

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA (Lac),
LIGNINA PEROXIDASA (LiP) Y MANGANESO PEROXIDASA (MnP) DE
“*Pleurotus ostreatus*” CULTIVADO EN RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE
RAQUIS DE PALMA DE ACEITE, BAGAZO DE FIQUE Y PULPA DE CAFÉ

RAQUEL GABRIELA CÓRDOBA BOLAÑOS
GERMÁN RICARDO CULTID CHAMORRO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2015

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA (Lac),
LIGNINA PEROXIDASA (LiP) Y MANGANESO PEROXIDASA (MnP) DE
“*Pleurotus ostreatus*” CULTIVADO EN RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE
RAQUIS DE PALMA DE ACEITE, BAGAZO DE FIQUE Y PULPA DE CAFÉ

RAQUEL GABRIELA CÓRDOBA BOLAÑOS
GERMÁN RICARDO CULTID CHAMORRO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

DIRECTORA

OLGA LUCÍA BENAVIDES CALVACHE
M. Sc. Ciencias Agrarias

CODIRECTOR

JESÚS ADRIANO ROMO RAMOS
M. Sc. Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2015

Las ideas y conclusiones aportadas en el presenta trabajo de grado son de responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1º del acuerdo No.324 del 11 de octubre de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Olga Lucía Benavides Calvache
Directora

Jesús Adriano Romo Ramos
Codirector

Jesús Cabrera Moncayo
Jurado

Juan David Giraldo
Jurado

San Juan de Pasto, Enero de 2015

DEDICATORIA.

*A Dios quien nunca coloca sobre nuestros hombros más peso del que podemos soportar,
a mis padres por su apoyo incondicional y por su comprensión, a mi hermano por su
cariño y a mi compañero de tesis y compañero de vida porque sin él no hubiera sido
posible la materialización de este sueño.*

Raquel Córdoba

*A Dios por brindarme la oportunidad de culminar esta etapa tan importante de mi vida,
quien ilumina cada paso que doy, a mi madre por su valioso ejemplo de lucha y amor, a
mis hermanos por su constante apoyo, y a Raquelita por permitirme entrar en su vida y
en su corazón.*

Germán Cultid

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. Objetivos	17
1.1. Objetivo general	17
1.2. Objetivos específicos	17
2. Marco referencial	18
2.1. Antecedentes	18
2.2. Marco teórico	23
2.2.1. Hongos de pudrición de la madera	24
2.2.1.1. Hongos de pudrición blanda	24
2.2.1.2. Hongos de pudrición oscura	24
2.2.1.3. Hongos de pudrición blanca	25
2.2.2. Descripción del género <i>Pleurotus</i>	26
2.2.3. Características morfológicas de <i>P.ostreatus</i>	27
2.2.4. Taxonomía y características de <i>P.ostreatus</i>	28
2.2.5. Cultivo del hongo <i>P.ostreatus</i>	30
2.2.5.1. Preparación de la semilla	30
2.2.5.2. Preparación del sustrato	30
2.2.5.3. Etapas del cultivo	31
2.2.6. Factores que afectan el crecimiento de <i>Pleurotus</i>	31
2.2.7. Requerimientos nutricionales	33
2.2.8. Composición química de residuos lignocelulósicos	33
2.2.8.1. Celulosa	33
2.2.8.2. Hemicelulosa	34
2.2.8.3. Lignina	36
2.2.9. Actividad enzimática	39
2.2.10. Sistema enzimático implicado en la degradación de la lignina	39
2.2.10.1. Enzimas lacasas (Lac)	40
2.2.10.2. Lignina peroxidasa (LiP)	47
2.2.10.2.1. Oxidación del alcohol veratrílico	48
2.2.10.2.2. Oxidación de compuestos modelo	50
2.2.10.3. Manganese peroxidasa	53
2.2.10.3.1. Quelantes Mn^{3+}	55
2.2.10.3.2. Oxidación de sustratos fenólicos	56
2.2.10.3.3. Oxidación de sustratos no fenólicos	57

2.2.10.3.4. Compuesto III	58
3. Metodología	60
3.1. Recolección de sustratos	60
3.2. Preparación de sustratos	61
3.3. Cultivo del hongo <i>P. ostreatus</i>	64
3.3.1. Inoculación	64
3.3.2. Incubación	65
3.3.3. Fructificación	66
3.4. Muestreo para la determinación de la actividad enzimática	67
3.5. Obtención del extracto enzimático de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP)	68
3.5.1. Medición de la actividad enzimática lacasa (Lac)	69
3.5.2. Medición de la actividad enzimática lignina peroxidasa (LiP)	70
3.5.3. Medición de la actividad enzimática manganeso peroxidasa (MnP)	71
3.6. Inducción segunda cosecha	72
4. Diseño experimental	73
5. Análisis de resultados	74
5.1. Sustratos empleados para el cultivo del hongo <i>P. ostreatus</i>	74
5.2. Determinación de máximos de absorción	75
5.3. Medición de la actividad enzimática lacasa (Lac)	77
5.3.1. Análisis estadístico para la actividad lacasa (Lac)	83
5.4. Medición de la actividad enzimática lignina peroxidasa (LiP)	86
5.4.1. Análisis estadístico para la actividad lignina peroxidasa (LiP)	91
5.5. Medición de la actividad enzimática manganeso peroxidasa (MnP)	95
5.5.1 Análisis estadístico para la actividad manganeso peroxidasa (MnP)	99
5.6. Características macroscópicas y microscópicas de <i>P. ostreatus</i>	105
5.7. Microorganismos contaminantes del sustrato de fique	106
5.7.1. <i>Penicillium spp</i>	106
5.7.2. <i>Trichoderma spp</i>	108
5.8. Inducción segunda cosecha	109
CONCLUSIONES	111
RECOMENDACIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXOS	127

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Codificación de los sustratos	61
Tabla 2. Dosificación de tratamientos para la producción de <i>P. ostreatus</i>	63
Tabla 3. Condiciones de desarrollo para el cultivo del hongo <i>P. ostreatus</i>	68
Tabla 4. Composición química de celulosa y lignina en los sustratos empleados para el cultivo del hongo <i>P.ostreatus</i>	74
Tabla 5. Valores de la actividad enzimática lacasa (U/L)	78
Tabla 6. Desarrollo de micelio y fructificación en el cultivo del hongo <i>P.ostreatus</i>	81
Tabla 7. Pruebas de efectos intra-sujetos	83
Tabla 8. Comparaciones múltiples DHS de Tukey	84
Tabla 9. Subconjuntos homogéneos	85
Tabla 10. Tipos de enzimas oxidativas producidas por hongos de pudrición blanca	88
Tabla 11. Valores de la actividad enzimática lignina peroxidasa (U/L)	89
Tabla 12. Aplicaciones potenciales de las enzimas y microorganismos Ligninolíticos	91
Tabla 13. Pruebas de efectos intra-sujetos	92
Tabla 14. Comparaciones múltiples DHS de Tukey	93
Tabla 15. Subconjuntos homogéneos	94
Tabla 16. Valores de la actividad enzimática manganeso peroxidasa (U/L)	96
Tabla 17. Pruebas de efectos intra-sujetos. Resultados del análisis estadístico ANOVA con las correcciones de Medidas repetidas	100
Tabla 18. Comparaciones múltiples DHS de Tukey	101
Tabla 19. Subconjuntos homogéneos	102
Tabla 20. Valores de actividad enzimática (U/L) correspondientes a la inducción segundo cultivo	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i>	27
Figura 2. Partes fundamentales de <i>Pleurotus</i> . Características Morfológicas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
Figura 3. <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
Figura 4. Estructura de la celulosa	34
Figura 5. Estructura molecular de la hemicelulosa	35
Figura 6. Monómeros precursores de la molécula de lignina	37
Figura 7. Estructura de la lignina	38
Figura 8. Esquema de acción de la enzima lacasa	42
Figura 9. Reacción monoelectrónica típica de las lacasas sobre compuestos del tipo fenólicos	43
Figura 10. Estructura del ABTS	44
Figura 11. Ciclo catalítico del sistema oxidativo de la enzima lacasa	44
Figura 12. Oxidación de compuestos modelo de lignina no fenólicos tipo β -O-4 por el sistema Lacasa/mediador	44
Figura 13. Oxidación de compuestos fenólicos de lignina tipo β -1 por acción de lacasas	46
Figura 14. Ciclo catalítico de la LiP	48
Figura 15. Participación del alcohol veratrílico en la oxidación de la lignina	49
Figura 16. Efecto túnel en la degradación de la lignina por la LiP.	50
Figura 17. Mecanismo de degradación de dímeros modelo de lignina no fenólicos de tipo β -1 por la LiP: ruptura $C\alpha$ - $C\beta$	52
Figura 18. Mecanismo de degradación de dímeros modelo de lignina no fenólicos de tipo β -O-4 por la LiP	53
Figura 19. Ciclo catalítico de la MnP	55
Figura 20. Oxidación de compuestos modelo de lignina fenólicos arilglicerol tipo β -aril éter catalizada por MnP	56
Figura 21. Oxidación de compuestos modelo de lignina no fenólicos tipo β -O-4 por acción de la MnP	58
Figura 22. Municipios de recolección de Sustratos	60
Figura 23. Recolección de Sustratos	61
Figura 24. Pretratamiento de materiales lignocelulósicos	62
Figura 25. Sustratos acondicionados	63
Figura 26. Preparación de los sustratos	64
Figura 27. Inoculación de sustratos	65

Figura 28. Sustratos en proceso de invasión micelial.	65
Figura 29. Formación de primordios y setas.	66
Figura 30. Muestreo para la determinación de la actividad enzimática	67
Figura 31. Preparación del extracto enzimático	69
Figura 32. Espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 MERCK	70
Figura 33. Intensidad de color de los extractos con el complejo enzimático	75
Figura 34. Espectro UV-Visible del ABTS oxidado por acción de la lacasa	76
Figura 35. Espectro UV-Visible del 2,6-DMP oxidado por acción de la MnP	76
Figura 36. Espectros UV-Visible del alcohol veratrílico oxidado por acción de la LiP	77
Figura 37. Medición de la actividad enzimática lacasa	78
Figura 38. Oxidación del ABTS	78
Figura 39. Actividad de la enzima lacasa producida por <i>P. ostreatus</i> en los Sustratos	79
Figura 40. Contaminación en bagazo de fique	81
Figura 41. Medición de la actividad enzimática lignina peroxidasa	86
Figura 42. Mecanismo de oxidación del alcohol veratrílico por la LiP, que resulta en una variedad de productos de reacción incluyendo el aldehído veratrílico	87
Figura 43. Actividad de la enzima lignina peroxidasa producida por <i>P. ostreatus</i> en los sustratos	90
Figura 44. Medición de la actividad enzimática manganeso peroxidasa	95
Figura 45. Mecanismo propuesto para la oxidación del 2,6-DMP por la MnP	96
Figura 46. Actividad de la enzima manganeso peroxidasa producida por <i>P. ostreatus</i> en los sustratos	97
Figura 47. Macroscopía <i>P. ostreatus</i> . Cultivo de 6 días, PDA, residuo pulpa de café	105
Figura 48. Microscopía <i>P. ostreatus</i>	106
Figura 49. Colonia de <i>Penicillium spp</i>	107
Figura 50. Estructura microscópica de una colonia de <i>Penicillium spp</i>	107
Figura 51. Colonia de <i>Trichoderma spp</i>	108
Figura 52. Estructura microscópica de una colonia de <i>Trichoderma spp</i>	109
Figura 53. Actividad enzimática inducción segunda cosecha	110

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Mapa de campo cultivo de <i>P. ostreatus</i>	127
ANEXO B. Procedimiento para determinación de lignina y celulosa	127
ANEXO C. Análisis estadístico medidas repetidas Lac	128
ANEXO D. Análisis estadístico medidas repetidas LiP	129
ANEXO E. Análisis estadístico medidas repetidas MnP	130
ANEXO F. Caracterización de microorganismos (hongos) en los residuos lignocelulósicos tratados	130
ANEXO G. Curvas de actividad enzimática	132
ANEXO H. Análisis por HPLC de algunos compuestos producidos en la obtención del complejo enzimático.	135

LISTA DE ABREVIATURAS

Lac	Lacasa
MnP	Manganeso Peroxidasa
LiP	Lignina Peroxidasa
ABTS	2,2'-azinobis-(ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) Ácido 2,2'-azino bis(3-etilbencen-tiazolina-6-sulfónico)
2,6-DMP	2,6-Dimetoxifenol
AV	Alcohol veratrílico
<i>P.ostreatus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
ξ	Coeficiente de absortividad molar
U/L	Unidades de actividad enzimática por litro de extracto
PDA	Papa-dextrosa-agar
HL	Hongos ligninolíticos
HMS	Hongos microscópicos de suelo
HPA	Hidrocarburos policíclicos aromáticos

RESUMEN.

La gran cantidad de residuos lignocelulósicos generados por las actividades agrícolas en Nariño ocasiona un problema ambiental, la necesidad de buscar alternativas para el aprovechamiento de estos materiales, los cuales presentan un alto valor agregado, ha conllevado al cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre estos residuos para la producción de enzimas extracelulares tales como lacasa (Lac) (EC 1.10.3.2), lignina peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.7). El aprovechamiento de los residuos de la industria nariñense generaría una nueva fuente de ingresos y aportaría soluciones a problemas alimenticios y medicinales.

En el presente trabajo se determinó espectrofotométricamente la actividad enzimática de las enzimas Lac, LiP y MnP en siete sustratos de crecimiento para el hongo comestible y medicinal *P. ostreatus*. Los sustratos fueron elaborados a partir de residuos lignocelulósicos provenientes de cultivos agrícolas de importancia económica en el departamento de Nariño (Colombia): pulpa de café, bagazo de fique, raquis de palma de aceite y granza de avena. Dado que los residuos de cereales presentan la mejor eficiencia biológica para el cultivo de *P. ostreatus*, en esta investigación se empleó granza de avena como patrón de producción, y además se usó en el enriquecimiento en 30% de cada residuo lignocelulósico. Adicionalmente se usaron los residuos lignocelulósicos sin enriquecimiento con granza de avena.

Para determinar la actividad enzimática se empleó el método del ABTS para la Lac, el método del alcohol veratrílico para la LiP y el método del 2,6 DMP para la MnP. Se compararon las actividades enzimáticas para seis tiempos de producción del hongo *P. ostreatus* (7, 14, 24, 32, 39 y 46 días). De estos materiales lignocelulósicos, el bagazo de fique en el día 24 presentó la mayor actividad lacasa con un valor de 290,123 U/L, seguido del sustrato bagazo de fique con granza de avena con un valor de 269,474 U/L en un tiempo de 7 días, los máximos valores de actividad lacasa se obtuvieron en la etapa de desarrollo del micelio y los valores de actividad más bajos en la etapa de fructificación. Para la enzima MnP se encontró su mayor actividad enzimática en el periodo de fructificación para los sustratos pulpa de café y pulpa de café con granza de avena con valores correspondientes a 47,711 U/L y 14,318 U/L, respectivamente. La actividad LiP medida durante los seis días de muestreo presentó valores con tendencia a cero, se alcanzó una máxima actividad para LiP el día 46 con un valor correspondiente a 1,053 U/L en el sustrato bagazo de fique, siendo este sustrato el que mejor se comportó durante todas las mediciones. Por otra parte el sustrato raquis de palma de aceite fue el que presentó valores más bajos de LiP.

ABSTRACT.

The quantity of waste lignocellulosic generated by agricultural activities in Nariño causes an environmental problem, the need to find alternatives to the use of these materials, which have a high added value, has led to the cultivation of *Pleurotus ostreatus* on these residues to production of extracellular enzymes such as laccase (Lac) (EC 1.10.3.2), lignin peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14) and manganese peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.7). The use of waste from nariñense industry would generate a new entrance source and it would bring food and medicinal solutions to problems.

In this study the enzymatic activity of laccase enzymes, lignin peroxidase and manganese peroxidase in seven growth substrates for edible and medicinal mushroom *P. ostreatus* was spectrophotometrically determined. The substrates were prepared from wastes lignocellulosic from agricultural crops of economic importance in the department of Nariño (Colombia): coffee pulp, bagasse sisal, rachis oil palm and oat chaff. Because residues of cereals have the best biological efficiency for growing *P. ostreatus*, this research oat husk was used as production pattern, and further enrichment was used in 30% of each lignocellulosic residue. Additionally lignocellulosic residues were used without enrichment with oat chaff.

To determine the enzymatic activity, the ABTS method for Lac was used, the method of veratryl alcohol for LiP and 2,6 DMP method for MnP. They were compared the enzymatic activities to six times of the fungus production *P. ostreatus* (7, 14, 24, 32, 39 and 46 days). Of these lignocellulosic materials, bagasse sisal on day 24 showed the highest laccase activity with a value of 290.123 U/L, followed sisal bagasse substrate with oat pellets with a value of 269.474 U/L in a time of 7 days, the maximum laccase activity values were obtained in the stage of development of the mycelium and the values of lower activity in the fruiting stage. For most MnP enzyme activity in the fruiting period for substrates coffee pulp and coffee pulp pellets of oatmeal with values corresponding to 47.711 U/L and 14.318 U/L, respectively, were found. LiP activity measured during the six days of sampling showed values tending to zero, maximum LiP activity was reached at day 46 with a value corresponding to 1,053 U/L sisal bagasse substrate, the substrate being the best it behaved for all measurements. Moreover, the rachis oil palm substrate was presented LiP lowest values.

INTRODUCCIÓN.

El departamento de Nariño se caracteriza por tener una amplia producción agrícola, destacándose los cultivos de fique, palma de aceite y café, los cuales son predominantes dentro de la economía regional.

En el campo de la agricultura se producen grandes cantidades de residuos vegetales y agroindustriales los cuales son generados y acumulados anualmente en la naturaleza en forma sólida, ocasionando serios problemas de contaminación ambiental y su desaprovechamiento como fuentes potenciales de alto valor agregado (Molwitz, *et al.*, 1996). Estos materiales se componen básicamente por celulosa, hemicelulosa y lignina y son conocidos por ser excelentes sustratos para la producción de enzimas ligninolíticas tales como lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa (Pandey, *et al.*, 1999). Estas enzimas extracelulares son generadas a partir del metabolismo de hongos filamentosos, los cuales tienen la capacidad de producirlas (Tien, *et al.*, 1984).

Dichos residuos se pueden utilizar como sustratos para el cultivo de hongos filamentosos (Pandey, *et al.*, 1999). Los hongos tanto por su capacidad hidrolítica como por su distribución, son los organismos lignocelulolíticos por excelencia. Entre ellos existen algunos con mayor capacidad degradativa de lignina, los que producen la llamada “pudrición blanca” que podrían utilizarse en el proceso de bioconversión. Esta categoría definida por el tipo de pudrición que causan en la madera contiene cientos de especies de basidiomicetes, todos son capaces de degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa, pero la velocidad y extensión de la degradación de cada componente de la pared celular varía considerablemente (Carlile, *et al.*, 2001).

El hongo *P. ostreatus* pertenece al grupo de hongos denominados de podredumbre blanca, es degradador de materia orgánica y se alimenta principalmente de lignina y celulosa (Domínguez, D., 2006) Los hongos como *P. ostreatus* poseen varios sistemas de enzimas lignocelulósicas esencialmente fenol-oxidasas, las cuales son responsables de la conversión de los polifenoles y permiten degradar grandes polímeros, incluyendo la lignina.

