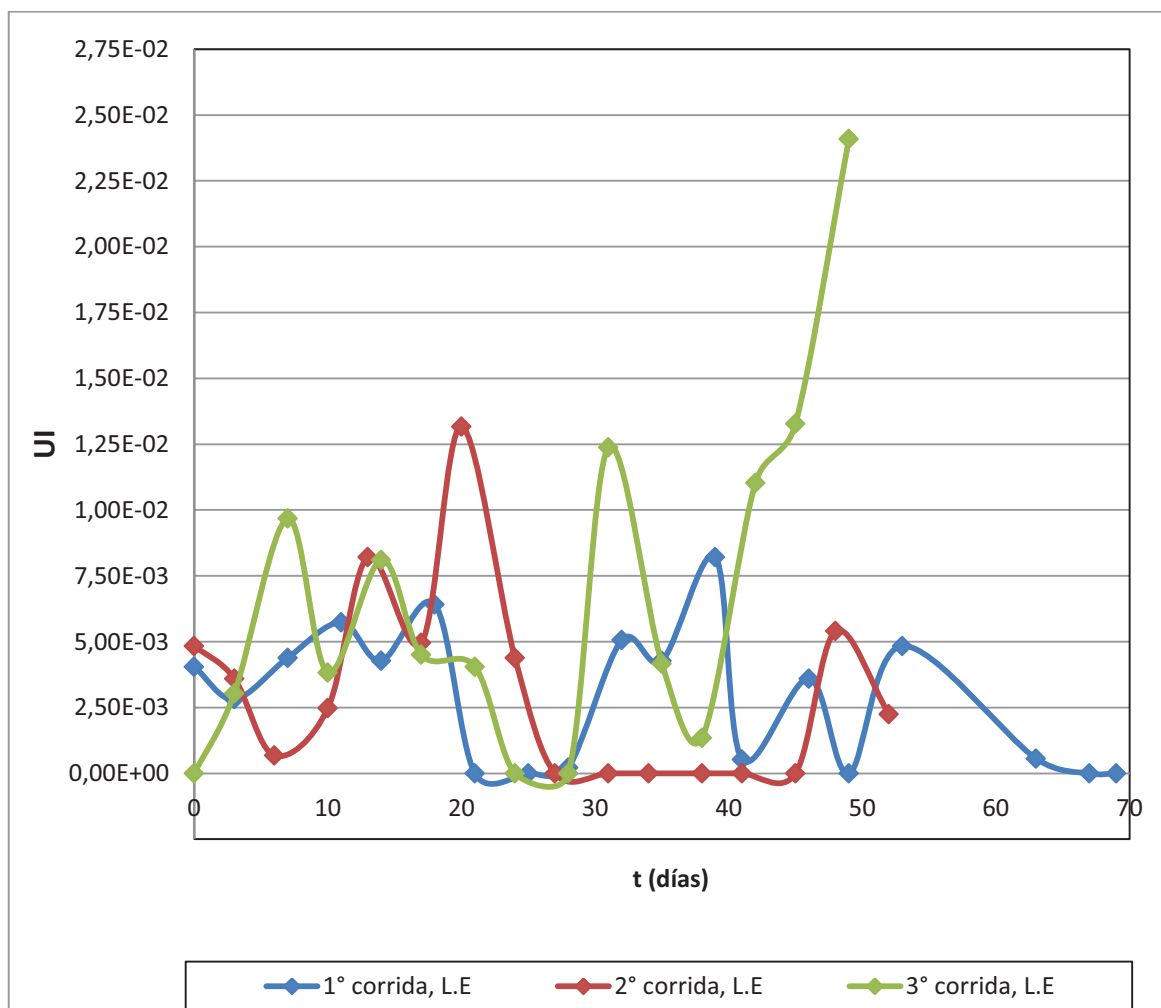


Figura 3.8. Variación de la actividad enzimática ligninolítica con el tiempo las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes* del grupo 1

Como se observa en la Figura 3.8, los datos de actividad enzimática para la segunda corrida del grupo 1 presentaron picos más altos que para la primera corrida, pero en la segunda corrida se observa un mayor número de días sin producción de la enzima que en la primera corrida. El mayor pico de producción de esta enzima se dio en el día 20 con un valor de $1,32 \times 10^{-2}$ UI. Desde el día 27

hasta el día 45 de fermentación, se tuvo un valor de 0,00 UI, es decir no existió producción de la enzima en estos días. En el día de la primera cosecha, es decir el día 31; no se obtuvo actividad enzimática; mientras que en el último día de fermentación (día 52) el valor fue de $2,25 \times 10^{-3}$ UI.

La tercera corrida presenta valores de actividad enzimática mayores a las dos corridas anteriores. Los picos más importantes se presentaron en los días 31 y 49. Para el día 31, el valor de la actividad enzimática fue de $1,24 \times 10^{-2}$ UI y para el día 49 el valor fue de $2,41 \times 10^{-2}$ UI, y este fue el valor más alto de actividad enzimática ligninolítica observado en las tres corridas. Al igual que en la segunda corrida, el día de la cosecha (día 28) no se obtuvo valor de actividad enzimática lignino peroxidásica.

En la Figura 3.9 se presentan los datos de actividad enzimática ligninolítica (UI) con respecto al tiempo, para el grupo 2 de las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes*.

La curva para la primera corrida de fermentación del grupo 2, presentó igual tendencia que los valores de actividad enzimática presentados para el grupo 1 durante la misma corrida. El máximo valor de actividad enzimática se presentó el día 39 y fue de $8,22 \times 10^{-3}$ UI. En el día de la primera cosecha del grupo 2 (día 49), se tuvo un valor de $4,84 \times 10^{-3}$ UI y para el último día de fermentación el valor de actividad fue de $6,75 \times 10^{-4}$ UI.

La segunda corrida del grupo 2, presentó un mayor número de picos, sobre todo a partir del día 42, que los picos presentados por el grupo 1 para esta corrida. Se tuvieron tres picos consecutivos a partir del día 45, los picos se presentaron los días 48, 55 y 66, y los valores alcanzados fueron de $1,31 \times 10^{-2}$ UI, $1,62 \times 10^{-2}$ UI y $1,60 \times 10^{-2}$ UI. En esta corrida, también se obtuvo un valor de cero de actividad enzimática lignino peroxidásica en el día de la primera cosecha (día 59).

La tercera corrida presentó repetidos picos a partir del día 35. Estos picos consecutivos se presentaron en los días 42, 49, 56 y 63, con valores de actividad

enzimática para estos días de $1,41 \times 10^{-2}$ UI, $1,89 \times 10^{-2}$ UI, $1,89 \times 10^{-2}$ UI y $3,22 \times 10^{-2}$ UI respectivamente. El día 56 correspondió al día de primera cosecha del grupo 2 y el día 63 fue el último día de la fermentación.

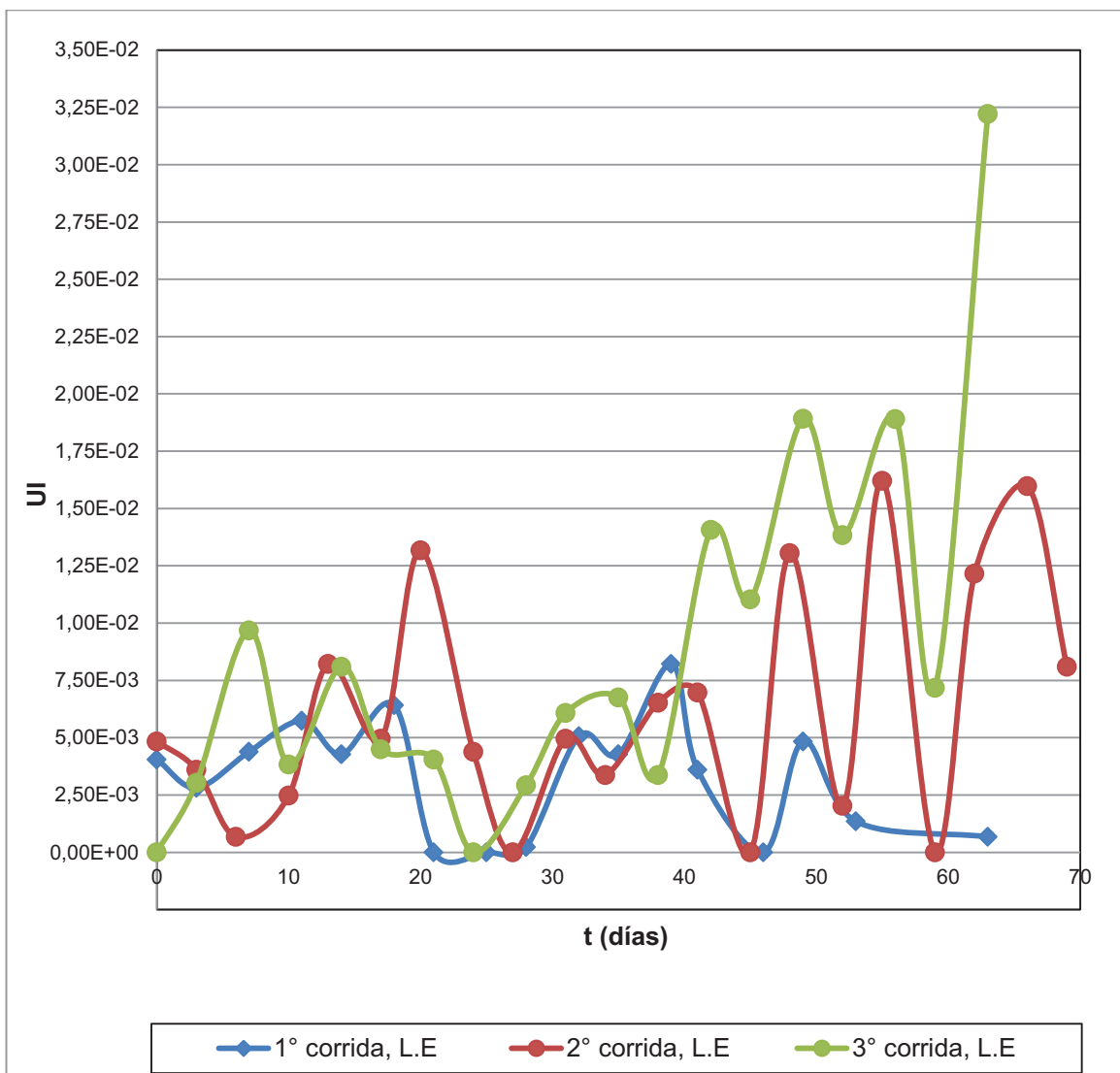


Figura 3.9. Variación de la actividad enzimática ligninolítica con el tiempo para las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes* del grupo 2

La enzima lignino peroxidásica en los ensayos realizados por Vaca (2011) para la obtención de extractos con actividad enzimática celulolítica y ligninolítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171, presentaron valores similares a los reportados en este proyecto para esta enzima, inclusive la mayoría de valores reportados fueron de cero o cercanos a cero (pp. 38-41).

Los máximos picos de producción de la enzima lignino peroxidásica se tuvieron en las etapas finales de fermentación del hongo *Lentinus edodes* y este comportamiento es comparable con los resultados obtenidos por Montoya (2003), en este trabajo la enzima lignino peroxidásica se presentó en los últimos días de incubación del hongo *Grifola frondosa* en dos tipos de sustratos distintos y con esto se confirmó que la lignificación se produce cuando la cantidad de nitrógeno está casi agotada, también se confirmó la presencia de la enzima lignino peroxidásica en la fase de generación de metabolitos secundarios del hongo (p. 60). A pesar de que los días de producción de la enzima lignino peroxidásica por el hongo *Lentinus edodes* en aserrín tropical es comparable con los días de producción de la enzima lignino peroxidásica por el hongo *Grifola frondosa*, los valores de producción de la enzima lignino peroxidásica reportados por Montoya fueron mucho más altos que los obtenidos en este trabajo. Los máximos valores de actividad enzimática lignino peroxidásica obtenidos por Montoya fueron 7,37 y 6,73 UE ($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min), cabe recalcar que para esta autora las unidades UE tienen la misma definición que las unidades UI.

La comparación de medias para la actividad de la enzima lignino peroxidásica en el día inicial de las corridas demuestra que hay diferencias estadísticas significativas. En la Figura 3.10 se presenta de manera gráfica el valor de la media de actividad enzimática lignino peroxidásica para el día inicial de cada corrida y la desviación estándar. En la Tabla 3.11 se tiene el valor p, del análisis de este valor se tuvo que existió una diferencia estadísticamente significativa en la producción de dicha enzima en las tres corridas en este día. El menor valor de la media de producción enzimática se obtuvo para la tercera corrida.

En la Figura 3.11 se presenta de manera gráfica el valor de la media de actividad enzimática lignino peroxidásica y la desviación estándar para el día en el que el micelio cubrió completamente el sustrato. En la Tabla 3.11 se tiene el valor p, del análisis de este valor se tuvo que existió una diferencia estadísticamente significativa en la producción de dicha enzima en las tres corridas en este día. El menor valor de la media de producción enzimática se obtuvo para la primera corrida.

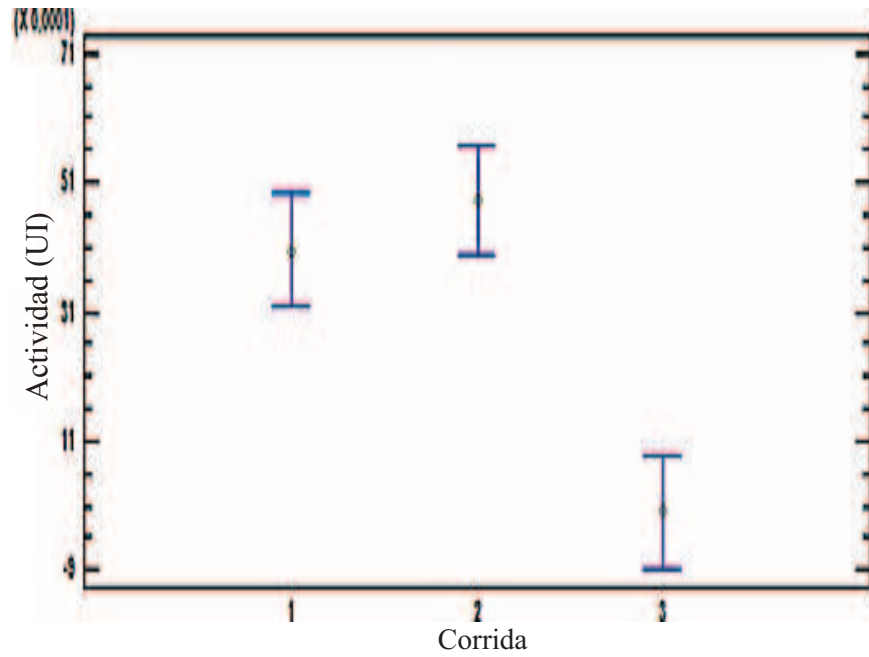


Figura 3.10. Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica en el día inicial para las tres corridas y los dos grupos

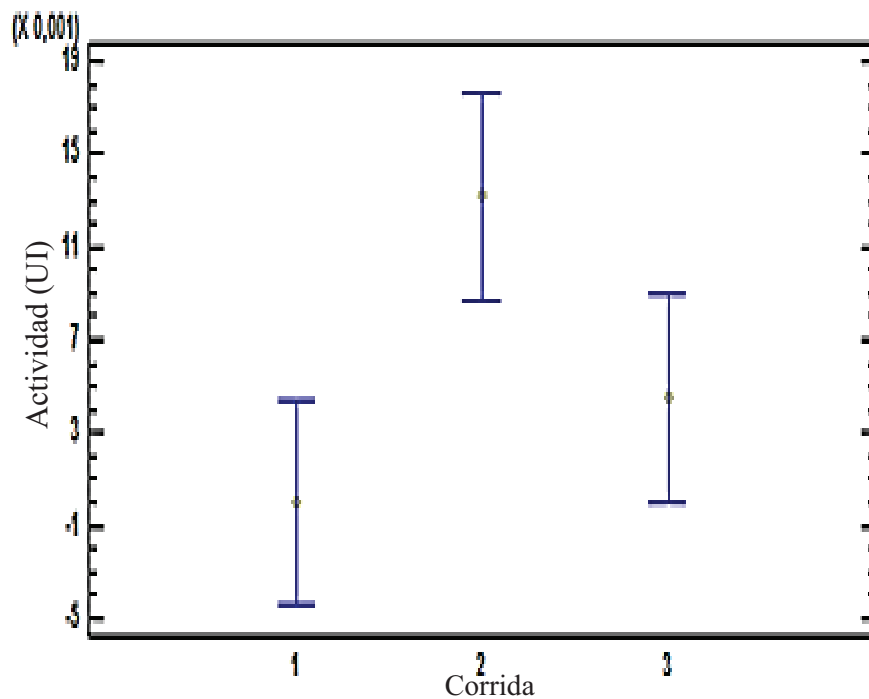


Figura 3.11. Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica para el día de población completa del micelio de las tres corridas y los dos grupos

La diferencia estadística observada en la Figura 3.10 y 3.11, implica que hubo influencia del número de corrida en la producción de esta enzima y esto se atribuye a que la producción de la enzima lignino peroxidásica se da debido a la acción metabólica secundaria de los microorganismos; por lo tanto, tiene una asociación limitada con el crecimiento del hongo y en las fases iniciales de un proceso fermentativo puede o no producirse.

En las Figuras 3.12 y 3.13 que corresponden al análisis del valor medio y desviaciones estándar para el día de primera cosecha y el día de post. inducción respectivamente, se obtuvo como resultado que no existe una variación estadísticamente significativa en la producción de la enzima lignino peroxidásica. En la Tabla 3.11 se presenta el valor de p para estos días y como se observa dichos valores confirman que no existe una diferencia estadística significativa entre la actividad enzimática lignino peroxidásica producida en estos días para las tres corridas.

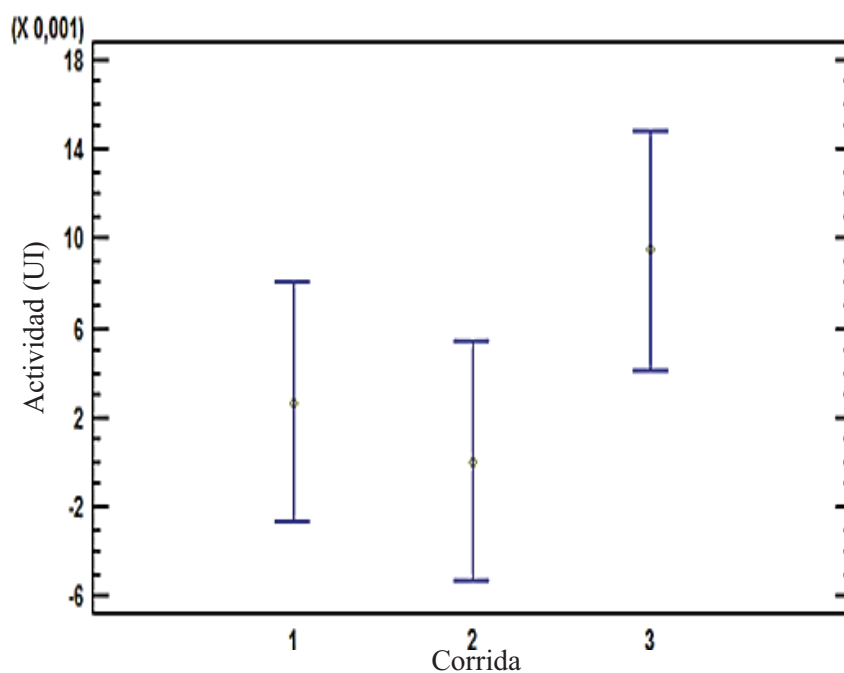


Figura 3.12. Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica para el día de primera cosecha para las tres corridas y los dos grupos

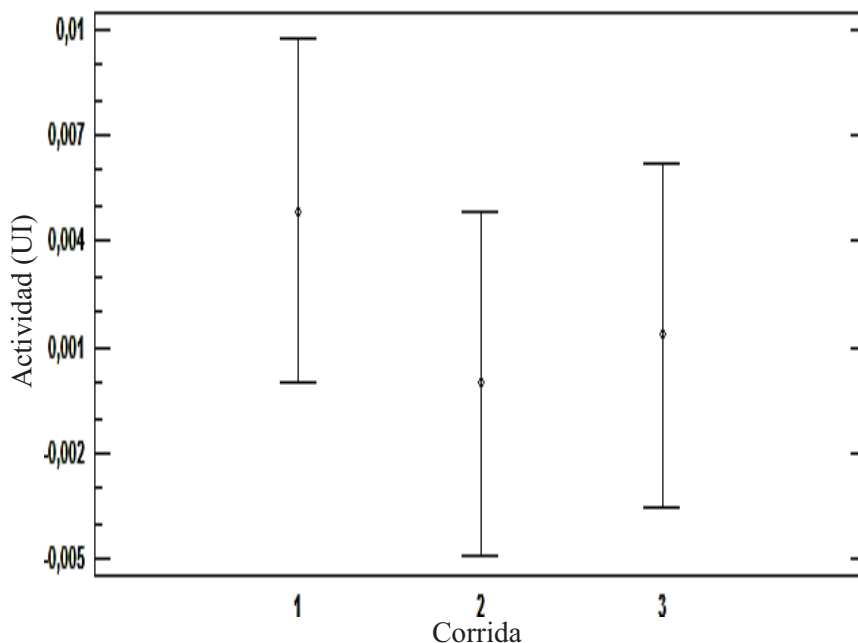


Figura 3.13. Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica para el día de post. inducción para las tres corridas y los dos grupos

En la Figura 3.14 se tiene la representación del valor medio y desviación estándar para el último día de las corridas, como se puede ver en esta gráfica las líneas de confianza no se traslapan lo que significa que existe una diferencia estadísticamente significativa; es decir, que hubo una influencia del número de corrida en la producción de esta enzima. El valor p que se presenta en la Tabla 3.11, también representa la existencia de una diferencia estadística significativa. El mayor valor de media se obtuvo para la tercera corrida y dicha variación en los valores de actividad enzimática puede deberse a que como se mencionó con anterioridad esta enzima se deriva de la acción metabólica secundaria y por lo general no se presenta en las fases de desarrollo micelial si no una vez que el microorganismo se estresa debido a falta de nutrientes.

En la Tabla 3.11 también se tienen los datos de actividad enzimática lignino peroxidásica promedio, al comparar estos valores se tuvo que el valor promedio más alto de actividad enzimática lignino peroxidásica se presentó el último día de las corridas y el menor valor promedio de producción de esta enzima se tuvo el día inicial. Estos resultados son producto del comportamiento propio de esta enzima pues es un metabolito secundario.

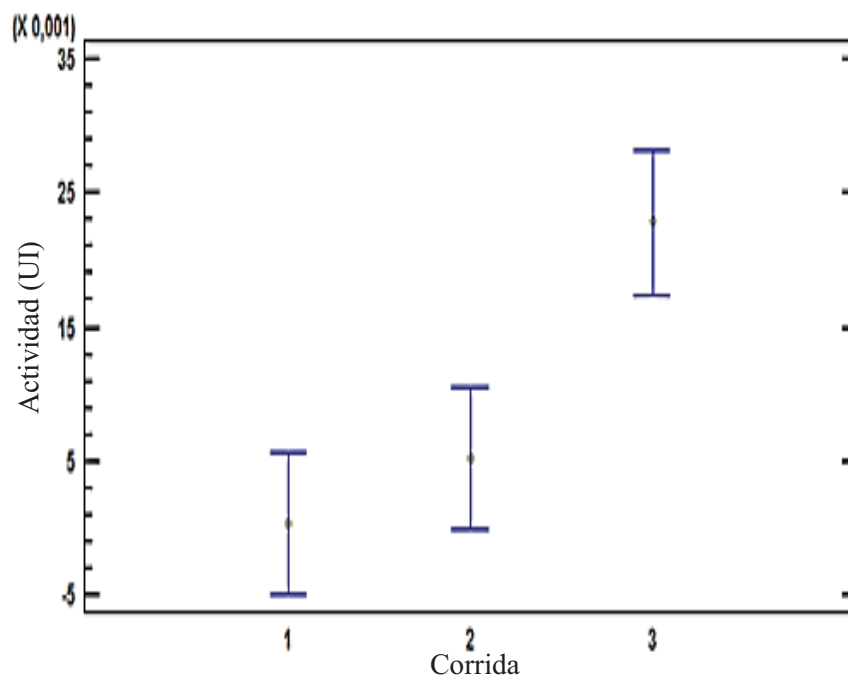


Figura 3.14. Valores medios de actividad enzimática lignino peroxidásica del último día de fermentación para las tres corridas y los dos grupos

Tabla 3.11. Datos de variación de la actividad enzimática lignino peroxidásica promedio y p-valor para las tres corridas

Día de análisis	p-valor	Actividad enzimática lignino peroxidásica promedio (UI)
Día Inicial	0,0003	2,97E-03
Día de crecimiento del micelio	0,0235	5,89E-03
Día de primera cosecha	0,1768	4,05E-03
Día post. inducción	0,3839	2,06E-03
Último día de corrida	0,0025	9,42E-03

3.3.3.DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MANGANESOPEROXIDÁSICA DEL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

En las tablas 3.12, 3.13 y 3.14 se listan los valores de UI calculados para la actividad enzimática manganeso peroxidásica del hongo *Lentinus edodes* en la primera, segunda y tercera corrida de fermentación.

Como se observa en la Tabla 3.12, los valores de actividad enzimática manganeso peroxidásica son iguales para el grupo 1 y para el grupo 2, desde el inicio de la fermentación hasta el día 39; excepto por el día 18. A partir del día 41, la tendencia tanto para el grupo 1 como para el grupo 2 es parecida para esta corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*.