La lignina es un biopolímero hidrofóbico con varias unidades de fenil-propanol entrelazadas que constituyen una macromolécula amorfa e insoluble que mantiene fuertemente unida la pared celular (López, *et al.*, 2001). Varios estudios han puesto en evidencia que químicamente la degradación de la lignina implica una serie de cambios

oxidativos, que conducen a una progresiva despolimerización y liberación de compuestos de bajo peso molecular hasta dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) (Vares, *et al.*, 1997). El proceso de degradación de la lignina ocurre durante el metabolismo secundario, cuando hay limitación de nutrientes, durante este metabolismo se producen, además de enzimas, metabolitos con potencial terapéutico (policétidos, ácidos grasos, polifenoles, flavonoides y terpenoides) (Suárez, *et al.*, 2013).

Diversas investigaciones sobre producción de enzimas ligninolíticas han demostrado que existen varias aplicaciones a nivel industrial relacionadas con procesos de deslignificación, desinfección de suelos y efluentes industriales, las cuales pueden servir para eliminar diversos contaminantes difíciles de degradar, como los hidrocarburos del petróleo, plaguicidas, colorantes sintéticos que se utilizan en la industria textil y otros compuestos que son tóxicos para la flora y la fauna (Usnayo, P., 2007).

La necesidad de mitigar la contaminación de los recursos naturales, generada por los residuos lignocelulósicos producidos por las actividades agrícolas en Nariño, permitió que el presente estudio se centrara en determinar las actividades enzimáticas de lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa en siete sustratos de crecimiento del hongo “*Pleurotus ostreatus*” tales como: pulpa de café, bagazo de fique y raquis de palma de aceite, enriquecidos y no enriquecidos con granza de avena, con lo cual se estaría dando un posible uso para estos residuos.

1. OBJETIVOS.

1.2. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar y comparar la actividad enzimática de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) en sustratos de crecimiento del hongo *P. ostreatus*: pulpa de café, raquis de palma de aceite, bagazo de fique, enriquecidos y no enriquecidos con granza de avena.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

→Obtener el extracto enzimático de cada sustrato de crecimiento y realizar el correspondiente seguimiento mediante el método de oxidación ABTS para lacasa, el método de oxidación de alcohol veratrílico para LiP y para MnP el método de oxidación del compuesto 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP).

→Determinar la actividad enzimática de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) a diferentes tiempos de producción del hongo *P. ostreatus*, mediante técnica espectrofotométrica.

2. MARCO REFERENCIAL.

2.1. ANTECEDENTES.

Los hongos de podredumbre blanca de la madera tienen la capacidad de producir un complejo enzimático con actividad oxidativa contra una amplia variedad de sustancias tóxicas recalcitrantes como plaguicidas, tintes, hidrocarburos poliaromáticos, explosivos, entre otras, que contaminan suelos y cuerpos de agua. Su propagación sobre suelos contaminados, la producción de enzimas ligninolíticas y la biodegradación de contaminantes, se favorece cuando estos hongos se inoculan en el suelo mezclados con materiales lignocelulósicos que les suministran la fuente de carbono necesaria para sostener su crecimiento e inducir la producción del complejo enzimático (Quintero, *et al.*, 2006). *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus spp.* son los hongos que se han identificado con mayores potencialidades para ser empleados con estos fines (Rodríguez, *et al.*, 2003).

El *P. ostreatus*, es un potente biodegradador. Este hongo es capaz de metabolizar compuestos muy tóxicos en otros más simples y atacar un amplio rango de compuestos orgánicos mediante una enzima peroxidasa llamada lacasa, además es capaz de oxidar un sorprendente grupo de compuestos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA). El *P. ostreatus* es bastante eficiente en la degradación de fenantreno y fluoreno y es menos eficiente con el fluorantreno. Vyas, *et al.*, (1995), mostraron la habilidad del hongo para degradar antraceno. Según Bossert, *et al.*, (1984), *P. ostreatus* tiene la capacidad de mineralizar a dióxido de carbono (CO₂), 7% de catecol, 3% de fenantreno, 0,4% de pireno y 0,19% de benzopireno en 11 días de incubación. También mineraliza 0,6% de antraceno pero requiere de 35 días y 0,19% de fluoreno en 15 días. La biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos de 2 y 3 anillos ha sido demostrada extensivamente, mientras que la de hidrocarburos policíclicos aromáticos de 4, 5 y 6 anillos es menos significativa.

La enzima lacasa se encuentra ampliamente distribuida en plantas y hongos degradadores de la lignina. Bajas concentraciones de lacasa se producen en la madera y en cultivos de hongos sumergidos, mientras que altas concentraciones son inducidas por la adición de compuestos aromáticos. La fermentación del hongo *P. ostreatus* puede llevarse a cabo por medio de dos métodos, cultivo en fase sumergida y cultivo en estado sólido. El cultivo en medio sólido presenta algunos problemas como: un tiempo relativamente largo hasta la producción del inóculo secundario (32-34 días),

contaminación frecuente por la manipulación del sustrato (López, *et al.*, 1996), inseguridad en la disponibilidad del sustrato a lo largo del año y dificultades en el control del proceso (Hadar, *et al.*, 1986).

Una alternativa para evitar los problemas antes mencionados es la obtención del inóculo en cultivo líquido, ya que permite producir mayor cantidad de biomasa de mejor calidad en menos tiempo, favorece la dispersión y adaptación del hongo y facilita su manipulación durante la siembra en el sustrato final. Esto a su vez, disminuye el tiempo de fructificación y mantiene su capacidad productiva, además de ciertas propiedades genéticas, fisiológicas y morfológicas de la cepa (Raaska, L., 1990). Algunas cepas de *Pleurotus*, uno de los cinco hongos comestibles más importantes en el mundo, han sido cultivadas en líquido de una manera más rápida y controlada que en medio sólido (Hadar, *et al.*, 1991). El cultivo de *P. ostreatus* en sistema sumergido ha sido utilizado en la degradación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Bezalel, *et al.*, 1996) aunque, poco se conoce de su características de crecimiento bajo estas condiciones.

El cultivo sumergido de los hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus* permite producir al mismo tiempo enzimas ligninolíticas importantes. Este tipo de organismos degradan lignina más extensa y rápidamente que otros grupos de organismos conocidos (Cullen, *et al.*, 1996). El *P. ostreatus* es capaz de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos (Bezalel, *et al.*, 1997) y colorantes artificiales causantes de contaminación ambiental en industrias textiles (Vyas, *et al.*, 1995), entre otros. Esta actividad parece estar relacionada a la producción de enzimas como la manganeso peroxidasa, enzimas que utilizan peróxido y la lacasa, que es una polifenol oxidasa capaz de oxidar polifenoles, fenoles sustituidos y diaminas (Bezalel, *et al.*, 1996).

La producción de lacasa en los *Pleurotus*, está directamente relacionada con la cantidad de biomasa producida (Das, *et al.*, 1997). En contraste con otros hongos ligninolíticos en los que la actividad ligninolítica se expresa e incrementa en concentraciones limitantes de nutrientes en el cultivo (por ejemplo las actividades lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa del *Phanerochaete chrysosporium*), en el *Pleurotus* la lacasa no es regulada por condiciones limitantes de nutrientes, pues cantidades suficientes o en exceso de estos estimulan esta actividad y la producción de biomasa (Kerem, *et al.*, 1992).

Se han encontrado pocas referencias con lo relacionado a la producción de enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus* sobre los sustratos empleados en este estudio, sin embargo en investigaciones previas se ha evaluado la capacidad de transformación de residuos lignocelulósicos sobre otro tipo de sustratos, por ejemplo se ha investigado el potencial que tiene la cáscara de plátano (verde y madura) variedad Dominico-Hartón como sustrato para la producción de la enzima extracelular lacasa utilizando el hongo *P. ostreatus*, este hongo se cultivó en diferentes mezclas: Cáscaras de plátano verde (PV), cáscaras de plátano maduro (PM), cáscaras de plátano verde-bagazo de caña (50/50) (PVB), cáscaras de plátano maduro-bagazo de caña (50/50) (PMB). La determinación de la enzima lacasa se llevó a cabo por la oxidación ABTS donde se encontró un máximo de actividad lacasa el día 24; con excepción del tratamiento con PM que lo alcanzó en el día 34. El sustrato PMB tuvo la mayor producción de lacasa con una concentración de 19.4 U/L (Manjarrés, *et al.*, 2010).

En otro estudio, se emplearon “raquis” (residuos ricos en lignina y hemicelulosa producidos durante el proceso de extracción del aceite de palma) para el crecimiento del hongo *P. ostreatus* en fase sólida durante 10 días de fermentación y a una temperatura de 28°C. Este trabajo se enfocó en evaluar la actividad enzimática de la lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa a partir del cultivo de *P. ostreatus*, modificando las condiciones de tamaño de partícula del sustrato (2, 3 y 4 cm) y la fuente de nitrógeno, cloruro de amonio y nitrato de potasio (NH_4Cl y KNO_3). La actividad de la lignina peroxidasa fue casi nula en el sustrato sin suplemento. Por otro lado, las mejores condiciones encontradas para la producción de lacasa (7,42 U/L) fue en cultivo sin suplemento con tamaño de partícula de 3cm, y para manganeso peroxidasa (20,29 U/L) fue en el cultivo suplementado con nitrato de amonio (NH_4NO_3) en una relación de carbono/nitrógeno (C/N) de 20 y un tamaño de partícula de 3cm (Gil, L., 2012).

Por otro lado, se evaluó el efecto de los bifenilospoliclorados (BPC) sobre la actividad enzimática de *P. ostreatus* en cultivo líquido. Las actividades manganeso peroxidasa (MnP), lacasa (Lac) y versátil peroxidasa (VP) fueron cuantificadas por espectrofotometría. VP fue inducida 27 veces a los 12 días de cultivo, Lac 11.4 veces, y aunque MnP no registró inducción la actividad aumentó al adicionar sulfato de cobre (CuSO_4) (250 mg/l), bagazo de caña (2.5 g/l) y Tween 80 (3,500 mg/l); también la actividad VP fue mejorada con la adición de Tween 80 (13 mg/l) a pH 4, mientras que Lac fue mayor a pH 6 y 100 rpm (Gayosso, *et al.*, 2004).

En un estudio realizado en Tepletita, Tlaxcala, México, se evaluó el efecto del pH de desarrollo del hongo *P. ostreatus* sobre su actividad lacasa. Los valores de pH evaluados fueron 3.5, 4.5, 6.5 y 8.5, se utilizó un medio de cultivo líquido previamente empleado para producir lacasas que contenía glucosa como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno, sulfato de cobre (CuSO_4) como inductor de lacasas y otras sales minerales. Las fermentaciones fueron caracterizadas parcialmente, reportando los parámetros cinéticos de desarrollo del hongo y de producción de lacasa.

La actividad lacasa se determinó usando 2,6-dimetoxifenol como sustrato. Se observó que los valores máximos de velocidad específica de crecimiento (μ) se obtuvieron a pH 3.5 sin extracto de levadura y a pH 4.5 con valores de 0.037 y 0.034 h^{-1} respectivamente. Por otro lado, los valores máximos de biomasa se observaron a pH de 6.5 y 8.5 con valores de 6.7 g/L y 8.3 g/L respectivamente. La máxima actividad de lacasas observada fue cuando el hongo se desarrolló a pH de 6.5 alcanzando 36500 U/L a las 432 h de fermentación evaluada al mismo pH. Sin embargo, en las fermentaciones a pH inicial de 4.5 y 8.5 se obtuvieron valores de actividad de 33500 U/L y 21000 U/L respectivamente; por su parte la fermentación de pH 3.5 con extracto de levadura mostró una actividad máxima de lacasa de 4030 U/L, en la fermentación de 3.5 sin extracto de levadura se observaron valores máximos de actividad de 462 U/L.

Se observó que el pH de desarrollo del hongo es un factor que modifica el patrón de producción de las lacasas, además de que algunas enzimas producidas a un pH dado presentaron actividad en pH diferente, se obtuvieron valores de actividad y mayor número de isoenzimas en pH de producción diferentes al pH óptimo de desarrollo del hongo (Díaz, R., 2009).

En otra investigación, se analizó la producción de biomasa y enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus* en medio sintético con extracto de levadura a diferentes concentraciones de glucosa (0,5-20 g/l), diferentes pH (3,5-6,5) y temperaturas de incubación (23-32°C), se obtuvieron aproximadamente 307 U/L de enzima lacasa y 0,41 U/L de manganeso peroxidasa en medio líquido extracelular y 0,015 U/g de lacasa y 0,809 U/g de manganeso peroxidasa en sustrato sólido. No se detectó actividad de la enzima lignina peroxidasa en ninguna de las dos condiciones (Guillén, *et al.*, 1998).

En el grupo de Investigación de Genética y Microbiología (GIGM) de la Universidad Pública de Navarra se ha trabajado en múltiples facetas del hongo

comestible *P. ostreatus*. Facetas que van desde la anotación del genoma y la mejora de cepas industriales hasta las posibles aplicaciones biotecnológicas de este hongo.

Una de estas aplicaciones podría ser el pretratamiento del material lignocelulósico que se emplea para la producción del bioetanol, en base a la capacidad enzimática del hongo para descomponer esta materia. Los biocombustibles de segunda generación, que se producen a partir de restos de origen vegetal, necesitan en su proceso un pretratamiento de la materia prima. Hacia el año 2010 este pretratamiento se realizaba con ácidos y a presiones y temperaturas elevadas, lo que daba lugar a productos secundarios contaminantes y a un gasto energético muy alto. En caso de que este procedimiento lo pudieran realizar, al menos parcialmente, hongos que produzcan enzimas tales como la manganoso peroxidasa, lignina peroxidasa, lacasa o la peroxidasa versátil, se reducirían costes y contaminación (Redin, A., 2010).

La lacasa o fenol-oxidasa, es una enzima muy importante en la degradación de la lignocelulosa y también en la industria papelera, alimentaria. Por esto tiene una gran importancia económica, y se han llevado a cabo diversos estudios para conocer su valor de actividad en cultivos de *P. ostreatus*, y posibles métodos de inducción (Redin, A., 2010).

La necesidad de buscar alternativas al petróleo, para suplir la demanda energética mundial, ha incentivado la producción de azúcares y etanol a partir de biomasa lignocelulósica. En este proceso juegan un papel muy importante las enzimas con alto poder deslignificante para facilitar la etapa de hidrólisis y obtención de azúcares. Por ello en un estudio realizado en el 2012, se evaluó la obtención de un complejo enzimático lignocelulolítico mediante el cultivo sumergido de *P. ostreatus* y *Panicum maximum* como sustrato de crecimiento, y el efecto sobre su degradación. Se analizó a nivel matraz el efecto de inductores metálicos, concentración de sustrato y tiempo sobre la actividad lacasa. Los valores que maximizaron esta actividad fueron: cobre (Cu) 6,0 mM, manganeso (Mn) $3,50 \times 10^{-08}$ mM, cadmio (Cd) 2,3 mM, gramínea 5,2% p/v y tiempo 9,6 días. Bajo estas condiciones, en biorreactor se alcanzó una actividad lacasa de 3819,2 U/L y una productividad volumétrica de 31,8 U/L/h, superiores 2,5 y 4,7 veces respectivamente, con relación a las obtenidas en matraz. Finalmente, se evaluó el efecto del complejo enzimático sobre la degradación de *P. maximum*, y se obtuvo un grado de deslignificación de 25,5% y de celulosa y hemicelulosa hidrolizada de 4,9% y 1,1% respectivamente. El extracto obtenido presentó alta actividad lacasa y capacidad de degradación parcial de lignina, por lo tanto, tiene aplicación no sólo en procesos de

obtención de azúcares, sino en la industria textil, en la oxidación de compuestos fenólicos, en biorremediación y en procesos de deslignificación en general (Rangel, S., 2012).

La adición de cobre (Cu) (0,5 – 5 mM) o de cadmio (Cd) (1 – 5 mM) a un cultivo de *P. ostreatus* en medio líquido con nitrógeno (N) limitado a los 12 días de incubación, incrementó la actividad de la enzima lacasa. Se ha observado que la adición de 2 mM de cadmio (Cd), aumenta la actividad enzimática en 18,5 veces. La adición de 1 mM de cobre (Cu), aumenta la actividad enzimática en 8 veces. Cuando se adiciona el cobre (Cu) o el cadmio (Cd) antes de los 12 días, la actividad enzimática disminuye. Plata (Ag), mercurio (Hg), plomo (Pb), zinc (Zn) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), disminuyen la actividad de la lacasa y reducen la estabilidad de la enzima, mientras que la adición de cobre (Cu) (0,5–5 mM), incrementa ambas, la actividad y la estabilidad de la lacasa (Petr, *et al.*, 2002).

Por otro lado, se han realizado diversos ensayos de medios de cultivo para aumentar la producción de lacasa, en los cuales se dan cuenta que ésta mejora limitando en Nitrógeno (N) y agitando el medio; usando celobiosa y peptona como fuente de carbono (C) y nitrógeno (N), la actividad enzimática aumenta. El ABTS, induce la producción de lacasa (Hou, *et al.*, 2004).

2.2. MARCO TEÓRICO.

Uno de los grandes retos de la humanidad en la actualidad es el de convertir los procesos productivos en procesos limpios y eficientes energéticamente. Por otro lado, se requiere tener la capacidad tecnológica para restaurar los sitios dañados ambientalmente. La biotecnología tiene un papel importante que desempeñar en esta transformación tecnológica. La investigación deberá estar enfocada en la utilización de nuevas herramientas biotecnológicas para la prevención, control y remediación de las contaminaciones ambientales. Por tanto se pretende analizar la posibilidad de usar sistemas enzimáticos para la transformación de contaminantes que conlleve a una reducción, o eliminación, de su impacto ambiental. Los microorganismos responsables del reciclaje del carbón proveniente de la lignina, o degradadores de lignina, presentan una batería de enzimas poco específicas con un uso potencial en la transformación de compuestos contaminantes y xenobióticos (Dávila, *et al.*, 2001).

2.2.1. HONGOS DE PUDRICIÓN DE LA MADERA.

Los hongos presentan gran variedad de formas de vida, entre las que se encuentran los de pudrición, que se dividen dependiendo de los cambios químicos y estructurales que ocasionan a la madera. Se han distinguido tres grupos: de pudrición blanda, de pudrición oscura y de pudrición blanca (Schwarze, *et al.*, 2000).

2.2.1.1. Hongos de pudrición blanda.

El nombre de pudrición blanda es usado por la consistencia suave de la madera después de su degradación por ascomicetos y deuteromicetos. Hay también algunos que hacen a la madera quebradiza, como es el caso de *Ustilina deusta*. Las hifas involucradas en la pudrición blanda crecen dentro de la pared celular en dirección a las microfibrillas de celulosa. La destrucción de la pared celular siempre ocurre en lugares cercanos a la hifa, lo que ocasiona la formación de cavidades sin la pared celular, la cual en una sección transversal aparece como un pequeño círculo, formando hoyos ovalados en la pared secundaria (Schwarze, *et al.*, 2000).

2.2.1.2. Hongos de pudrición oscura.

Sólo el 6% de todos los hongos de pudrición conocidos actualmente ocasionan la pudrición oscura. Esta pudrición es causada por hongos basidiomicetes principalmente, lleva este nombre porque al degradar los carbohidratos y polímeros (celulosa y hemicelulosa) presentes en la madera, ésta adquiere un color oscuro y una consistencia quebradiza.

La degradación preferencial de estos hongos por la celulosa y hemicelulosa está estrechamente asociada con la pérdida de firmeza de la madera después de un corto periodo de degradación (Schwarze, *et al.*, 2000).

Otra característica importante de estos hongos es que se asocian principalmente con coníferas, la razón de esto es probablemente debido a que estos hongos están adaptados a la estructura de la madera blanda de las coníferas, están restringidos en su habilidad de degradar lignina, por lo que se han considerado como hongos muy específicos comparados con los hongos de pudrición blanca, los cuales se pueden encontrar en una gran variedad de árboles (Schwarze, *et al.*, 2000).

2.2.1.3. Hongos de pudrición blanca.

La pudrición blanca es ocasionada principalmente por basidiomicetos y ascomicetos. El nombre de pudrición blanca se deriva de la apariencia blanquecina en la madera al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa (Schwarze, *et al.*, 2000). Estos son aerobios obligados, su nutrición es por medio de la combustión biológica de la madera y materiales asociados, usando oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones. La vía metabólica de producción de energía interna es a partir de la glucólisis en el citoplasma y ciclo de Krebs en la mitocondria que es la misma que la mayoría de los organismos aeróbicos (Kirk, *et al.*, 1998).

Las hifas invaden rápidamente las células de la madera y permanecen en la pared del lumen, secretan enzimas y metabolitos que provocan la despolimerización de la hemicelulosa, celulosa y la fragmentación de la lignina. Presentan dos patrones de descomposición, la pudrición simultánea donde la celulosa, hemicelulosa y lignina, son removidas simultáneamente y la deslignificación, en la cual la lignina es removida antes de la hemicelulosa y celulosa. Los hongos de pudrición blanca rompen la lignina por un proceso oxidativo por medio de fenol-oxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como las lacasas, manganeso peroxidasas, lignina peroxidasas, tirosinasas y peroxidasas (Schwarze, *et al.*, 2000).

Algunos hongos pueden causar pudrición simultánea en alguna parte de la madera y en otra parte se lleva a cabo la deslignificación. El factor responsable de la ocurrencia de uno u otro tipo de pudrición todavía es incierto (Kirk, *et al.*, 1998). La degradación de la lignina con respecto a otros componentes depende mucho de las condiciones ambientales (pH, temperatura, grado de humedad) y de la especie de hongo involucrado (Palmieri, *et al.*, 1997). Los hongos de pudrición blanca producen varias isoformas de oxidasas y peroxidasas, involucradas en la degradación de la lignina en su hábitat natural (Palmieri, *et al.*, 2000).

Los hongos del género *Pleurotus* son basidiomicetos de pudrición blanca, presentan un alto valor nutricional, tienen propiedades terapéuticas y variadas aplicaciones biotecnológicas, principalmente en procesos de biodegradación, ya que producen lacasas, manganeso peroxidasas y veratril alcohol oxidasas, aunque no producen lignina peroxidasas (Palmieri, *et al.*, 1997).

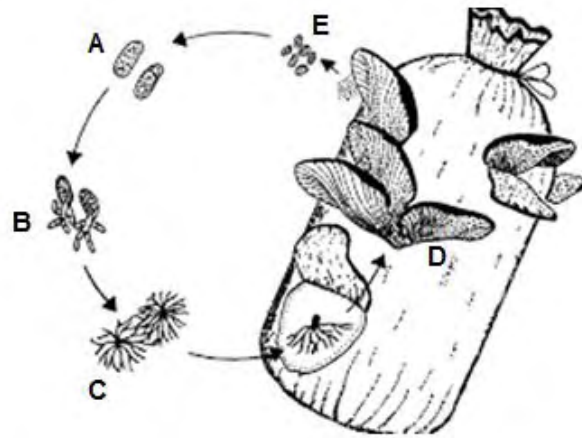
2.2.2. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Pleurotus*.

El género *Pleurotus* comprende especies generalmente de color blanco, amarillento o rosado a veces grisáceo o de color oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. Con relación al estípite puede carecer de éste o puede ser lateral o excéntrico y puede ser corto, mediano o largo. Las laminillas son longitudinalmente decurrentes sobre la base del estípite, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción del pie. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides) y son lisas.

El género es cosmopolita, está distribuido en Europa, Asia, África, Australia, Estados Unidos, Canadá y Latinoamérica. Es un hongo saprótrofo (saprófito), crece sobre troncos, ramas o árboles muertos y algunas veces se encuentra en el suelo sobre raíces podridas. La temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género es variable, *P. ostreatus* se desarrolla en climas templados, con una temperatura óptima de crecimiento de 25°C, mientras que *Pleurotus pulmonarius* se desarrolla en climas semi-tropicales (15-28°C) (Díaz, R., 2009).

En los basidiomicetes existen dos modelos sexuales: 1) En el homotalismo los hongos son autocompatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este último modelo. En la figura 1 se muestra el ciclo de vida del género *Pleurotus*. En este hongo las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) (A) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia) (B) formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de fíbulas (C), la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero (D), posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas) que son expulsadas hacia el ambiente (E) (Figura 1) (Díaz, R., 2009).

Figura 1. Ciclo de vida del género *Pleurotus*.



Fuente: Díaz, R., 2009.

En la Figura 2.A se muestran las partes fundamentales de *Pleurotus*.

2.2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *P. ostreatus*.

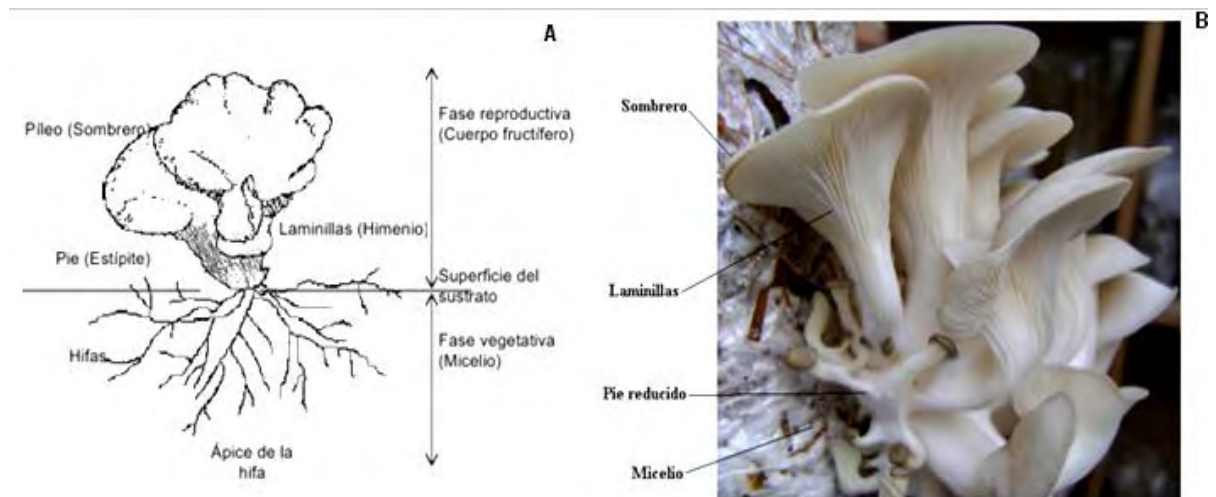
El cuerpo de las setas se constituye principalmente de: Sombrero (Pileo), pie reducido, (estípite) y Láminas (Himenio) (Figura 2.B).

Sombrero: El sombrero de esta seta (cuerpo fructífero) tiene forma de paraguas, más o menos circular, con la superficie lisa abombada y convexa su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja (Gaitán, *et al.*., 2006).

Láminas: Están dispuestas radicalmente como las varillas de un paraguas, que van desde el pie o tallo que lo sostiene, hasta el borde, son anchas, espaciadas unas de otras, de color blanco crema, en ocasiones bifurcadas, y en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie.

Pie: Es firme, blanco, algo peludo en la base, muy corto. Lateral u oblicuo, ligeramente duro, con el principio de las laminillas en la parte de arriba (Lopez, E., 2002).

Figura 2. A: Partes fundamentales de *Pleurotus*. B: Características Morfológicas de *P. ostreatus*.



Fuente: Díaz, R., 2009.

Fuente: Esta Investigación.

2.2.4. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS DE *P. ostreatus*.

P. ostreatus se lo clasifica taxonómicamente de la siguiente forma (Cardona, L., 2001):

Reino: Fungi
 Subreino: Fungi superior
 División: Basidiomycota
 Subdivisión: Basidiomycotina
 Clase: Himenomycetes
 Orden: Agaricales
 Familia: *Tricholomataceae*
 Género: *Pleurotus*
 Especie: *ostreatus*

Nombre común: Orellana

Nombre científico: *Pleurotus ostreatus*

Figura 3. *P. ostreatus*.



Fuente: Esta investigación.

Su nombre deriva del griego “pleuro”, que significa formado lateralmente en referencia a la posición del estípite respecto al píleo; y “ostreatus” en latín quiere decir en

forma de ostra y en este caso se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero. El sombrero tiene un tamaño que depende de la edad y de las condiciones más o menos favorables en que ha crecido el hongo, oscilando entre los 5 y 20 cm de diámetro, aunque pueden encontrarse ejemplares más grandes. Típicamente cuando existen las condiciones ambientales adecuadas, el hongo fructifica varias veces, la diferencia entre cada fructificación va de 7 a 10 días, cada aparición se la denomina comúnmente “oleada” (García, R., 2003).

Además de las propiedades medicinales (efectos antitumorales, antivirales, antiinflamatorios, efecto hepatoprotector, antihipertensión, antioxidante y control de colesterol) y el valor nutritivo, *Pleurotus spp.*, es un potente biodegradador y elimina toxinas; convierte los residuos orgánicos poco digeribles y no comestibles en alimentos para animales y humanos de buena calidad y palatabilidad, y se considera que su eficiencia en la producción de proteína por unidad de área y por unidad de tiempo es mayor que las fuentes de proteína animal (Cardona, L., 2001).

Estos organismos poseen un cuerpo "vegetativo" distintivo llamado micelio, conformado por un conjunto de finos filamentos denominados hifas, que constituyen el cuerpo del hongo. En un cultivo en fase sólida, el micelio se diferencia fácilmente ya que posee un color blanco.

Para los procesos de crecimiento y fructificación requiere de la combinación de factores físicos: temperatura, luz, oxígeno y dióxido de carbono, cuyos valores y concentraciones óptimas varían en función de la etapa en que se encuentran. El micelio debe tener a su disposición la fuente de carbono que constituye la base nutricional. Todos los hongos necesitan este tipo de fuente dado que están desprovistos de clorofila, y no pueden realizar la fotosíntesis. Por ese motivo pueden vivir y prosperar sobre materia orgánica muerta, esto es, extraer su fuente de carbono y demás nutrientes de, por ejemplo, el aserrín y la paja, entre otros. Cualquier residuo de la agroindustria puede ser factible de ser utilizado para este fin. La fuente de carbono está constituida por la lignina y la celulosa, que se encuentran en paja de cereales, cáscara de arroz, aserrín o viruta, entre otros (Cardona, L., 2001).

Ciclo de vida: a partir de las esporas o de hifas jóvenes se desarrolla el micelio que invade el sustrato, mientras haya disposición de sustrato y cuando se den condiciones ambientales (temperaturas inferiores a los 15–18 °C y ciclos de luz de 10–12 horas luz por día) y en la medida que se encuentren hifas compatibles se desarrolla una nueva

estructura que es la responsable de la reproducción sexual conocida como carpóforo, cuerpo fructífero o seta que es comestible para el caso particular con el que se trabaja.

2.2.5. CULTIVO DEL HONGO *P. ostreatus*.

2.2.5.1. Preparación de la semilla.

La semilla es la expansión de masa de micelio que busca potenciar metabólicamente al hongo para que se encuentre en condiciones ideales y así poder crecer eficientemente en los sustratos de producción.

Se realiza en dos etapas:

Inóculo primario, es la propagación del micelio en semillas a partir de una cepa crecida en medio de cultivo, se inocula de 25-28 °C en oscuridad hasta que el micelio cubra totalmente la semilla; 15 ó 29 días después, el inóculo primario está listo.

Inóculo secundario, es la propagación del micelio en semillas a partir del inóculo primario, es el que se usa para la siembra y fructificación de las setas. Se puede emplear en semillas de sorgo, trigo, cebada, entre otros.

2.2.5.2. Preparación del sustrato.

Lavado: Se deben realizar suficientes lavados con agua para poder eliminar azúcares que no son de interés.

Picado: Un tamaño de partícula aproximadamente de 2 a 5 cm, son los valores más citados y los que sugieren la mejor estabilidad y proporciones puesto que tiende a aumentar considerablemente la actividad enzimática, posiblemente debido a que se aumenta el área expuesta del material lignocelulósico y esto favorece el ataque enzimático (Gil, L., 2012).

Humectación: Durante 1 ó 2 días, los sustratos picados se deben humedecer mediante sistema de riego por aspersión. La humedad debe ser del 70-80%.

Pasteurización: Antes de empezar a utilizar los sustratos para el cultivo del hongo seta, es necesario someterlos a un tratamiento previo, que consiste básicamente en aplicarles calor para disminuir la flora microbiana nociva, que está presente en ellos y de esta manera evitar que los microorganismos compitan por espacio y nutrientes con el micelio de *Pleurotus*.

Siembra: La siembra es la fase más importante ya que en ésta se mezcla el micelio (o semilla) con los sustratos los cuales sirven como medio de desarrollo, el sustrato pasteurizado debe tener una temperatura de 20-25⁰C y una humedad del 70%, porque el hongo necesita para su crecimiento de ciertos espacios porosos, esto le permite que el intercambio de gases sea el óptimo para su crecimiento, tanto dióxido de carbono (CO₂) como de oxígeno (O₂), evitando así la aparición de organismos que puedan vivir sin oxígeno O₂ y que ocasionen pudrición del sustrato.

2.2.5.3. Etapas del cultivo.

Inoculación: Consiste en adicionar la semilla del hongo al sustrato ya preparado y estéril, se debe realizar en un lugar cerrado sobre un mesón previamente desinfectado para evitar que se presente contaminación en la fase del establecimiento micelial (Carvajal, G., 2010).

Incubación: En la fase de incubación se busca que el micelio invada totalmente el sustrato por medio de la optimización de las condiciones ambientales. Es necesario que la temperatura en el sitio de incubación permanezca alrededor de 20 a 28⁰C, con una humedad relativa alrededor del 70 a 80% y poca iluminación. Características que pueden variar dependiendo de la especie.

Fructificación: La fase de fructificación comienza una vez el sustrato es invadido por el micelio del hongo y se logran observar primordios o pines los cuales formarán el cuerpo fructífero. Para esta fase es necesario cambiar las condiciones del cultivo aumentando la humedad relativa y las condiciones de luminosidad para inducir la formación de los hongos.

Cosecha: Fase en la cual se realiza la recolección de los cuerpos fructíferos, utilizando una cuchilla estéril para evitar contaminaciones posteriores en los puntos del sustrato donde creció el hongo (Hernández, *et al.*, 2005).

2.2.6. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE *Pleurotus*.

Los hongos, como otros organismos, necesitan para su crecimiento condiciones específicas de temperatura, humedad, pH, luz y aireación. Para cada uno de estos factores, existe un rango delimitado por un punto mínimo y un punto máximo, bajo y sobre los cuales no habrá crecimiento. Entre los requerimientos considerados más importantes se encuentran (Pérez, B., 2006):

1. Temperatura: La mayoría de hongos son mesófilos, por lo que crecen a temperaturas entre 5 y 40°C. Generalmente el rango de temperatura óptima se encuentra entre 25 y 33°C para el crecimiento miceliar. Los hongos del género *Pleurotus* fructifican a 28°C (Pérez, B., 2006).

2. Humedad: El crecimiento máximo del micelio de la mayoría de especies de *Pleurotus* ocurre a una humedad relativa entre 60-95%, en el caso específico de *P. ostreatus* se ha observado que su humedad es mejor entre 80-85% (Pérez, B., 2006).

3. pH: Los hongos crecen en un amplio rango de pH, pero la mayoría de ellos prefieren un medio ácido para su desarrollo. El pH adecuado para el crecimiento miceliar de *Pleurotus* oscila entre 6.0-7.0 y fructifica entre 6.5-7.0 (Pérez, B., 2006).

4. Luz: Aunque se requiere luz para el crecimiento del micelio, cierta cantidad es esencial para la esporulación en muchas especies. La luz también juega un papel importante en la dispersión de las esporas, ya que las estructuras encargadas de expulsarlas en muchos hongos son fototróficas. Por otra parte, algunas especies requieren de oscuridad total para lograr el crecimiento de cuerpos fructíferos (Pérez, B., 2006).

En general, las especies de *Pleurotus* para crecimiento miceliar requieren oscuridad y para la fructificación requieren luz de longitudes de onda corta aproximadamente 150-200 lux (Pérez, B., 2006).

5. Aireación: La mayoría de los hongos son aerobios estrictos y requieren de al menos alguna moléculas de oxígeno libres en la atmósfera, es por eso que los cuerpos fructíferos generalmente crecen sobre o cerca de la superficie del sustrato (Pérez, B., 2006).

La concentración de dióxido de carbono (CO₂) es muy importante para el desarrollo de *Pleurotus*, una concentración relativamente alta de 20-25% es útil para propiciar el crecimiento del micelio. Sin embargo, concentraciones superiores al 0.6% inhiben la formación de primordios. Se debe tener una buena ventilación, una ventilación deficiente se manifiesta en deformaciones del cuerpo fructífero. Las cuales pueden ser desde un ligero alargamiento del estípite, la no formación del píleo o ambas (Pérez, B., 2006).

2.2.7. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES.

Los hongos son organismos que se desarrollan naturalmente sobre productos animales o vegetales, estos materiales extremadamente complejos proveen a los hongos de una gran cantidad de nutrientes, principalmente nitrógeno y carbono (Pérez, B., 2006).

1. Nitrógeno: El nitrógeno es requerido por los hongos para la síntesis de aminoácidos, proteínas y protoplasma, en su ausencia, no ocurre ningún crecimiento. Los hongos pueden utilizar nitrógeno inorgánico (nitratos, nitritos o amonio) y orgánico en forma de aminoácidos; sin embargo, la mayoría de ellos prefieren las formas orgánicas, por ejemplo muchos basidiomicetos degradadores de madera son incapaces de utilizar nitrato, pero crecen profusamente en fuentes orgánicas (Pérez, B., 2006).

2. Carbono: Representa casi la mitad del peso seco de un hongo, lo cual indica la importancia de los compuestos carbonados para la célula fúngica (Pérez, B., 2006).

Los hongos pueden utilizar diversos compuestos orgánicos o dióxido de carbono como fuentes de este elemento. Entre los carbohidratos, el azúcar que permite el crecimiento de la mayoría de hongos es la D-glucosa; algunos de estos organismos también son capaces de utilizar ácidos orgánicos como fuente de carbono, pero en general, los hongos crecen deficientemente o no crecen si los ácidos son la única fuente de carbono disponible (Pérez, B., 2006).

2.2.8. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS.

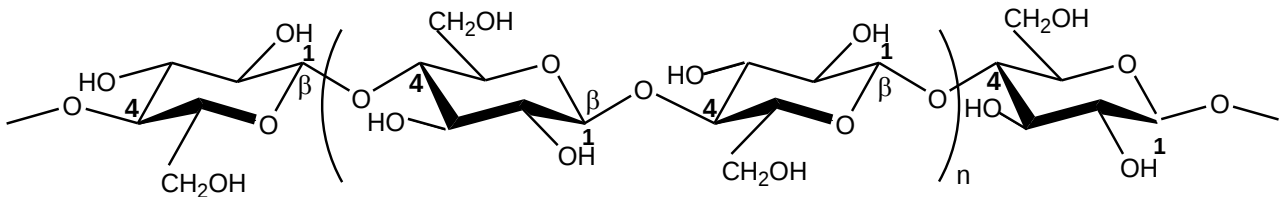
Los principales componentes de la pared celular vegetal son la celulosa y hemicelulosa enlazadas mediante lignina. Los materiales lignocelulósicos existen en la naturaleza en cantidades abundantes y no pueden degradarse por la mayoría de los organismos presentes en los ecosistemas. Entre los residuos lignocelulósicos se encuentran los desechos agrícolas, forestales y los de las industrias transformadoras de productos agrícolas (agroindustrias) (Benavides, O., 2013).