Tabla 3.12. Datos de variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para la primera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Grupo 1	Grupo 2
0	1,62E-03	7,61E-04	1,62E-03	7,61E-04	1,19E-03 ± 6,06E-04	1,19E-03 ± 7,28E-03
3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
7	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
11	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
14	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
18	3,81E-04	1,90E-03	0,00E+00	0,00E+00	1,14E-03 ± 1,08E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00
21	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
25	8,37E-03	1,10E-02	8,37E-03	1,10E-02	9,71E-03 ± 1,88E-03	9,71E-03 ± 1,88E-03
28	4,39E-02	5,52E-03	4,39E-02	5,52E-03	2,47E-02 ± 2,71E-02	2,47E-02 ± 2,71E-02
32	1,16E-02	9,14E-03	1,16E-02	9,14E-03	1,04E-02 ± 1,75E-03	1,04E-02 ± 1,75E-03
35	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
39	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
41	0,00E+00	0,00E+00	2,09E-02	1,14E-02	0,00E+00 ± 0,00E+00	1,62E-03 ± 6,73E-03
46	6,95E-03	1,82E-02	0,00E+00	0,00E+00	1,26E-02 ± 7,94E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00
49	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
53	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
63	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
67	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00 ± 0,00E+00	
69	0,00E+00	0,00E+00			0,00E+00 ± 0,00E+00	

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

Tabla 3.13. Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
6	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
13	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
17	1,28E-02	3,82E-02	1,28E-02	3,82E-02	2,55E+00 ± 1,80E-02	2,55E+00 ± 1,80E-02
20	8,47E-02	3,31E-02	8,47E-02	3,31E-02	5,89E-02 ± 3,65E-02	5,89E-02 ± 3,65E-02
24	4,09E-03	4,82E-02	4,09E-03	4,82E-02	2,62E-02 ± 3,12E-02	2,62E-02 ± 3,12E-02
27	7,37E-02	7,66E-02	7,37E-02	7,66E-02	7,51E-02 ± 2,09E-03	7,51E-02 ± 2,09E-03
31	7,96E-02	7,57E-02	7,96E-02	7,57E-02	7,77E-02 ± 2,76E-03	7,77E-02 ± 2,76E-03
34	8,80E-02	8,80E-02	6,86E-02	7,47E-02	8,80E-02 ± 0,00E+00	7,17E-02 ± 4,31E-03
38	9,54E-02	5,90E-02	5,37E-02	4,54E-02	7,72E-02 ± 2,57E-02	4,95E-02 ± 5,85E-03
41	3,58E-02	3,14E-02	6,84E-02	7,50E-02	3,36E-02 ± 3,10E-03	7,17E-02 ± 4,68E-03
45	2,68E-02	1,88E-02	4,61E-02	4,46E-02	2,28E-02 ± 5,65E-03	4,53E-02 ± 1,01E-03
48	1,58E-02	9,14E-03	1,87E-02	3,38E-02	1,25E-02 ± 4,71E-03	2,63E-02 ± 1,06E-02
52	1,29E-02	1,39E-02	3,14E-02	3,24E-02	1,34E-02 ± 6,73E-04	3,19E-02 ± 6,73E-04
55			8,66E-03	1,83E-02		1,35E-02 ± 6,80E-03
59			1,62E-02	1,71E-02		1,67E-02 ± 6,73E-04
62			9,52E-04	1,71E-03		1,33E-03 ± 5,38E-04
66			8,75E-03	1,01E-02		9,42E-03 ± 9,42E-04
69			0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00 ± 0,00E+00

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

Tabla 3.14. Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	UI				UI Promedio	
	Grupo1	Grupo1	Grupo2	Grupo2	Cosecha Grupo 1	Cosecha Grupo 2
0	3,90E-03	3,81E-04	3,90E-03	3,81E-04	2,14E-03 ± 2,49E-03	2,14E-03 ± 2,49E-03
3	1,90E-04	1,52E-03	1,90E-04	1,52E-03	8,56E-04 ± 9,42E-04	8,56E-04 ± 9,42E-04
7	5,50E-02	0,00E+00	5,50E-02	0,00E+00	2,75E-02 ± 3,89E-02	2,75E-02 ± 3,89E-02
10	4,55E-02	4,36E-02	4,55E-02	4,36E-02	4,45E-02 ± 1,35E-03	4,45E-02 ± 1,35E-03
14	9,52E-04	1,33E-03	9,52E-04	1,33E-03	1,14E-03 ± 2,69E-04	1,14E-03 ± 2,69E-04
17	7,06E-02	3,54E-02	7,06E-02	3,54E-02	5,30E-02 ± 2,49E-02	5,30E-02 ± 2,49E-02
21	8,09E-02	8,08E-02	8,09E-02	8,08E-02	8,08E-02 ± 6,73E-05	8,08E-02 ± 6,73E-05
24	7,45E-02	7,72E-02	3,64E-02	3,41E-02	7,58E-02 ± 1,88E-03	3,52E-02 ± 1,61E-03
28	4,26E-02	4,42E-02	1,08E-02	1,50E-02	4,34E-02 ± 1,08E-03	1,29E-02 ± 2,96E-03
31	3,86E-02	3,71E-02	0,00E+00	0,00E+00	3,79E-02 ± 1,08E-03	0,00E+00 ± 0,00E+00
35	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
38	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
42	1,33E-03	3,81E-04	0,00E+00	0,00E+00	8,56E-04 ± 6,73E-04	0,00E+00 ± 0,00E+00
45	0,00E+00	0,00E+00	2,85E-04	3,81E-04	0,00E+00 ± 0,00E+00	3,33E-04 ± 6,73E-05
49	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00	0,00E+00 ± 0,00E+00
52			0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00 ± 0,00E+00
56			0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00 ± 0,00E+00
59			0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00 ± 0,00E+00
63			0,00E+00	0,00E+00		0,00E+00 ± 0,00E+00

$\bar{x} \pm \sigma$ (n = 2)

En la Figura 3.15 se presentan los valores de actividad enzimática manganeso peroxidásica del grupo 1 en las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. La actividad enzimática manganeso peroxidásica presentó valores de actividad cercanos a cero. Los días 25, 28, 32 y 46 se tuvieron picos de actividad

enzimática manganeso peroxidásica. Los valores más altos de actividad enzimática correspondieron a los picos presentados los días 28 y 46, y los valores fueron de $2,47 \times 10^{-2}$ UI y $1,47 \times 10^{-2}$ UI respectivamente.

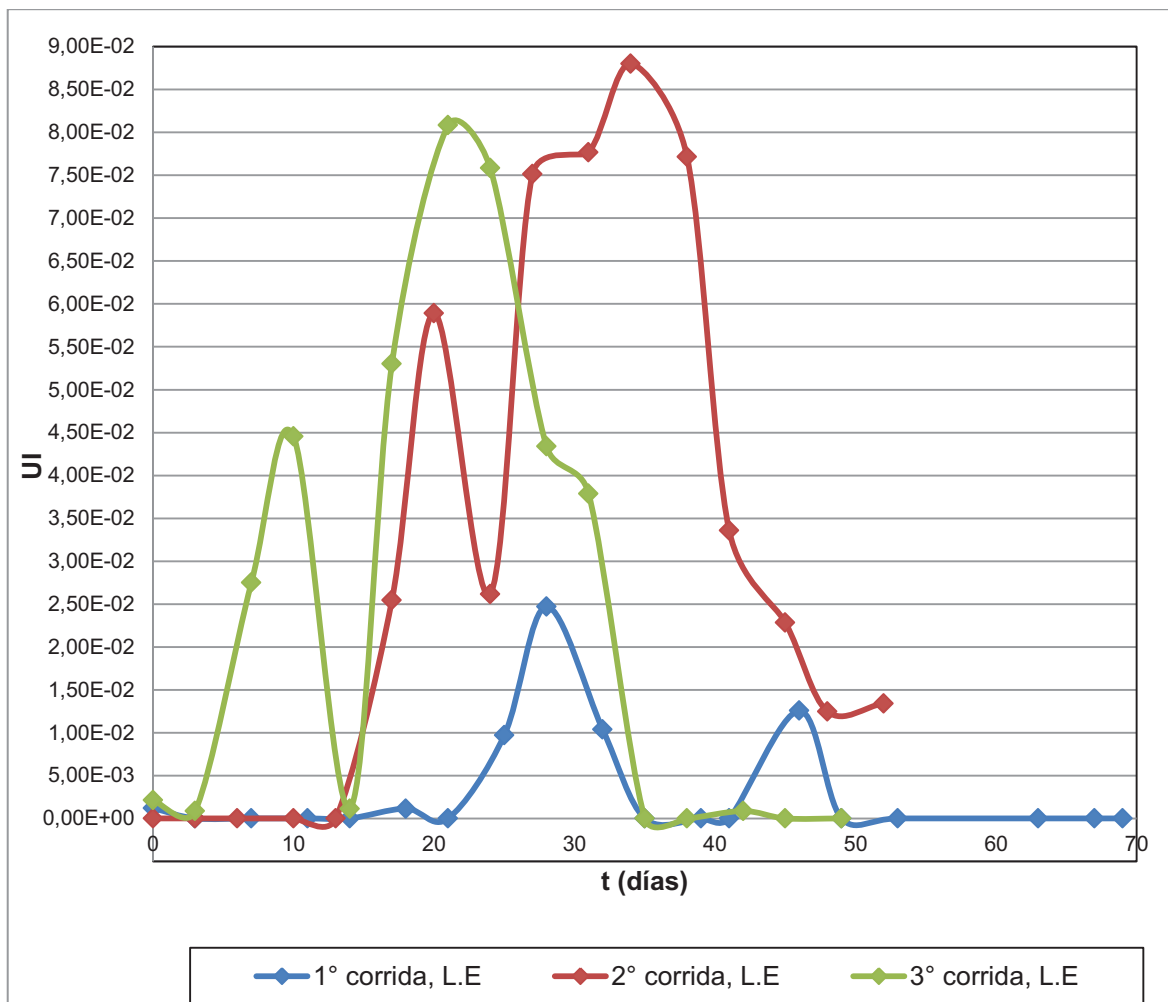


Figura 3.15. Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes* para el grupo 1

En la segunda corrida se tuvieron valores de actividad enzimática mayores a los valores presentados en la primera corrida. En esta corrida en la Figura 3.15, se pueden observar dos picos significativos, el primero se presentó en el día 20, con un valor de $5,89 \times 10^{-2}$ UI, y el segundo se presentó el día 34, con un valor de $8,80 \times 10^{-2}$ UI. En el día de la primera cosecha del grupo 1 (día 31), el valor de la actividad enzimática manganeso peroxidásica fue de $7,77 \times 10^{-2}$ UI, valor cercano al presentado en el día 34, donde se tuvo el valor más alto de actividad

enzimática para esta corrida y fue de $8,80 \times 10^{-2}$ UI. En el día 52, último día de la fermentación, se tuvo un valor de $1,34 \times 10^{-2}$ UI.

La tercera corrida presentó una tendencia muy parecida a la segunda corrida y también se pudieron observar dos picos sobresalientes. En el día 10 se presentó un primer pico con un valor de $4,45 \times 10^{-2}$ UI y en el día 21 se presentó el otro pico con un valor de $8,08 \times 10^{-2}$ UI. En el día de la primera cosecha del grupo 1, día 28, se tuvo un valor de $4,34 \times 10^{-2}$ UI. En la segunda cosecha el valor de la actividad fue nulo.

En la Figura 3.16 se graficaron los valores de actividad enzimática manganeso peroxidásica en función del tiempo para el grupo 2 en las tres corridas. En la primera corrida del grupo 2 se obtuvo una curva con igual tendencia que la curva que fue obtenida para el grupo 1. En el día 28 se presentó un pico con un valor de $2,47 \times 10^{-2}$ UI y en el día 41 se presentó otro pico con un valor de $1,61 \times 10^{-2}$ UI. En el día de la primera cosecha del grupo 2, día 49, no se tuvo actividad enzimática manganeso peroxidásica.

La segunda corrida del grupo 2 como se observa en la Figura 3.16, presentó un mayor número de picos que el grupo 1 para la misma corrida; sin embargo, los picos más importantes fueron tres. El primer pico se presentó en el día 20 y tuvo un valor de $5,89 \times 10^{-2}$ UI, el segundo pico se presentó el día 31 con un valor de $7,77 \times 10^{-2}$ UI, y un tercer pico se pudo observar en el día 41 con un valor de $7,17 \times 10^{-2}$ UI. Después de este día el valor de actividad enzimática manganeso peroxidásica disminuyó hasta llegar a ser nulo el último día de la corrida. En el día 59, día de la primera cosecha del grupo 2, se tuvo un valor de $1,67 \times 10^{-2}$ UI.

Para la tercera corrida del grupo 2 se tuvieron dos picos, uno el día 10, con un valor de $4,45 \times 10^{-2}$ UI y el otro el día 21, con un valor de $8,08 \times 10^{-2}$ UI. Después de este día el valor de la actividad enzimática manganeso peroxidásica disminuyó rápidamente, y fue nulo desde el día 31 hasta el último día de la corrida.

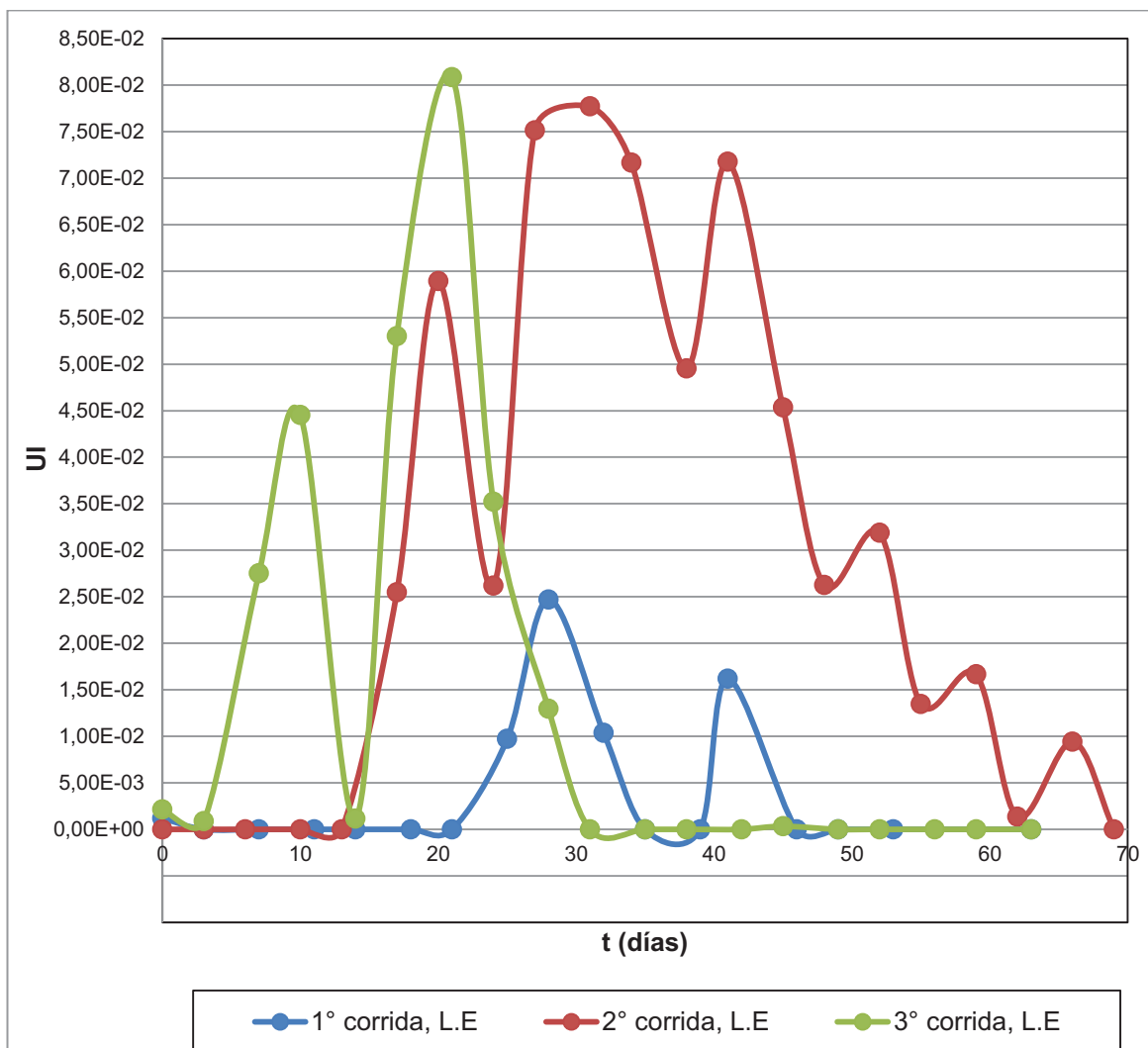


Figura 3.16. Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo de las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes* para el grupo 2

En la figura anterior se observa que, la actividad manganeso peroxidásica se produjo entre los días 20 y 50 de las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes*, en los días anteriores y posteriores a este período no existió producción de la enzima manganeso peroxidásica.

Según Buswell, Cai y Chang (1995) la producción de la enzima manganeso peroxidásica se da por la limitación de nitrógeno y por la existencia de manganeso, ya que la función de la manganeso peroxidasa es oxidar Mn^{+2} a Mn^{+3} debido a que la disponibilidad de estos compuestos es variable en los sustratos y dependiente de la fase de desarrollo en la que se encuentre el hongo, esta

enzima puede o no ser producida por el hongo (p. 136). Se podría decir que la disponibilidad de estos compuestos en el proceso fermentativo se dio entre los días 20 y 50 de fermentación del hongo *Lentinus edodes*.

El perfil de actividad de la enzima manganeso peroxidásica obtenido en este trabajo, está en el rango de valores presentado para el estudio de producción de enzimas celulolíticas y ligninolíticas a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* en rastrojo de maíz realizado por Vaca (2011), pues en dicho estudio se produjo la enzima manganeso peroxidásica durante los días 12 y 22 de la fermentación para las cepas 404 y 2171 de *Pleurotus ostreatus* respectivamente, y el máximo valor alcanzado fue de $7,93 \times 10^{-2}$ UI para la cepa 404 y de $8,63 \times 10^{-2}$ UI para la cepa 2171; en los demás días de fermentación los valores de actividad enzimática fueron de cero o cercanos a cero (pp. 44).

Del análisis estadístico realizado para la enzima manganeso peroxidásica se determinó que no existió una diferencia estadísticamente significativa en la producción de dicha enzima en las diferentes corridas, para ninguno de los días considerados para el análisis, excepto el día de post inducción, día en el cual si hubo una diferencia estadística significativa.

En las figuras 3.17, 3.18 y 3.19 se tienen las gráficas correspondientes a los valores medios y desviaciones estándar de la producción de la enzima manganeso peroxidásica para las tres corridas en los días inicial, de completa formación del micelio y de la primera cosecha respectivamente; como se observa en estas figuras, no existe una diferencia estadísticamente significativa ya que las líneas de confianza se solapan. En la Tabla 3.15 se tabularon los valores p para estos días de análisis y como se observa en dicha tabla los valores son mayores que 0,05 que es el nivel de confianza predeterminado, por lo cual se puede decir que no existió diferencia estadísticamente significativa en la producción de esta enzima para estos días.

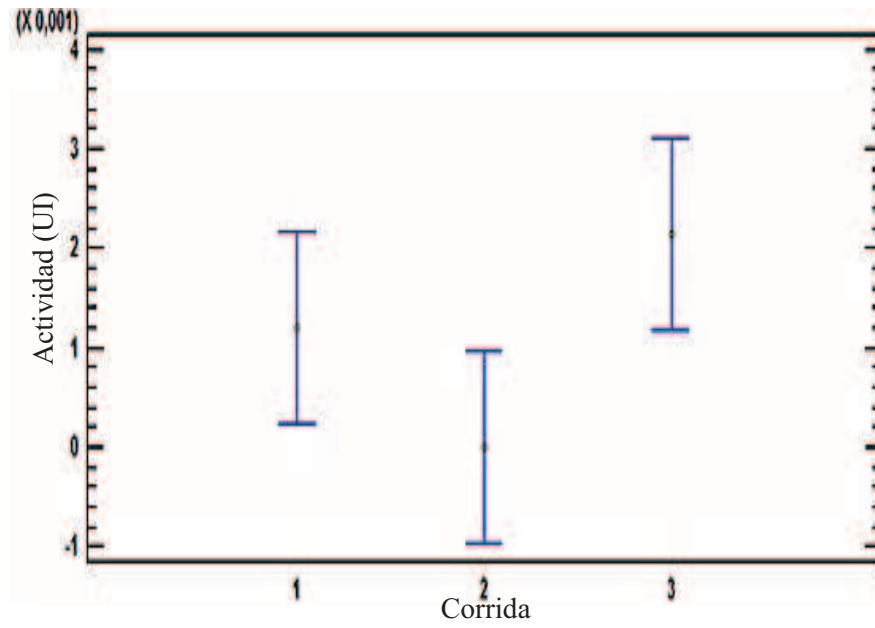


Figura 3.17. Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica en el día inicial para las tres corridas y los dos grupos

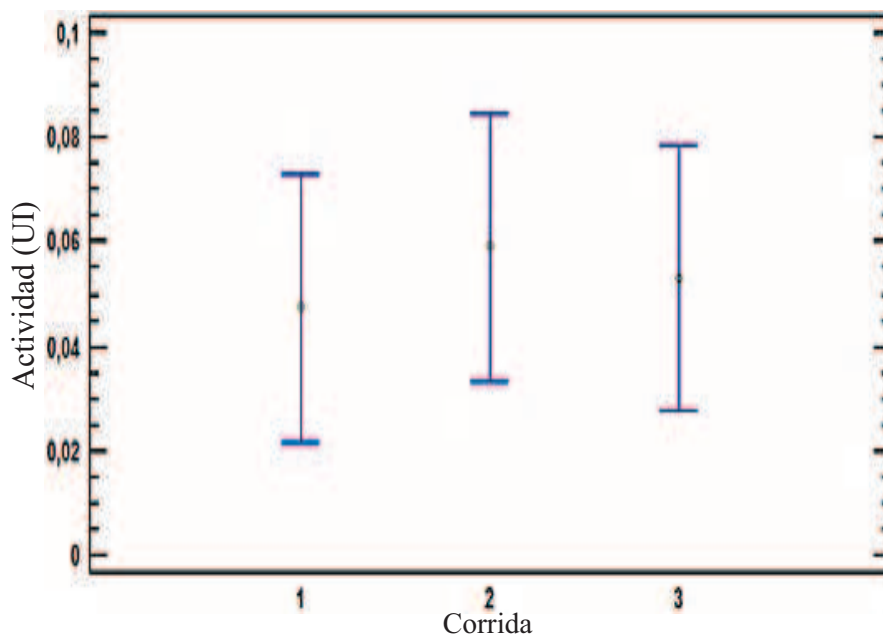


Figura 3.18. Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica para el día de población completa del micelio para las tres corridas y los dos grupos

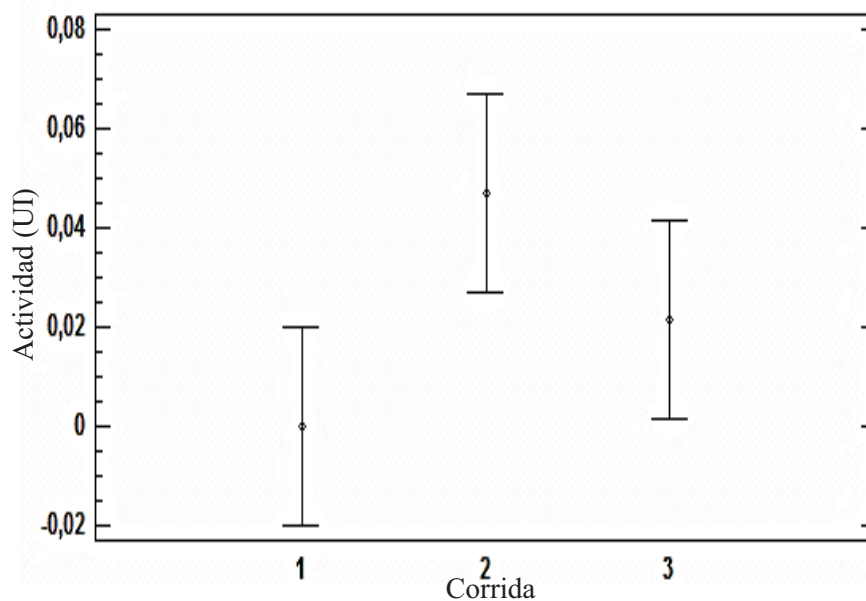


Figura 3.19. Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica para el día de primera cosecha para las tres corridas y los dos grupos

En la Figura 3.20 se graficaron los valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica y las desviaciones estándar para el día de post inducción de las tres corridas. Como se observa en esta figura existe una diferencia estadísticamente significativa para estos valores pues el valor de la media para la segunda corrida fue diferente de cero; mientras que, para las otras dos corridas fue de cero. La diferencia estadística observada debida al valor mayor a cero de la segunda corrida se dio ya que la enzima manganeso peroxidásica se produjo durante prácticamente todo el proceso de fermentación de esta corrida, seguramente esto sucedió debido a la presencia de mayor cantidad de Mn^{+2} en esta corrida. En la Tabla 3.15 se tiene el valor de p , el cual fue menor a 0,05 y por eso se concluye que existió una diferencia estadística significativa en la producción de enzima manganeso peroxidásica en este día.

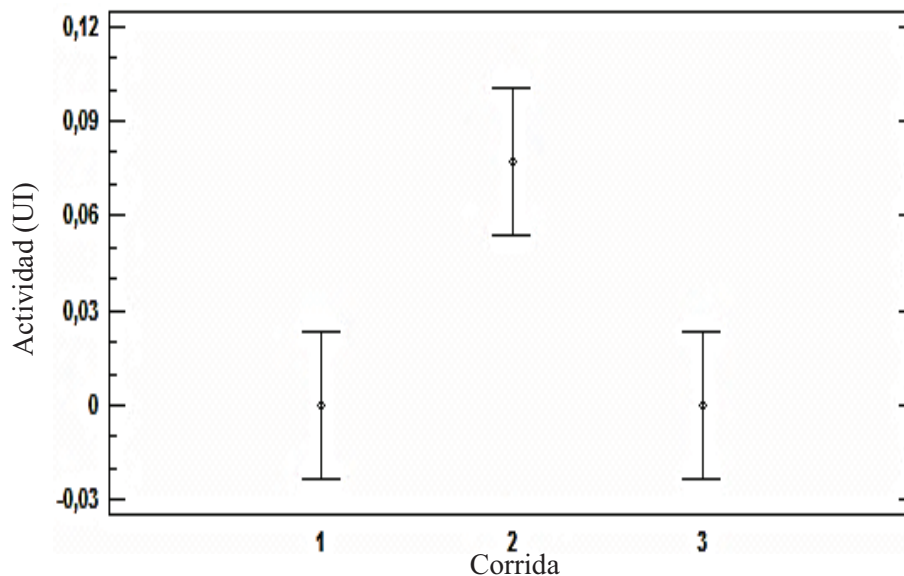


Figura 3.20. Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica para el día de post. inducción para las tres corridas y los dos grupos

En la Figura 3.21 se observa de manera gráfica los valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica y sus respectivas desviaciones estándar, esta figura indica que no existió una diferencia estadística significativa en la producción de esta enzima en el último día de la corrida. Esta figura se parece a la Figura 3.20, pues al igual que en la Figura 3.20, en la Figura 3.21 se tienen que el mayor valor medio de actividad manganeso peroxidásica se obtuvo en la corrida 2, lo que infiere que lo mencionado en el anterior párrafo fue verdadero y en esta corrida hubo mayor disponibilidad de Mn^{+2} , por lo que se produjo mayor cantidad de enzima manganeso peroxidasa. En la Tabla 3.15 se observa el valor de p , el cual al ser mayor que 0,05 no existió una diferencia estadística significativa.

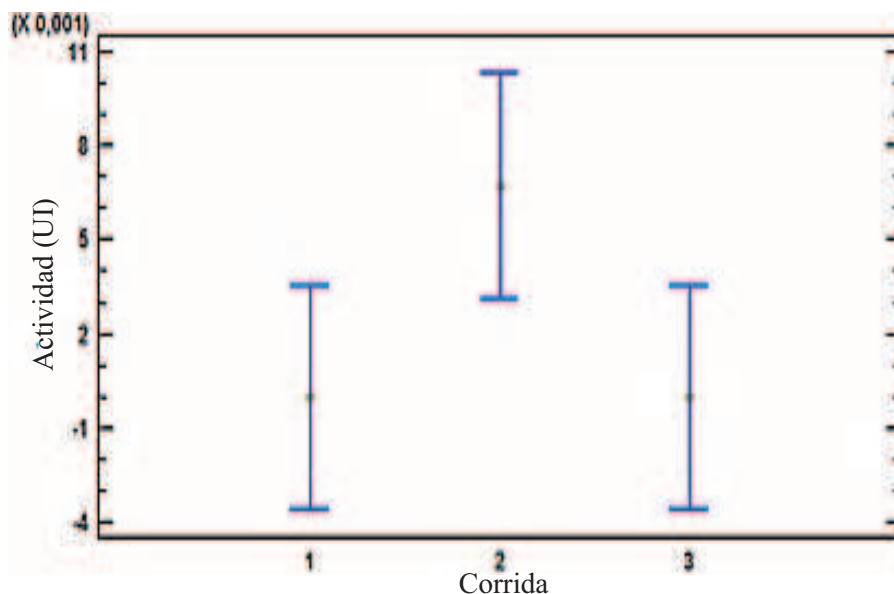


Figura 3.21. Valores medios de actividad enzimática manganeso peroxidásica del último día de fermentación para las tres corridas y los dos grupos

En la Tabla 3.15 se presentan los valores p y los valores de actividad enzimática manganeso peroxidásica promedio; el valor promedio de actividad enzimática manganeso peroxidásica más alto se presentó el día de crecimiento del micelio y el menor valor promedio de producción de esta enzima se tuvo el día inicial. Estos resultados son producto del comportamiento propio de esta enzima pues es un metabolito secundario.