2.2.8.1. Celulosa.

La celulosa, que es el biopolímero de la D-glucosa, es el material orgánico más abundante sobre la corteza terrestre. Las plantas sintetizan la celulosa como material estructural para soportar su peso. Las moléculas largas de celulosa llamadas microfibrillas, forman haces por los puentes de hidrógeno que se crean entre los numerosos grupos $-OH$ de los anillos de glucosa. En la celulosa las unidades de D-

glucosa están unidas por enlaces glicosídicos β -1,4, disposición bastante rígida y muy estable. En la figura 4 se muestra una estructura parcial de celulosa.

Figura 4. Estructura de la celulosa.



Fuente: Rosas, *et al*, 2006.

La longitud del polímero es altamente variable y dependiente del organismo del cual la celulosa haya sido obtenida, así como de la edad y estado metabólico al momento de la extracción. Un grado de polimerización promedio de alrededor de 10000 se determinó para la celulosa de la madera (Zabel, *et al.*, 1992). Cada monómero de glucosa presenta una rotación de 180° respecto de los residuos contiguos, estabilizada por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. Las microfibrillas están conformadas por zonas cristalinas donde las moléculas de celulosa se hallan ordenadas y regiones paracristalinas donde se hallan desorganizadas. La estructura cristalina de la celulosa hace que la pared de la célula sea anisótropa y por consiguiente con doble refracción (birrefringente) cuando se mira con luz polarizada.

Se consideran dos tipos de celulosa: la nativa o cristalina, caracterizada por un alto grado de cristalinidad u ordenamiento y de polimerización, resultando así insoluble (avicel, fibras de algodón, papel de filtro, entre otros); y la celulosa modificada, la cual resulta soluble como la celulosa amorfa, carboximetilcelulosa, celooligosacáridos, en las cuales el grado de cristalinidad y el grado de polimerización es menor (Levin, L., 1998).

2.2.8.2. Hemicelulosa.

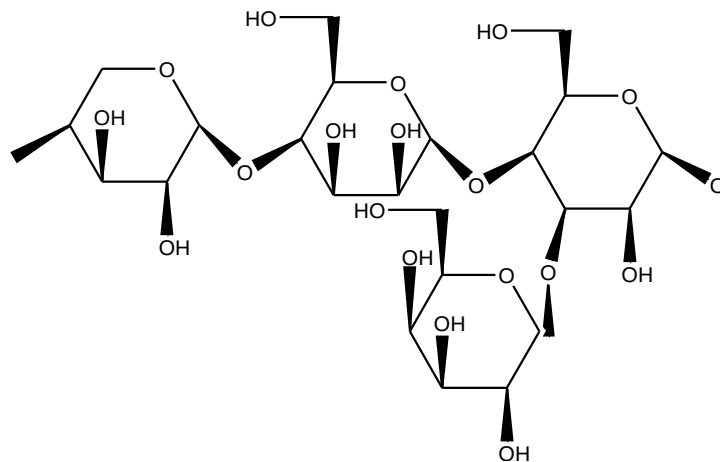
En contraste con la celulosa, la cual es cristalina, fuerte y resistente a la hidrólisis, las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas con pequeña solidez, fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidos (Zabel, *et al.* 1992). Las hemicelulosas son polímeros de diversas hexosas y pentosas, principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, y ácido D-glucururónico, que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa.

La mayoría de las hemicelulosas ocurre como heteropolisacáridos, poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces β -1,4 (de menor longitud que la de celulosa (grado de polimerización 100-200)) (Figura 5) de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud.

Se clasifican usualmente de acuerdo a los azúcares residuales presentes. Los tipos y cantidades de hemicelulosas presentes en las paredes celulares de las maderas de angiospermas y coníferas son diferentes. Estas últimas contienen menos hemicelulosas, constituidas principalmente por glucomananos y galactoglucomananos (Moore, D., 1998). En los glucomananos la cadena principal está formada por residuos alternos β -D-glucopiranosido y β -D-manopiranosido; en los galactoglucomananos, sustituyentes D-galactopiranosil terminales están asociados al O-6 de manosa o glucosa (Zabel, *et al.* 1992).

Los xilanos son las principales hemicelulosas en la madera de angiospermas (constituyen del 10 al 35% del peso seco) (Zabel, *et al.* 1992). Consisten de una cadena principal de unidades β -D-xilopiranosido con uniones β -1,4 y dependiendo de su origen, esta cadena puede tener diferentes sustituyentes y cadenas laterales.

Figura 5. Estructura molecular de la hemicelulosa.



Fuente: Taiz, L., 2006.

Las hemicelulosas cubren y unen a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. La corta extensión de las cadenas que incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas,

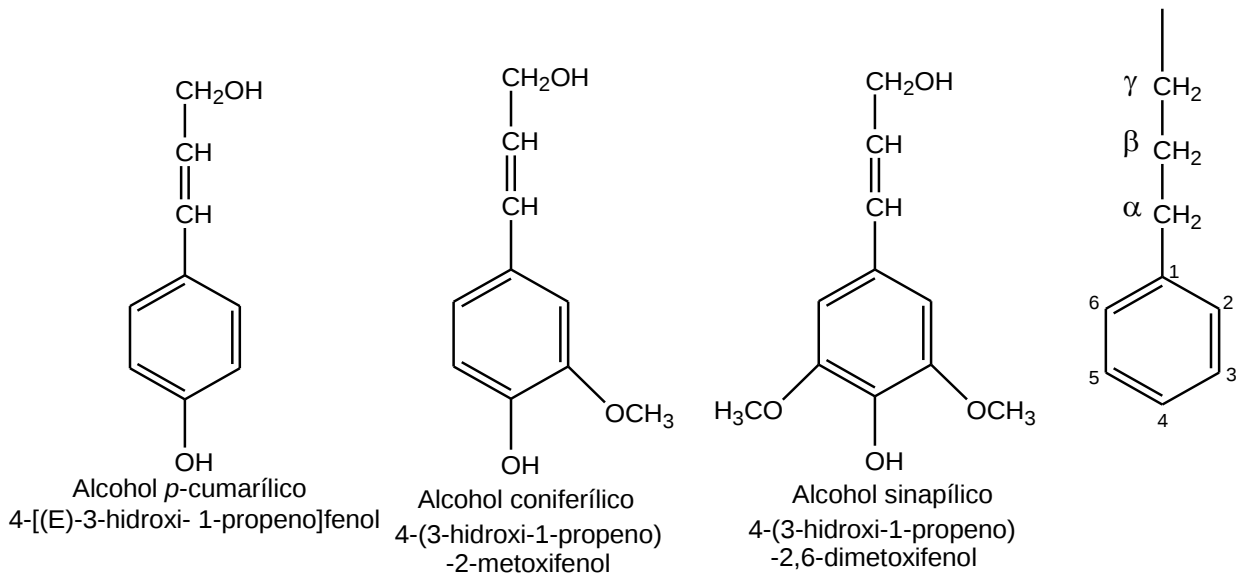
explicaría por qué este polímero está entre los primeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de pudrición (Zabel, *et al.* 1992).

2.2.8.3. Lignina.

La lignina es el polímero aromático no polisacárido más abundante de la naturaleza. Es un compuesto insoluble en agua y amorfo, de alto peso molecular, tridimensional. La lignina está formada por polimerización al azar de unidades radicales de alcohol sinapílico, *p*-cumarílico y coniferílico, unidades que se pueden observar en la figura 6. La polimerización de la lignina se lleva a cabo luego de la degradación de los polisacáridos y se inicia por oxidación enzimática de los precursores a radicales fenoxi (por abstracción de un electrón). 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.

El proceso de polimerización de los monómeros se inicia con una oxidación que da semiquinonas, luego estos radicales libres reaccionan unos con otros y forman enlaces covalentes entre C-O o C-C, siendo el predominante el enlace β -O-4, mostrado en la figura 7 (Bommarius, *et al.*, 2004) el cual usualmente con adición de agua da una forma más estable de β -O-4 enlace éter. Alrededor del 40-60% de todas las uniones que conforman la lignina corresponden a enlaces tipo éter. En la figura 7 se puede observar la estructura de la lignina.

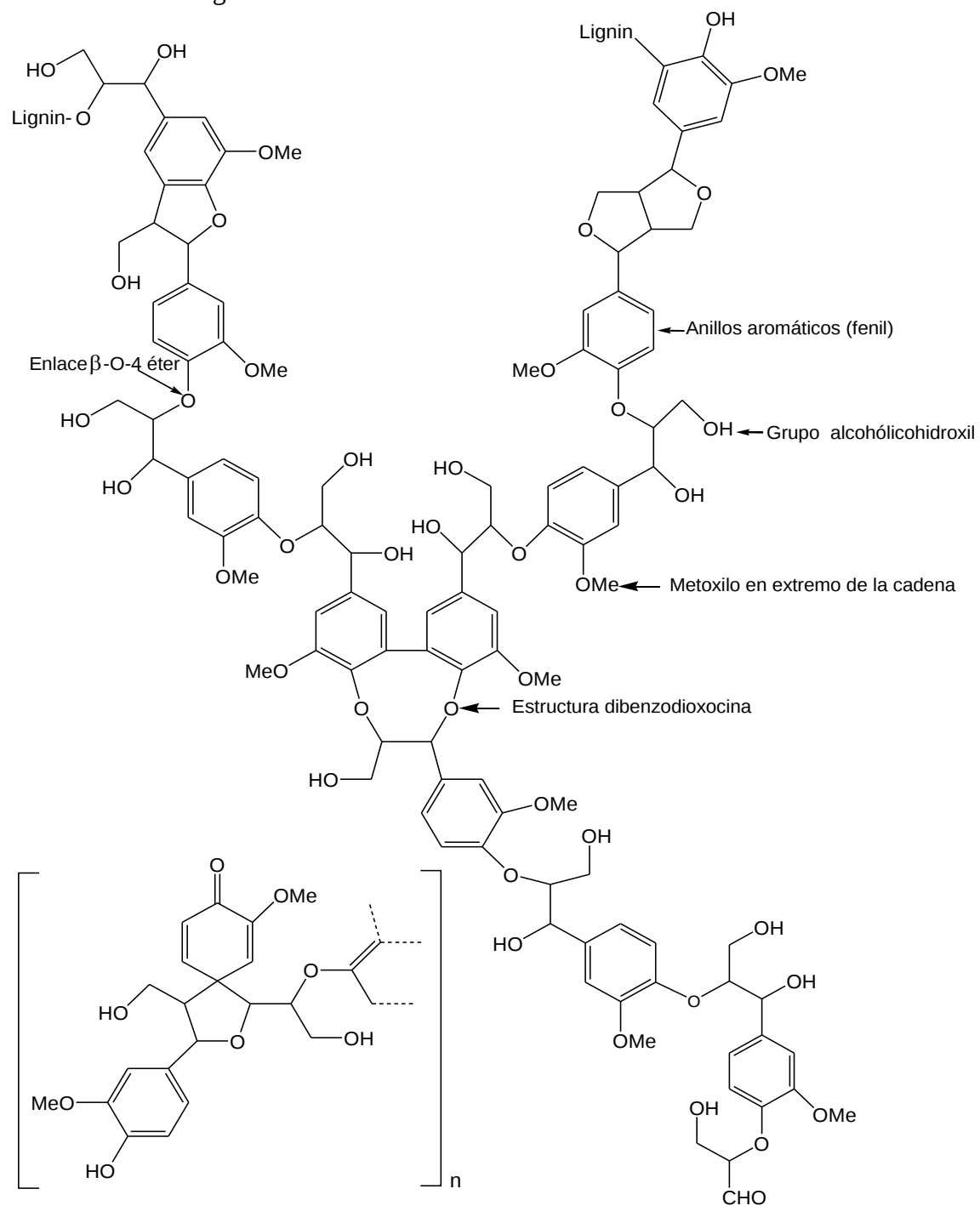
Figura 6. Monómeros precursores de la molécula de lignina. La acción de peroxidasas y lacasas generan radicales libres en estos monómeros, los cuales una vez activados se van polimerizando al azar para formar diversos tipos de uniones.



Fuente: Bommarius, *et al.*, 2004.

Los tres precursores monoméricos están presentes en proporciones variables dependiendo de diversos factores que incluyen la especie vegetal, tipo de tejido y localización exacta de la lignina en la pared celular. Las unidades de guayacil lignina (G) que se originan a partir del alcohol coniferílico predominan en las maderas de coníferas, en cambio las maderas de angiospermas contienen cantidades más o menos equivalentes de unidades guayacil y siringil (S-lignina, derivada del alcohol sinapílico) y la lignina de los pastos además de unidades guayacil y siringil contiene unidades *p*-hidroxifenil (que se originan del alcohol *p*-cumarílico) (Montoya, S., 2008).

Figura 7. Estructura de la lignina.



Fuente: Bommarius, *et al.*, 2004.

La lignina imparte resistencia a la degradación microbiana de la madera. La íntima asociación espacial existente entre los polisacáridos y la lignina dentro de las paredes celulares de la madera provee una barrera protectora que impide la degradación de la celulosa. Una vez que la lignina que rodea a las fibrillas de celulosa es removida o modificada, la celulosa resulta más accesible a las enzimas microbianas y puede ser eficientemente degradada. Así, la lignificación en muchas plantas puede ser un mecanismo de resistencia a la enfermedad y se produce como un mecanismo de defensa hacia los hongos patógenos o en respuesta a heridas. Debido a su estructura la lignina es altamente resistente a la degradación. Hasta el momento los únicos organismos capaces de mineralizarla eficientemente llevándola a dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) como productos finales son los hongos causantes de pudrición blanca (Montoya, S., 2008).

Estos hongos en su mayoría pertenecen a los órdenes Aphyllophorales y Agaricales; poseen un complejo de enzimas oxidasas y peroxidasas que catalizan las primeras reacciones que rompen uniones dentro de la compleja molécula de lignina, generando moléculas más pequeñas, estos productos de degradación se incorporan luego a los ciclos metabólicos del organismo originando como producto final dióxido de carbono (CO_2).

Se ha demostrado que la lignina como sustrato único no es una fuente aprovechable para el crecimiento de los hongos, sino que es necesaria la presencia de un cosustrato (Montoya, S., 2008).

Debido a la importancia que la biodegradación de lignina tiene en el ciclo global del carbono en la naturaleza, y al interés del uso de los materiales lignocelulósicos como fuentes renovables de materiales, compuestos químicos y energía, este proceso ha sido objeto de investigación creciente desde hace décadas (Cañas, A., 2009).

2.2.9. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

2.2.10. SISTEMA ENZIMÁTICO IMPLICADO EN LA DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA.

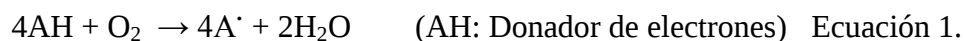
La biodegradación de la lignina es un proceso complejo catalizado por enzimas que muestran una gran inespecificidad. El proceso implica tanto la despolimerización inicial de la lignina como la transformación que sufren los productos derivados de la

misma para incorporarse en las rutas generales del metabolismo. El sistema enzimático ligninolítico extracelular está formado por dos tipos de actividades enzimáticas, peroxidasas y oxidasas. Estas enzimas son capaces de actuar directamente sobre el polímero de lignina, como las peroxidasas o las lacasas, o bien cooperar en el proceso generando peróxido de hidrógeno (H₂O₂), como en el caso de las oxidasas (Rodríguez, E., 2006).

Los hongos de pudrición blanca participan en la biodegradación de la lignina (polímero estereoirregular) mediante mecanismos oxidativos. El sistema enzimático ligninolítico, como ya se mencionó, es poco específico, ya que las peroxidasas y oxidasas actúan al azar sobre la molécula de lignina, generando radicales libres que son inestables y tienden a polimerizarse. Las principales enzimas que actúan directa o indirectamente sobre la lignina son: lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas. Ciertos hongos de pudrición blanca producen las tres enzimas, algunos sólo dos y pocos producen una (Díaz, R., 2009).

2.2.10.1. Enzimas lacasas (Lac) (EC 1.10.3.2).

Las enzimas lacasas son glicoproteínas (Heinzkill, *et al.*, 1998), su punto isoeléctrico (pI) y su pH óptimos son ácidos (Kirk, *et al.*, 1998); presentan peso molecular variable, el peso molecular de su monómero está entre 50–100 kDa (Claus, H., 2004), se han clasificado dentro del grupo de enzimas denominadas azul cobre oxidasas. Con respecto al pH, el óptimo de estas enzimas puede variar de 3 a 7 con un intermedio de 4.5 donde es completamente estable a una temperatura de 37°C por un mínimo de 5 días (Gayosso, *et al.*, 2004). Estas enzimas requieren cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, ligninas y diferentes sustratos no fenólicos mediante la transferencia de un electrón resultando la formación de radicales libres (Claus, H., 2003), de acuerdo con la siguiente ecuación (Quevedo, B., 2011):



Lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, despolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Edens, *et al.*, 1999).

En la presencia de mediadores, las lacasas presentan una gama ampliada de sustratos y luego son capaces de oxidar compuestos con un potencial redox superior al propio. La lacasa, a diferencia de la LiP y la MnP, no requiere peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) para oxidar sus sustratos. El sitio activo de cada molécula de lacasa tiene cuatro iones cobre, uno tipo I (T1), uno tipo 2 (T2) y dos tipo 3 (T3). Los sitios de los dos iones cobre T3 están antiferromagnéticamente acoplados. Los sitios T2 y T3 están organizados en un único grupo que es capaz de ligarse al oxígeno, el cual es el aceptor final de electrones. La actividad de la lacasa está ampliamente distribuida entre los diferentes grupos de hongos, bacterias y también en algunas plantas e insectos (Niladevi, K., 2009).

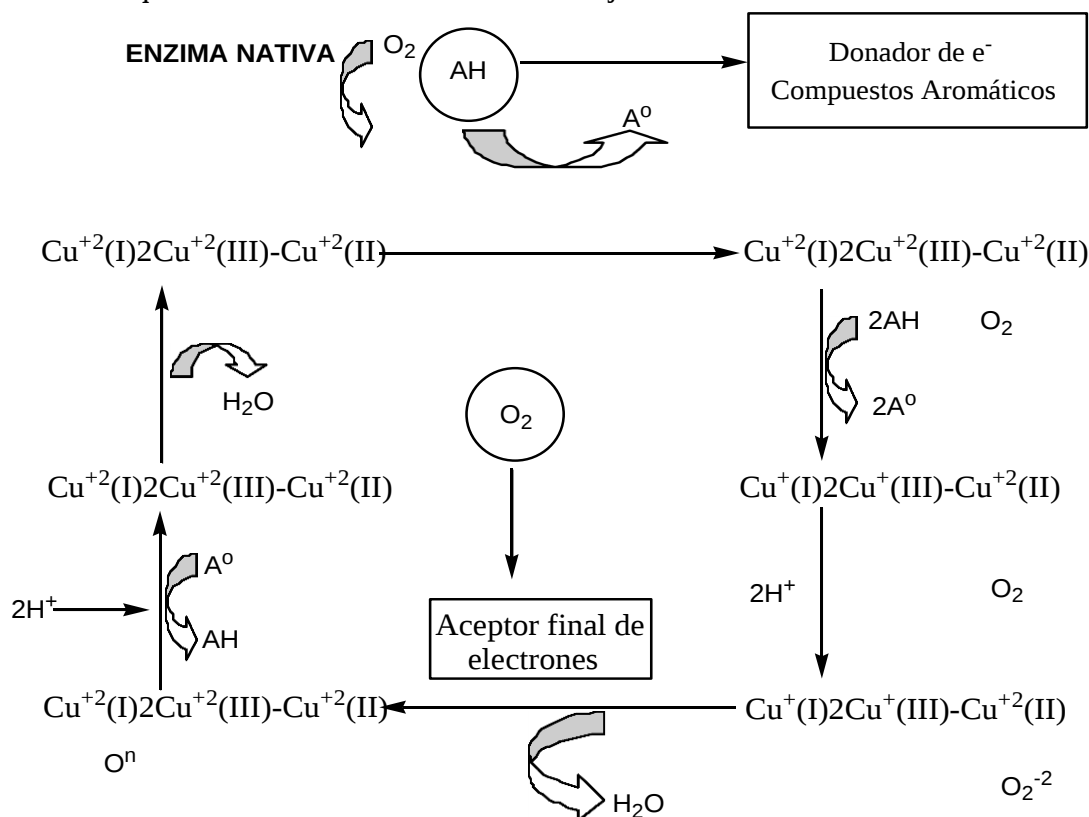
Cobre tipo 1 (T1) (Cu_1): es responsable del color azul de la proteína. Tiene una alta absorbancia en la región del visible (605 nm) provocada por la unión covalente cobre-cisteína. Debido al alto potencial redox de este cobre es el sitio donde ocurre la oxidación del sustrato (Durán, E., 2007).