Tabla 3.15. Datos de variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica promedio y p-valor para las tres corridas

Día de análisis	p-valor	Actividad enzimática manganeso peroxidásica promedio (UI)
Día Inicial	0,0915	1,11E-03
Día de crecimiento del micelio	0,8791	5,31E-02
Día de primera cosecha	0,0721	2,30E-02
Día post. inducción	0,0213	2,57E-02
Último día de corrida	0,1009	2,23E-03

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

Para determinar los períodos de mayor generación de las actividades enzimáticas celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica, se graficaron los datos de actividad enzimática en función del tiempo para las tres corridas y se compararon los perfiles de generación de cada enzima y los picos máximos de actividad enzimática, con los períodos de crecimiento del hongo.

3.4.1. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA LA PRIMERA CORRIDA DEL GRUPO 1

Con los datos de actividad enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica del grupo 1 obtenidos de las tablas 3.4, 3.8 y 3.11 respectivamente, se obtuvo la Figura 3.22. En esta figura se observa que la enzima producida en mayor cantidad por el hongo *Lentinus edodes* durante toda la etapa de fermentación fue la enzima celulolítica. La curva de actividad enzimática celulolítica con el tiempo para el grupo 1 del hongo *Lentinus edodes* presentó varios picos en las diferentes fases de crecimiento del hongo.

Durante la fase de adaptación al sustrato, que presentó el hongo se tuvo que la actividad enzimática celulolítica disminuyó con respecto al valor inicial que fue de 0,147 UI, en el día de finalización de la fase de desarrollo del micelio del hongo sobre todo el aserrín de la funda se presentó un primer pico en el día 25 con un valor de 0,146 UI. Luego entró en la etapa en la que el micelio se fortificó, se dio la inducción y se generaron los primordios, en esta etapa la actividad enzimática disminuyó. La actividad enzimática celulolítica volvió a incrementar cuando se tuvo la primera cosecha en el día 41 con un valor de 0,166 UI. Durante la fase de inducción del nuevo periodo de fructificación se observa que los datos de actividad enzimática disminuyeron y aumentaron, y se presentó un pico el día 53.

El máximo valor de actividad enzimática celulolítica se presentó el día 69 y el valor fue de 0,246 UI. El día 69 fue el último día de fermentación y no se obtuvieron cuerpos fructíferos.

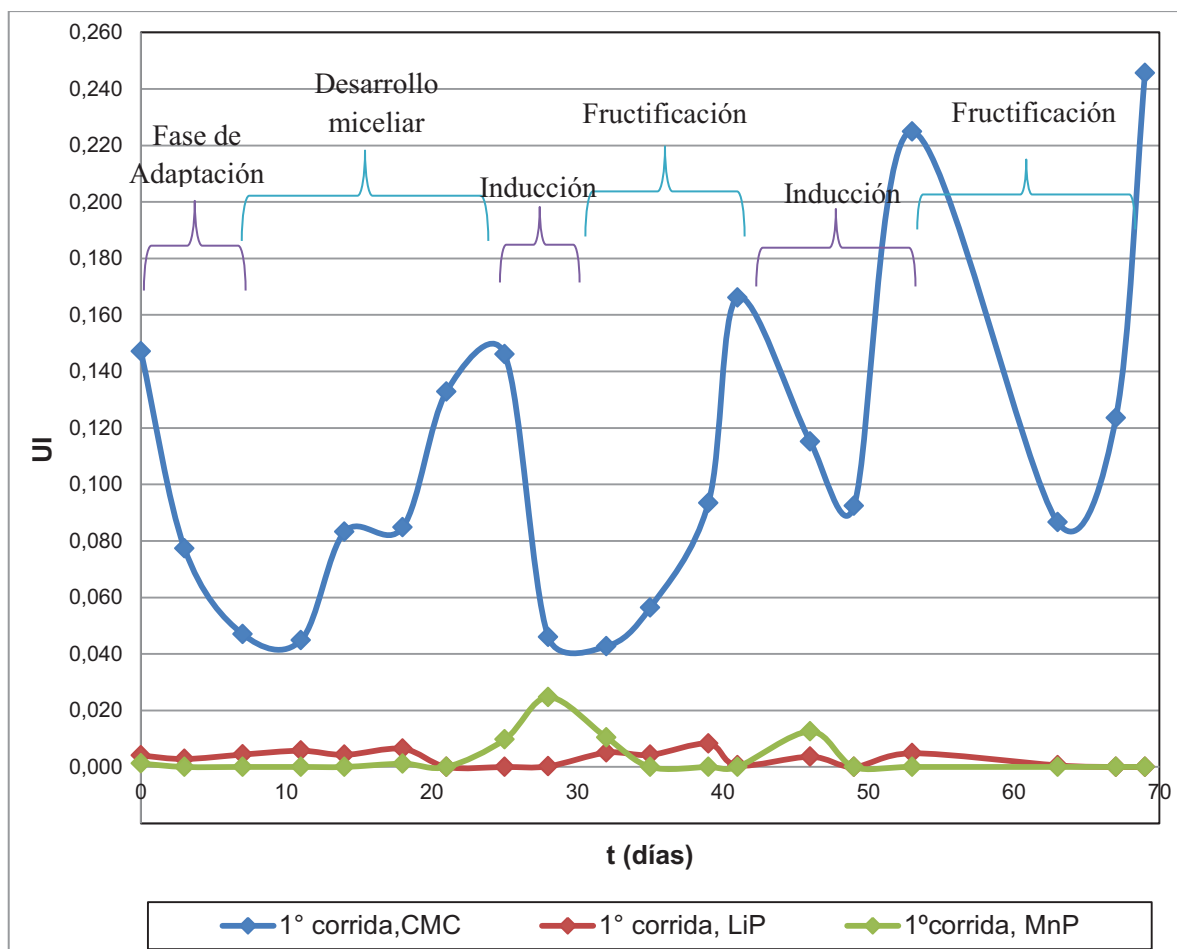


Figura 3.22. Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), lignino peroxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo de la primera corrida de fermentación del grupo 1 del hongo *Lentinus edodes*

En la Figura 3.22 se observa que la actividad enzimática lignino peroxidásica es prácticamente nula y no presentó picos pronunciados en ninguna fase de fermentación del hongo. Sin embargo, la máxima producción de actividad enzimática se tuvo el día 39 con un valor de $8,22 \times 10^{-3}$ UI.

La mayoría de días del proceso de fermentación del hongo *Lentinus edodes* no se presentó actividad enzimática manganeso peroxidásica; pero, al comparar los

valores de producción de esta enzima con la actividad enzimática lignino peroxidásica, los picos de la actividad manganeso peroxidásica alcanzaron valores mayores. El máximo pico de producción de la enzima manganeso peroxidásica se obtuvo en el día 28 con un valor de $2,47 \times 10^{-2}$ UI.

3.4.2. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA LA PRIMERA CORRIDA DEL GRUPO 2

Con los datos de actividad enzimática del grupo 2 de las tablas 3.5, 3.8 y 3.12 se obtuvo la Figura 3.23. Se observa que la tendencia de las curvas de producción enzimática de las tres enzimas, fueron iguales a la producción enzimática del grupo 1. Sin embargo, en este caso, la primera cosecha se presentó el día 49, 8 días más tarde que en el grupo 1, resultado esperado debido a la diferencia en el crecimiento del hongo *Lentinus edodes* en las fundas correspondientes a los 2 grupos.

En la primera cosecha del grupo 2 debido al mayor tiempo de fermentación del hongo hasta llegar a la etapa de la cosecha, se tuvo un incremento en la actividad enzimática celulolítica con respecto a la actividad enzimática presentada en la fermentación del grupo 1. En la fase de desarrollo del micelio se tuvo que los valores de actividad enzimática celulolítica disminuyeron con respecto al valor inicial que fue de 0,147 UI. Para el día 25 el micelio había cubierto casi por completo el aserrín al igual que en el caso anterior, pero la fase de apareamiento de los primordios se tardó más y la primera cosecha recién se presentó el día 49 con un valor de 0,225 UI y este fue el máximo valor de actividad enzimática celulolítica que se tuvo para esta corrida.

Respecto de la actividad enzimática lignino peroxidásica, se observa un comportamiento similar al del grupo 1. La máxima producción de actividad enzimática lignino peroxidásica se tuvo el día 39 con un valor de $8,22 \times 10^{-3}$ UI, al igual que en el grupo 1.

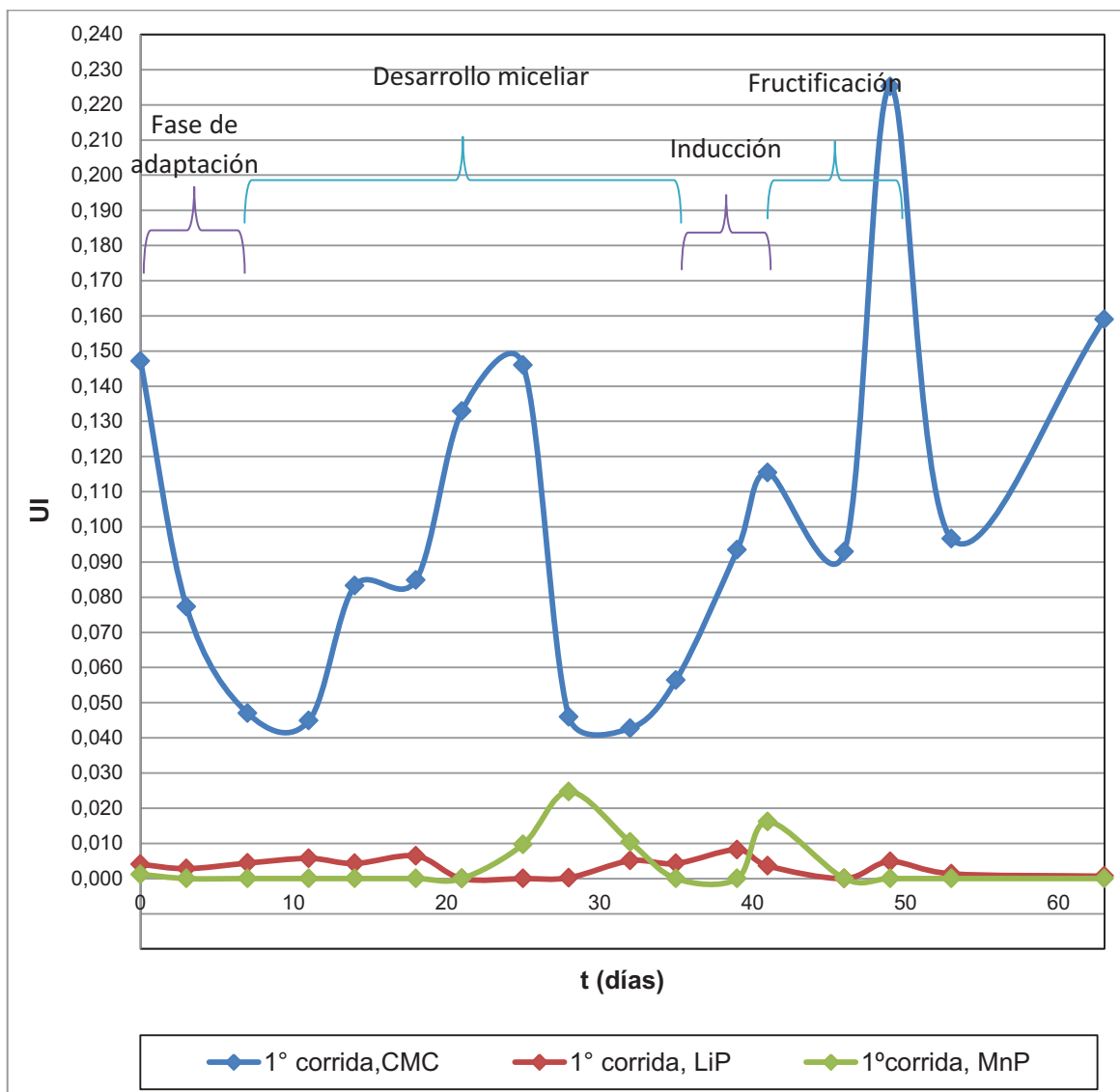


Figura 3.23. Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), lignino peroxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo de la primera corrida de fermentación del grupo 2 del hongo *Lentinus edodes*

El máximo valor de actividad manganeso peroxidásica se presentó el día 28 con un valor de $2,47 \times 10^{-2}$ UI, y la tendencia de la curva de actividad enzimática en función del tiempo para el grupo 2 fue igual a la obtenida para el grupo 1.

3.4.3. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA LA SEGUNDA CORRIDA DEL GRUPO 1

En la Figura 3.24 se presentan la variación de la actividad enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica en función del tiempo para el grupo 1 durante la segunda corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. La actividad enzimática celulolítica fue mayor que las actividades enzimáticas lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica en toda la etapa de fermentación del hongo.

La actividad enzimática celulolítica disminuyó en los primeros días de fermentación del hongo, quizá esto estuvo asociado a la fase de adaptación del hongo. En el día 20 se presentó un primer pico con un valor de 0,134 UI y esto se dio durante la fase de desarrollo del micelio en el aserrín. Luego, la actividad enzimática disminuyó, volvió a aumentar, y presentó un pico en el día 31 que fue el día de la primera cosecha del grupo 1 el valor de actividad enzimática fue de 0,175 UI. Después del día 31, durante la fase de inducción de la nueva oleada el valor de actividad enzimática disminuyó, pero al tiempo de segunda cosecha el valor de actividad enzimática nuevamente aumentó y al día 52 presentó un valor de 0,191 UI, este fue el máximo valor de actividad enzimática celulolítica obtenido, excepto por el valor de actividad inicial (día 0).

La actividad enzimática lignino peroxidásica fue prácticamente nula para esta corrida, por lo tanto no existió una producción considerable de esta enzima durante el tiempo de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. El máximo valor de actividad enzimática lignino peroxidásica se alcanzó el día 20 y fue de $1,32 \times 10^{-2}$ UI; es decir, el máximo valor de actividad enzimática se presentó al finalizar la fase de desarrollo del micelio sobre todo el sustrato. En el último día de fermentación se tuvo un valor bajo de actividad enzimática lignino peroxidásica de $2,25 \times 10^{-3}$ UI.

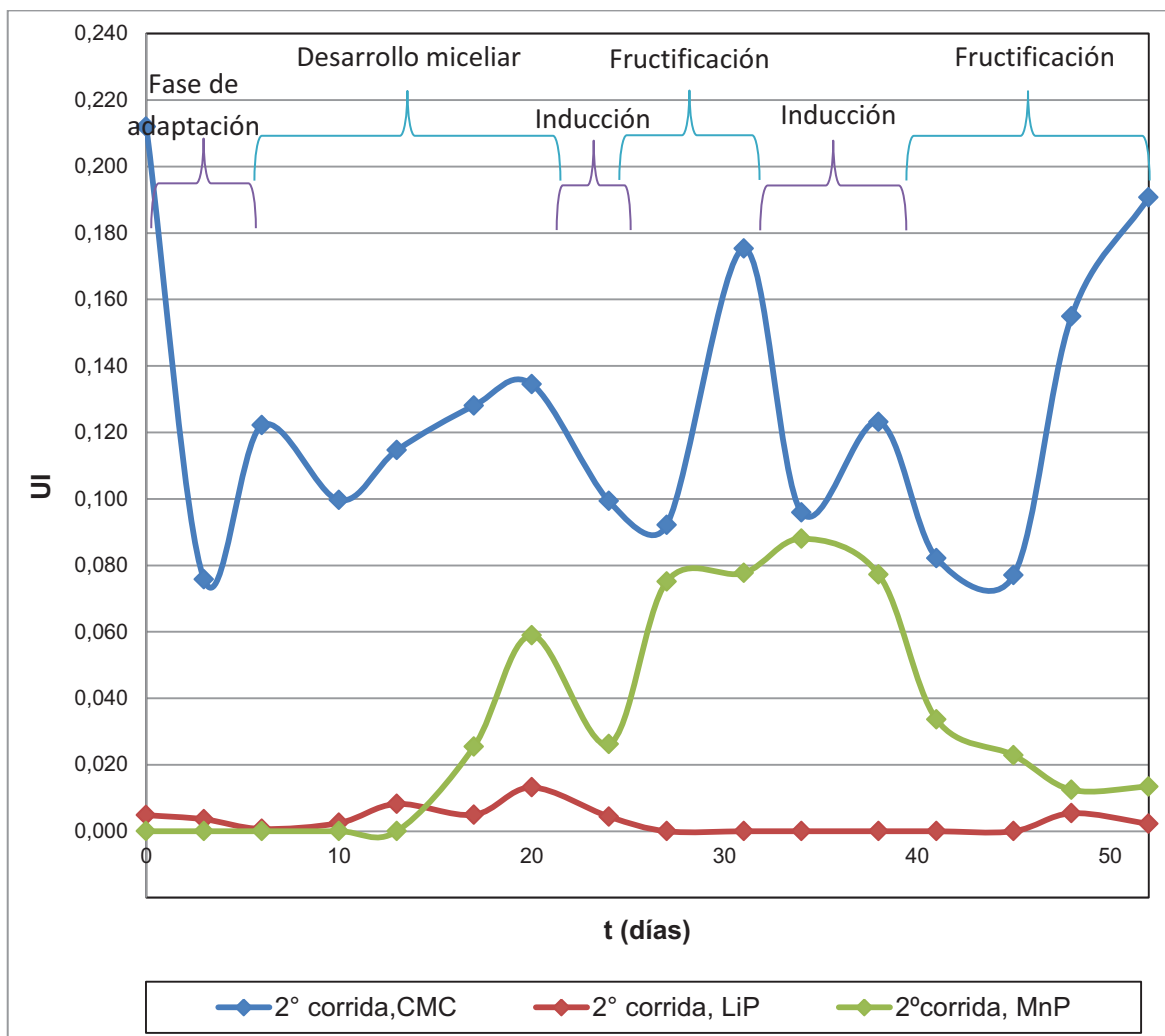


Figura 3.24. Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), ligninoperoxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del grupo 1 del hongo *Lentinus edodes*

La actividad enzimática manganeso peroxidásica presentó mayor producción que la obtenida en la primera corrida. Un primer pico de actividad enzimática se tuvo en el día 20 con un valor de $5,89 \times 10^{-2}$ UI, día en el que el micelio había poblado por completo al sustrato. Un segundo pico se presentó el día 34 con un valor de $8,80 \times 10^{-2}$ UI y fue el máximo valor de actividad enzimática que se presentó para esta corrida. El día 31, día de la primera cosecha se obtuvo un valor de $7,77 \times 10^{-2}$ UI, y este valor fue muy cercano al presentado el día 34. En el día de segunda cosecha, el valor de actividad enzimática manganeso peroxidásica fue de $1,34 \times 10^{-2}$ UI.

3.4.4. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA LA SEGUNDA CORRIDA DEL GRUPO 2

En la Figura 3.25 se presentan los datos de variación de las actividades enzimáticas celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica con el tiempo para el grupo 2 en la segunda corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. Estos datos se tomaron de las tablas 3.6, 3.9 y 3.13.

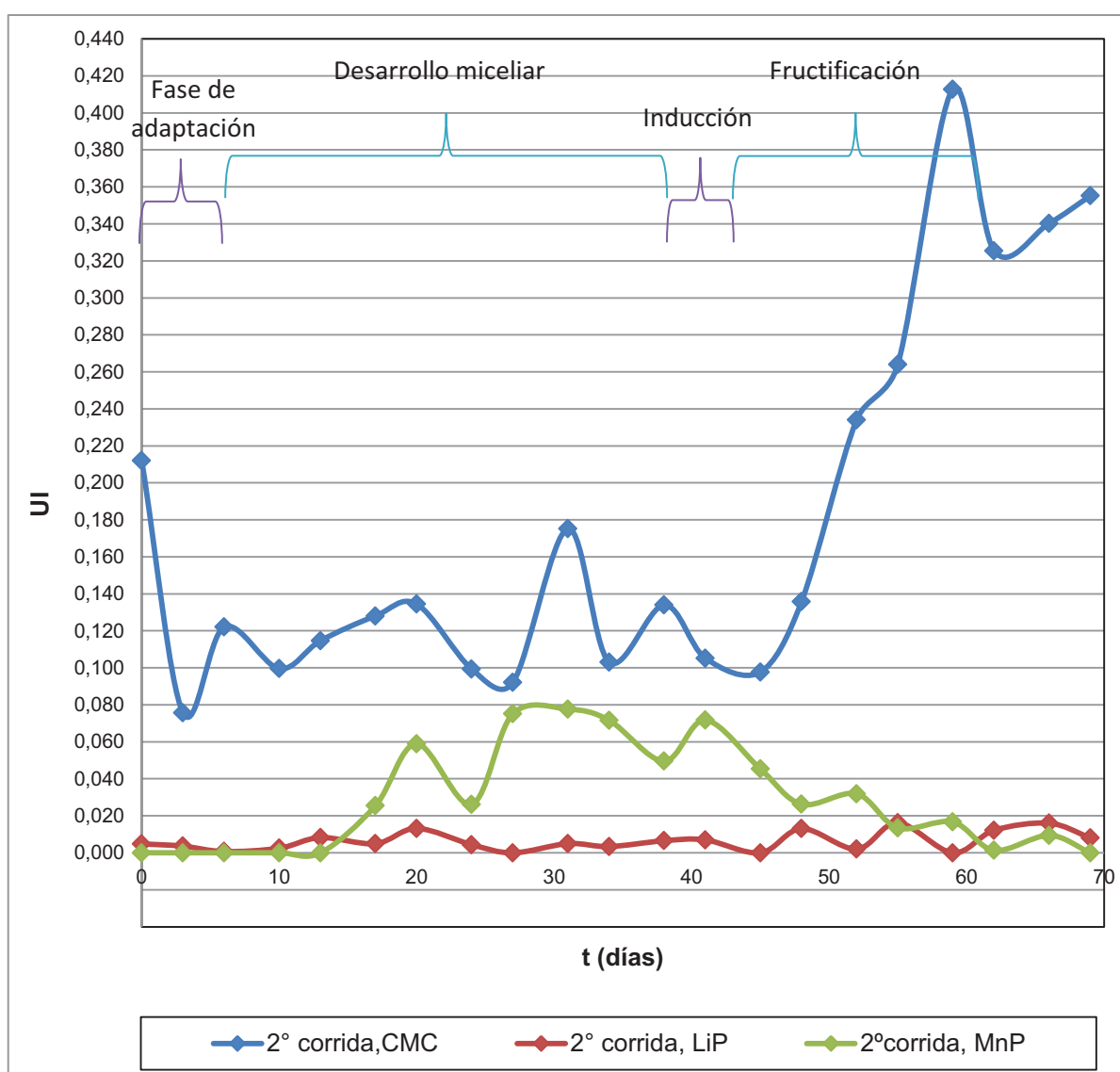


Figura 3.25. Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), ligninoperoxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo para la segunda corrida de fermentación del grupo 2 del hongo *Lentinus edodes*

La actividad enzimática celulolítica del grupo 2 fue mucho más alta que la actividad presentada en el grupo 1, pero esta diferencia se presentó desde el día 31; es decir, la mayor producción de actividad enzimática celulolítica se obtuvo después de la fase de desarrollo del micelio, la cual fue más larga para el grupo 2. A partir de este día el valor de actividad enzimática celulolítica disminuyó, pero desde el día 48 hasta el final de esta corrida se tuvieron valores de actividad enzimática celulolítica mayores. El día de la primera cosecha del grupo 2 que se dio en el día 59, se tuvo el máximo valor de actividad enzimática celulolítica y fue de 0,418 UI.

Para la actividad enzimática lignino peroxidásica del grupo 2 de esta corrida se presentó una tendencia muy parecida a la tendencia presentada por el grupo 1. El máximo valor de producción enzimática lignino peroxidásica fue de $1,62 \times 10^{-2}$ UI y se presentó en el día 55. Para el día de la primera cosecha del grupo 2 no se tuvo actividad enzimática lignino peroxidásica.

La actividad manganeso peroxidásica a partir del día 41 disminuyó; en el día de la primera cosecha del grupo 2 se tuvo un valor de $1,67 \times 10^{-2}$ UI. El máximo valor de actividad manganeso peroxidásica se tuvo el día 31 con un valor de $7,77 \times 10^{-2}$ UI. Para el final de la corrida el valor de actividad enzimática fue de 0,00 UI.

3.4.5. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA LA TERCERA CORRIDA DEL GRUPO 1

En la Figura 3.26 se presentan los datos de variación de las actividades enzimáticas celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica en función del tiempo para el grupo 1 de la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. Estos datos se tomaron de las tablas 3.6, 3.9 y 3.13.