Cobre tipo 2 (T2) (Cu_4): se caracteriza por no presentar absorbancia detectable en la región del visible y por tener una alta afinidad por aniones (F^- , CN^-) que actúan como inhibidores de la actividad de la enzima (Durán, E., 2007).

Cobre tipo 3 (T3) (Cu_2) y (T3) (Cu_3): es un complejo binario formado por un par de iones Cu^{2+} - Cu^{2+} unidos por puente hidróxido con un máximo de absorbancia a 330 nm y un espectro de fluorescencia característico (Durán, E., 2007).

De los tres átomos de cobre que poseen las lacasas, uno de ellos es responsable de la coloración azul. Las enzimas que no poseen este átomo de cobre se denominan lacasas blancas o amarillas (Khusal et al., 2010).

Figura 8. Esquema de acción de la enzima lacasa. El sitio activo de las lacasas es oxidado por el oxígeno o por un compuesto aromático, generando un intermediario deficiente de un par de electrones. Dicho componente será oxidado nuevamente por O_2 o por sustratos fenólicos. El ciclo es completado gracias a cuatro oxidaciones posteriores, provocando que la enzima vuelva a su estado relajado.



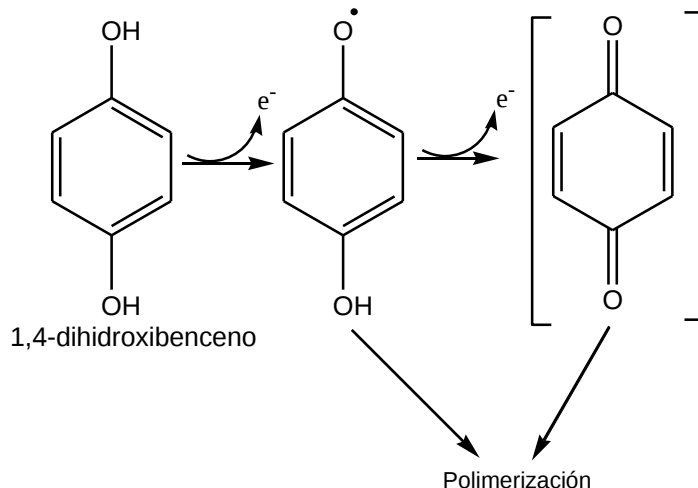
Fuente: Páez, M., 2012.

Las lacasas son de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX. La función fisiológica de estas enzimas no ha sido comprendida totalmente; se ha reportado que en plantas, las lacasas participan en la lignificación y en hongos en la morfogénesis (formación de esporas, de pigmentos de los cuerpos fructíferos), patogénesis, virulencia y degradación de lignina o eliminación de fenoles tóxicos que surgen durante esta degradación (Mansur, *et al.*, 1997), pero también se ha reportado actividad de lacasas en algunos insectos y bacterias, en los cuales todavía no es clara su función (Galhaup, *et al.*, 2002). La estructura molecular de las lacasas se ha establecido a partir de las enzimas aisladas de hongos. Estas enzimas forman parte de las enzimas ligninolíticas que presentan los hongos de pudrición blanca para degradar a la lignina y

son secretadas en múltiples isoformas dependiendo de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo (Giardina, *et al.*, 1999).

Las lacasas oxidan el sustrato a través de una reacción monoelectrónica generando radicales libres. Estos radicales son inestables y pueden ser oxidados nuevamente por las lacasas o pueden polimerizarse (Figura 9).

Figura 9. Reacción monoelectrónica típica de las lacasas sobre compuestos del tipo fenólicos. Se forma un radical libre que puede ser convertido a una quinona en un segundo paso catalizado por la enzima o por desprotonación espontánea. Además, las quinonas y los radicales libres generados pueden polimerizarse.



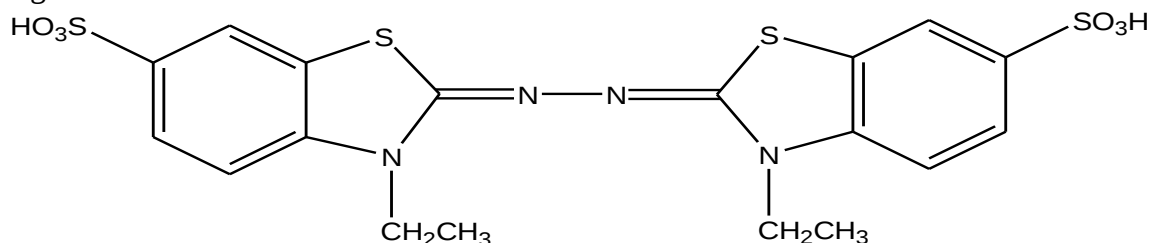
Fuente: Thurston, C., 1994.

Las lacasas fúngicas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar y algunas veces mineralizar por completo gran variedad de contaminantes ambientales (Wilkolazka, *et al.*, 2002), así como degradar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados (sistema lacasa-mediador) (Li, *et al.*, 1999). En este sistema, metabolitos de bajo peso molecular, previamente oxidados por lacasas, actúan como agentes que son esenciales en la oxidación de compuestos no fenólicos por lacasas, como el alcohol veratrílico o dímeros modelo de lignina (Rodríguez, E., 2006).

El mediador más ampliamente estudiado es el ABTS, un compuesto aromático sintético con sustituciones nitrogenadas. Éste es capaz de ser oxidado por la enzima y a su vez, oxidar las estructuras de la lignina. Además, debido a su tamaño reducido, puede ingresar a la pared celular permitiendo su acción sobre los grupos fenólicos y no

fenólicos presentes en el interior de la pared celular.

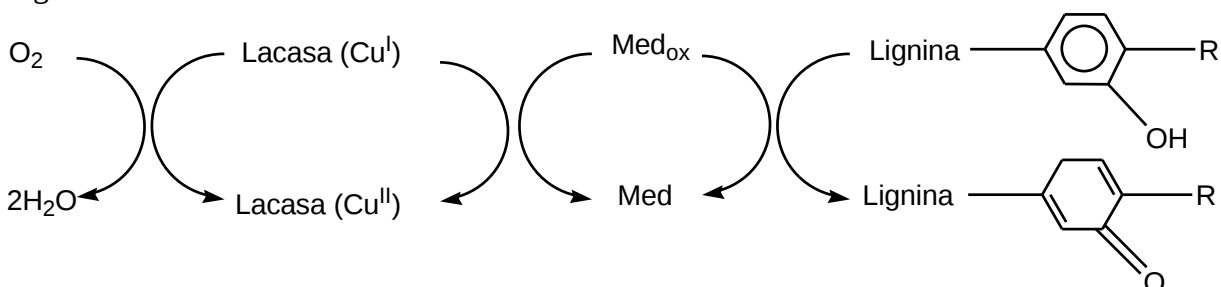
Figura 10. Estructura del ABTS.



Fuente: Wong, D., 2009.

El mecanismo de acción propuesto simplificado se muestra en la figura 11. El oxígeno presente en la solución oxida a la enzima, la cual oxida al mediador tomando un electrón y generando un radical libre. El mediador oxidado difunde dentro de las fibras y oxida a la lignina. El ciclo siguiente comienza cuando el oxígeno es reducido a agua (H_2O).

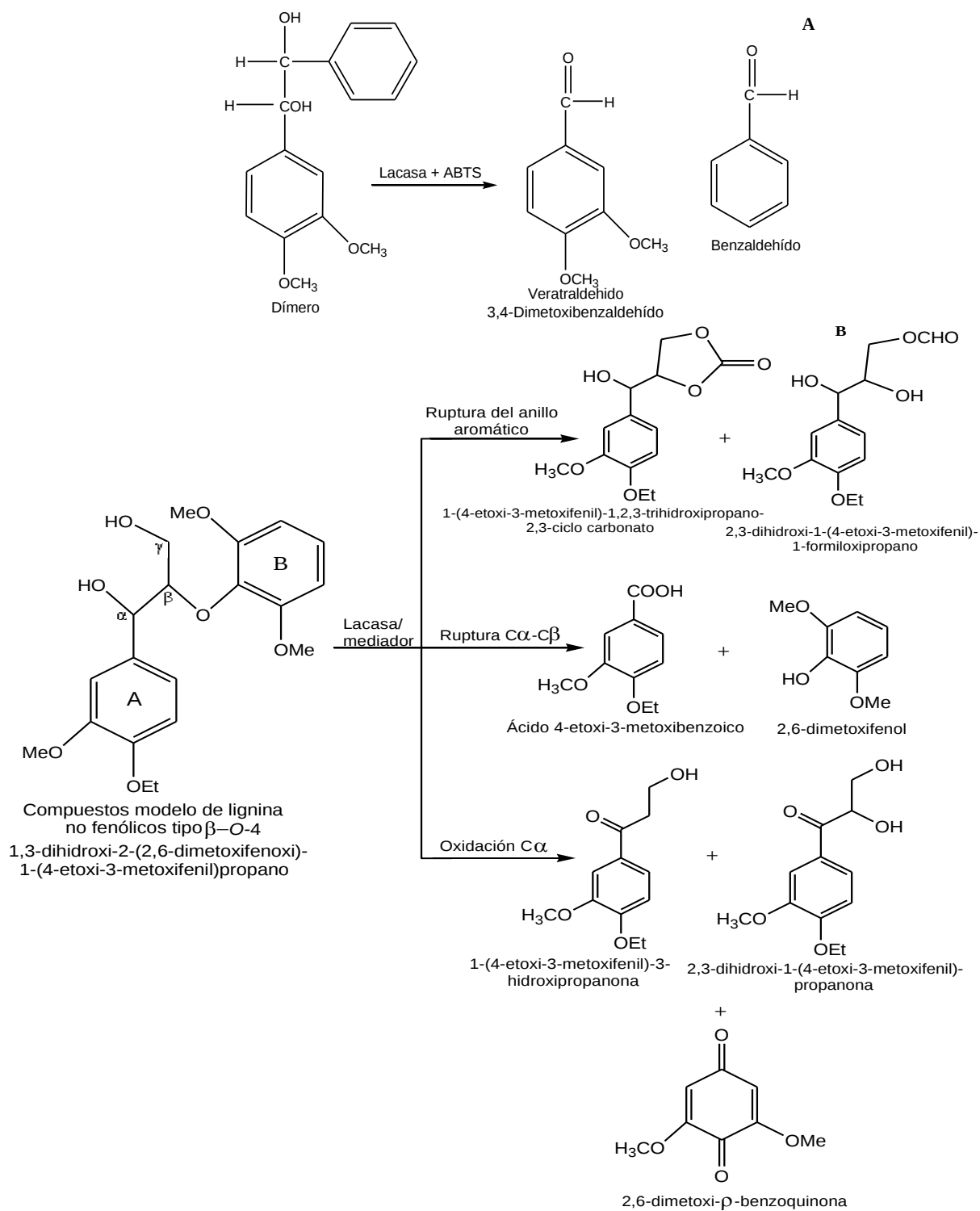
Figura 11. Ciclo catalítico del sistema oxidativo de la enzima lacasa.



Fuente: Herrera, L., 2008.

La figura 12.A muestra los posibles productos de reacción generados por acción del sistema lacasa-ABTS sobre un modelo de lignina del tipo no fenólico. Se observa que se produce ruptura del enlace $C\alpha-C\beta$ del dímero, generándose compuestos con grupos aldehídos.

Figura 12. A: Reacción entre un modelo de lignina y el sistema Lacasa/ABTS. B: Oxidación de compuestos modelo de lignina no fenólicos tipo β -O-4 por el sistema Lacasa/mediador

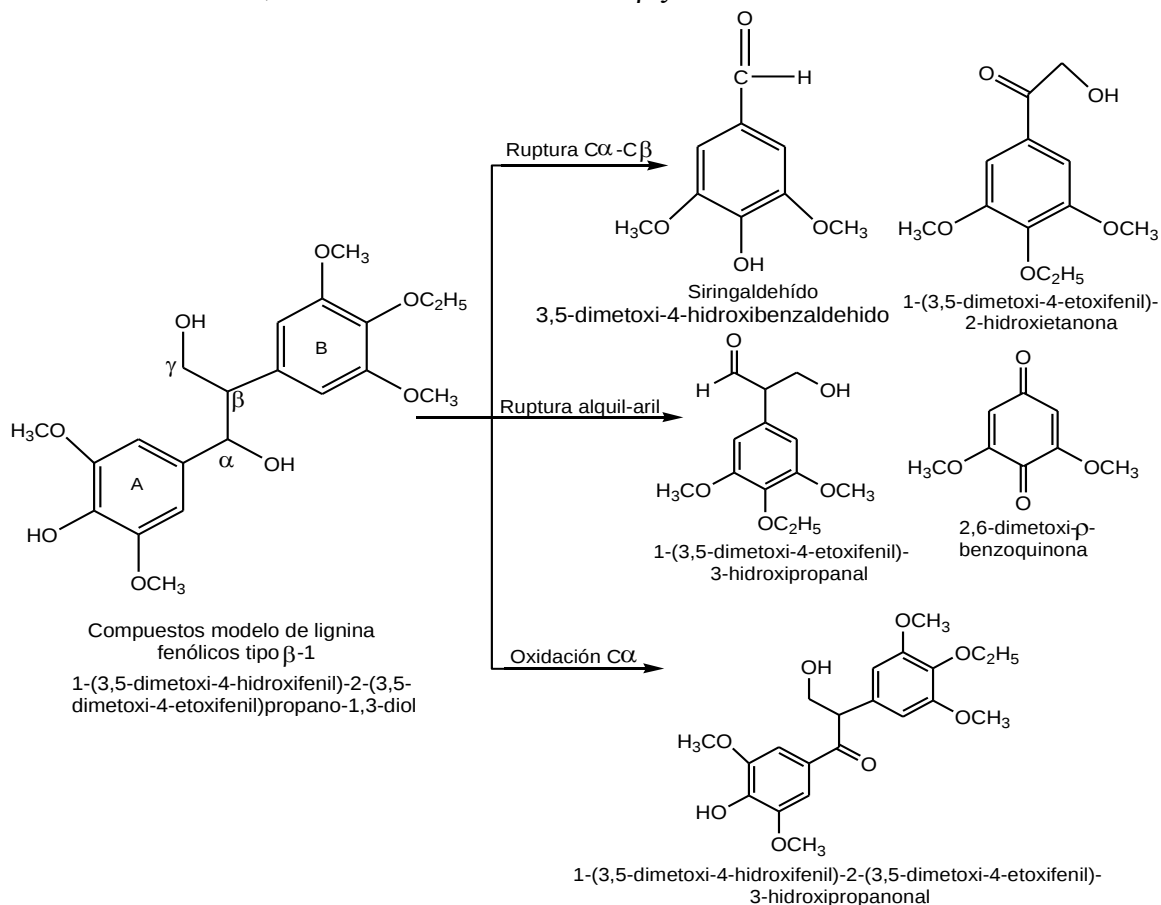


Fuente: Wong, D., 2009.

Las lacasas tienen muchas aplicaciones como son: clarificación del vino (remueve compuestos fenólicos), análisis de drogas (distinguir morfina de codeína), deslignificación y procesos de biorremediación (decoloración de efluentes, blanqueamiento y deslignificación de la pulpa de papel, degradación de herbicidas, entre otros) (Moreira, *et al.*, 1999).

En la oxidación de la lignina reacciona un electrón generando radicales libres, la oxidación de un electrón del sustrato se acopla a la reducción de cuatro electrones de oxígeno. El producto inicial es inestable y puede sufrir una segunda oxidación enzimática o de lo contrario una reacción no enzimática tal como la hidratación o polimerización (Archibald, *et al.*, 1997) (Figura 13).

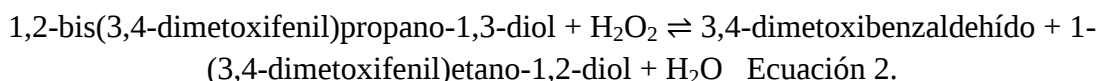
Figura 13. Oxidación de compuestos fenólicos de lignina tipo β -1 por acción de lacasas. El enlace del sustrato natural (lignina) se rompe por la acción de las lacasas, incluyendo la oxidación del $C\alpha$, la escisión del enlace $C\alpha-C\beta$ y el enlace aril-alkil.



Fuente: Wong, D., 2009.

2.2.10.2. Lignina peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14).

La LiP, conocida como ligninasa es una de las enzimas más importantes involucradas en la degradación de la lignina. Fue descubierta en 1983 a partir del hongo de pudrición blanca, *P. chrysosporium*. Posteriormente se encontró en los extractos de medios de cultivo de otros basidiomicetos como *Phlebia radiata*, *T. versicolor*, *Bjerkandera adusta* y el ascomyceto *Chrysonilia sitonphila*. Las lignina peroxidases son glicoproteínas del tipo oligomanosa con un peso molecular en el intervalo de 38 a 43 KDa (Niladevi, K., 2009). Esta enzima cataliza la despolimerización oxidativa de la lignina, esta reacción es dependiente de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La reacción global se representa así (Wong, D., 2009):



La LiP es relativamente inespecífica a sus sustratos y puede oxidar sustratos aromáticos fenólicos y también una variedad de compuestos modelo de lignina no fenólicos, así como una gama de compuestos orgánicos con un potencial redox de 1,4 V (en comparación al electrodo estándar de hidrógeno) en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La actividad enzimática de la LiP se mide convenientemente por el aumento en la absorbancia a 310 nm producto de la oxidación del alcohol veratrílico (VA) a veratrilo aldehído (VAD) (Wong, D., 2009). El mecanismo general de la reacción catalizada por la LiP consta de dos pasos (Wong, D., 2009):

1) La oxidación de 2e⁻ de la enzima nativa [Fe (III)] produce el compuesto intermedio I que es un catión radical de la Fe (IV) oxoporfirina [Fe (IV) = O⁺; LiP-I], al tiempo que se produce la ruptura del enlace O-O del sustrato peróxido (H₂O₂) (Figura 14).



2) Dos consecutivas reducciones de 1e⁻ del compuesto LiP-I por sustratos donadores de electrones para producir la enzima nativa. La primera reducción de 1e⁻ de la LiP-I por un sustrato reductor, tal como VA, produce el compuesto II [Fe (IV) =O, LiP-II] y un radical catiónico (VA⁺·). Una segunda reducción de 1e⁻ devuelve la enzima a su estado de oxidación férrico, completando el ciclo catalítico. En algunos casos el compuesto LiP-I también puede retornar a la enzima nativa por una reducción directa de 2e⁻.

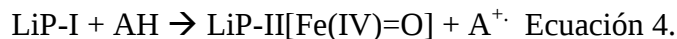
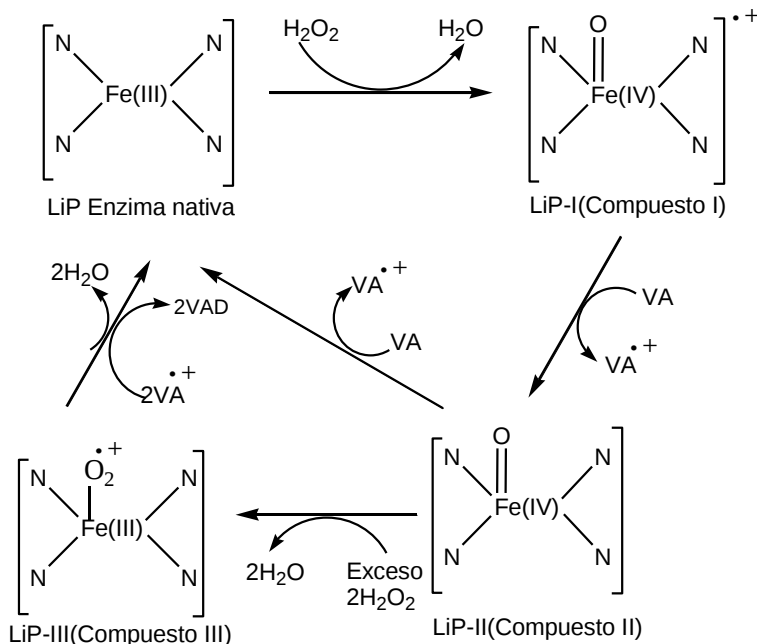


Figura 14. Ciclo catalítico de la LiP. El catión radical del alcohol veratrílico funciona como un mediador redox y el compuesto III vuelve a la forma de la LiP nativa.



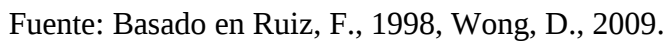
Fuente: Wong, D., 2009.

En muchos casos, los sustratos no tienen acceso al grupo hemo de la LiP y la oxidación del sustrato no ocurre. En tales casos se involucra un mediador redox, que juega un papel importante. El alcohol veratrílico es un excelente sustrato para la LiP y éste actúa como mediador redox para la oxidación indirecta de otros sustratos. El alcohol veratrílico estimula la oxidación previniendo la inactivación de la enzima y éste se oxida al radical catiónico VA, que es fuertemente oxidante y actúa transfiriendo un electrón a la reacción catalítica de la LiP (Niladevi, K., 2009).

2.2.10.2.1. Oxidación del alcohol veratrílico.

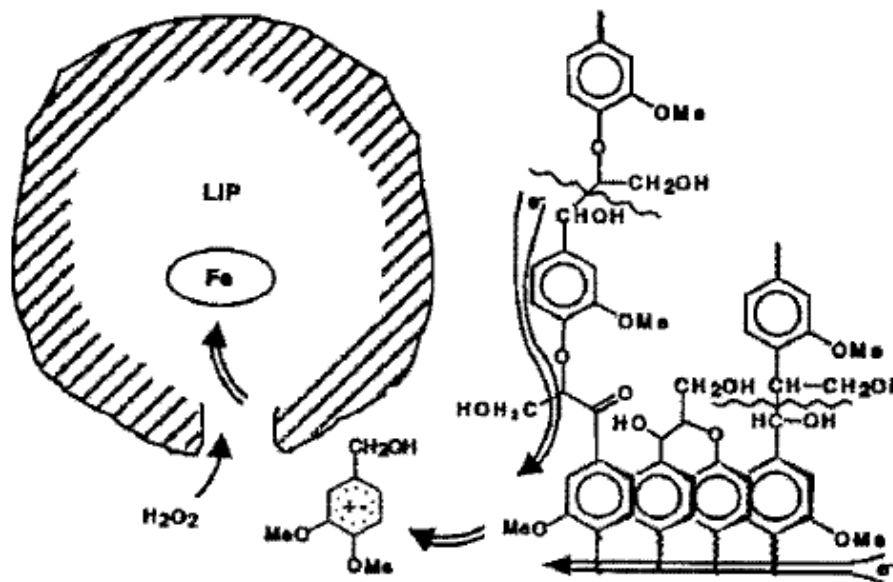
Se ha comprobado que el alcohol veratrílico, un metabolito aromático secretado durante el metabolismo secundario de algunos hongos, posibilita la oxidación de ciertos sustratos de potencial redox alto (como el alcohol anisílico) y de la lignina polimérica por la LiP. Generalmente se admite que el radical catiónico del alcohol veratrílico actúa como

Figura 15. Participación del alcohol veratrílico en la oxidación de la lignina. A: Hipótesis del intermediario. B: Cierre del ciclo catalítico en la oxidación del alcohol anisílico.



Se ha propuesto al alcohol veratrílico como un intermediario natural en la degradación de la lignina, ya que la LiP necesita de un mediador para poder oxidar compuestos a los que no puede acceder directamente como el polímero de lignina. Estudios realizados han mostrado que la vida media del radical catiónico del alcohol veratrílico es de alrededor de 60 ms, un valor demasiado bajo para poder actuar como un mediador eficaz entre la LiP y la lignina de la pared vegetal. Sin embargo, se había sugerido que la LiP podría dar lugar a una degradación a distancia, no por desplazamiento del radical sino por una reacción de transferencia electrónica, efecto túnel (Figura 16), hasta alcanzar la zona de la lignina donde se produzca la degradación (Ruiz, F., 1998).

Figura 16. Efecto túnel en la degradación de la lignina por la LiP, incluyendo la presencia de alcohol veratrílico que facilita la transferencia electrónica de la lignina al hemo.



Fuente: Ruiz, F., 1998.

2.2.10.2.2. Oxidación de compuestos modelo.

Los compuestos modelo son monómeros, dímeros, entre otros, representativos de algunas de las unidades estructurales de la lignina. Pueden ser fenólicos o no fenólicos. Los más ampliamente utilizados son estructuras diméricas que contienen uniones β -1, β -5 y β -O-4. Estos tres tipos de uniones representan más del 65% de todas las que se establecen en las ligninas de coníferas y caducifolias (Have, *et al*, 2001).

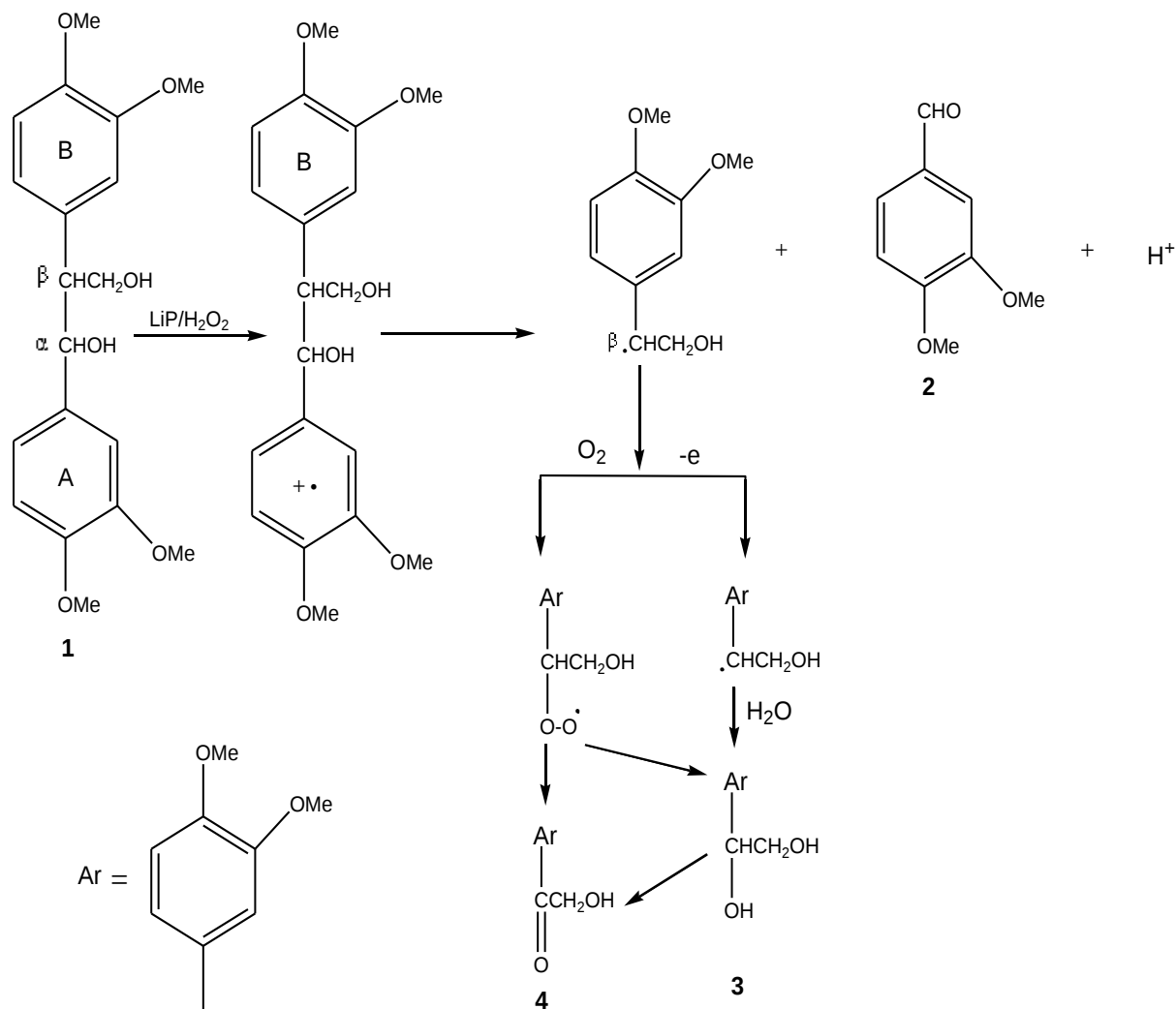
La oxidación de estos compuestos por la LiP se produce, al igual que sucede con en el alcohol veratrílico, mediante la sustracción de un electrón de alguno de los anillos aromáticos del dímero.

El que un núcleo aromático sea sustrato para la LiP depende de su potencial de oxidación que viene definido por los sustituyentes que presenta y su posición en el anillo aromático. Los sustituyentes, a su vez, condicionan las reacciones que sufren los radicales catiónicos: rupturas de enlaces ($C\alpha-C\beta$, alquil-arílica, $\beta-O-4$ en dímeros de este tipo, del anillo aromático y desmetoxilaciones, oxidación del grupo hidroxilo del $C\alpha$, y polimerización por unión de radicales (Have, *et al.*, 2001).

En las figuras 17 y 18 se muestran los productos resultantes de la oxidación monovalente de dímeros $\beta-1$ y $\beta-O-4$ por la LiP.

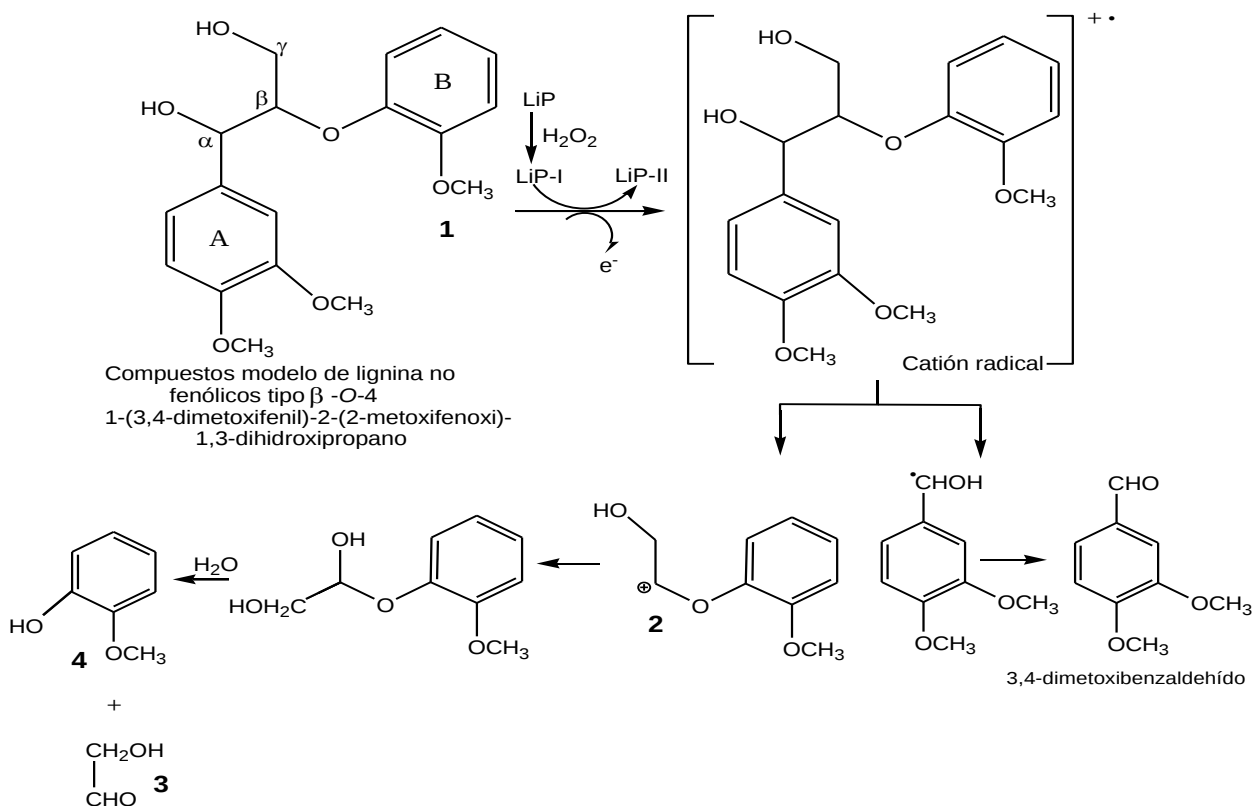
En la oxidación del dímero $\beta-1$ (Figura 17), tras la formación de un radical intermediario sobre el sustrato (1), la unión $C\alpha-C\beta$ se rompe homolíticamente para dar un radical centrado en el carbono y un aldehído aromático (2). A continuación, el radical puede reaccionar con oxígeno (condiciones aerobias) formándose un radical centrado en el oxígeno. La evolución de este radical da lugar a otro producto de reacción (4) que ha incorporado un átomo de oxígeno. Bajo condiciones anaerobias el radical centrado en el carbono es atacado por el oxígeno del agua (H_2O) dando los mismos productos finales obtenidos en condiciones aerobias a través de un intermediario (3).

Figura 17. Mecanismo de degradación de dímeros modelo de lignina no fenólicos de tipo β -1 por la LiP: ruptura $C\alpha$ - $C\beta$.



Fuente: Ruiz, F., 1998, Wong, D., 2009.

Figura 18. Mecanismo de degradación de dímeros modelo de lignina no fenólicos de tipo β -O-4 por la LiP. La ruptura $C\alpha$ - $C\beta$ catalizada por la LiP está generalmente seguida por la ruptura de la unión éter entre el fragmento de la cadena lateral y el segundo anillo aromático (2). Ésta da lugar a pequeños fragmentos alifáticos solubles en agua (H_2O) (3) y estructuras fenólicas (4).



Fuente: Wong, D., 2009.

2.2.10.3. Manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.7).

Es una enzima ampliamente distribuida entre los hongos causantes de pudrición blanca. Es una hemoproteína glicosilada con fuerte preferencia por el Mn^{+2} como sustrato. Este tipo de peroxidasas se han encontrado en la mayoría de hongos que degradan lignina, detectándose además en procesos naturales de degradación de lignocelulosa (Hofrichter, M., 2001).

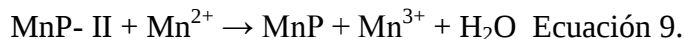
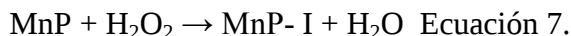
La MnP se encontró por primera vez en cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium*. Posteriormente se halló en otros hongos de podredumbre blanca y en otros basidiomycetos, como *Agaricus bisporus*, *Ceriporiospora subvermispora*, *Citocybula dusenii*, *L. edodes*, *Nemtoloma forwardii*, *Panus tigrinus*, *Phlebia*

radiata, *P. ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, *Stropharia rugosoannulata* y *T. versicolor* (Niladevi, K., 2009).

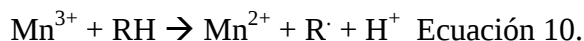
La principal reacción catalizada por la MnP es la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} por el H_2O_2 (Wong, D., 2009).



El ciclo catalítico (Figura 19) implica la oxidación de Mn^{2+} por el compuesto MnP-I y el compuesto MnP-II para producir Mn^{3+} .

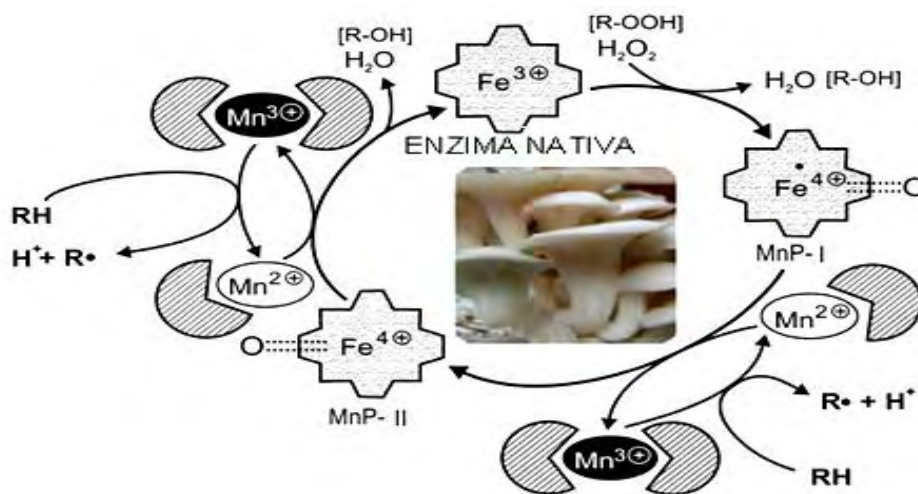


El Mn^{3+} formado media la oxidación de sustratos orgánicos.



La adición de un equivalente de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a la enzima nativa produce el compuesto MnP-I, que es un catión radical de la Fe (IV) oxoporfirina [$Fe(IV) = O^{\cdot+}$]. El enlace peróxido del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se escinde posterior a la transferencia de $2e^-$ del grupo hemo-porfirina de la enzima. La formación del compuesto MnP-I es independiente del pH, presenta una constante de velocidad de segundo orden ($2,0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$). La adición de un equivalente de Mn^{2+} reduce rápidamente el compuesto I al compuesto II. La conversión del compuesto MnP-I al compuesto MnP-II también se puede lograr mediante la adición de otros donantes de electrones, tales como ferrocianuro y una variedad de compuestos fenólicos (Hofrichter, M., 2002). La reducción del compuesto II genera nuevamente la enzima nativa, sin embargo, la enzima requiere obligatoriamente los iones Mn^{2+} para completar su ciclo catalítico.