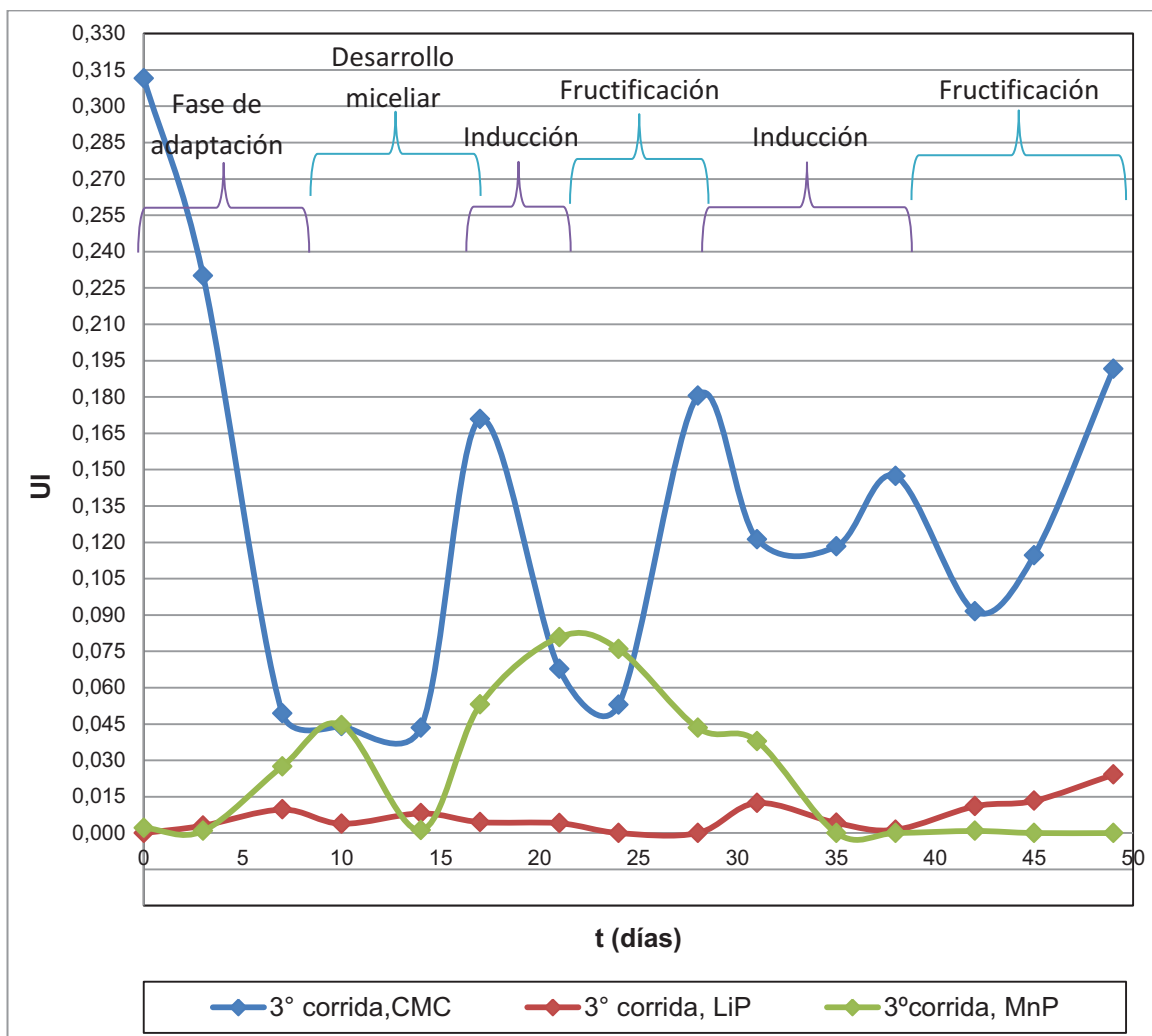


Figura 3.26. Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), ligninoperoxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del grupo 1 del hongo *Lentinus edodes*

La actividad celulolítica para la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes* presentó valores variables, en la Figura 3.26 se puede observar la presencia de varios picos. Al igual que para las anteriores corridas, el valor de actividad enzimática disminuyó en los primeros días de fermentación, durante la fase de adaptación; luego de esto se presentó un primer pico en el día 17 con un valor de 0,171 UI. Para el día 17 la fase de desarrollo del micelio en el sustrato estuvo casi finalizada y comenzó a engrosarse para la posterior producción de los primordios, fase de fructificación. El día 28 se presentó un segundo pico con un valor de 0,180 UI y este fue el día de la primera cosecha del grupo 1. Durante la

fase de inducción de la nueva oleada, el valor de actividad enzimática celulolítica disminuyó, pero para el día de la segunda cosecha el valor de actividad enzimática celulolítica incrementó y se obtuvo un valor de 0,192 UI.

La tendencia de la actividad enzimática lignino peroxidásica para esta corrida difirió un poco de las tendencias analizadas para las dos corridas anteriores, y presentó varios picos; sin embargo, el día de la primera cosecha del grupo 1 (día 28) no se tuvo producción enzimática lignino peroxidásica. Para el día 49, último día de fermentación el valor de actividad enzimática lignino peroxidásica incrementó y tuvo un valor de $2,41 \times 10^{-2}$ UI y fue el valor máximo de actividad enzimática de esta corrida.

La actividad enzimática manganeso peroxidásica para esta corrida incrementó en los primeros días de fermentación. El día 17 presentó un valor de $5,13 \times 10^{-2}$ UI y el día 21 se presentó el máximo valor de actividad enzimática manganeso peroxidásica que fue de $8,08 \times 10^{-2}$ UI. El día de la primera cosecha del grupo 1, día 28, el valor de actividad enzimática manganeso peroxidásica fue de $4,34 \times 10^{-2}$ UI. Finalmente, para el último día de fermentación (día 49) no se tuvo actividad enzimática lignino peroxidásica.

3.4.6. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA LA TERCERA CORRIDA DEL GRUPO 2

En la Figura 3.27 se presentan los datos de variación de las actividades enzimáticas celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica con el tiempo del grupo 2 de la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*. Estos datos se tomaron de las tablas 3.7, 3.10 y 3.14.

La actividad enzimática celulolítica para la cosecha del grupo 2 presentó un comportamiento muy parecido al del grupo 1, en las fases de adaptación y desarrollo del micelio. El incremento de la actividad enzimática celulolítica se dio a

partir del día 42, y alcanzó el máximo valor de actividad en el día 56, día de la primera cosecha del grupo 2, con un valor de 0,666 UI.

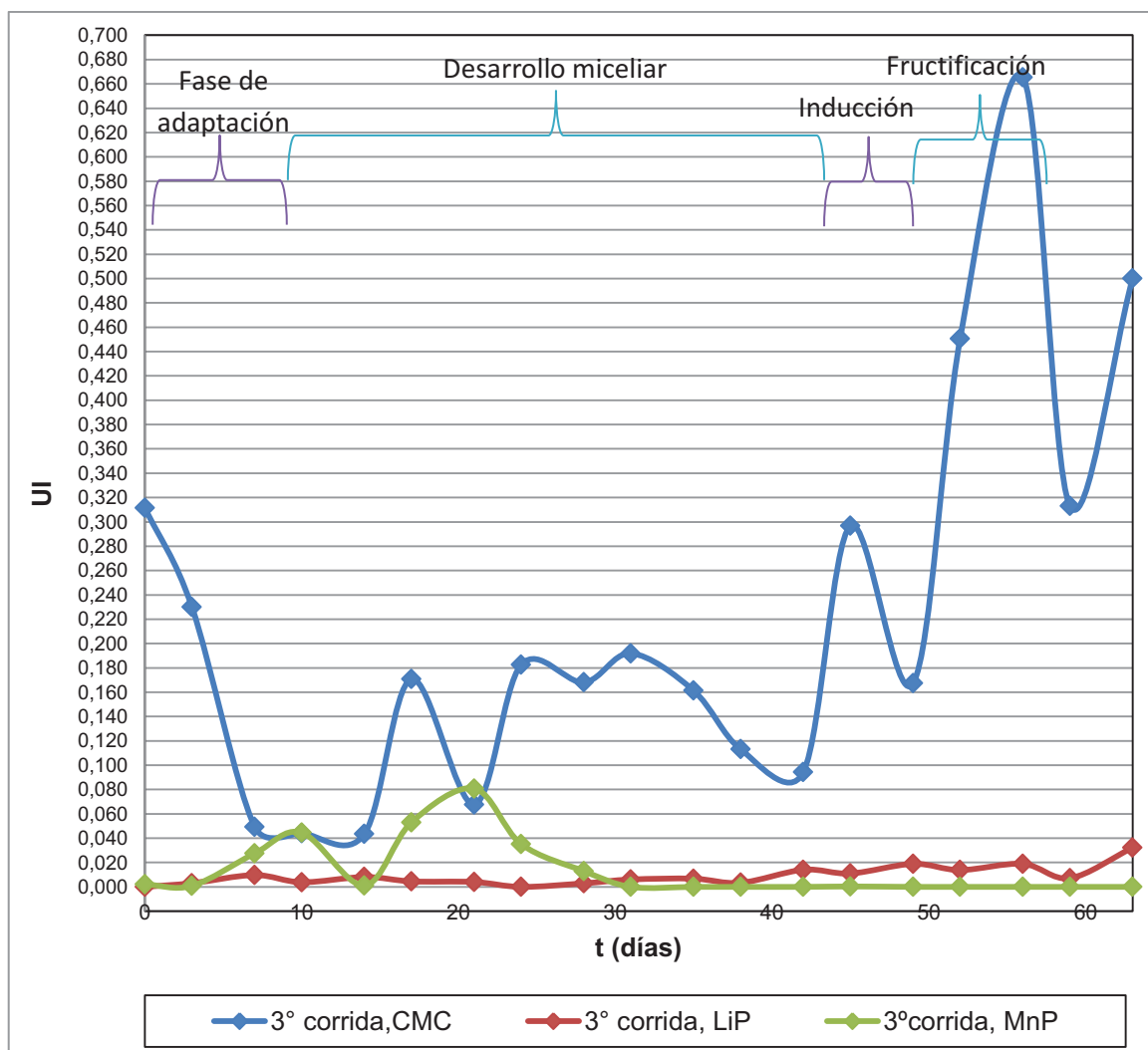


Figura 3.27. Variación de las actividades enzimáticas celulolítica (CMC), ligninoperoxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) con el tiempo para la tercera corrida de fermentación del grupo 2 del hongo *Lentinus edodes*

La tendencia de la actividad lignino peroxidásica para la primera cosecha del grupo 2 fue muy parecida a la presentada en el grupo 1. A partir del día 38 se presentan varios picos; el día de la primera cosecha del grupo 2 el valor de actividad enzimática lignino peroxidásica fue de $1,89 \times 10^{-2}$ UI, y fue uno de los valores de actividad enzimática lignino peroxidásica más alto. El máximo valor de

actividad enzimática lignino peroxidásica se tuvo el día 63 con un valor de $3,22 \times 10^{-2}$ UI.

Al igual que para el grupo 1 el máximo valor de actividad enzimática manganeso peroxidásica se presentó el día 21 y el valor fue de $8,08 \times 10^{-2}$ UI. A partir del día 31 y en adelante, no se tuvo actividad enzimática manganeso peroxidásica.

3.4.7. ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LAS TRES CORRIDAS DE FERMENTACIÓN DEL HONGO *Lentinus edodes*

En la Tabla 3.16 se presentan los datos de las máximas producciones enzimáticas para el grupo 1 en las diferentes corridas y los días en los cuales se obtuvieron estos valores.

Tabla 3.16. Tiempos y valores de máxima generación enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica para las tres corridas de fermentación del grupo 1 del hongo *Lentinus edodes*

Parámetro		Corridas					
		Primera Corrida		Segunda Corrida		Tercera Corrida	
		Grupo 1	DÍA	Grupo 1	DÍA	Grupo 1	DÍA
Máxima actividad enzimática	Celulolítica	0,246 UI	69	0,191 UI	52	0,192 UI	49
	Lignino Peroxidásica	$8,22 \times 10^{-3}$ UI	39	$1,32 \times 10^{-2}$ UI	20	$2,41 \times 10^{-2}$ UI	49
	Manganeso peroxidásica	$2,47 \times 10^{-2}$ UI	28	$8,80 \times 10^{-2}$ UI	34	$8,08 \times 10^{-2}$ UI	21

Se tiene que la máxima actividad enzimática celulolítica para las tres corridas se tuvo en el día de segunda cosecha del grupo 1. A pesar de no haber tenido cuerpos fructíferos para cosechar en el día de segunda cosecha del grupo 1, los máximos valores de actividad enzimática celulolítica se tuvieron para estos días

en las tres corridas, debido posiblemente a que el hongo estuvo mayor tiempo en contacto con el aserrín y producto de esto degradó por más tiempo la celulosa que es el mayor componente del aserrín.

La máxima actividad enzimática lignino peroxidásica se obtuvo en los días 39, 20 y 49 para la primera, segunda y tercera corrida respectivamente.

La máxima actividad manganeso peroxidásica se presentó en los días cercanos a la primera cosecha en las tres corridas. En el caso de la primera corrida el valor máximo se presentó el día 28; 13 días antes de la primera cosecha del grupo 1; para la segunda corrida se presentó el día 34, tres días después de la primera cosecha del grupo 1 y finalmente para la tercera corrida el valor máximo se tuvo el día 21, 7 días antes de la primera cosecha del grupo 1.

En la Tabla 3.17 se presentan los datos de las máximas producciones enzimáticas del grupo 2 de las diferentes corridas y los días en los cuales se obtuvieron dichos valores.

Tabla 3.17. Tiempos y valores de máxima generación enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica para las tres corridas de fermentación del grupo 2 del hongo *Lentinus edodes*

Parámetro		Corridas					
		Primera Corrida		Segunda Corrida		Tercera Corrida	
		Grupo 2	DÍA	Grupo 2	DÍA	Grupo 2	DÍA
Máxima actividad enzimática	Celulolítica	0,225 UI	49	0,418 UI	59	0,666 UI	56
	Lignino Peroxidásica	$8,22 \times 10^{-3}$ UI	39	$1,62 \times 10^{-2}$ UI	55	$3,22 \times 10^{-2}$ UI	63
	Manganeso peroxidásica	$2,47 \times 10^{-2}$ UI	28	$7,77 \times 10^{-2}$ UI	31	$8,08 \times 10^{-2}$ UI	31

La máxima actividad enzimática celulolítica para las tres cosechas se dio el día de la primera cosecha del grupo 2 en las tres corridas.

Como se analizó anteriormente la actividad enzimática celulolítica estuvo presente durante todo el proceso de desarrollo del hongo *Lentinus edodes* y este comportamiento corresponde a los resultados esperados. Según lo expresado por Montoya (2008), los hongos de pudrición blanca dentro de sus requerimientos nutricionales prefieren la celulosa y hemicelulosa como fuente de energía, y en presencia de estos compuestos secretan celulasas. Además la actividad celulósica está directamente ligada al desarrollo del micelio (p. 50).

De los datos presentados en la Tabla 3.17 se tiene que el máximo valor de actividad lignino peroxidásica se obtuvo en diferentes etapas de desarrollo del hongo para las tres corridas.

Si se compara la actividad enzimática celulolítica con la actividad enzimática lignino y manganeso peroxidásica, se puede notar que la actividad enzimática celulolítica es mucho mayor que la actividad lignino y manganeso peroxidásica, esto se podría atribuir a que el contenido inicial de celulosa en el aserrín es prácticamente el doble que el de lignina.

Los valores máximos de actividad manganeso peroxidásica se tuvieron nuevamente en los días cercanos a la primera cosecha del grupo 2. Para la primera corrida el máximo valor de actividad manganeso peroxidásica se tuvo 21 días antes de la cosecha. El máximo valor de actividad enzimática manganeso peroxidásica para la segunda corrida se tuvo 28 días antes de la primera cosecha del grupo 2 y para la tercera corrida se tuvo 25 días antes de la primera cosecha del grupo 2. En otras palabras, la máxima actividad enzimática manganeso peroxidásica se produjo entre 21 y 28 días antes de la cosecha del grupo 2.

La lignina es el polímero responsable de la resistencia que tiene la madera ante la acción microbiana; la función principal de la lignina es proteger a la celulosa para impedir su degradación por acción de microorganismos. Cuando la lignina es removida o modificada por cualquier agente, la celulosa queda disponible para ser fácilmente degradada por las enzimas microbianas (Blanchette, 1995, p. 1005). Debido a esta disposición de la lignina y la celulosa en la madera, algunos hongos

de pudrición blanca degradan primero la lignina y luego la celulosa (Kirk y Farrel, 1987, p. 498); sin embargo, de los datos obtenidos en este trabajo resultó que el hongo *Lentinus edodes* no presentó este comportamiento, ya que tanto las enzimas celulolíticas como las enzimas ligninolíticas se produjeron durante toda la fermentación del hongo *Lentinus edodes*.

De lo analizado anteriormente se tiene que para la actividad lignino peroxidásica no se puede establecer una relación clara entre el crecimiento del hongo y la actividad de la enzima lignino peroxidásica, esto también es debido a los bajos valores de actividad lignino peroxidásica que en general se presentaron para todas las corridas de fermentación realizadas. Sin embargo; la actividad lignino peroxidásica presentó los máximos valores en los últimos días de fermentación de las tres corridas para el grupo 2, y este fenómeno también se presentó para la fermentación del hongo *Grifola frondosa* en residuos sólidos en el trabajo desarrollado por Montoya (2008), donde la máxima actividad lignino peroxidásica alcanzó un valor de 9,51738 UE ($\mu\text{Mmol/g}$ sustrato seco. min); comportamiento atribuible a un metabolito secundario (p. 61).

Los máximos valores de actividad enzimática manganeso peroxidásica se dieron en la fase de desarrollo del micelio, comportamiento esperado, pues la enzima manganeso peroxidasa es una enzima ligninolítica que para la mayoría de hongos de pudrición blanca se produce en los primeros días de fermentación, entre la fase de adaptación y la fase de desarrollo miceliar, ya que para desarrollarse el hongo *Lentinus edodes* debe descomponer primero la lignina en mayor proporción que la celulosa (Niladevi, 2009, p. 405).

Los valores de actividad enzimática lignino y manganeso peroxidásica producidos por el hongo *Lentinus edodes* no fueron altos, y esto coincide con la descripción de Pérez y Jeffries (1992), que señalaron que la laccasa es la enzima ligninolítica que se encuentra con mayor frecuencia en los hongos de pudrición blanca (p. 2404).

3.4.8. ANÁLISIS GLOBAL DE LA GENERACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICA LIGNINOPEROXIDÁSICA Y MANGANESO PEROXIDÁSICA

En la Figura 3.28 se presenta un gráfico comparativo de los valores promedio de actividad enzimática celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica, calculadas para los días más importantes del proceso fermentativo relacionados con la fase de crecimiento del hongo. El eje de ordenadas corresponde a nueve días específicos de crecimiento del hongo *Lentinus edodes*. El eje de abscisas representa el valor de actividad enzimática en Unidades Internacionales. En esta figura se observa de mejor manera la relación entre el crecimiento del hongo *Lentinus edodes* y la producción de enzimas celulolítica, manganeso peroxidásica y ligninoperoxidásica. Así, la producción de enzima peroxidásica es baja comparada con las otras dos enzimas que fueron producidas en el proceso de fermentación del aserrín por el *Lentinus edodes*.

La enzima celulolítica es la que más se produce durante todo el proceso fermentativo, lo cual se explica porque es la enzima encargada de liberar la celulosa para que sea utilizada por el hongo como fuente de energía para su crecimiento. Se observa que la actividad celulolítica disminuye desde el día de la inoculación hasta que termina la adaptación. Esto sugiere que durante la obtención del inóculo se generó una cantidad suficiente de celulasas para que el hongo pueda adaptarse en el aserrín. Se observa también que la actividad manganeso peroxidásica se va incrementando desde la inoculación hasta la generación del micelio, lo cual implicaría que la celulosa en el aserrín no está disponible para ser consumida por el hongo, y se generan las ligninasas con el objeto de degradar la lignina que recubre a la celulosa. Cuando ya hay algo de celulosa disponible, nuevamente se genera la celulasa. Este comportamiento se observa durante todo el proceso fermentativo: la celulosa disminuye en los períodos en los cuales la manganeso peroxidasa se incrementa.

Como ya se ha mencionado anteriormente, se observa que durante el proceso fermentativo casi no hay generación de actividad lignino peroxidásica y esto se

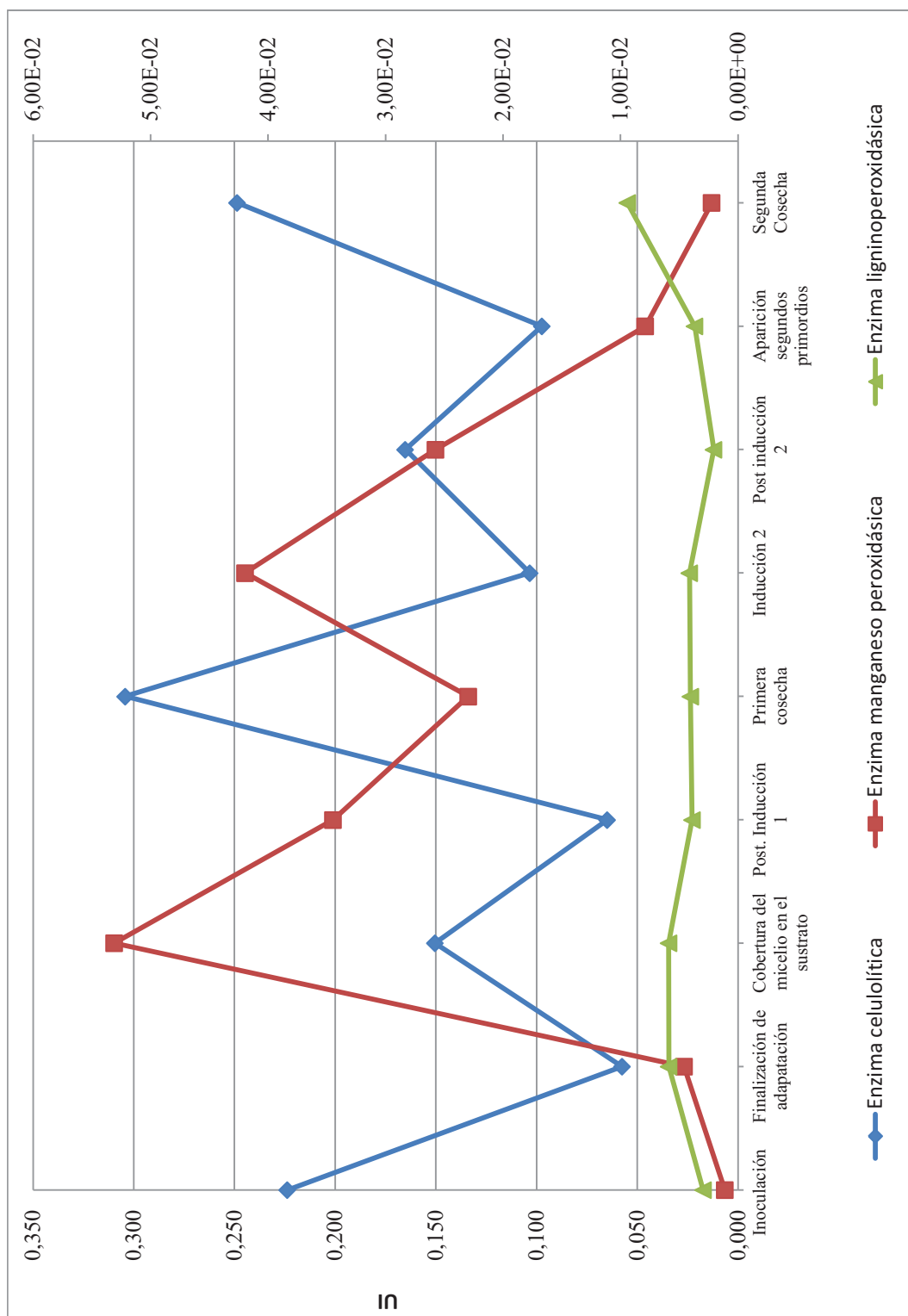


Figura 3.28. Variación de las actividades enzimáticas celulolítica, lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica para nueve días principales de crecimiento del *Lentinus edodes*

produjo ya que el microorganismo aparentemente no tuvo días prologados de estrés, producto de la falta de nutrientes, por lo que no se logró una mayor producción de esta enzima; adicionalmente, el *Lentinus edodes* produce otro tipo de enzimas ligninolíticas como la laccasa en mayor cantidad que la lignino peroxidasa.

3.5. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA Y MANGANESO PEROXIDÁSICA PRODUCIDOS POR EL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

En el siguiente subcapítulo se analizan los datos de estabilidad de los extractos con actividad enzimática celulolítica y manganeso peroxidásica producidos por el hongo *Lentinus edodes* en aserrín tropical, en función del tiempo y para tres temperaturas de almacenamiento que fueron 15,5 °C, 3 °C y – 14 °C.

3.5.1. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA PRODUCIDOS POR EL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

Los resultados de la variación de la actividad enzimática celulolítica de los extractos en función del tiempo para las tres temperaturas de almacenamiento se presentan en la Tabla 3.18.

A temperatura ambiente se observa una mayor disminución de los valores de actividad enzimática de los extractos, que para las otras temperaturas de análisis. El valor inicial de actividad enzimática fue de 0,254 UI y después de los 30 días de análisis de la influencia de la temperatura en la actividad enzimática celulolítica de los extractos se tuvo un valor de 0,158 UI. En los 30 días de análisis perdió un total de 0,096 UI.

A temperatura de refrigeración se tuvo que la actividad enzimática celulolítica disminuyó pero en menor proporción que a temperatura ambiente y en mayor proporción que a temperatura de congelación. De un valor de 0,254 UI pasó a un valor de 0,190 UI, y perdió un valor de 0,064 UI en los 30 días de almacenamiento a esta temperatura.

Tabla 3.18. Variación de la actividad enzimática celulolítica en función del tiempo de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

UI							
Días	T amb. (15,5 °C)	T ref. (3 °C)	Tcong. (-14 °C)	Días	T amb. (15,5 °C)	T ref. (3 °C)	Tcong. (-14 °C)
0	0,254	0,254	0,254	16	0,206	0,243	0,261
2	0,211	0,209	0,289	18	0,207	0,227	0,273
4	0,255	0,277	0,290	20	0,212	0,238	0,264
6	0,266	0,261	0,288	22	0,185	0,228	0,262
8	0,227	0,252	0,279	24	0,199	0,229	0,253
10	0,242	0,266	0,280	26	0,179	0,229	0,237
12	0,212	0,275	0,300	28	0,174	0,198	0,228
14	0,232	0,251	0,276	30	0,158	0,190	0,224

A temperatura de congelación se tuvo que la actividad enzimática celulolítica disminuyó de 0,254 UI a 0,224 UI, es decir perdió tan solo 0,003 UI en los 30 días de almacenamiento. Se observa que a temperatura de congelación los extractos fueron más estables que a las otras dos temperaturas de almacenamiento, pues a esta temperatura se conservó una mayor actividad enzimática celulolítica.

3.5.1.1. Análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática celulolítica para un modelo de degradación de orden cero

Para el análisis de estabilidad de los extractos no se consideraron los datos de los 4 primeros días, ya que se observó una variabilidad muy grade debido a la formación de precipitados durante estos primeros días de análisis.

En la Figura 3.29 se tienen los valores de variación de la actividad enzimática celulolítica de los extractos en función del tiempo para las tres temperaturas de almacenamiento. Se presentan también las líneas de tendencia de estas curvas con sus respectivas ecuaciones lineales, las cuales describen la velocidad de variación de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para cada temperatura según el modelo de orden de reacción cero.

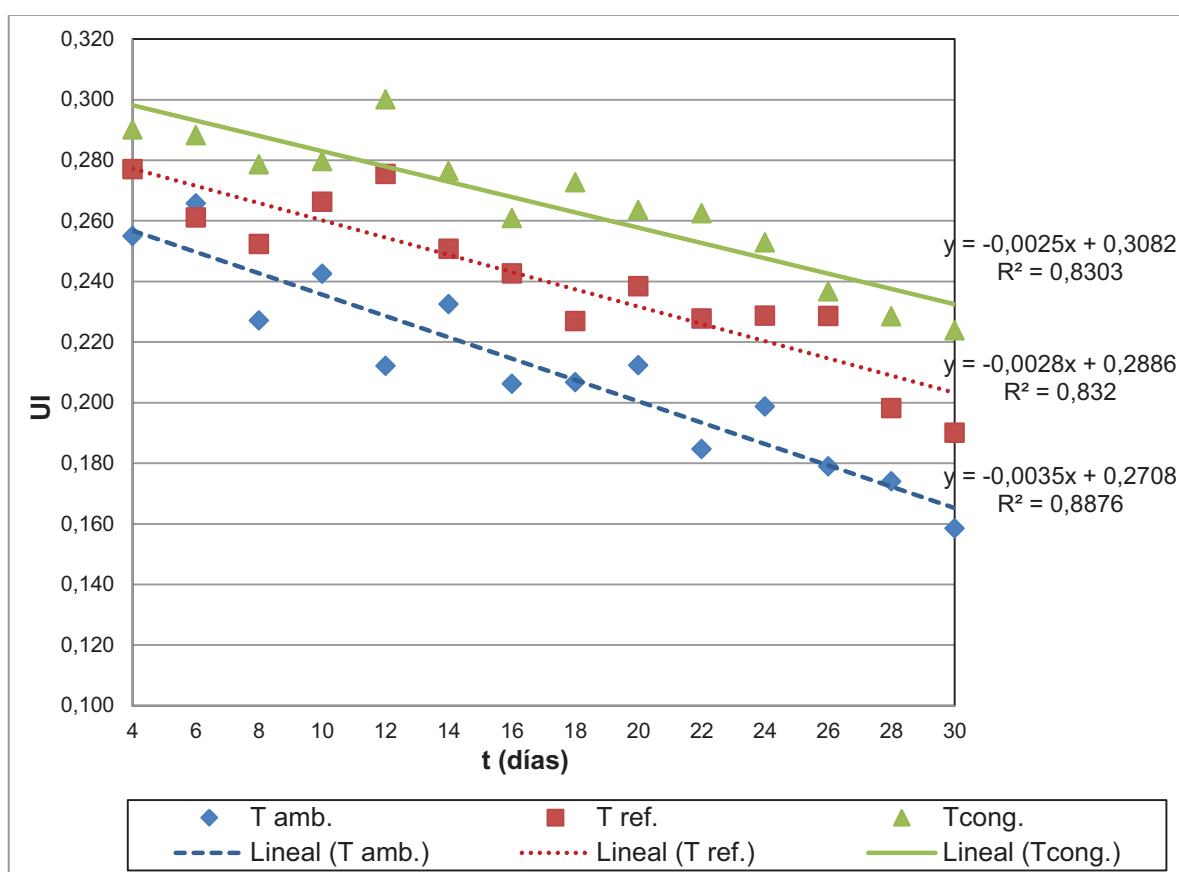


Figura 3.29. Variación de la actividad enzimática celulolítica de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C de temperatura en función del tiempo y líneas de tendencia

En la Tabla 3.19 se tabulan los valores de la actividad enzimática inicial y final, también se presenta el valor de la pendiente k para cada temperatura y finalmente se tiene el tiempo de conservación (t_{50}) de la actividad enzimática celulolítica inicial expresado en días. Como se observa en esta tabla el valor de la constante k es menor mientras menor es la temperatura de almacenamiento.

El tiempo (t_{50}) indica el número de días que los extractos enzimáticos tardarían en perder el 50% de la actividad enzimática celulolítica inicial a las tres temperaturas de análisis.

A la temperatura de almacenamiento ambiental promedio de 15,5 °C se tuvo un t_{50} de 36,4 días; a la temperatura de refrigeración (3 °C) se tuvo un t_{50} de 49,5 días y para el almacenamiento a la temperatura de congelación (-14 °C) el t_{50} fue de 58,0 días.

Tabla 3.19. Datos de la actividad enzimática celulolítica inicial y final, de la constante k y del t_{50} de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

Temperatura (°C)	UI ₀	UI	k (UI/día)	t ₅₀ (día)
15,5	0,255	0,128	0,0035	36,4
3	0,277	0,139	0,0028	49,5
-14	0,290	0,145	0,0025	58,0

Como se observa en la Tabla 3.19, la temperatura de almacenamiento a la cual mejor se conservó la actividad enzimática celulolítica de los extractos fue a temperatura de congelación; la temperatura de almacenamiento bajo la cual se dio el menor tiempo de conservación del 50% de la actividad enzimática inicial fue a la temperatura ambiental.

En la Figura 3.30 se observa la variación del logaritmo natural de la constante de reacción para los extractos almacenados a diferentes temperaturas con respecto al inverso de dichas temperaturas, también se tiene la regresión lineal de la curva

y el valor del coeficiente de regresión lineal, para una reacción de orden cero. Los valores del logaritmo natural de la constante de reacción y del inverso de las temperaturas se presentan en la Tabla 3.20.

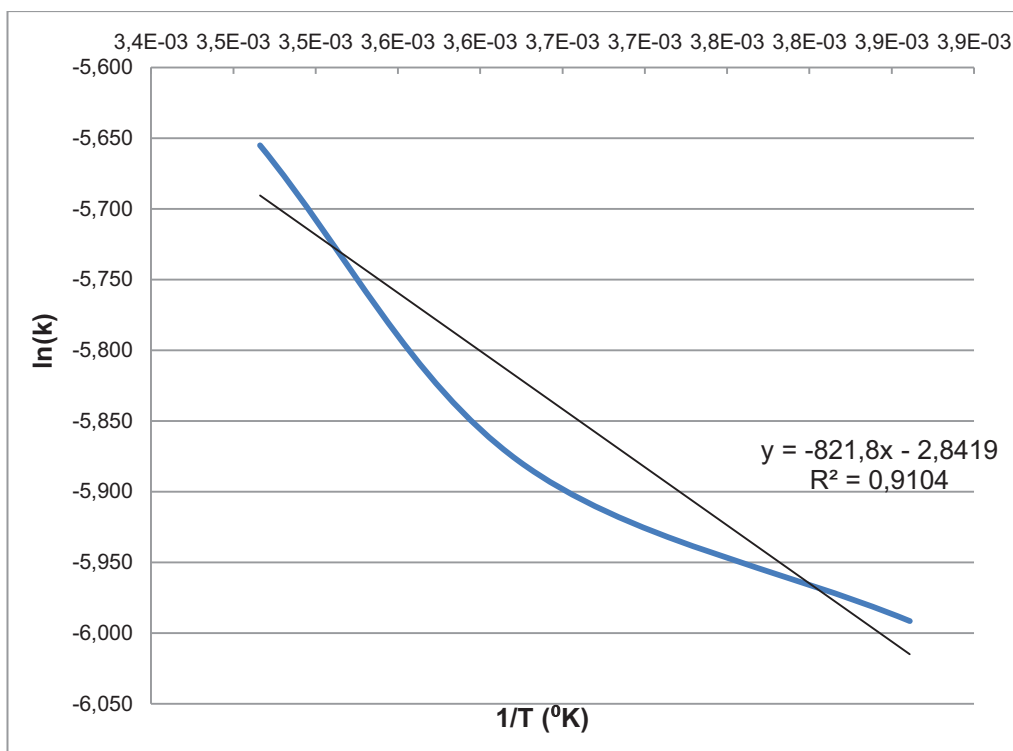


Figura 3.30. Variación del $\ln(k)$ con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos

A partir de la regresión lineal de la recta presentada en la Figura 3.30 se calculó la energía de activación. El valor de la energía de activación para estas reacciones fue de 6,681 KJ/mol y este valor se presenta en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Datos de \ln de la constante de reacción, el inverso de la temperatura y del valor de la energía de activación para reacciones ajustadas a un modelo de orden cero

Temperatura ($^{\circ}\text{K}$)	$\ln(k)$	$1/T$ ($^{\circ}\text{K}^{-1}$)	Ea KJ/mol
288,5	-5,655	3,5E-03	6,681
276	-5,878	3,6E-03	
259	-5,991	3,9E-03	

3.5.1.2. Análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática celulolítica para un modelo de degradación de primer orden

Los datos de $\ln(UI)$ con respecto al tiempo de los extractos, con actividad enzimática celulolítica, almacenados a temperatura ambiente, de refrigeración y de congelación se presentan en el Anexo XIV. Con los datos tabulados en la Tabla AXIV.1 se obtuvo la Figura 3.31.

En la Figura 3.31 presenta la variación del logaritmo natural de la actividad enzimática celulolítica con el tiempo para las tres temperaturas de almacenamiento (15,5 °C, 3 °C y -14 °C). En esta figura también se presentan las líneas de tendencia y sus respectivas ecuaciones para el análisis del t_{50} para los extractos ajustados a un modelo de reacciones de primer orden.

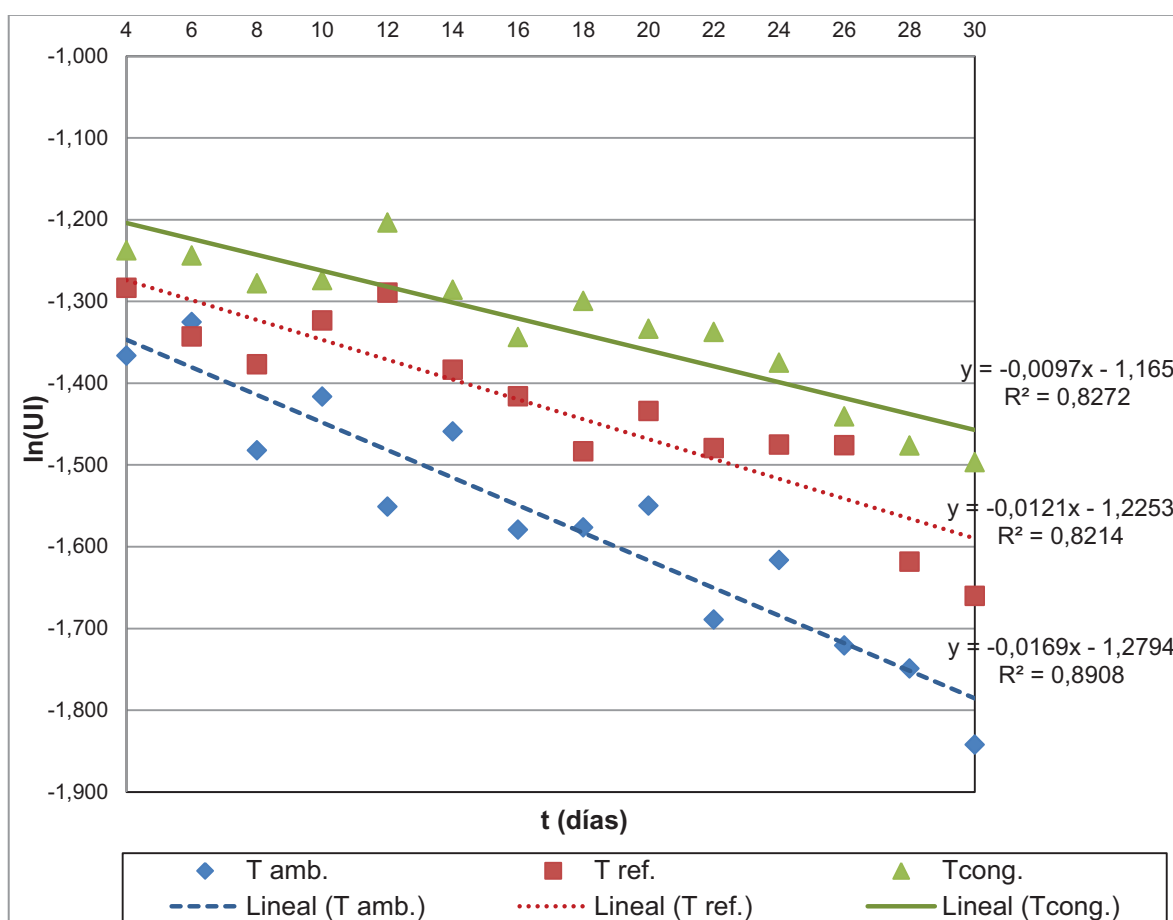


Figura 3.31. Variación del $\ln(UI)$ de los extractos con actividad celulolítica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C en función del tiempo y líneas de tendencia

En la Tabla 3.21 se tabulan los valores del logaritmo natural de la actividad enzimática inicial y final, el valor de la constante de reacción para cada temperatura y el t_{50} , tiempo en el que pierde el 50% de la actividad enzimática celulolítica inicial de los extractos, expresado en días.

Tabla 3.21. Datos del ln de la actividad enzimática celulolítica inicial y final, de la constante de reacción y del t_{50} de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

Temperatura (°C)	ln(UI ₀)	ln(UI)	k (día ⁻¹)	T ₅₀ (días)
15,5	-1,366	-2,060	0,0169	41,0
3	-1,284	-1,977	0,0121	57,3
-14	-1,238	-1,931	0,0097	71,5

A la temperatura ambiental promedio (15,5 °C) se tuvo un t_{50} de 41,0 días, a la temperatura de refrigeración (3 °C) este tiempo fue de 57,3 días y para el almacenamiento a la temperatura de congelación (-14 °C) se tuvo un t_{50} de 71,5 días.

Al analizar las reacciones como reacciones de primer orden se tuvo que el mayor t_{50} se dio a la temperatura de congelación y el menor tiempo de conservación de la actividad enzimática celulolítica en los extractos se tuvo al almacenar los extractos a temperatura de refrigeración.

Con los valores de la Tabla 3.21 se obtuvo el valor de la constante de reacción. En la Figura 3.32 se presenta la variación del logaritmo natural de la constante de reacción con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos con actividad enzimática celulolítica.

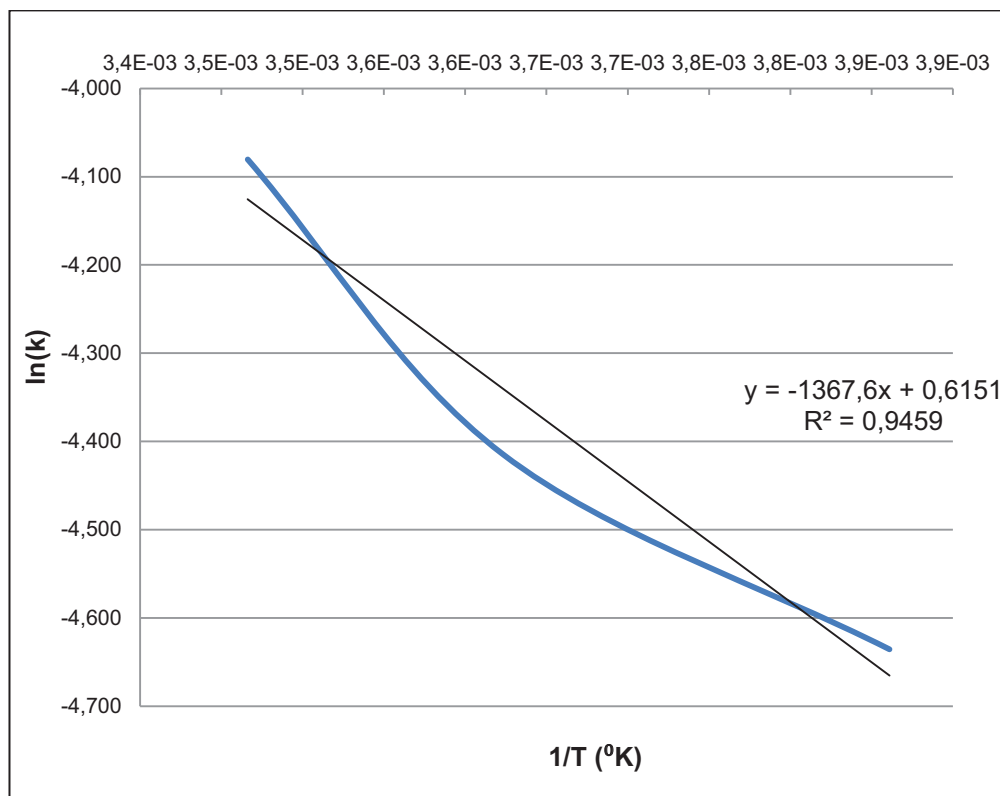


Figura 3.32. Variación del $\ln(k)$ con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos

El valor de la energía de activación para estas reacciones analizadas como reacciones de primer orden fue de 11,164 KJ/mol y se presenta en la Tabla 3.22.

Tabla 3.22. Datos de \ln de la constante de reacción, el inverso de la temperatura y del valor de la energía de activación para reacciones ajustadas a un modelo de primer orden

Temperatura (°K)	$\ln(k)$	1/T (°K ⁻¹)	Ea (KJ/mol)
288,5	-4,080	3,5E-03	11,164
276	-4,415	3,6E-03	
259	-4,636	3,9E-03	

En la Tabla 3.23 se presentan los datos de las constantes de reacción, los coeficientes de regresión lineal y el valor de la energía de activación obtenidos al

almacenar los extractos a tres temperaturas diferentes y al haber analizado estos datos como reacción de orden cero y primer orden.

El valor de energía de activación obtenido al analizar las reacciones como reacciones de primer orden fue mayor en aproximadamente 4 KJ/mol del obtenido para el análisis de las reacciones ajustadas a un modelo de orden cero, lo que quiere decir que los extractos con actividad enzimática celulolítica presentaron mayor variación de la actividad enzimática celulolítica existente en los extractos con la temperatura (Reynosa, 2004, p. 172).

Tabla 3.23. Datos de la constante de reacción, el coeficiente de regresión lineal y la energía de activación para reacciones ajustadas a un modelo de orden cero y primer orden

	Orden cero			Primer orden		
Temperatura (° C)	k (UI/día)	r ²	Ea (KJ/mol)	k (día ⁻¹)	r ²	Ea (KJ/mol)
15,5	0,0035	0,9104	6,681	0,0169	0,9459	11,164
3	0,0028			0,0121		
-14	0,0025			0,0097		

El valor más alto de coeficiente de regresión lineal fue para el análisis de los extractos bajo un modelo de primer orden; este resultado fue el esperado ya que la mayoría de procesos de degradación enzimática corresponden a modelos de primer orden (Labuza y Riboh, 1982, p. 70).

3.5.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MANGANESO PEROXIDÁSICA PRODUCIDOS POR EL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

Los resultados de estabilidad de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo, para 15,5 °C, 3 °C y -14 °C de temperatura de almacenamiento, se observan en la Tabla 3.24.

Los valores de actividad enzimática manganeso peroxidásica de los extractos almacenados a las tres condiciones de temperatura presentaron una tendencia a disminuir conforme pasaron los días de almacenamiento de los extractos.

Tabla 3.24. Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

UI							
Días	T amb. (15,5 °C)	T ref. (3 °C)	Tcong. (-14 °C)	Días	T amb. (15,5°C)	T ref. (3 °C)	Tcong. (-14 °C)
0	0,053	0,053	0,053	16	0,053	0,055	0,066
2	0,051	0,053	0,054	18	0,038	0,043	0,054
4	0,052	0,064	0,055	20	0,039	0,049	0,054
6	0,061	0,069	0,073	22	0,042	0,038	0,057
8	0,056	0,055	0,068	24	0,032	0,046	0,050
10	0,051	0,057	0,058	26	0,038	0,040	0,046
12	0,050	0,062	0,066	28	0,037	0,041	0,049
14	0,048	0,049	0,055	30	0,024	0,032	0,042

A 15,5 °C los valores de actividad enzimática de los extractos disminuyeron rápidamente, el valor inicial de actividad enzimática fue de 0,053 UI y después de los 30 días de análisis de la influencia de la temperatura ambiental en la actividad enzimática manganeso peroxidásica de los extractos se obtuvo 0,024 UI, es decir en este tiempo de almacenamiento el valor de la actividad enzimática manganeso peroxidásica se redujo a menos de la mitad del valor inicial.

A 3 °C se tuvo que la actividad enzimática manganeso peroxidásica disminuyó pero en menor proporción que a temperatura ambiente y en mayor proporción que a temperatura de congelación, el valor inicial de actividad enzimática fue de 0,053 UI y después de 30 días de análisis el valor final fue de 0,032 UI. En este periodo de tiempo la actividad manganeso peroxidásica disminuyó en 0,021 UI.

A la temperatura de almacenamiento de $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ se tuvo que la actividad enzimática manganeso peroxidásica disminuyó de un valor de 0,053 UI a un valor de 0,042 UI, entonces se podría decir que a esta temperatura de almacenamiento los extractos conservaron mejor su actividad manganeso peroxidásica, pues en este tiempo solo se perdió 0,011 UI de la actividad enzimática inicial.

Para el análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica no se consideraron los datos de los 6 primeros días de almacenamiento, ya que en estos días se observó una variabilidad muy grande en los datos asociada a la formación de precipitados.

3.5.2.1. Análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica para un modelo de degradación de orden cero

En la Figura 3.33 se graficaron los valores de estabilidad para los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica con el tiempo para $15,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se presentan también las líneas de tendencia de estas curvas con sus respectivas ecuaciones y valores de coeficiente de regresión lineal.

En la Tabla 3.25 se tabulan los valores de la actividad enzimática inicial y final, el valor de la constante de reacción para cada temperatura de almacenamiento y el tiempo (t_{50}), tiempo que los extractos se tardarían en perder el 50% de la actividad manganeso peroxidásica inicial.

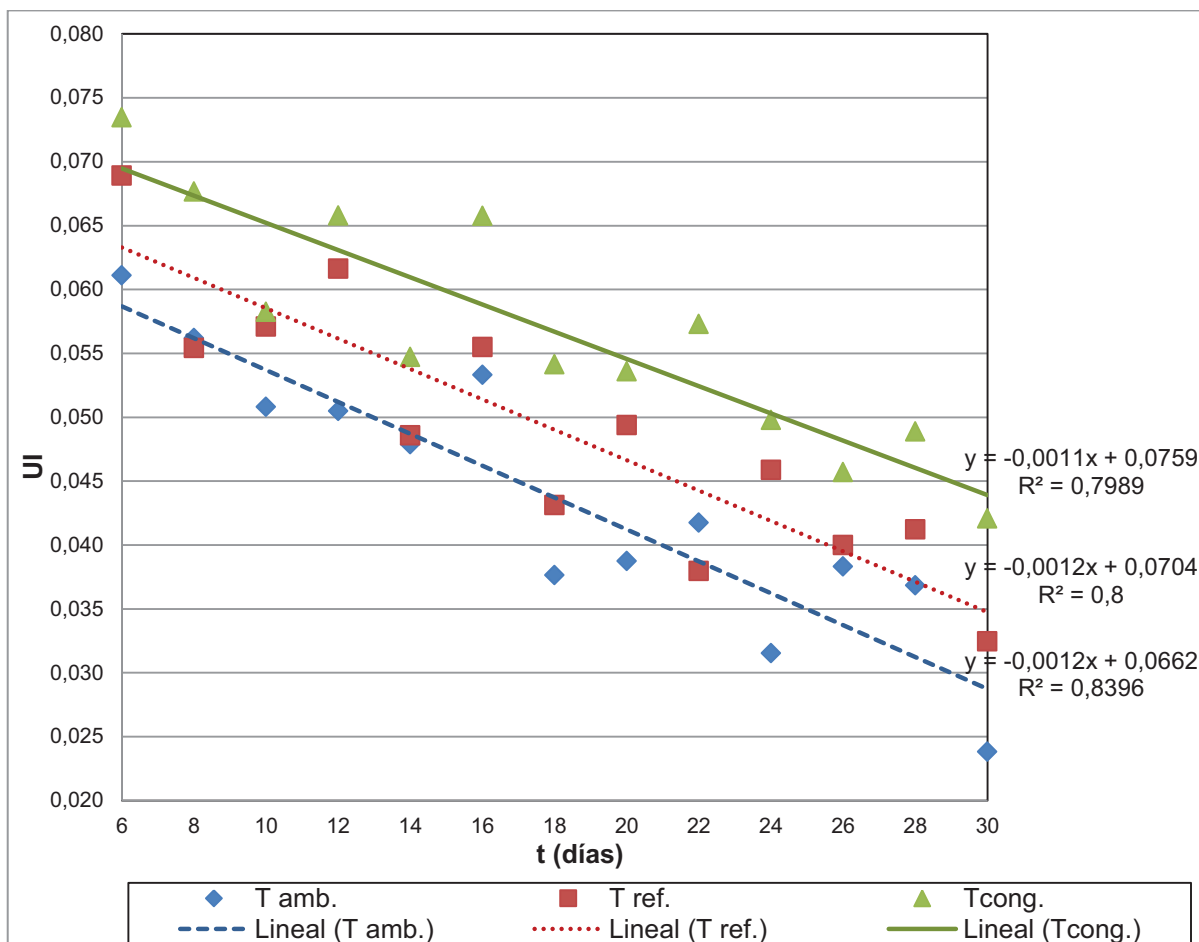


Figura 3.33. Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C con respecto al tiempo

A 15,5 °C se tuvo un t_{50} de 25,5 días; a temperatura de refrigeración (3 °C) se tuvo un t_{50} de 28,7 días y para el almacenamiento a la temperatura de congelación (-14 °C) el t_{50} , fue de 33,4 días.

Tabla 3.25. Datos la actividad enzimática manganeso peroxidásica inicial y final, de la constante y del t_{50} de los extractos almacenados a temperatura de 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

Temperatura (°C)	UI ₀	UI	k (UI/día)	t ₅₀ (días)
15,5	0,061	0,031	0,0012	25,5
3	0,069	0,034	0,0012	28,7
-14	0,073	0,037	0,0011	33,4

Al analizar las reacciones como reacciones de orden cero se obtuvo que la mejor temperatura de almacenamiento para la conservación de la actividad manganoso peroxidásica de los extractos fue a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$, en otras palabras al almacenar los extractos a temperatura de congelación estos conservaron por más tiempo su actividad enzimática manganoso peroxidásica.

En la Figura 3.34 se graficaron los valores del logaritmo natural de la constante de reacción con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento, en esta figura también se presenta la ecuación de la recta y el valor del coeficiente de regresión lineal.

Con los valores de la Tabla 3.25 se calculó la energía de activación y el valor se presenta en la Tabla 3.26. El valor de la energía de activación para estas reacciones fue de $1,888\text{ KJ/mol}$.

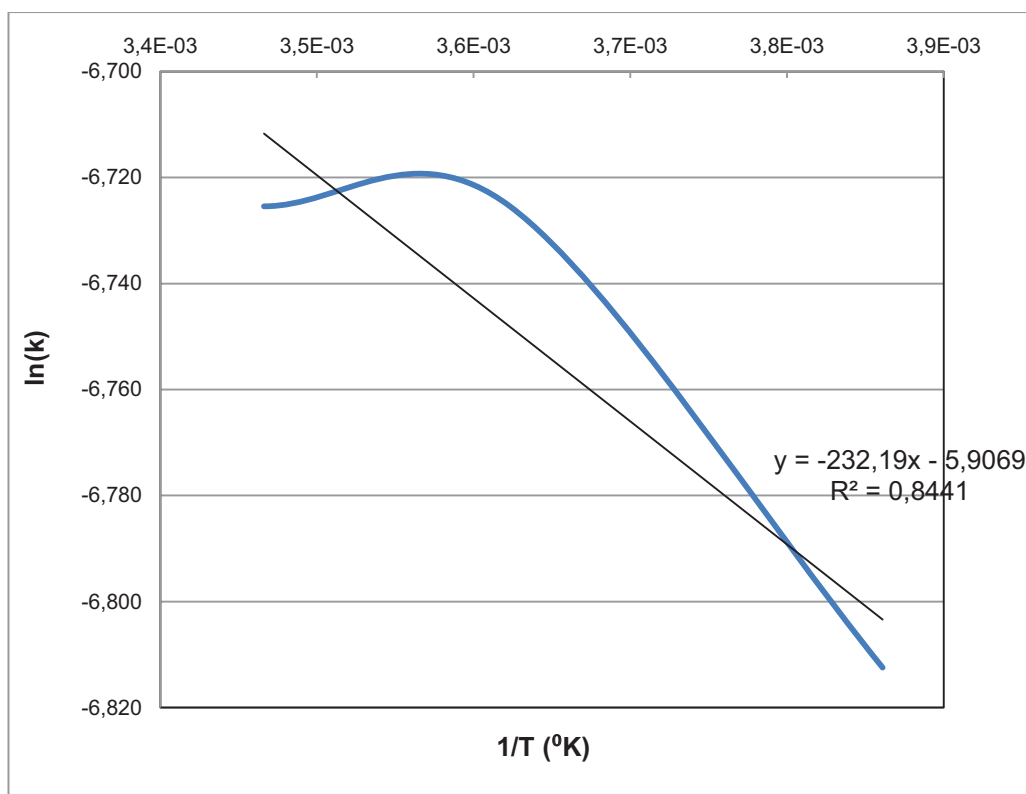


Figura 3.34. Variación del $\ln(k)$ con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos

Tabla 3.26. Datos de ln de la constante de reacción, el inverso de la temperatura y del valor de la energía de activación para un modelo de degradación de orden cero

Temperatura (°K)	ln (k)	1/T (°K ⁻¹)	Ea (KJ/mol)
288,5	-6,725	3,5E-03	1,888
276	-6,725	3,6E-03	
259	-6,812	3,9E-03	

3.5.2.2. Análisis de estabilidad de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica para un modelo de degradación de primer orden

En la Tabla AXIV. 2 del Anexo XIV se tienen los datos de ln (UI) de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C con respecto al tiempo.