Figura 19. Ciclo catalítico de la MnP.



Fuente: Hofrichter, M., 2002.

2.2.10.3.1. Quelantes Mn^{3+} .

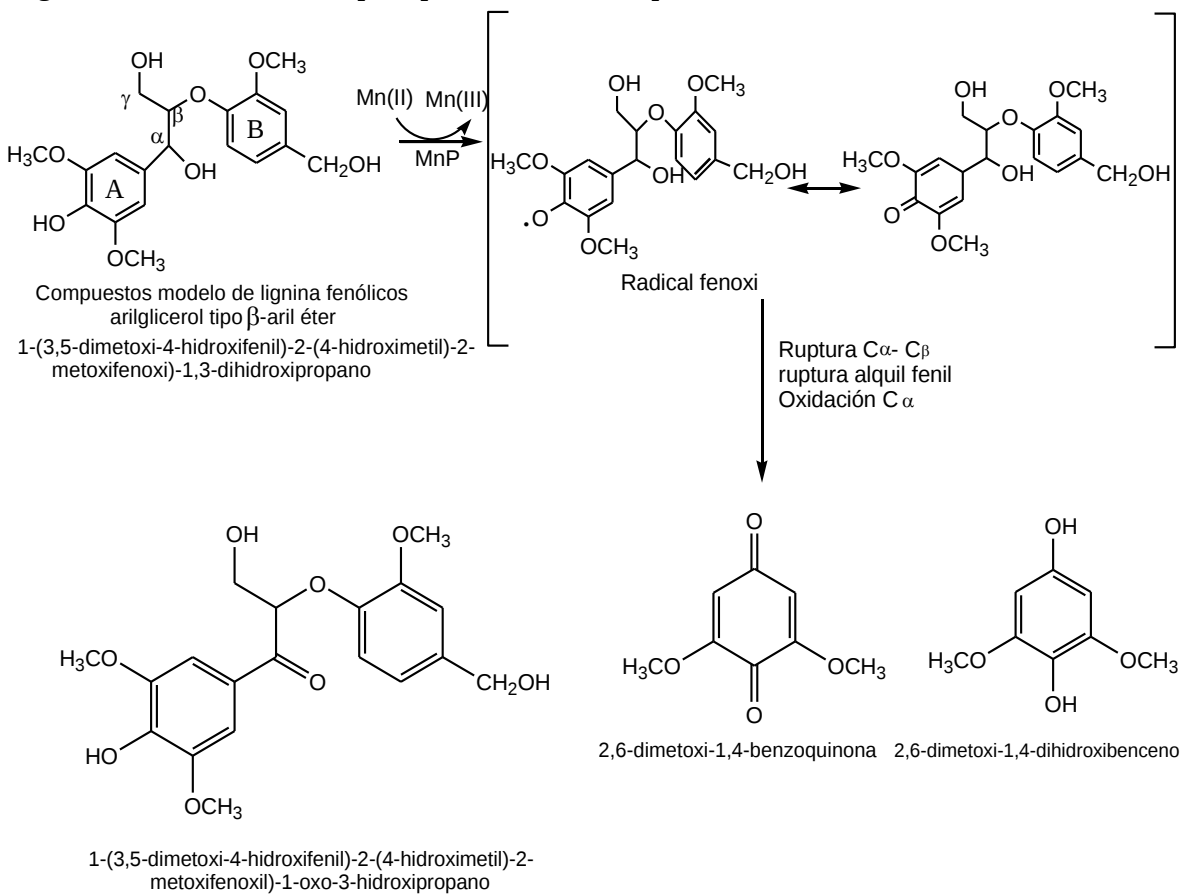
El Mn^{3+} es un oxidante con una vida media muy corta en medios acuosos. Sin embargo, los hongos de podredumbre blanca secretan metabolitos aromáticos (como el alcohol veratrílico y el anisaldehído) y alifáticos al mismo tiempo que las enzimas ligninolíticas, incluyendo ácidos dicarboxílicos que actúan eficientemente como quelantes de iones metálicos como el Mn^{3+} . Estos quelantes, entre los que se encuentran el oxalato y el malonato, no compiten con la enzima por el Mn^{2+} debido a que presentan una constante de unión muy baja por él. Sin embargo, unen el Mn^{3+} facilitando su disociación de la enzima y lo estabilizan en solución acuosa con un potencial redox elevado (0.9-1.2) (Ruiz, F., 1998).

Se han asociado otras funciones fisiológicas con estos quelantes, incluyendo un incremento de la actividad enzimática por su capacidad para facilitar la disociación de Mn^{3+} de la enzima. El oxalato ha sido propuesto para actuar como un agente buffer extracelular, lo que permite que el hongo pueda controlar el pH de su medio ambiente. También puede actuar como un secuestrante de calcio para aumentar el tamaño del poro de la pared celular de la planta y para facilitar la penetración de las moléculas de la enzima. La oxidación del ácido oxálico por Mn^{3+} produce un radical formiato ($HCO_2^{\cdot-}$) que reacciona con el dióxigeno para formar superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y, posteriormente, peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este proceso también ha sido implicado en contribuir a la capacidad del hongo para degradar la lignina (Wong, D., 2009).

2.2.10.3.2. Oxidación de sustratos fenólicos.

El Mn^{3+} quelado actúa como un agente oxidante difusible, capaz de oxidar sustratos fenólicos lo cual implica la oxidación de $1e^-$ del sustrato para producir un radical fenoxi intermedio, que sufre reordenamientos, rompimientos de enlaces y degradación no enzimática para producir diversos productos (Figura 20). El Mn^{3+} puede catalizar la oxidación de sustratos fenólicos, incluyendo fenoles simples, aminas, colorantes, así como también compuestos modelo de lignina fenólicos. El Mn^{3+} quelado es un oxidante suave bajo condiciones fisiológicas, limitado a la oxidación de las estructuras de lignina fenólica y, por sí mismo, no es capaz de oxidar compuestos no fenólicos (Reddy, G., 2003).

Figura 20. Oxidación de compuestos modelo de lignina fenólicos arilglicerol tipo β -aril éter catalizada por MnP. Lo cual implica la oxidación de $1e^-$ del sustrato para producir un radical fenoxi intermedio, que sufre reordenamientos, rompimientos de enlaces y degradación no enzimática para producir diversos productos.



Fuente: Wong, D., 2009.

2.2.10.3.3. Oxidación de sustratos no fenólicos.

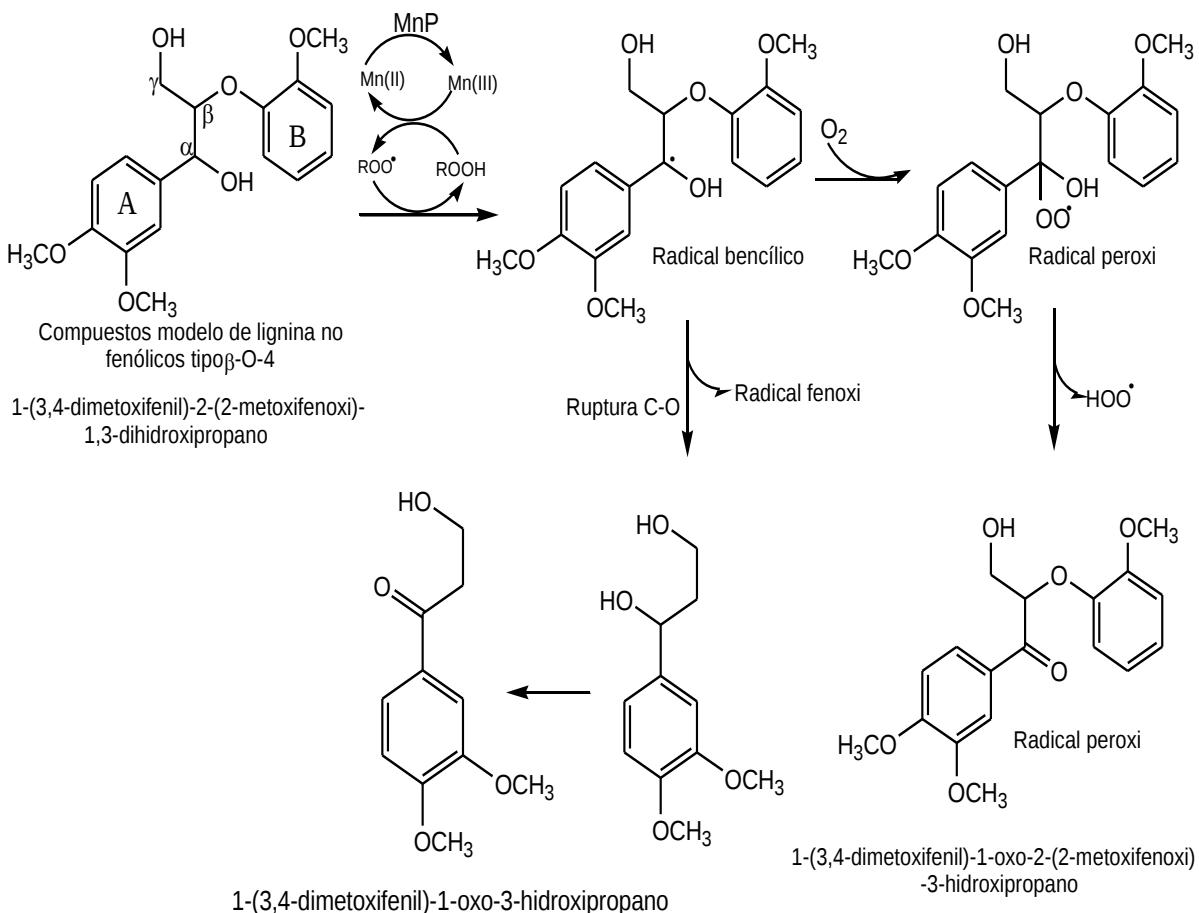
Para los sustratos no fenólicos, la oxidación por Mn^{3+} implica la formación de radicales reactivos en presencia de un segundo mediador (Reddy, G., 2003). El mecanismo seguido, a diferencia del de la LiP, no implica la formación de un radical catiónico. El Mn^{3+} producido por la MnP en presencia de tioles, como el glutatión, media la oxidación de alcoholes bencílicos sustituidos y estructuras diaril propano a sus respectivos aldehídos (Reddy, G., 2003). En estas reacciones, el Mn^{3+} oxida tioles a radicales tiilo, que posteriormente pueden sustraer un hidrógeno del sustrato para formar un radical bencílico. Este último sufre reacciones no enzimáticas para producir los productos finales.

La degradación oxidativa de compuestos modelo de lignina (fenólicos y no fenólicos) y lignina sintética también se ha observado en reacciones en las se produce la peroxidación de lípidos insaturados para catalizar las rupturas $C\alpha-C\beta$ y rupturas β -aril éter de estructuras de lignina no fenólicas diaril propano y β -O-4, respectivamente (Figura 21) (Reddy, G., 2003, Kapich, *et al.*, 2005).

En ausencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) exógeno, la enzima oxida la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida), glutatión, ditiotreitól, y ácido dihidroximaleico, generando peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Esta actividad oxidativa de la MnP tiene implicaciones en la degradación de la lignina por hongos, debido a que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido puede estar disponible para la enzima para iniciar el ciclo catalítico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) también podría ser utilizado por la LiP, porque esta enzima depende también de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para su actividad catalítica (Kapich, *et al.*, 2005).

Figura 21. Oxidación de compuestos modelo de lignina no fenólicos tipo β -O-4 por acción de la MnP. El mecanismo implica la sustracción de un hidrógeno del carbono bencílico (Ca) a través de radicales peroxilo del lípido, seguido de la adición de O_2 para formar un radical peroxilo, y una posterior escisión oxidativa y degradación no enzimática.



Fuente: Wong, D., 2009.

2.2.10.3.4. Compuesto III.

De manera similar a la LiP y a otras peroxidases, el compuesto MnP-II reacciona con un exceso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para formar un complejo superoxo de Fe^{3+} (MnP-III), que puede oxidarse adicionalmente por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) lo cual resulta en el blanqueo del grupo hemo y la inactivación irreversible de la enzima. La tasa de inactivación de la MnP es un orden de magnitud menor que la de la LiP. La reactivación de MnP-III está mediada por el Mn^{3+} , que interactúa ya sea por oxidación del superóxido hierro-coordinado o reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una

actividad de tipo catalasa. Este mecanismo contrasta con el de la LiP donde el compuesto LiP-III es oxidado nuevamente a la enzima nativa por el catión radical de sustratos aromáticos (Bacocchi, *et al.*, 2001).

En altas concentraciones de manganeso se genera una inhibición de la enzima, debido a que se generan grandes cantidades de peróxido de hidrógeno que rompen el ciclo catalítico de la enzima y afecta la cantidad de biomasa fúngica y el crecimiento micelial del hongo (Gómez, *et al.*, 2005).

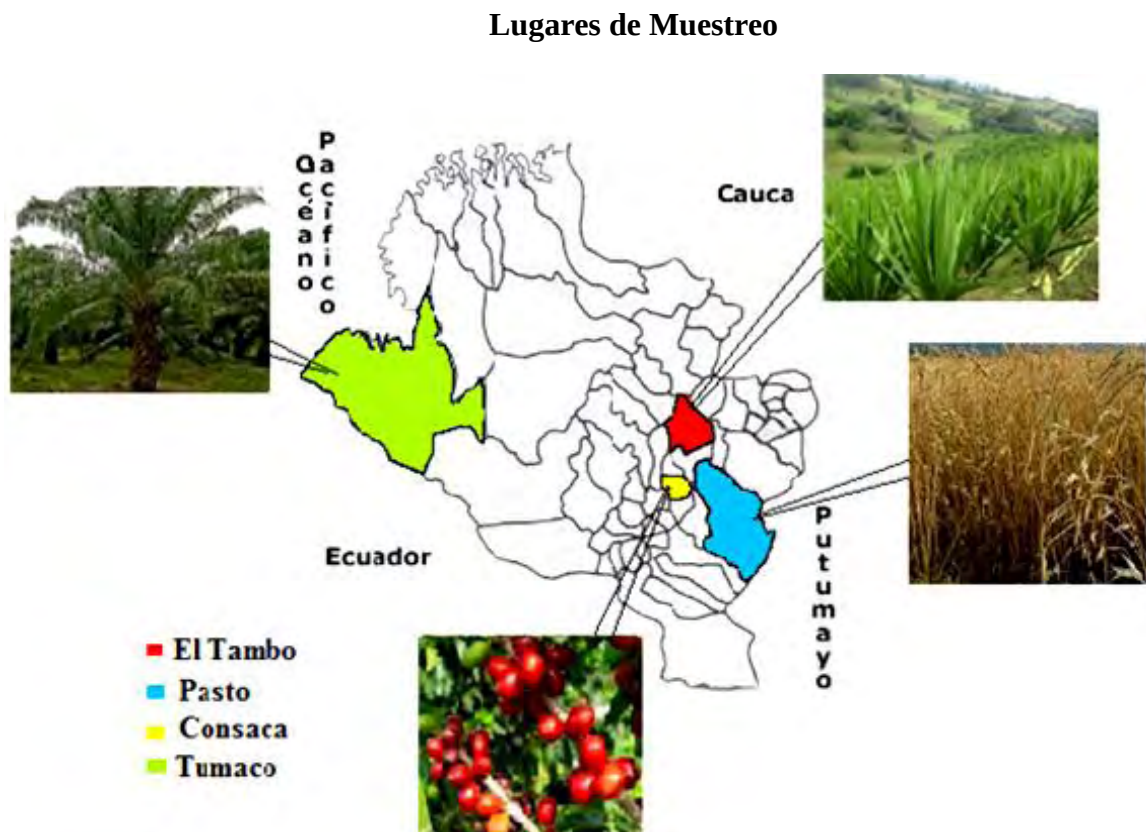
La actividad de la MnP es estimulada por la acción de lignina peroxidasas, presencia de sulfato de cobre (CuSO_4) y por sustratos como el lactato, el cual ayuda a la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} , igualmente el pH es un factor indispensable debido a que la enzima es inestable a pHs mayores a 7.5, en los cuales la determinación de la actividad es nula (Gómez, *et al.*, 2005).

3. METODOLOGÍA.

3.1. RECOLECCIÓN DE SUSTRATOS.

El bagazo de fique de la especie negra común (*Furcraea gigantea*) se recolectó de un cultivo ubicado en el municipio de El Tambo (Nariño) vereda capulí de Minas, Finca la Brisa. La pulpa de café (*Coffea arabica*) fue obtenida del municipio de Consacá (Nariño), el raquis de palma de aceite (*Elaeis guineensis*) de la zona Palmera de Tumaco (Nariño) y la granza de avena (*Avena sativa*) de Corpoica ubicado en el municipio de Pasto, todos estos sustratos provenientes de cultivos del departamento de Nariño (Figura 22). En cada caso se recolectaron muestras frescas que se mezclaron entre sí y se procedió a realizar el correspondiente cuarteo con lo cual se obtuvo una muestra representativa que sirvió para la obtención de cada sustrato (Figura 23).

Figura 22. Municipios de recolección de Sustratos.



Fuente: Gobernación de Nariño. Oficina departamental de turismo.

Figura 23. Recolección de sustratos.



Fuente: Esta investigación.

3.2. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS.

Para esta investigación, se trabajó con siete sustratos para el crecimiento del hongo *P. ostreatus* preparados a base de bagazo de fique, pulpa de café, raquis de palma de aceite y granza de avena. Las unidades productivas de los siete sustratos se codificaron teniendo en cuenta la tabla 1.

Tabla 1. Codificación de los sustratos.

SUSTRATO	CÓDIGO
Pulpa de café	T1
Pulpa de café con granza de avena	T2
Bagazo de fique	T3
Bagazo de fique con granza de avena	T4
Raquis de palma de aceite	T5
Raquis de palma de aceite con granza de avena	T6
Granza de avena	T7

Fuente: Esta investigación.

Las muestras se transportaron en sacas (sacos) para realizar el correspondiente pretratamiento. Los sustratos se sumergieron en agua (H_2O) con el fin de eliminar impurezas, tierra e insectos, en el caso del bagazo se realizaron varios lavados con agua (H_2O) caliente con el fin de eliminar el jugo de fique para evitar que sus componentes químicos actuaran como fungicida, inhibiendo el crecimiento de *P. ostreatus* (Benavides, O., 2013). Posteriormente, los materiales se escurrieron y se secaron al ambiente. Los materiales secos se picaron usando una máquina picadora de forraje, hasta obtener un material con tamaño promedio de partícula de 2 cm (Varnero, *et al.*, 2010) (Figura 24).

Figura 24. Pretratamiento de materiales lignocelulósicos. a) Lavado. b) secado. c) picado.



Fuente: Esta investigación.

Todos los materiales para el cultivo del hongo fueron acondicionados con carbonato de calcio ($CaCO_3$) grado analítico (Merck), al 2% en peso y con sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ grado analítico (Merck), al 1% en peso, adicionalmente tres de los tratamientos fueron enriquecidos con 30% de granza de avena (Tabla 2).

Tabla 2. Dosificación de tratamientos para la producción de *P. ostreatus*.

TRATAMIENTO	BAGAZO DE FIQUE (%)	PULPA DE CAFÉ (%)	RAQUIS DE PALMA DE ACEITE (%)	GRANZA DE AVENA (%)	SULFATO DE AMONIO (%)	CARBONATO DE CALCIO (%)
T1	97,00	-----	-----	-----	1,00	2,00
T2	67,00	-----	-----	30,00	1,00	2,00
T3	-----	97,00	-----	-----	1,00	2,00
T4	-----	67,00	-----	30,00	1,00	2,00
T5	-----	-----	97,00	-----	1,00	2,00
T6	-----	-----	67,00	30,00	1,00	2,00
T7	-----	-----	-----	97,00	1,00	2,00

Fuente: Esta investigación.