En la Figura 3.35 se presenta la variación del logaritmo natural de la actividad enzimática manganeso peroxidásica en función del tiempo para las tres temperaturas de almacenamiento (15,5 °C, 3 °C y -14 °C). En esta figura también se presentan las líneas de tendencia y sus respectivas ecuaciones para el análisis del t_{50} de los extractos al ajustarse un modelo de primer orden.

En la Tabla 3.27 se tabulan los valores de la actividad enzimática inicial y final, el valor de la constante de reacción para cada temperatura y el tiempo (t_{50}) de conservación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica expresado en días.

El valor de la constante de reacción fue menor mientras menor fue la temperatura. A la temperatura de almacenamiento de 15,5 °C se tuvo un t_{50} de 23,2 días, a la temperatura de almacenamiento de 3 °C el t_{50} fue de 28,9 días y para el almacenamiento a la temperatura - 14 °C el t_{50} fue de 36,7 días.

En este caso al analizar las reacciones como reacciones de primer orden se tuvo que el tiempo que más se demoró en perderse el 50% de la actividad manganeso peroxidásica inicial fue de 36,7 días y esto se logró al almacenar los extractos a temperatura de congelación.

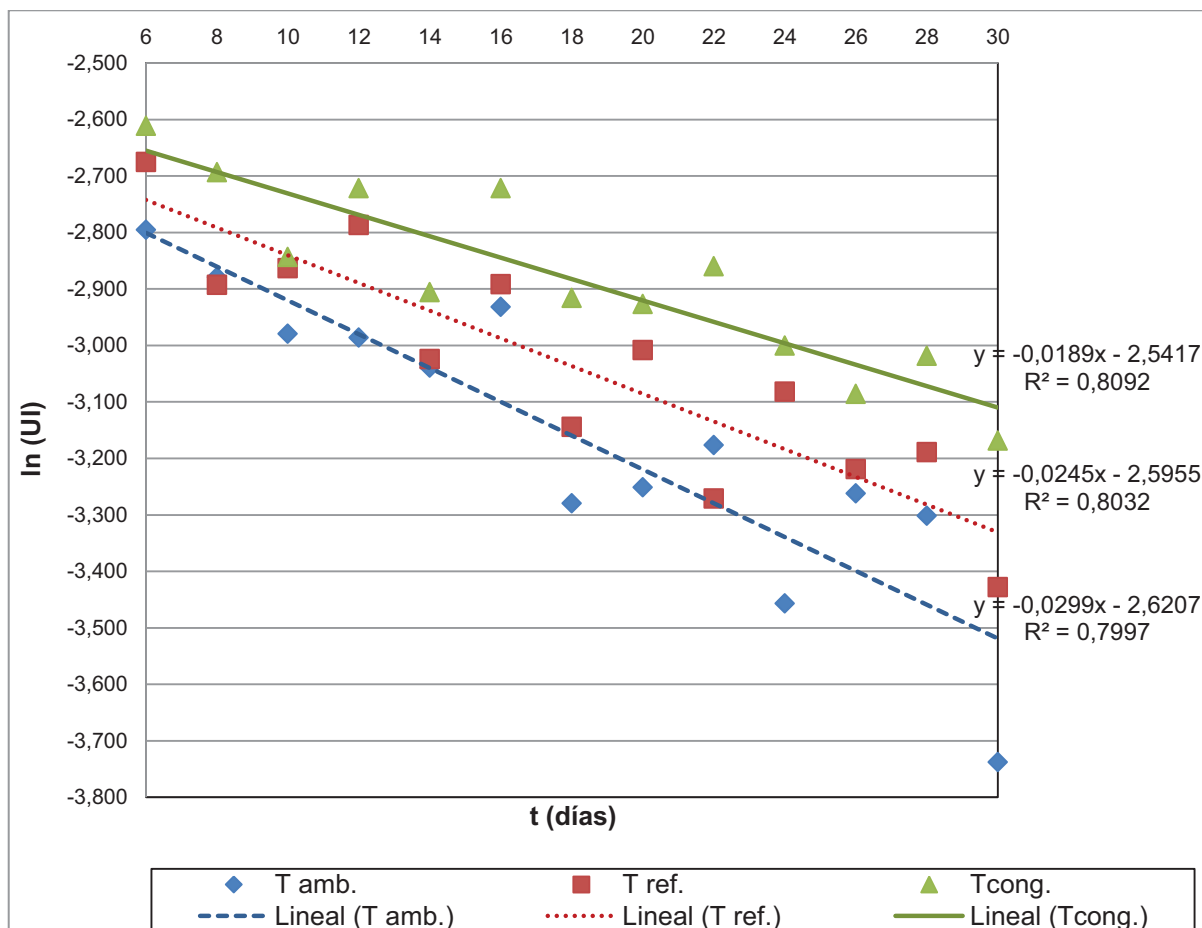


Figura 3.35. Variación del ln (UI) de los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C con respecto al tiempo

Los t_{50} alcanzados para el análisis de la actividad enzimática manganeso peroxidásica son mucho menores a los alcanzados para el análisis de la actividad enzimática celulolítica, probablemente esto sucedió ya que la concentración inicial enzimática celulolítica en los extractos fue mayor a la concentración inicial enzimática manganeso peroxidásica. En general se puede decir que los extractos que presentan mayores valores de actividad enzimática inicial son los extractos

que más se verán influenciados por la temperatura de almacenamiento a la que se expongan.

Tabla 3.27. Datos de \ln de la actividad enzimática manganeso peroxidásica inicial y final, de la constante y del t_{50} de los extractos almacenados a temperatura de 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

Temperatura (°C)	$\ln(UI_0)$	$\ln(UI)$	k (1/día)	t_{50} (días)
15,5	-2,795	-3,489	0,0299	23,2
3	-2,675	-3,368	0,0245	28,9
-14	-2,611	-3,304	0,0189	36,7

En la Figura 3.36 se graficaron los valores del logaritmo natural de la constante de reacción en función del inverso de la temperatura, la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión lineal.

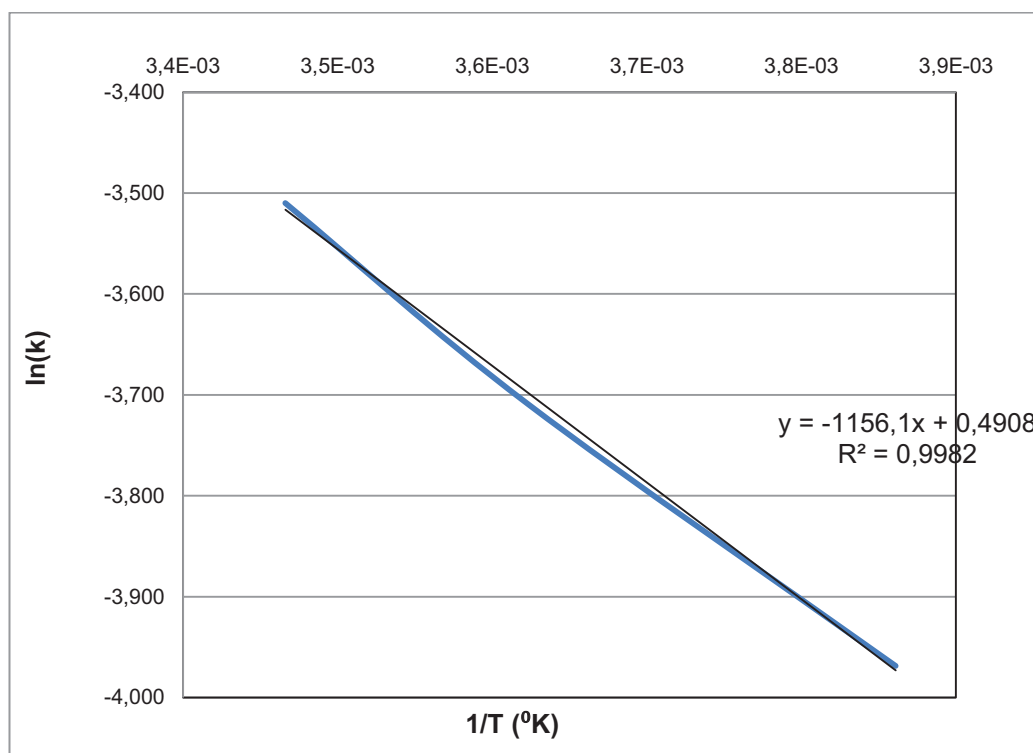


Figura 3.36. Variación del $\ln(k)$ con respecto al inverso de la temperatura de almacenamiento de los extractos

La energía de activación se calculó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la Figura 3.36 y se presenta en la Tabla 3.28. El valor de la energía de activación para estas reacciones ajustadas a un modelo de primer orden fue de 9,399 KJ/mol.

Tabla 3.28. Datos del logaritmo natural de la constante de reacción, el inverso de la temperatura y del valor de la energía de activación para un modelo de primer orden

Temperatura (°K)	ln (k)	1/T (°K ⁻¹)	Ea (KJ/mol)
288,5	-3,510	3,5E-03	9,399
276	-3,709	3,6E-03	
259	-3,969	3,9E-03	

En la Tabla 3.29 se presentan los datos de las constantes de reacción, los coeficientes de regresión lineal y el valor de la energía de activación obtenidos al almacenar los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica a tres temperaturas diferentes y al haber analizado estos datos como reacción de orden cero y primer orden.

Tabla 3.29. Datos de la constante de reacción, el coeficiente de regresión lineal y la energía de activación para reacciones ajustadas a un modelo de orden cero y primer orden

Temperatura (° C)	Orden cero			Primer orden		
	k (UI/día)	r ²	Ea (KJ/mol)	k (día ⁻¹)	r ²	Ea (KJ/mol)
15,5	0,0012	0,8441	1,888	0,0299	0,9982	9,399
3	0,0012			0,0245		
-14	0,0011			0,0189		

El valor de energía de activación obtenido al analizar las reacciones como reacciones de primer orden fue mayor en aproximadamente 7 KJ/mol a la energía de activación obtenida para el análisis de las reacciones ajustadas a orden cero.

El valor más alto de coeficiente de regresión lineal se obtuvo para el análisis de los extractos bajo un modelo de primer orden; este resultado es correspondiente a lo esperado ya que la mayoría de procesos de degradación enzimática corresponden a modelos de primer orden (Labuza y Riboh, 1982, p. 70).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Los valores promedio totales de peso de hongo fresco y eficiencia biológica fueron de 41,6 g y 19,6 %, respectivamente.
- Los valores máximos de actividad enzimática celulolítica en todas las corridas de fermentación del hongo *Lentinus edodes* se presentaron en los días de la primera cosecha con valores que oscilaron entre de 0,225 UI y 0,666 UI; y en el día de la segunda cosecha (o último día de fermentación) con valores entre 0,191 UI y 0,246 UI.
- En el proceso de fermentación del hongo *Lentinus edodes* se generó una mínima cantidad de ligninoperoxidasa, el máximo valor obtenido fue de $3,22 \times 10^{-2}$ UI.
- La actividad manganeso peroxidásica se generó en mayor cantidad en los periodos de inducción con valores entre $2,47 \times 10^{-2}$ UI, $7,77 \times 10^{-2}$ UI y $8,08 \times 10^{-2}$ UI.
- La máxima actividad celulolítica se obtuvo en el periodo de cosecha; mientras que la máxima actividad enzimática ligninoperoxidasa parecería no haber estado relacionada con un periodo específico de crecimiento del hongo y finalmente, la máxima producción de la enzima manganeso peroxidasa estuvo asociado a la fase de desarrollo del micelio ya que en dicho periodo se presentaron los valores máximos de producción de esta enzima.
- Para un modelo de estabilidad de primer orden, a -14 °C se obtuvo el máximo valor de t_{50} para la actividad enzimática celulolítica y fue de 71,5 días.

- Para un modelo de estabilidad de primer orden, a - 14 °C se obtuvo el máximo valor de t_{50} para la actividad enzimática manganeso peroxidasa y fue de 36,7 días.
- El valor de la energía de activación para la estabilidad de la actividad enzimática celulolítica ajustada a un modelo de primer orden fue de 11,164 KJ/mol.
- El valor de la energía de activación para la estabilidad de la actividad enzimática manganeso peroxidásica ajustada a un modelo de primer orden fue de 9,399 KJ/mol.

4.2. RECOMENDACIONES

- Complementar los análisis de actividades enzimáticas realizados para la fermentación de hongos comestibles con el análisis de la cinética de actividad enzimática de la laccasa, pues esta enzima en la mayoría de hongos de pudrición blanca se produce en mayor proporción que las enzimas lignino y manganeso peroxidasa.
- Analizar la influencia del tamaño de las fundas con respecto a la actividad enzimática celulolítica, manganeso peroxidásica, ligninoperoxidasa y de la laccasa.
- Determinar el porcentaje óptimo de inóculo de hongo *Lentinus edodes* que se debe de añadir en cada funda, para obtener mejores rendimientos y tiempos de desarrollo del hongo *Lentinus edodes* más cortos.
- Estudiar la influencia de la temperatura de almacenamiento de los extractos con actividad enzimática celulolítica y manganeso peroxidásica durante un tiempo más prolongado para poder realizar un análisis más completo de la estabilidad de las actividades enzimáticas.

- Estudiar métodos de extracción, concentración y purificación de los extractos con actividad enzimática.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abadulla, E. Tzanov, T. Costa, S. Robra, KH. Cavaco-Paulo, A. y Gübitz. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Application Environ Microbiol*, 66, 3357-3362.
2. Álvarez, E. (2003). *Aprovechando los residuos madereros*. Recuperado de http://www.ecoportat.net/Temas_Especiales/Educación_Ambiental/Aprovechando_los_Residuos_Madereros (Junio, 2012).
3. Avery, H., y Shaw, D. (1987). *Cálculos básicos en química-física*. (volumen 3). Barcelona, España: Reverte.
4. Barba, M. (1998). *Influencia de la antigüedad de la cepa en el rendimiento del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Ensayos de fructificación del hongo comestible *Lentinus Edodes**. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
5. Béguin, P. y Lemaire, M. (1996). The Cellulosome: An Exocellular, Multiprotein Complex Specialized in Cellulose Degradation. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*, 31(3), 201-236. doi: 10.3109/10409239609106584
6. Blanchette, R.A. (1995). Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany*, 73(5), 999-1010.
7. Bommarius, A.S. y Riebel, B. (2004). *Biocatalysis: fundamentals and applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
8. Braverman, J. (1990). Enzimas. Berk Z. (Ed.). *Bioquímica de los Alimentos*. (pp. 30-45). México D.F., México: Editorial el Manual Moderno S.A.

9. Buswell, J., Cai, Y. y Chang, S. (1995). Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128(1):133-137.
10. Carbajal, P. y Flores, D. (2011). *Pared Celular, generalidades*. Recuperado de <http://www.agro.unlpam.edu.ar/> (Agosto, 2012).
11. Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola: Actividad microbiana*. San Antonio de Jujuy, Argentina: Alberdi.
12. Carrión, J. (2000). *Estudio del efecto de la adición de azúcar y rastrojo de maíz en el rendimiento del cultivo del hongo comestible Lentinus edodes en dos sustratos*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
13. Casey, J. (1990). *Pulpa y papel: Química y tecnología química*. (Vol. 1). Madrid, España: NORIEGA-LIMUSA.
14. Casp, A. y Abril. (2003). *Procesos de Conservación de Alimentos*. (Segunda Edición). Madrid, España: Mundi-Prensa
15. Chandel, A. y Singh, O. (2010). Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of Biofuel. *Microbiol Biotechnol*, 89(1), 1289-1303.
16. Chang, S. (1987). Producción mundial de setas comestibles cultivadas en 1986. *Instituto de Micología del trópico*, 7(4), 117-120.
17. Chang, S.T. y Miles, P.G. (1984). A New Look at Cultivated Mushrooms. *Bio Science*, 34(6), 358-362.

18. Chang, S. y Miles, P. (1989). *Edible mushrooms and their cultivation*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press.
19. Chávez, M., Brito, J., Pérez, U. y Delfín. J. (1990). *Temas de Enzimología*. (Tomo II), Habana, Cuba: Universidad de la Habana.
20. Chen, A. (2005). *Que es el shiitake*. Recuperado de <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/P/P/shiitake/capitulo%201%20pag.1-15.pdf>, (Junio, 2012).
21. Chen, A.W., Arrol, N. y Stamets, P. (2000). Shiitake cultivation systems. *Mushroom Science*, 15(1), 771-778.
22. Cook, D. y Flegg, P. (1962). The relation between yield of the cultivated mushroom and stage of maturity at picking. *Horticulture Science*, 37(1), 167-174.
23. Couto, S. y Herrera, J. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Advantaces*, 24(1), 500-513.
24. Curvetto, N., Figlas, D., González, M. y Delmastro, S. (2004). Cáscaras de semilla de girasol. *Mushroom Growers' Handbook*, 2(1), 127-133. Recuperado de <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/P/P/shiitake/capitulo%204%20pag.127-133.pdf> (Mayo, 2012).
25. Dávila, G. y Vázquez-Duhalt. R. (2006). *Enzimas Ligninolíticas Fúngicas para Fines Ambientales*. Recuperado de: vazqduh@ibt.unam.mx (Junio, 2012).
26. Davis, J. (2008). Producing Shiitake Mushroom. A guide for Small-Scale Outdoor Cultivation on Logs. *Agriculture and Life Science*, 12(1), 1-9.

27. Dawson, J. (1988). Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*, 240, 433-439.
28. Delfín, I. y Durán, C. (2003). Biodegradación de residuos urbanos lignocelulósicos por *Pleurotus*. *Rev. Int. Comtam. Ambient*, 19(1), 37-45.
29. Díaz, N., Bárcena, J., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Toribio, F. y Túnez, I. (2005). *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Recuperado de http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf (Agosto, 2012).
30. Espasa-Calve S.A. (2005). *Diccionario de la Lengua Española*. Recuperado de <http://www.wordreference.com/definicion/> (Febrero, 2013).
31. Fan, L., Pan, H., y Wu, Y. (2005). Processing Shiitake. *Mushroom Growers Handbook*, 2(4), 190-194.
32. France, A., Cañumir, J., y Cortéz, M. (2000). Producción de hongos Ostra. *Boletín INIA*, 23(3), 1-28. Recuperado de <http://www.inia.cl/link.cgi/Documentos/Catalogo/Boletines/411> (Enero, 2012).
33. Gaitán R., Esqueda, M., Guitierrez, A., Sánchez, M. y Mata, G. (2005). Bioconversion of agrowastes by *Lentinus edodes*: the high potencial of viticulture residues. *Microbiol Biotechnol*, 71(1), 432-439.
34. Gaitán, D. y Pérez, L. (2008). *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de Crisantemo*. (Trabajo de Grado para Microbiología Industrial). Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis274.pdf> (Mayo, 2011).

35. García, I. (2003). *Experimentación de diferentes tipos de sustratos para el cultivo de *Lentinus edodes* (Shiitake) y su desarrollo químico biológico*. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma de Iztapalapa.
36. Ghose, T. (1987). *Measurement of Cellulase. Activities Pure & Applied Chemistry*. Recuperado de <http://www.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf> (Mayo, 2011).
37. Grant, J. (1996). *Manual sobre la fabricación de pulpa y papel (Laboratorio)*. (Primera edición en español). México, México D.F.: Compañía Editorial Continental.
38. Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. (Tercera edición). Barcelona, España, Reverte.
39. Hofrichter, M. (2000). Manganese peroxidase: enzymatic combustion of lignin. *Bio Spektrum*, 6(1), 198-199.
40. Ikegaya, N. (1997). Breeding and cultivation of shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms. *Food Reviews International*, 13(3), 335-343.
41. Inbio. (2009). *Glosario*. Recuperado de: <http://www.inbio.ac.cr/papers/liquenes/glosario.html> (Febrero, 2013).
42. Israilides, C. y Philippoussis, A. (2003). Bio-technologies of recycling agro-industrial wastes for the production of commercially important polysaccharides and mushrooms. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 20(4): 247-259.
43. Kamm, B. y Kamm, M. (2006). Biorefineries: Multi product processes. *Advantages in Biochemistry Engineering and Biotechnology*, 105(1), 175-204.

44. King, A.D. y Bolin, H.R. (1989). Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technology*, 43(2), 132-139.
45. Kirk, T y Farrel, R. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews of Microbiology*, 41(11), 465-505.
46. Komatsu, M. y Tokimoto, K. (1982). Effects of incubation temperature and moisture content of bed-logs on primordium formation of *Lentinus edodes*. *Totory Mycol*, 20(1), 104-112.
47. Kozak, M. y Krawczyk, J. (1989). *Growing Shiitake Mushrooms in a Continental Climate*. (1era.ed.). Peshtigo, Estados Unidos: Field and Forest Products Inc.
48. Labuza, T. y Riboh, D. (1982). *Theory and application of Arrhenius kinetics the prediction of nutrient losses in foods*. *Food Technol*, 46(10), 66-74.
49. Lahman, O. y Rinker, D. (2004). *Mushroom practices and production in Latin America: 1994-2002. Mushroom Science: Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Pennsylvania, Estados Unidos: The Pennsylvania State University Press.
50. Lizuka, C. y Takeuchi, M. (1978). *Method of artificially growing edible fungi*. United States. Patent N°4,071,973.
51. 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(4), 818-826. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822009000400012>.
52. López, A. (1986). *Hongos comestibles y medicinales en México*. México D.F., México: Editorial Posada.

53. López, A. (2007). *Manual de Producción de Micelio de Hongos Comestibles: Como elaborar "Micelio activado" para cultivo doméstico y semindustrial de hongos comestibles*. (1era.ed). Veracruz, México: Universidad Veracruzana.
54. López, J., Valencia, N. y Chang, S. (2004). Cultivation of shiitake on coffee waste. Romaine, Keil, Rinker and Royse (Eds.) *Mushroom Science: Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*, (pp. 307-311). University Park, Estados Unidos: The Pennsylvania State University Press.
55. Lynd, L., Weimer, P., Zyl W. y Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Bio Rev*, 66(4), pp. 506-577.
56. Markham, P. (1998). Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycological Research*, 98, 1089-1106.
57. Miller, M. y Jong, S.C. (1987). Commercial cultivation of shiitake in sawdust filled plastic bags. *Crop Science: Cultivating Edible Fungi*, 10(10), 421-426.
58. Montoya, S. (2008). *Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto Grifola Frondosa*. (Tesis de Grado – Maestría en Ingeniería Química), Universidad Nacional de Colombia, Manizales-Colombia.
59. Moore, D. (1998). *Fungal Morphogenesis*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
60. Morais, M., Ramos, A., Matos, A. y Santos, E. (2000). Production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on lignocellulosic residues. *Food science*

and Technology International, 6(2), 123-128. Recuperado de <http://fst.sagepub.com/content/6/2/123.short> (Enero, 2012).

61. Niladevi. K. (2009). LigninoLythic Enzymes. En P. Singh nee` Nigam, A. Pandey (Ed.). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization* (398-410). DOI: 10.1007/978-1-4020-9942-7 22.
62. Ovando, S. y Wilszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42), 113-122.
63. Pérez, J. y Jeffries, T. (1992). Roles of Manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *App Environl Microbiol*, 58, 2402-2409.
64. Philippoussis, N. (2003). Using Agro-industrial Residues as Substrates. En P. Singh nee` Nigam, A. Pandey (Ed.). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization* (163-196). DOI: 10.1007/978-1-4020-9942-7 22.
65. Royse, D. (2001). *Cultivation of Shiitake on Natural and Synthetic Logs*. Recuperado de [http:// www.cas.psu.edu](http://www.cas.psu.edu), (Mayo, 2012).
66. Rui, J. Schönsee, I y Barcelo, D. (1998). Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Journal Mass Spectrom*, 33, 653-663.
67. Ruiz, F. (1998). *Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica* (Tesis Doctoral). Recuperado de <http://eprints.ucm.es/tesis/19972000/X/3/X3066901.pdf>.

68. Sadana, A. (1991). *Biocatalysis: Fundamentals of Deactivation Kinetics* (1era. ed.). Englewood Cliffs, Estados Unidos: Prentice Hall.
69. Saguy, I y Karel, M. (1980). Modeling of quality deterioration during food processing and storage. *Food Technology*, 34(2), 78-85.
70. Shoji, O. y Kitamoto, Y. (1997). Future of mushroom production and biotechnology. *Food Reviews International*, 13(3), 461-469.
71. Silva, R., Fritz, C., Cubillos, J., y Día, M. (2010). *Manual para la producción de hongos comestibles (SHIITAKE)*. Recuperado de http://www.forestaluchile.cl/shiitake/Manual%20Producci%C3%B3n%20de%20hongos%0comestibles_2010.pdf (Mayo, 2012).
72. Singer, R. (1961). *Mushrooms and Truffles: Botany, Cultivation and Utilization*. New York, Estados Unidos: Interscience Publisher.
73. Singh, R. (1994). Scientific principles of shelf-life evaluation. Jones AA (Ed.). *Shelf life evaluation of foods*. (pp. 3-25). London, Inglaterra: Academic & Professional.
74. Singhania. R. (2009). Cellulolytic Enzymes. En P. Singh nee` Nigam, A. Pandey (Ed.). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues* (pp. 372-381). DOI: 10.1007/978-1-4020-9942-7 20.
75. Smith, C. (1997). Commercial production of shiitake substrates, *Mushroom World*, 3(1), 4-12.
76. Sun, Y. y Cheng, J. (2001). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.

77. Tan, Y. y Moore, D. (1992). Convenient and effective methods for "in vitro" cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Mycol. Res.* 96(1), 1077-1084.
78. Taoukis, P.S.; Labuza, T.P. y Saguy, I. (1997). Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction. *The Handbook Of Food Engineering Practice* (pp.361-403). Boca Raton, EEUU: CRC Press.
79. Tien, M. y Kirk K. (1983). *Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase*. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC345042> (Julio, 2011).
80. 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 Ingeniero Químico no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
81. Verdu, G. (1987). Evolución de los biocidas en el suelo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 13(1), 99-116.
82. Vilchez, P. (2000). *Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz*. (Tesis para optar el Título profesional de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología), Recuperado de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/>.
83. Villa, Y. (2007). *Determinación de la cinética de crecimiento del Hongo Phanerochaete chrysosporium en residuos ligninocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica en el sustrato a escala de laboratorio*. (Tesis previa a la Obtención del título de Ingeniero Químico no publicada). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

84. Yamanaka y Kasuji. (1997). *Production of cultivated edible mushrooms, reviews International*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1080/87559129709541113> (Mayo, 2012).
85. Zadrazil, F. y Kutman, R. (1982). The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics; En Chang, S. y Quimio, T., (Ed.). *Tropical mushrooms Biological Nature and Cultivation Methods*, (pp. 277-297). Hong Kong, China: Chinese University press.

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE RESINAS, CERAS Y GRASAS

La determinación de resinas, ceras y grasas se midió basándose en el principio de solubilidad Alcohol-Benceno y siguió la norma TAPII-T-6-os-59.

Solvente

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

Equipo

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

Muestra para análisis

Se utiliza una fracción de tamaño de partícula entre 0,25 y 0,4 mm de diámetro, para lo cual en primer lugar se muele la muestra, con malla de molina de 1 mm y luego se tamiza la muestra molida mediante el uso de tamices # 40 y 60, se toma la fracción recolectada en el tamiz # 60.

Se determina la humedad del análisis, al pesar 2 g de la muestra molida y tamizada y colocándola en la estufa a 105 °C por un tiempo de 12 horas, se lleva

la muestra al desecador hasta que se enfríe, se pesa la muestra resultante del proceso y se determina el contenido de humedad con la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{Masa_{inicial} - Masa_{final}}{Masa_{inicial}} * 100$$

Método

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

Se dejan los capuchones secar al ambiente. Se extrae la mezcla alcohol-benceno del balón de extracción con ayuda de un rotavapor hasta que la grasa quede 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 horas, para luego dejarlo enfriar en el desecador. Se pesa el balón y se halla el contenido de ceras, grasas y resinas de la siguiente forma:

$$\%Grasas = \frac{Masabalón_{inicial} - Masabalón_{final}}{Masathimble_{inicial} * (1 - H_{análisis})} * 100$$

ANEXO II

DETERMINACIÓN DE CELULOSA

Se fundamenta en que la fracción de celulosa contenida en una muestra se aísla por clorinación. El método seguido está en la norma TAPPI-T-17-m-55.

Reactivos

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

Equipo

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

Método

Se pesa 2 g de muestra previamente tratada con alcohol-benceno, para eliminar las resinas, ceras y grasas (Ver Anexo III). Se coloca la muestra en un erlenmeyer de 125 mL y se añade 50 mL de hipoclorito de sodio al 10%, dejándola reaccionar durante 8 horas. Para eliminar el exceso de lignina se filtra el material en un crisol poroso previamente tarado y luego se lava con 50 mL de agua, 50 mL de bióxido de azufre al 3%, 50 mL de agua nuevamente y 50 mL de sulfito de sodio al 2%. Se transfiere el material del crisol a un vaso de precipitación y se añade 115 mL

de sulfito de sodio al 2%. Se lo introduce en un baño de agua caliente por un período de 30 minutos. Se vuelve a filtrar la solución en el mismo crisol y se lava el material filtrado con 250 mL de agua. Se seca la muestra a 105 °C en la estufa por un lapso de 3 horas. 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 siguiente fórmula:

$$\%Celulosa = \frac{Masacrisol_{inicial} - Masacrisol_{final}}{Masamuestra_{inicial} * (1 - H^*)} * 100$$

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

ANEXO III

DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Se fundamenta en que los carbohidratos de material celulósico se hidrolizan al ser atacados por ácidos fuertes y dejan la lignina como residuo insoluble. Esto se encuentra detallado en la norma TAPPI-T-13-os-54.

Reactivos

- Solución de ácido sulfúrico, 72%.

Equipo

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

Método

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

Se transfiere la muestra a un balón de 1000 mL y se añade 560 mL de agua, para que la solución nueva tenga una concentración de ácido sulfúrico del 3%. Se mantienen en ebullición la muestra con reflujo por un período de 4 horas. Se deja enfriar y sedimentar la muestra contenida en el balón.

Finalmente se filtra la solución en un crisol poroso previamente tarado, y se lavan los carbohidratos que pudieren quedar con 500 mL de agua destilada caliente. Se seca la muestra contenida en el crisol filtrante en la estufa durante 3 horas a 105 °C. Se coloca el crisol en el desecador hasta que se enfríe y se lo pesa.

Se determina la cantidad de lignina de la siguiente manera:

$$\%Lignina = \frac{Masacrisol_{inicial} - Masacrisol_{final}}{Masamuestra_{inicial} * (1 - H^*)} * 100$$

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

ANEXO IV

PROCESO DE OBTENCIÓN DEL INÓCULO DEL HONGO *Lentinus edodes*

En las figuras AIV.1, AIV.2, AIV.3, AIV.4 y AIV.5 se observa el desarrollo del hongo en tubos de ensayo, cajas Petri y frascos de vidrio.

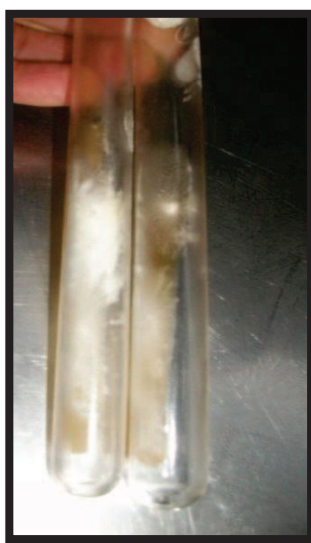


Figura AIV. 1. Crecimiento de *Lentinus edodes* en tubos con agar

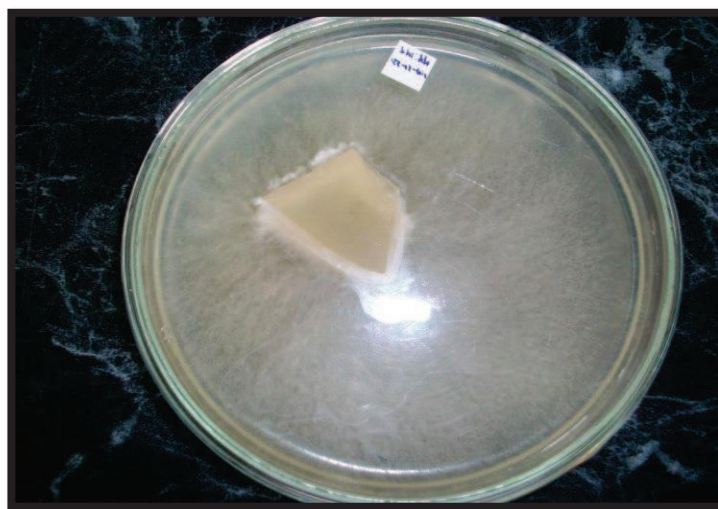


Figura AIV.2. Crecimiento de *Lentinus edodes* en caja Petri



Figura AIV.3. Crecimiento de *Lentinus edodes* en tubos y cajas Petri en la incubadora a 28 °C



Figura AIV.4. Crecimiento de *Lentinus edodes* en frascos de vidrio de 250 mL con trigo y relación de humedad 1:1,2



Figura AIV.5. Desarrollo del micelio de *Lentinus edodes* en frascos de vidrio de 250 mL con trigo y relación de humedad 1:1,2

ANEXO V

DESARROLLO DEL HONGO *Lentinus edodes* EN FUNDAS DE ASERRÍN DE MADERAS TROPICALES

En las figuras AV.1 y AV.2 se observa el proceso de siembra del hongo *Lentinus edodes* en fundas plásticas.



Figura AV. 1. Inoculación del Hongo *Lentinus edodes* en las fundas con aserrín esterilizado



Figura AV. 2. Fundas de 300 g de aserrín inoculadas con *Lentinus edodes*

En las figuras AV.3, AV.4, AV.5 y AV.6 se observa el desarrollo del hongo en las fundas de aserrín hasta que se logra un cubrimiento total del hongo sobre el aserrín.

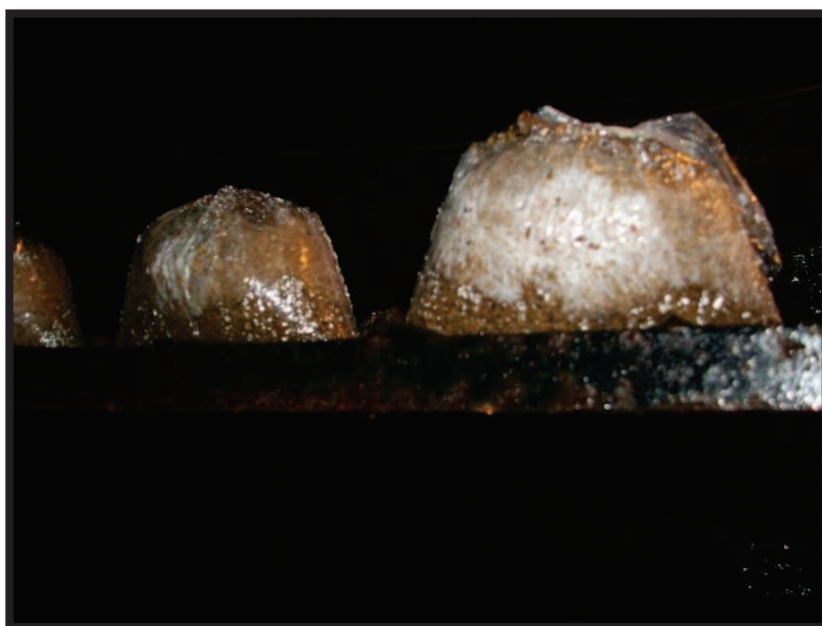


Figura AV. 3. Crecimiento del micelio del *Lentinus edodes* en las fundas con aserrín de maderas tropicales



Figura AV. 4. Fortificación del micelio del *Lentinus edodes* en las fundas con aserrín de maderas tropicales



Figura AV. 5. Aparecimiento de los primordios de *Lentinus edodes* en las fundas con aserrín de maderas tropicales

En las figuras AV.6 yAV.7 se observa el aparecimiento de los primordios y el período de remojo de las fundas.



Figura AV. 6. Fortalecimiento del micelio del *Lentinus edodes*, después de haber retirado las fundas



Figura AV. 7. Inducción de la salida y desarrollo de los primordios de *Lentinus edodes*

En las figuras AV.8, AV.9 y AV.10 se observa el crecimiento de los primordios y el pardeamiento del micelio de las fundas en la cámara clara-oscuro.



Figura AV. 8. Separación de las fundas según el desarrollo del micelio de *Lentinus edodes* en la cámara clara-oscuro en dos grupos



Figura AV. 9. Separación de las fundas según el desarrollo del micelio de *Lentinus edodes* en la cámara clara-oscuro en dos grupos



Figura AV. 10. Crecimiento de los primordios de *Lentinus edodes* en la cámara clara oscura

En las figuras AV.11, AV.12 y AV.13 se observa el desarrollo de los cuerpos fructíferos en la cámara clara-obscura.



Figura AV. 11. Cuerpos fructíferos de *Lentinus edodes* en primera corrida



Figura AV. 12. Cuerpos fructíferos de *Lentinus edodes* en la segunda corrida



Figura AV. 13. Cuerpos fructíferos de *Lentinus edodes* en la tercera corrida

ANEXO VI

DATOS DE VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA PARA LAS TRES CORRIDAS DE FERMENTACIÓN DEL HONGO *Lentinus edodes* EN ASERRÍN TROPICAL

Los datos de variación de la absorbancia con respecto al tiempo de fermentación en aserrín tropical del hongo *Lentinus edodes* obtenidos durante las tres corridas, para el ensayo de determinación de la actividad celulolítica de las cosechas del grupo 1 y 2 se observan en las tablas AVI.1, AVI.2 y AVI.3.

Los datos de variación de la absorbancia con respecto al tiempo de fermentación en aserrín tropical del hongo *Lentinus edodes* obtenidos durante las tres corridas para el ensayo de determinación de la actividad ligninoperoxidásica para las cosechas del grupo 1 y 2, se observan en las tablas AVI.4, AVI.5 y AVI.6.

Los datos de variación de la absorbancia con respecto al tiempo de fermentación en aserrín tropical del hongo *Lentinus edodes* obtenidos durante las tres corridas, para el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica de la primera cosecha y tiempo de segunda cosecha del grupo 1 y primera cosecha del grupo 2 se observan en las tablas AVI.7, AVI.8 y AVI.9.

Tabla AVI. 1. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática celulolítica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la primera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,166	0,083	0,166	0,083	0,125	0,125
3	0,069	0,050	0,069	0,050	0,060	0,060
7	0,043	0,020	0,043	0,020	0,031	0,031
11	0,015	0,044	0,015	0,044	0,029	0,029
14	0,034	0,096	0,034	0,096	0,065	0,065
18	0,052	0,082	0,052	0,082	0,067	0,067
21	0,068	0,155	0,068	0,155	0,111	0,111
25	0,127	0,120	0,127	0,120	0,124	0,124
28	0,023	0,038	0,023	0,038	0,030	0,030
32	0,035	0,020	0,035	0,020	0,027	0,027
35	0,016	0,064	0,016	0,064	0,040	0,040
39	0,059	0,090	0,059	0,090	0,075	0,075
41	0,197	0,088	0,104	0,086	0,142	0,095
46	0,082	0,108	0,056	0,092	0,095	0,074
49	0,069	0,078	0,209	0,186	0,074	0,197
53	0,121	0,274	0,077	0,078	0,197	0,078
63	0,083	0,053	0,133	0,138	0,068	0,136
67	0,116	0,089			0,103	
69	0,211	0,222			0,216	

Tabla AVI.2. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática celulolítica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la segunda corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,059	0,312	0,059	0,312	0,185	0,185
3	0,080	0,037	0,080	0,037	0,058	0,058
6	0,084	0,119	0,084	0,119	0,101	0,101
10	0,088	0,073	0,088	0,073	0,080	0,080
13	0,133	0,056	0,133	0,056	0,094	0,094
17	0,128	0,086	0,128	0,086	0,107	0,107
20	0,118	0,108	0,118	0,108	0,113	0,113
24	0,082	0,079	0,082	0,079	0,080	0,080
27	0,070	0,077	0,070	0,077	0,073	0,073
31	0,112	0,190	0,112	0,190	0,151	0,151
34	0,080	0,074	0,066	0,102	0,077	0,084
38	0,118	0,086	0,080	0,145	0,102	0,112
41	0,060	0,069	0,097	0,074	0,064	0,086
45	0,060	0,058	0,058	0,100	0,059	0,079
48	0,156	0,108	0,113	0,115	0,132	0,114
52	0,162	0,168	0,205	0,206	0,165	0,206
55			0,233	0,234		0,234
59			0,366	0,378		0,372
62			0,313	0,269		0,291
66			0,306	0,303		0,305
69			0,306	0,331		0,318

Tabla AVI. 3. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática celulolítica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,269	0,287	0,269	0,287	0,278	0,278
3	0,307	0,097	0,307	0,097	0,202	0,202
7	0,035	0,032	0,035	0,032	0,033	0,033
10	0,029	0,028	0,029	0,028	0,029	0,029
14	0,024	0,032	0,024	0,032	0,028	0,028
17	0,139	0,154	0,139	0,154	0,147	0,147
21	0,054	0,047	0,054	0,047	0,051	0,051
24	0,043	0,031	0,152	0,163	0,037	0,158
28	0,152	0,159	0,135	0,153	0,156	0,144
31	0,094	0,106	0,166	0,167	0,100	0,166
35	0,107	0,088	0,145	0,131	0,098	0,138
38	0,127	0,122	0,095	0,091	0,125	0,093
42	0,077	0,069	0,085	0,066	0,073	0,075
45	0,090	0,098	0,201	0,327	0,094	0,264
49	0,191	0,142	0,159	0,128	0,166	0,143
52			0,419	0,396		0,407
56			0,600	0,615		0,608
59			0,282	0,276		0,279
63			0,456	0,451		0,454

Tabla AVI.4. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la primera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,007	0,011	0,007	0,011	0,009	0,009
3	0,007	0,006	0,007	0,006	0,006	0,006
7	0,015	0,005	0,015	0,005	0,010	0,010
11	0,016	0,010	0,016	0,010	0,013	0,013
14	0,008	0,011	0,008	0,011	0,010	0,010
18	0,013	0,016	0,013	0,016	0,014	0,014
21	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001
32	0,008	0,015	0,008	0,015	0,011	0,011
35	0,013	0,007	0,013	0,007	0,010	0,010
39	0,026	0,011	0,026	0,011	0,018	0,018
41	0,000	0,002	0,011	0,005	0,001	0,008
46	0,002	0,015	0,000	0,000	0,008	0,000
49	0,000	0,000	0,019	0,003	0,000	0,011
53	0,019	0,003	0,004	0,002	0,011	0,003
63	0,003	0,000	0,002	0,001	0,001	0,002
67	0,000	0,000			0,000	
69	0,000	0,000			0,000	

Tabla AVI.5. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la segunda corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,008	0,014	0,008	0,014	0,011	0,011
3	0,013	0,003	0,013	0,003	0,008	0,008
6	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002
10	0,011	0,000	0,011	0,000	0,006	0,006
13	0,016	0,021	0,016	0,021	0,018	0,018
17	0,022	0,000	0,022	0,000	0,011	0,011
20	0,047	0,011	0,047	0,011	0,029	0,029
24	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
31	0,000	0,000	0,014	0,008	0,000	0,011
34	0,000	0,000	0,006	0,009	0,000	0,008
38	0,000	0,000	0,012	0,017	0,000	0,015
41	0,000	0,000	0,016	0,015	0,000	0,016
45	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
48	0,015	0,009	0,031	0,027	0,012	0,029
52	0,003	0,007	0,008	0,001	0,005	0,005
55			0,041	0,031		0,036
59			0,000	0,000		0,000
62			0,029	0,025		0,027
66			0,027	0,044		0,036
69			0,015	0,021		0,018

Tabla AVI.6. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática ligninoperoxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,008	0,006	0,008	0,006	0,007	0,007
7	0,022	0,021	0,022	0,021	0,022	0,022
10	0,003	0,015	0,003	0,015	0,009	0,009
14	0,029	0,007	0,029	0,007	0,018	0,018
17	0,013	0,008	0,013	0,008	0,010	0,010
21	0,010	0,008	0,010	0,008	0,009	0,009
24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,000	0,006	0,007	0,000	0,007
31	0,028	0,027	0,013	0,014	0,028	0,014
35	0,009	0,010	0,016	0,014	0,009	0,015
38	0,004	0,002	0,008	0,007	0,003	0,008
42	0,024	0,025	0,032	0,031	0,025	0,031
45	0,029	0,030	0,024	0,025	0,030	0,025
49	0,054	0,053	0,040	0,044	0,054	0,042
52			0,011	0,051		0,031
56			0,042	0,042		0,042
59			0,015	0,017		0,016
63			0,069	0,074		0,072

Tabla AVI.7. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la primera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,008	0,004	0,008	0,004	0,006	0,006
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	0,002	0,010	0,000	0,000	0,006	0,000
21	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	0,044	0,058	0,044	0,058	0,051	0,051
28	0,231	0,029	0,231	0,029	0,130	0,130
32	0,061	0,048	0,061	0,048	0,055	0,055
35	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
39	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
41	0,000	0,000	0,110	0,060	0,000	0,085
46	0,037	0,096	0,000	0,000	0,066	0,000
49	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
53	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
63	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
67	0,000	0,000			0,000	
69	0,000	0,000			0,000	

Tabla AVI.8. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la segunda corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
17	0,067	0,201	0,067	0,201	0,134	0,134
20	0,445	0,174	0,445	0,174	0,310	0,310
24	0,022	0,254	0,022	0,254	0,138	0,138
27	0,387	0,403	0,387	0,403	0,395	0,395
31	0,419	0,398	0,419	0,398	0,408	0,408
34	0,463	0,463	0,361	0,393	0,463	0,377
38	0,501	0,310	0,282	0,239	0,406	0,260
41	0,188	0,165	0,360	0,394	0,177	0,377
45	0,141	0,099	0,242	0,235	0,120	0,238
48	0,083	0,048	0,099	0,178	0,066	0,138
52	0,068	0,073	0,165	0,170	0,071	0,168
55			0,046	0,096		0,071
59			0,085	0,090		0,088
62			0,005	0,009		0,007
66			0,046	0,053		0,050
69			0,000	0,000		0,000

Tabla AVI.9. Datos de variación de la absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica de las cosechas del grupo 1 y 2 durante la tercera corrida de fermentación del hongo *Lentinus edodes*

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0	0,021	0,002	0,021	0,002	0,011	0,011
3	0,001	0,008	0,001	0,008	0,005	0,005
7	0,289	0,000	0,289	0,000	0,145	0,145
10	0,239	0,229	0,239	0,229	0,234	0,234
14	0,005	0,007	0,005	0,007	0,006	0,006
17	0,371	0,186	0,371	0,186	0,279	0,279
21	0,425	0,425	0,425	0,425	0,425	0,425
24	0,392	0,406	0,191	0,179	0,399	0,185
28	0,224	0,232	0,057	0,079	0,228	0,068
31	0,203	0,195	0,000	0,000	0,199	0,000
35	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
38	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
42	0,007	0,002	0,000	0,000	0,005	0,000
45	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000	0,002
49			0,000	0,000		0,000
52			0,000	0,000		0,000
56			0,000	0,000		0,000
59			0,000	0,000		0,000
63			0,000	0,000		0,000

ANEXO VII

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL ASERRÍN DESPUÉS DE LA ESTERILIZACIÓN

En dos crisoles previamente tarados se colocaron y pesaron 2 muestras de aserrín húmedo estéril, el proceso de esterilización se dio por 4 horas a 91 °C. Se dejó secar las muestras de aserrín en una estufa a 105 °C durante 24 horas, y después se enfriaron en un desecador por 3 horas. Se registraron los pesos de los crisoles y se determinó el porcentaje de agua presente en el aserrín, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

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

Los pesos inicial y final del aserrín húmedo se presentan en la Tabla AVII.1 y en la Tabla AVII.2 se presentan el valor de humedad del aserrín de maderas tropicales utilizado.

Tabla AVII. 1. Pesos inicial y final del aserrín húmedo

Muestra	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
Aserrín 1	20,05	15,82
Aserrín 2	23,23	18,68

Tabla AVII. 2. Porcentaje de humedad de las muestras de aserrín

Muestra	% Humedad	% Humedad Promedio
Aserrín 1	21,09	20,34
Aserrín 2	19,59	

ANEXO VIII

OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE D-GLUCOSA

Para la curva de calibración se preparó una solución de glucosa anhidra de 2 g/L. Se prepararon 6 muestras diluidas a diferentes concentraciones de glucosa en buffer citrato 0,5 M y pH 4,8. Los datos se tabulan en la Tabla AVIII.1.

Tabla AVIII. 1. Concentración de los estándares utilizados para la obtención de la curva de calibración de glucosa

Dilución	Concentración (g/L)
Sin dilución (Blanco)	2,00
2 mL de solución de glucosa + 2 mL de buffer	1,00
2 mL de solución de glucosa + 4 mL de buffer	0,667
2 mL de solución de glucosa + 7 mL de buffer	0,444
2 mL de solución de glucosa + 10 mL de buffer	0,333
2 mL de solución de glucosa + 12 mL de buffer	0,286
2 mL de solución de glucosa + 16 mL de buffer	0,222
2 mL de solución de glucosa + 21 mL de buffer	0,174

Se leyeron las absorbancias de las diluciones estándar a 540 nm y se restó el valor del blanco, con lo que se elaboró la curva de calibración. La curva de calibración obtenida fue:

$$Abs = k_1 * [ConcentraciónGlucosa] + k_o$$

$$Abs = 0,36126 * C - 0,01256$$

$$r^2 = 0,9965$$

Con esta curva se determinó la concentración enzimática celulolítica de los extractos.

ANEXO IX

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE LOS EXTRACTOS

Para determinar la actividad celulolítica de los extractos obtenidos del crecimiento del hongo *Lentinus edodes* en aserrín tropical primero fue necesario obtener la curva de calibración de la D-glucosa y se realizó siguiendo el procedimiento detallado en el Anexo 2 de éste proyecto. Finalmente la curva de calibración utilizada para calcular la concentración de celulosa contenida en los extractos fue:

$$C = \frac{Abs + 0,01256}{0,36126}$$

Entonces la concentración se calculó para cada absorbancia medida de la siguiente manera:

$$C = \frac{0,125 + 0,01256}{0,36126} = 0,379 \frac{mg \text{ de glucosa}}{mL \text{ extracto}}$$

La longitud de onda a la cual se midió la absorbancia fue 540 nm. Para determinar la actividad enzimática celulolítica se realizó los siguientes cálculos.

$$UI = 0,379 \frac{mg \text{ de glucosa}}{mL \text{ extracto}} * \frac{1 \text{ m mol glucosa}}{180 \text{ mg glucosa}} * \frac{1000 \mu\text{mol glucosa}}{1 \text{ m mol glucosa}}$$

$$* \frac{75 \text{ mL de extracto}}{45 \text{ g aserrín húmedo}} * \frac{100 \text{ g de aserrín húmedo}}{79,66 \text{ g de aserrín seco}}$$

$$* \frac{1}{30 \text{ min de reacción}}$$

$$UI = 0,147 \frac{\mu\text{mol}}{g \text{ de aserrín seco} * \text{min}}$$

ANEXO X

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNINOPEROXIDÁSICA DE LOS EXTRACTOS

Para determinar la actividad enzimática ligninoperoxidásica se utilizó la ecuación de la Ley de Lambert-Beer, la cual quedó expresada de la siguiente manera:

$$C = \frac{A}{\varepsilon \times l}$$

El valor del coeficiente de extensión molar para determinación de la actividad ligninoperoxidásica es de $9\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y la longitud de onda es de 310 nm. Entonces se calcula la concentración molar de la enzima ligninoperoxidásica contenida en los extractos y queda:

$$C = \frac{0,009}{9\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1} * 1\text{ cm}} = 9,677 \times 10^{-7}\text{ M}$$

Entonces para calcular la actividad enzimática ligninoperoxidásica se tiene:

$$UI = \frac{9,677 \times 10^{-7}\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}} * \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1\text{ mol}} * \frac{1\text{ L mezcla de reacción}}{1000\text{ mL mezcla de reacción}} * \frac{10\text{ mL de mezcla de reacción}}{0,5\text{ mL de extracto}} * \frac{75\text{ mL de extracto}}{45\text{ g aserrín húmedo}} * \frac{100\text{ g de aserrín húmedo}}{79,66\text{ g de aserrín seco}} * \frac{1}{60\text{ min de reacción}}$$

$$UI = 4,05 \times 10^{-3} \frac{\mu\text{mol}}{\text{g de aserrín seco} * \text{min}}$$

ANEXO XI

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA DE LOS EXTRACTOS

Para determinar la actividad enzimática manganeso peroxidásica se utilizó la ecuación de la Ley de Lambert-Beer, la cual quedó expresada de la siguiente manera:

$$C = \frac{A}{\varepsilon \times l}$$

El valor del coeficiente de extensión molar para determinación de la actividad manganeso peroxidásica es de $22\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y la longitud de onda a la cual se midió la absorbancia fue de 610 nm . Entonces se calcula la concentración molar de la enzima manganeso peroxidásica contenida en los extractos y queda:

$$C = \frac{0,006}{22\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1} * 1\text{ cm}} = 2,841 \times 10^{-7}\text{ M}$$

Entonces para calcular la actividad enzimática ligninoperoxidásica se tiene:

$$UI = \frac{2,841 \times 10^{-7}\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}} * \frac{10^6\mu\text{mol}}{1\text{ mol}} * \frac{1\text{ L mezcla de reacción}}{1000\text{ mL mezcla de reacción}} \\ * \frac{10\text{ mL de mezcla de reacción}}{0,5\text{ mL de extracto}} * \frac{75\text{ mL de extracto}}{45\text{ g aserrín húmedo}} \\ * \frac{100\text{ g de aserrín húmedo}}{79,66\text{ g de aserrín seco}} * \frac{1}{10\text{ min de reacción}}$$

$$UI = 1,19 \times 10^{-3} \frac{\mu\text{mol}}{\text{g de aserrín seco} * \text{min}}$$

ANEXO XII

**ANÁLISIS GLOBAL DE LA GENERACIÓN DE ENZIMAS
CELULOLÍTICAS, LIGNINOLÍTICAS Y MANGANESO
PEROXIDÁSICAS**

En la Tabla AXII.1 se muestran los datos de actividad enzimática celulolítica correspondientes a los nueve días de análisis relacionados con el crecimiento del hongo *Lentinus edodes*.

Tabla AXII. 1.Datos de actividad en enzimática celulolítica de los días seleccionados para las tres corridas y los dos grupos

UI								
Día inicial	Día finalización de adaptación	Día de completa formación del micelio	Día de post. inducción	Día de primera cosecha	Día de inducción	Día de post. inducción	Día de aparición de primordios	Día de segunda cosecha
0,192	0,060	0,150	0,051	0,224	0,088	0,143	0,138	0,240
0,103	0,034	0,142	0,035	0,108	0,097	0,307	0,109	0,251
0,192	0,060	0,150	0,031	0,237	0,099	0,140	0,078	0,187
0,103	0,034	0,142	0,082	0,213	0,093	0,106	0,076	0,194
0,076	0,099	0,140	0,088	0,134	0,115	0,150	0,096	0,110
0,348	0,053	0,129	0,096	0,217	0,128	0,145	0,087	0,119
0,076	0,099	0,140	0,075	0,406				0,156
0,348	0,053	0,129	0,120	0,419				0,016
0,302	0,051	0,163	0,059	0,177				0,341
0,321	0,048	0,179	0,047	0,184				0,369
0,302	0,051	0,163	0,011	0,657				0,503
0,321	0,048	0,179	0,084	0,674				0,497

En la Tabla AXII.2 se muestran los datos de actividad enzimática ligninoperoxidásica correspondientes a los nueve días de análisis relacionados con el crecimiento del hongo *Lentinus edodes*.

Tabla AXII. 2. Datos de actividad en enzimática ligninoperoxidásica de los días seleccionados para las tres corridas y los dos grupos

UI								
Día inicial	Día finalización de adaptación	Día de completa formación del micelio	Día de post. inducción	Día de primera cosecha	Día de inducción	Día de post. inducción	Día de aparición de primordios	Día de segunda cosecha
3,38E-03	6,53E-03	0,00E+00	3,60E-03	0,00E+00	0,00E+00	8,55E-03	0,00E+00	0,00E+00
4,73E-03	2,25E-03	0,00E+00	6,53E-03	1,06E-03	0,00E+00	1,13E-03	0,00E+00	0,00E+00
3,38E-03	6,53E-03	0,00E+00	5,63E-03	8,55E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,00E-04
4,73E-03	2,25E-03	0,00E+00	2,93E-03	1,13E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,50E-04
3,38E-03	5,85E-03	2,14E-02	0,00E+00	0,00E+00	1,26E-02	1,80E-03	1,08E-02	1,35E-03
6,30E-03	1,35E-03	4,95E-03	0,00E+00	0,00E+00	1,22E-02	9,00E-04	1,13E-02	3,15E-03
3,38E-03	5,85E-03	2,14E-02	0,00E+00	0,00E+00				6,75E-03
6,30E-03	1,35E-03	4,95E-03	0,00E+00	0,00E+00				9,45E-03
0,00E+00	9,90E-03	5,63E-03	0,00E+00	0,00E+00				1,31E-02
0,00E+00	9,45E-03	3,38E-03	0,00E+00	0,00E+00				1,35E-02
0,00E+00	9,90E-03	5,63E-03	1,42E-02	1,89E-02				3,11E-02
0,00E+00	9,45E-03	3,38E-03	1,40E-02	1,89E-02				3,33E-02

En la Tabla AXII.3 se muestran los datos de actividad enzimática manganeso peroxidásica correspondientes a los nueve días de análisis relacionados con el crecimiento del hongo *Lentinus edodes*.

Con los datos de las tablas AXII.1, AXII.2 y AXII.3 se calcularon los valores promedio y las desviaciones estándar para cada día de análisis. Los días de análisis fueron seleccionados en relación a las fases de crecimiento que mayor correspondencia presentaron con la producción de enzimas. En la Tabla AXII.4 se presentan dichos valores.

Tabla AXII. 3. Datos de actividad en enzimática manganeso peroxidásica de los días seleccionados para las tres corridas y los dos grupos

UI								
Día inicial	Día finalización de adaptación	Día de completa formación del micelio	Día de post. inducción	Día de primera cosecha	Día de inducción	Día de post. inducción	Día de aparición de primordios	Día de segunda cosecha
1,62E-03	0,00E+00	8,37E-02	1,16E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
7,61E-04	0,00E+00	1,10E-02	9,14E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1,62E-03	0,00E+00	8,37E-02	0,00E+00	0,00E+00	8,80E-02	9,54E-02	2,68E-02	0,00E+00
7,61E-04	0,00E+00	1,10E-02	0,00E+00	0,00E+00	8,80E-02	5,90E-02	1,88E-02	0,00E+00
0,00E+00	0,00E+00	8,47E-02	7,37E-02	7,96E-02	3,86E-02	0,00E+00	1,33E-03	1,29E-02
0,00E+00	0,00E+00	3,31E-02	7,66E-02	7,57E-02	3,71E-02	0,00E+00	3,81E-04	1,39E-02
0,00E+00	0,00E+00	8,47E-02	4,61E-02	1,62E-02				0,00E+00
0,00E+00	0,00E+00	3,31E-02	4,46E-02	1,71E-02				0,00E+00
3,90E-03	5,50E-02	7,06E-02	7,45E-02	4,26E-02				0,00E+00
3,81E-04	0,00E+00	3,54E-02	7,72E-02	4,42E-02				0,00E+00
3,90E-03	0,00E+00	7,06E-02	0,00E+00	0,00E+00				0,00E+00
3,81E-04	0,00E+00	3,54E-02	0,00E+00	0,00E+00				0,00E+00

El valor de actividad enzimática promedio se calculó al utilizar la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

El número de datos para la mayoría de días fue de 12; sin embargo, para los días de inducción, post. inducción y aparición de primordios 2 solo se tuvieron 6 datos; puesto que, para el grupo 2 no se tuvo segunda cosecha en ninguna corrida.

El valor de las desviaciones estándar se calculó con la siguiente fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

- S = desviación estándar
 x_i = resultado i del mensurado
 \bar{x} = media aritmética de una muestra de n medidas
n-1 = grados de libertad

Tabla AXII. 4. Datos promedio y desviación estándar para los nueve días de análisis relacionados con el crecimiento del hongo *Lentinus edodes*

Día	ACTIVIDAD CELULOLÍTICA		ACTIVIDAD LIGNINO PROXIDÁSICA		ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA	
	UI Promedio	σ	UI Promedio	σ	UI Promedio	σ
Día inicial	0,244	0,112	2,97E-03	2,42E-03	1,11E-03	1,42E-03
Día finalización de adaptación	0,058	0,021	5,89E-03	3,39E-03	4,58E-03	1,59E-02
Completa formación del micelio	0,150	0,017	5,89E-03	7,59E-03	5,31E-02	2,93E-02
Post. Inducción	0,065	0,031	3,91E-03	5,31E-03	3,45E-02	3,42E-02
Primera Cosecha	0,304	0,193	4,05E-03	7,35E-03	2,30E-02	3,03E-02
Inducción	0,103*	0,015	4,13E-03*	6,40E-03	4,20E-02*	3,95E-02
Post. Inducción	0,165*	0,071	2,06E-03*	3,25E-03	2,57E-02*	4,15E-02
Aparición primordios	0,097*	0,023	3,68E-03*	5,71E-03	7,89E-03*	1,18E-02
Segunda cosecha	0,249	0,152	9,42E-03	1,17E-02	2,23E-03	5,22E-03

n = 12; n* = 6

ANEXO XIII

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA AJUSTADOS A UN MODELO DE ORDEN CERO

Para el cálculo de la estabilidad de los extractos con actividad enzimática ajustados a un orden cero se siguió el modelo matemático descrito en el acápite 1.3.5.2.

Entonces de la ecuación 1.14 se tiene que:

$$UI_f = UI_0 - kt$$

Ahora al graficar en la Figura AXIII.1 la actividad enzimática para las temperaturas de 15,5 °C, 3 °C y -14°C, se tiene las ecuaciones de las funciones lineales y el valor del coeficiente de regresión (r^2) para cada curva.

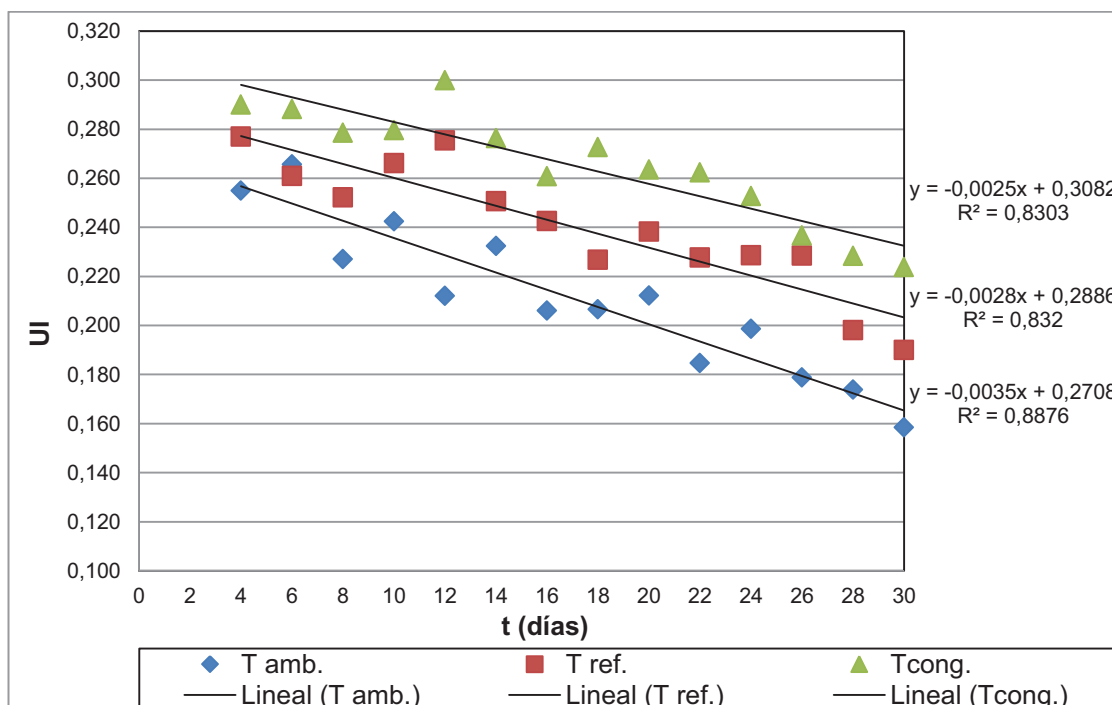


Figura AXIII. 1. Actividad enzimática celulolítica con respecto al tiempo para las temperaturas de 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

De la Figura AXIII. 1 se tiene las siguientes ecuaciones:

- Temperatura ambiental promedio de 15,5 °C

$$UI = 0,2708 - (-0,0035t)$$

$$r^2 = 0,8876$$

- Temperatura de refrigeración de 3 °C

$$UI = 0,2886 - (-0,0028 t)$$

$$r^2 = 0,8320$$

- Temperatura de congelación de -14 °C

$$UI = 0,3082 - (-0,0025 t)$$

$$r^2 = 0,8303$$

Al utilizar la ecuación 1.15 se tiene:

- Temperatura ambiental promedio de 15,5 °C

$$t_{50} = \frac{UI_o - UI_f}{k}$$

$$t_{50} = \frac{0,255 UI - 0,128 UI}{0,0035 \frac{UI}{día}}$$

$$t_{50} = 36,4 \text{ día}$$

- Temperatura de refrigeración de 3 °C

$$t_{50} = \frac{UI_o - UI_f}{k}$$

$$t_{50} = \frac{0,277 UI - 0,139 UI}{0,0028 \frac{UI}{día}}$$

$$t_{50} = 49,5 \text{ día}$$

- Temperatura de congelación de $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$

$$t_{50} = \frac{UI_o - UI_f}{k}$$

$$t_{50} = \frac{0,290 UI - 0,145 UI}{0,0025 \frac{UI}{\text{día}}}$$

$$t_{50} = 58,0 \text{ día}$$

En la Figura AXIII.2 se tiene la gráfica del valor del logaritmo natural de la pendiente k con respecto al inverso de las temperaturas de almacenamiento expresadas en grados kelvin, y son: $288,5\text{ }^{\circ}\text{K}$, $276\text{ }^{\circ}\text{K}$ y $259\text{ }^{\circ}\text{K}$, la línea de tendencia y valor del coeficiente de regresión (r^2).

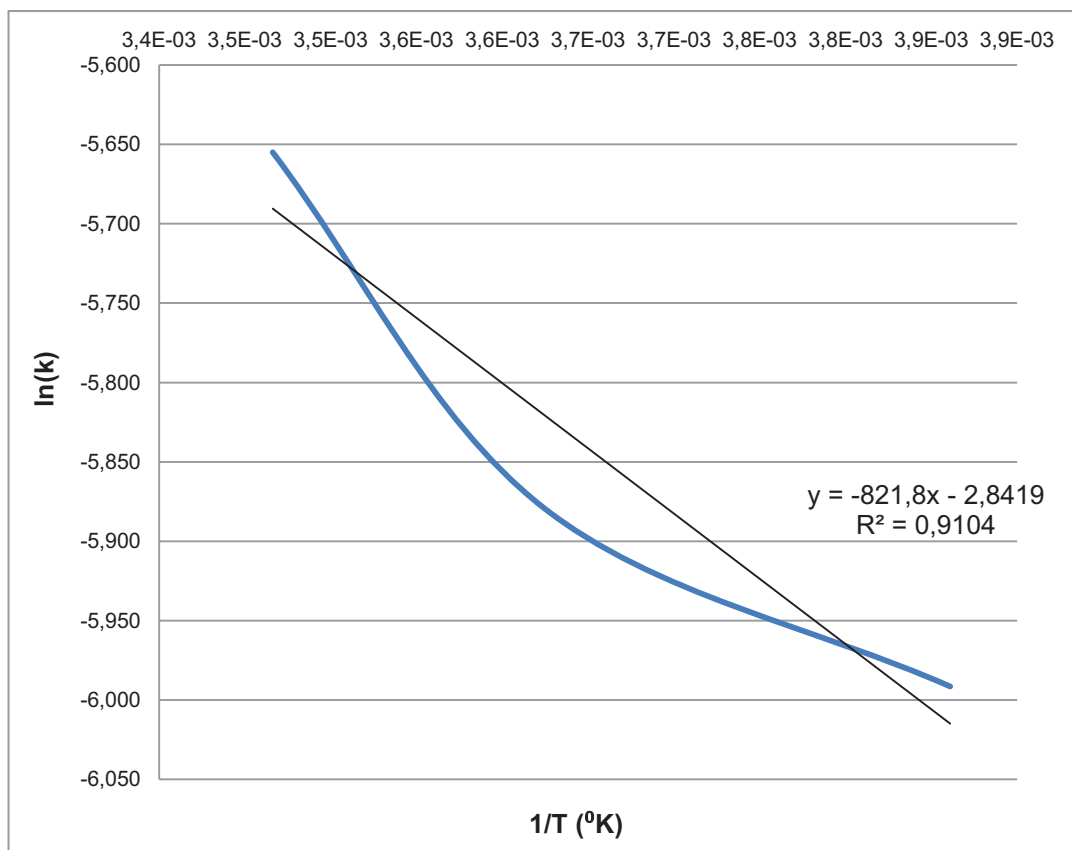


Figura AXIII. 2. $\ln(k)$ con respecto al inverso de las temperaturas $288,5\text{ }^{\circ}\text{K}$, $276\text{ }^{\circ}\text{K}$ y $259\text{ }^{\circ}\text{K}$

Entonces al utilizar la ecuación 1.23 se tiene:

$$\ln k = -2,8419 - \left(\frac{E_A}{(8,13(J * mol^{-1} * ^\circ K^{-1}))} * (-821,8^\circ K^{-1}) \right)$$

El valor de la energía de activación quedaría:

$$E_A = -(-821,8) * (8,13(J * mol^{-1} * ^\circ K^{-1})) * \frac{1 KJ}{1000 J}$$

$$E_A = 6,681 \frac{KJ}{mol}$$

ANEXO XIV

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA AJUSTADOS A UN MODELO DE PRIMER ORDEN

Para el cálculo de la estabilidad de los extractos con actividad enzimática ajustados a primer orden se siguió el modelo matemático descrito en el acápite 1.3.5.3. Entonces de la ecuación 1.18 se tiene que:

$$\ln(UI_f) = \ln(UI_o) - kt$$

En la Tabla AXIV.1 se presentan los datos del logaritmo natural de la actividad enzimática celulolítica en función del tiempo y temperatura de almacenamiento.

Al graficar en la Figura AXIV.1 el logaritmo natural de la actividad enzimática con respecto al tiempo para las temperaturas de 15,5 °C, 3 °C y -14 °C, se tiene las ecuaciones de las funciones lineales y el valor del coeficiente de regresión lineal (r^2) para cada curva.

Tabla AXIV. 1.Datos de variación del ln (UI) con el tiempo de los extractos con actividad enzimática celulolítica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

Días	ln UI		
	T amb. (15,5 °C)	T ref. (3 °C)	Tcong. (-14 °C)
0	-1,371	-1,371	-1,371
2	-1,556	-1,564	-1,242
4	-1,367	-1,284	-1,238
6	-1,325	-1,343	-1,244
8	-1,482	-1,377	-1,278
10	-1,417	-1,323	-1,274
12	-1,551	-1,289	-1,204
14	-1,459	-1,384	-1,286
16	-1,579	-1,416	-1,344
18	-1,577	-1,484	-1,300
20	-1,550	-1,434	-1,334
22	-1,689	-1,480	-1,338
24	-1,616	-1,476	-1,375
26	-1,721	-1,476	-1,441
28	-1,749	-1,619	-1,477
30	-1,842	-1,661	-1,497

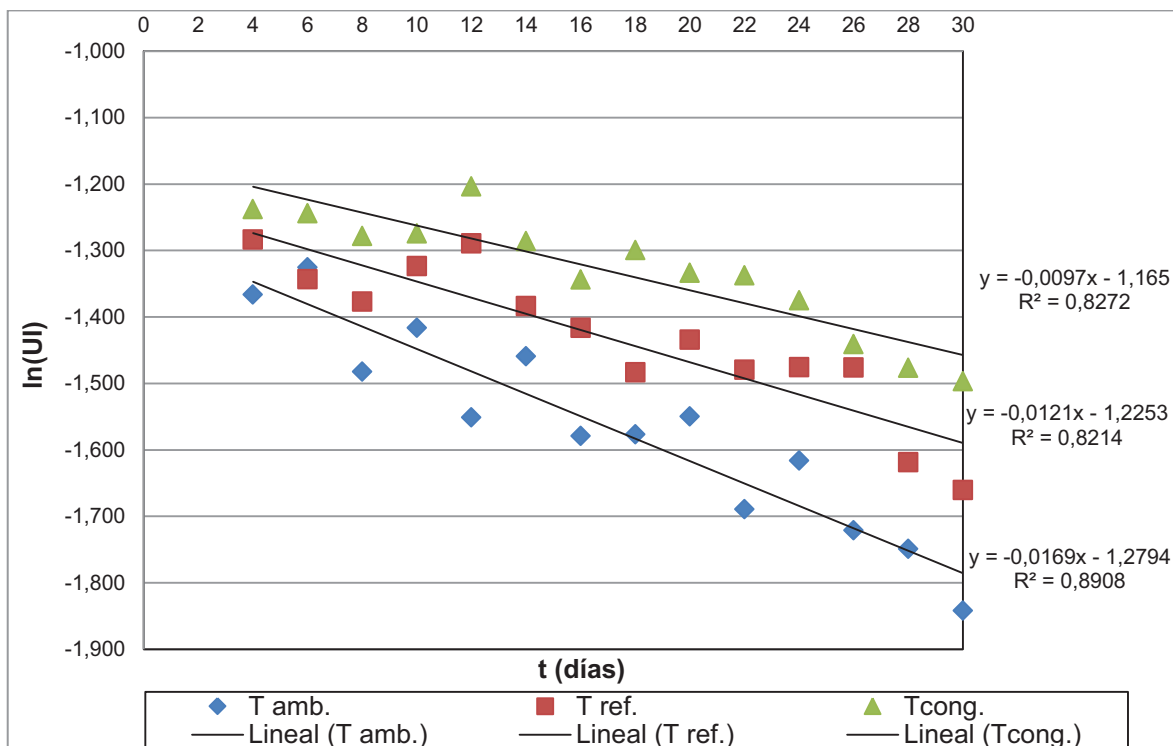


Figura AXIV. 1. Actividad enzimática manganeso peroxidásica con respecto al tiempo para las temperaturas de 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

De la Figura AXIV. 1 se tiene las siguientes ecuaciones:

- Temperatura ambiental promedio de 15,5 °C

$$\ln(UI) = -1,12794 - (-0,0169 t)$$

$$r^2 = 0,8908$$

- Temperatura de refrigeración de 3 °C

$$\ln(UI) = -1,2253 - (-0,0121 t)$$

$$r^2 = 0,8214$$

- Temperatura de congelación de -14 °C

$$\ln(UI) = -1,165 - (-0,0097 t)$$

$$r^2 = 0,8272$$

Al utilizar la ecuación 1.19 se tiene:

- Temperatura ambiental promedio de 15,5 °C

$$t = \frac{\ln(UI_o) - \ln(UI_f)}{k}$$

$$t = \frac{(-1,366) - (-2,060)}{0,0169 \text{ día}^{-1}}$$

$$t = 41,0 \text{ día}$$

- Temperatura de refrigeración de 3 °C

$$t = \frac{\ln(UI_o) - \ln(UI_f)}{k}$$

$$t = \frac{(-1,284) - (-1,977)}{0,0121 \text{ día}^{-1}}$$

$$t = 57,3 \text{ día}$$

- Temperatura de congelación de -14 °C

$$t = \frac{\ln(UI_o) - \ln(UI_f)}{k}$$

$$t = \frac{(-1,238) - (-1,931)}{0,0097}$$

$$t = 71,5 \text{ día}$$

En la Figura AXIV.2 se tiene la gráfica del valor del logaritmo natural de la pendiente k con respecto al inverso de las temperaturas de almacenamiento expresadas en grados kelvin (288,5 °K, 276 °K y 259 °K), la línea de tendencia y el valor del coeficiente de regresión lineal r^2 .

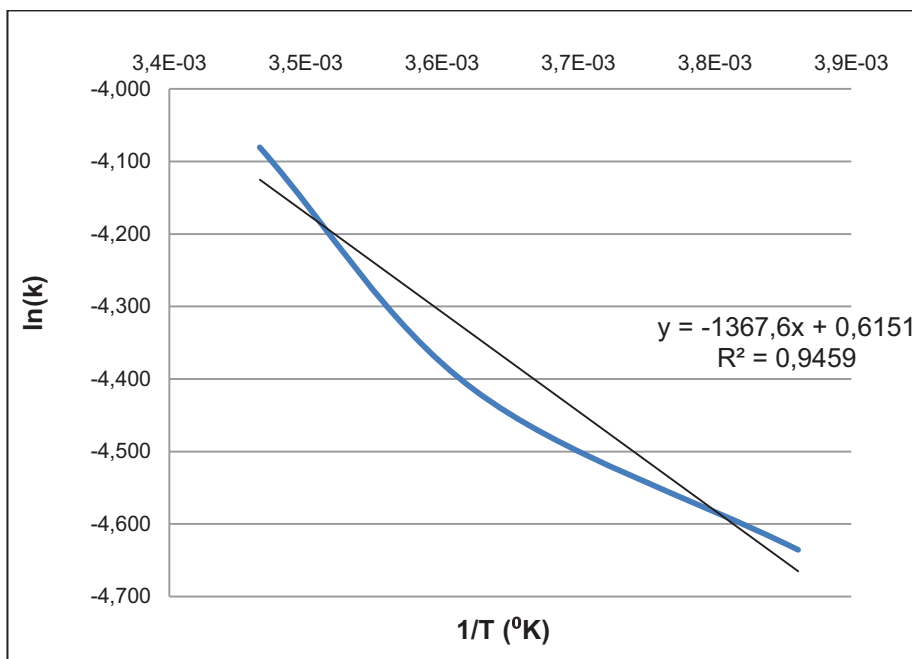


Figura AXIV. 2. Ln (k) con respecto al inverso de las temperaturas 288,5 °K, 276 °K y 259 °K

Entonces al utilizar la ecuación 1.23 se tiene:

$$\ln k = 0,6151 - \left(\frac{E_A}{(8,13(J * mol^{-1} * ^\circ K^{-1}))} * (-1367,6^\circ K^{-1}) \right)$$

El valor de la energía de activación quedaría:

$$E_A = -(-1367,6) * (8,13(J * mol^{-1} * ^\circ K^{-1})) * \frac{1 KJ}{1000 J}$$

$$E_A = 11,164 \frac{KJ}{mol}$$

En la Tabla AXIV.2 se presentan los datos del logaritmo natural de la actividad enzimática manganeso peroxidásica en función del tiempo y temperatura de almacenamiento. Con estos datos y siguiendo el modelo matemático descrito en este anexo se realizó el análisis de estabilidad para los extractos con actividad enzimática manganeso peroxidásica.

Tabla AXIV. 2. Datos de variación del ln (UI) con el tiempo de los extractos con actividad manganeso peroxidásica almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

Días	ln (UI)		
	T amb. (15,5 °C)	T ref. (3 °C)	Tcong. (-14 °C)
0	-2,939	-2,939	-2,939
2	-2,972	-2,932	-2,921
4	-2,955	-2,742	-2,902
6	-2,795	-2,675	-2,611
8	-2,879	-2,893	-2,693
10	-2,980	-2,863	-2,843
12	-2,986	-2,787	-2,721
14	-3,039	-3,024	-2,906
16	-2,932	-2,892	-2,722
18	-3,280	-3,144	-2,916
20	-3,251	-3,008	-2,927
22	-3,176	-3,271	-2,860
24	-3,457	-3,082	-3,000
26	-3,262	-3,219	-3,086
28	-3,302	-3,189	-3,018
30	-3,738	-3,428	-3,169

ANEXO XV

RESULTADO DEL ANÁLISIS DEL ASERRÍN



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 0048-2012

Cliente: PROYECTO TITULACIÓN, Carla Molina

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

No. muestra	Muestra	Servicio/Analito /En todas las muestras)	Laboratorio
1	Aserrín original	Humedad para análisis; solubilidad alcohol- benceno; celulosa lignina	Pulpa y papel
1	Aserrín fermentado 1 ^{ra} cosecha		
1	Aserrín fermentado 2 ^{ra} cosecha		
1	Aserrín fermentado 3 ^{ra} cosecha		

RESULTADOS

Muestra	Humedad(%)	Solubilidad alcohol- benceno (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)
Aserrín original	6,53	3,02	57,85	24,46
Aserrín fermentado 1 ^{ra} cosecha	7,88	5,04	56,56	23,47
Aserrín fermentado 2 ^{ra} cosecha	8,50	4,74	54,09	22,34
Aserrín fermentado 3 ^{ra} cosecha	4,76	4,03	50,20	20,78

COMENTARIOS:

PROFESIONAL RESPONSABLE
 DEL ANÁLISIS O TRABAJO

Ing. Oswaldo Acuña G