Finalmente, se incorporó agua (H₂O) hasta obtener el 70% de humedad (Rodríguez, *et al.*, 2001) (Figura 25).

Figura 25. Sustratos acondicionados.



Fuente: Esta investigación.

Los sustratos se empacaron en bolsas de polipropileno (con una varilla desinfectada se agujereó cada bolsa para permitir el intercambio gaseoso del sistema biológico) hasta completar 500 g por cada bolsa, para cada uno de los tratamientos se elaboraron seis unidades productivas. Posteriormente se cubrió cada bolsa con papel craft y se esterilizaron en autoclave Sterilof Mod. AUT/40/1PGR por una hora a 121°C (Figura 26) y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente para ser inoculados.

Figura 26. Preparación de los sustratos. a) Sustratos empacados en bolsas de polipropileno y papel craft. b) Esterilización del material.



Fuente: Esta investigación.

3.3. CULTIVO DEL HONGO *P. ostreatus*.

3.3.1. INOCULACIÓN.

Los sustratos se inocularon en cámara de flujo laminar, empleando micelio comercial de *P. ostreatus* (CP-50). Una vez realizada la siembra en razón del 2% por kg de sustrato se cerraron las bolsas en la parte superior (Figura 27).

Figura 27. Inoculación de sustratos. a) Cámara de flujo laminar. b) Micelio de *P. ostreatus* para inoculación de sustratos. c). Cierre de las bolsas de polipropileno.



Fuente: Esta investigación.

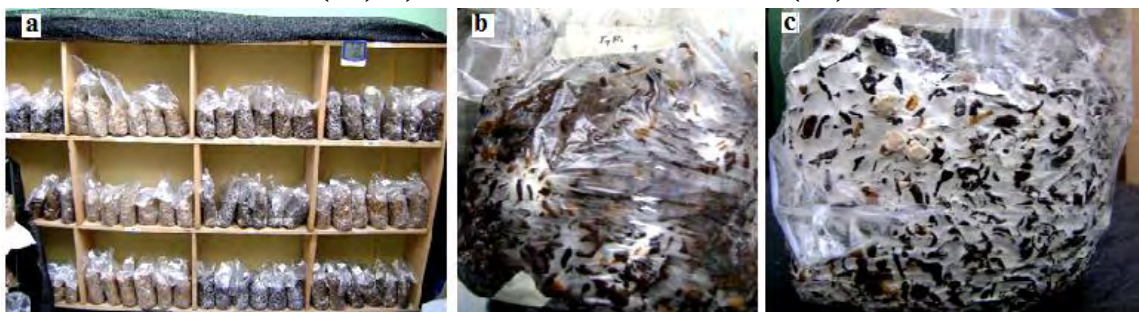
3.3.2. INCUBACIÓN.

Esta etapa se realizó en un espacio cerrado, libre de contaminaciones, provisto de paredes de ladrillo estucado, piso de cemento y teja plástica, que permitió la ventilación.

Las bolsas de los sustratos inoculados se dispusieron en estantes cubiertos con un sistema de penumbra removible, elaborado en malla negra. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA) (Anexo A).

El ambiente se mantuvo aireado y se humedeció constantemente para establecer una humedad relativa que varió del 60 al 80%. La temperatura ambiente se mantuvo entre 15 y 22°C. Para controlar estos parámetros se empleó un termohigrómetro digital. A diario se inspeccionaron todas las bolsas para determinar el crecimiento del micelio (Figura 28) y se evaluó la posible aparición de contaminantes.

Figura 28. Sustratos en proceso de invasión micelial. a) Sustratos recién inoculados. b) 7 días de invasión micelial (T1). c) 24 días de invasión micelial (T1)

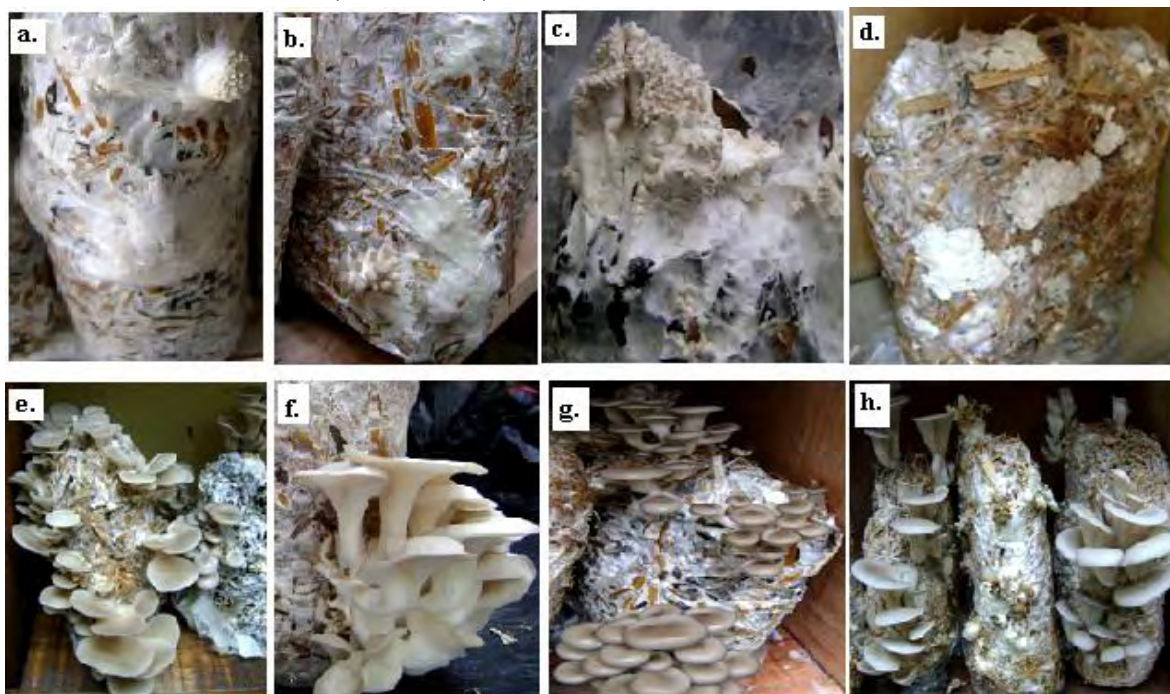


Fuente: Esta investigación.

3.3.3. FRUCTIFICACIÓN.

Cuando los sustratos fueron completamente colonizados, se abrieron las bolsas y se removió el sistema de penumbra. El medio ambiente permaneció aireado y fresco, para lo cual se humedecieron con más frecuencia las paredes y el piso del sitio de cultivo, hasta alcanzar alrededor del 90% de humedad relativa, requerida para la fructificación, la temperatura osciló entre 12 y 20 °C. Se realizó un seguimiento diario hasta la aparición y crecimiento de primordios (Figura 29).

Figura 29. Formación de primordios y setas. a) Formación de primordios (T2, 24 días). b) Formación de primordios (T7, 24 días). c) Formación de primordios (T1, 24 días). d) Formación de primordios (T6, 24 días). e) *P.ostreatus* en desarrollo (T2, 32 días). f) *P.ostreatus* en desarrollo (T7, 32 días). g) *P.ostreatus* en desarrollo (T1, 32 días). h) *P.ostreatus* en desarrollo (T6, 32 días).



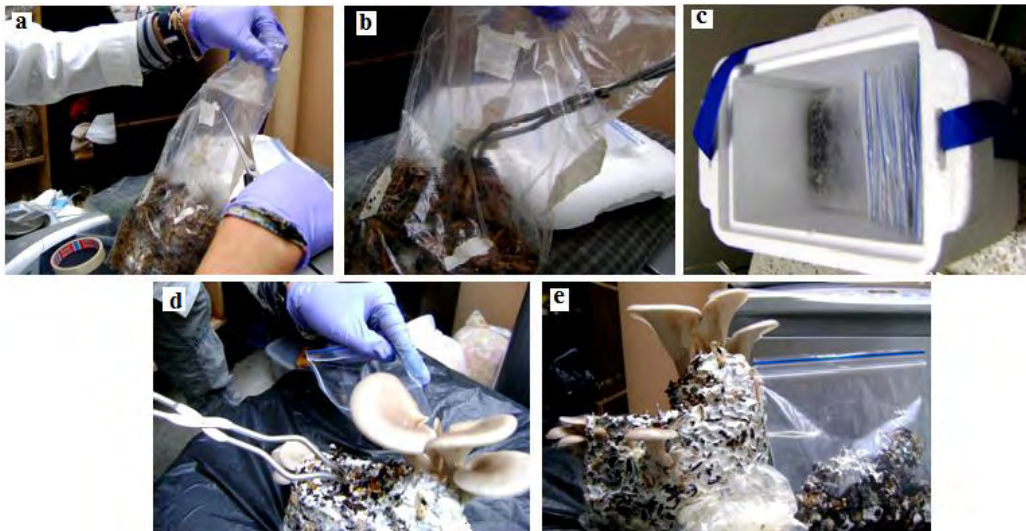
Fuente: Esta investigación.

3.4. MUESTREO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La actividad enzimática se evaluó en 7 tratamientos (T1 a T7), cada tratamiento contó con 3 repeticiones (R1 a R3) y por cada repetición se prepararon 6 bolsas, para un total de 126 bolsas. La determinación de la actividad enzimática tanto para lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa se realizó en 6 tiempos de producción micelial del hongo *P. ostreatus* correspondiente a los días 7, 14, 24, 32, 39 y 46.

Se muestreó la primera bolsa de cada repetición en todos los tiempos de producción, para lo cual el día 7, con una tijera esterilizada se realizó un pequeño corte en la parte superior de las bolsas de polipropileno, con una pinza esterilizada se tomó aproximadamente 10 g de sustrato, los cuales se depositaron en bolsas herméticas previamente esterilizadas. Las bolsas herméticas se transportaron en una nevera de icopor hasta el laboratorio de bioquímica de la Universidad de Nariño para la correspondiente medición de la actividad enzimática, al finalizar el muestreo las bolsas de polipropileno se sellaron con cinta. En el día 14, para realizar el muestreo únicamente se retiró la cinta y se realizó el procedimiento descrito anteriormente. Para el día 24 ya se había retirado las bolsas de polipropileno, porque ya se observó una completa invasión micelial y formación de primordios (Figura 30).

Figura 30. Muestreo para la determinación de la actividad enzimática. a y b) Muestreo día 7. c) Transporte de las muestras en nevera de icopor. d y e) Muestreo día 32.



Fuente: Esta investigación.

Tabla 3. Condiciones de desarrollo para el cultivo del hongo *P. ostreatus*.

Tiempo(Días)	Humedad relativa (%H.R)	Temperatura (°C)
7	72 – 73	16,2 - 17,3
14	65 – 74	15,9 - 17,2
24	62 – 65	15,6 - 16,7
32	70 – 80	13,6 - 14,5
39	71 - 68	14,8 – 15,8
46	70 – 73	14,5 – 14,9
Inducción	66 – 71	13,0 – 13,8

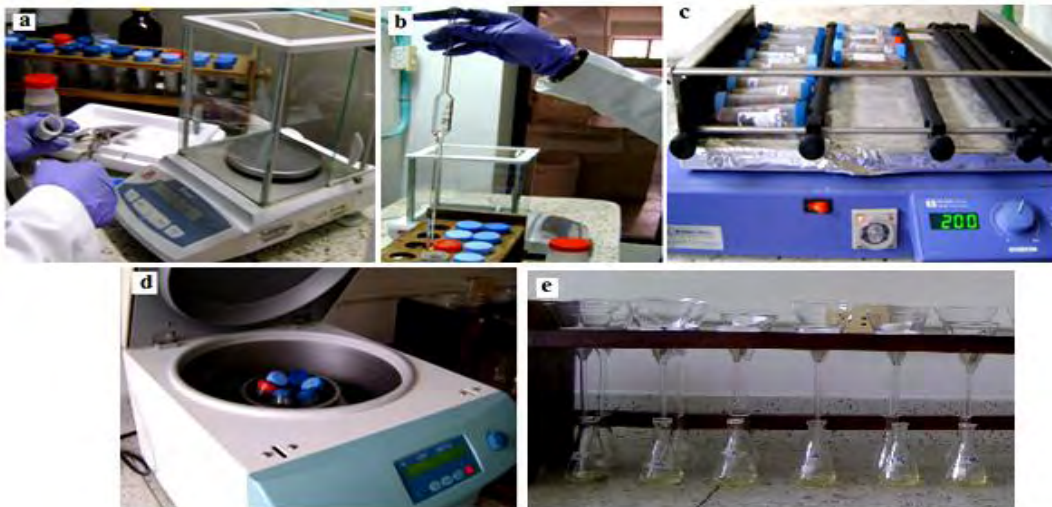
Fuente: Esta investigación.

3.5. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LACASA (Lac), LIGNINA PEROXIDASA (LiP) Y MANGANESO PEROXIDASA (MnP).

El extracto enzimático tanto para lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa se obtuvo de la siguiente manera: en tubos de centrifuga FALCON se pesaron 7,500 g de sustrato (en balanza de precisión Ohaus-pioneer) de cada bolsa de cultivo, se adicionó a cada tubo 30 mL de buffer acetato de sodio (CH_3COONa) 0,1M pH 5,0 (Gil *et al*).

Posteriormente los tubos se sometieron a agitación en un agitador recíproco IKA-WERKE HS 501 digital a 200 osc/min durante 10 minutos y se centrifugó en una centrifuga Hettich Zentrifugen universal 320 a 7000 r.p.m por 30 minutos. El sobrenadante se filtró a gravedad sobre papel filtro BOECO franja azul (Figura 31), finalmente el extracto se almacenó a 4 °C para una posterior medición de la actividad enzimática.

Figura 31. Preparación del extracto enzimático. a) Pesaje del sustrato. b) Adición de buffer acetato de sodio 0,1M pH 5,0. c) Agitación. d) Centrifugación. e) Filtración.



Fuente: Esta investigación.

3.5.1. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LACASA (Lac).

La actividad de la enzima lacasa se determinó mediante la oxidación de ABTS (Ácido 2,2'-azino bis(3-etilbencen-tiazolina-6-sulfónico)) al catión radical $ABTS^{\cdot+}$. El ensayo se realizó adicionando con una micropipeta directamente en una celda de cuarzo de 10mm, 1050 μ L de buffer acetato de sodio (CH_3COONa) 0,1M pH 5,0, 2100 μ L de extracto enzimático y 350 μ L de ABTS 1mM, para un volumen de reacción de 3,5 mL (modificado de Manjarrés *et al.*, 2012). Se generó una coloración azul debido a la oxidación del ABTS, para apreciar mejor la reacción los reactivos se adicionaron en el orden mencionado. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 MERCK ($\epsilon_{420nm}=36000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El blanco para esta medición se preparó con la adición de 1050 μ L de buffer acetato de sodio (CH_3COONa) 0,1M pH 5,0, 2100 μ L de extracto enzimático y el ABTS se reemplazó por 350 μ L de agua destilada.

Figura 32. Espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 MERCK.



Fuente: Esta investigación.

Una unidad de lacasa se define como un μmol de producto formado por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$), bajo las condiciones del ensayo. Las unidades enzimáticas (U/L) de lacasa se calculan utilizando la ecuación 11.

$$Lac \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times L} \right) = \frac{\Delta ABS \times Vr \times fd}{t \times \xi \times L \times Vm}$$

Ecuación 11.

Donde, ΔABS es la lectura de absorbancia final-lectura de absorbancia inicial, Vr es el volumen total de la reacción (mL), fd es el factor de dilución, ξ es el coeficiente de extinción molar, L es la longitud de la celda (cm), Vm es el volumen de la muestra (mL).

3.5.2. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINA PEROXIDASA (LiP).

La actividad de la enzima LiP se determinó mediante la oxidación de alcohol veratrílico a aldehído veratrílico. El ensayo se realizó adicionando con una micropipeta directamente en una celda de cuarzo de 10mm, 600 μL de buffer tartrato de sodio ($(\text{CHOHCOONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,25 M pH 3,0, 120 μL de alcohol veratrílico 10 mM (Alfa Aesar), 2250 μL de extracto enzimático y 30 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 4mM, para un volumen de reacción de 3,0 mL. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 310 nm en un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 MERCK ($\xi_{310\text{nm}} = 9,3 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El blanco para esta medición se preparó con la adición de 600 μL de buffer tartrato de sodio ($(\text{CHOHCOONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,25 M pH 3,0, 120 μL de alcohol veratrílico

10 mM, 2250 µL de extracto enzimático y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se reemplazó por 30 µL de agua destilada (modificado de Moreno, et al., 2008).

Una unidad de LiP se define como la cantidad de LiP requerida para oxidar 1 µmol de alcohol veratrílico por minuto (U= µmol/min), bajo las condiciones del ensayo. Las unidades enzimáticas (U/L) de LiP se calculan utilizando la ecuación 12.

$$LiP \left(\frac{\mu mol}{min \times L} \right) = \frac{\Delta ABS \times Vr \times fd}{t \times \xi \times L \times Vm}$$

Ecuación 12.

Donde, ΔABS es la lectura de absorbancia final-lectura de absorbancia inicial, Vr es el volumen total de la reacción (mL), fd es el factor de dilución, ξ es el coeficiente de extinción molar, L es la longitud de la celda (cm), Vm es el volumen de la muestra (mL).

3.5.3. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MANGANESO PEROXIDASA (MnP).

La actividad de MnP se determinó a partir de la oxidación del compuesto 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP). El ensayo se realizó adicionando con una micropipeta directamente en una celda de cuarzo de 10mm, 175 µL de sulfato de manganeso (MnSO₄) 0,4 mM, 1750 µL de 2,6-DMP 10mM (Alfa Aesar) en buffer acetato de sodio (CH₃COONa) 0,1 M pH 5,0, 1575 µL de extracto enzimático y 105 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 22 mM, para un volumen de reacción de 3,6 mL, los reactivos se deben adicionar en el orden mencionado. La absorbancia se registró a una longitud de onda de 468 nm en un espectrofotómetro UV-VIS PHARO 300 MERCK (ξ_{468nm}=10x10³ L mol⁻¹ cm⁻¹). El blanco para esta medición se preparó con la adición de 175 µL de sulfato de manganeso (MnSO₄) 0,4 mM, 1750 µL de 2,6-DMP 10mM en buffer acetato de sodio (CH₃COONa) 0,1 M pH 5,0, 1575 µL de extracto enzimático y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se reemplazó por 105 µL de agua destilada (modificado de Rangel, S., 2012).

Una unidad de actividad representa 1 µmol de producto oxidado de DMP por minuto. Las unidades enzimáticas (U/L) de MnP se calculan empleando la ecuación 13.

$$MnP \left(\frac{\mu mol}{min \times L} \right) = \frac{\Delta ABS \times Vr \times fd}{t \times \xi \times L \times Vm}$$

Ecuación 13.

Donde, ΔABS es la lectura de absorbancia final-lectura de absorbancia inicial, Vr es el volumen total de la reacción (mL), fd es el factor de dilución, ξ es el coeficiente de extinción molar, L es la longitud de la celda (cm), Vm es el volumen de la muestra (mL).

3.6. INDUCCIÓN SEGUNDA COSECHA.

Para la inducción, los sustratos lignocelulósicos fueron sumergidos en agua con el propósito de activar nuevamente el crecimiento del hongo *P. ostreatus*. Al completarse 15 días después de la inducción, se cosecharon los hongos y se realizó la última medición de la actividad enzimática.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para determinar la actividad enzimática en los siete sustratos de crecimiento del hongo *P. ostreatus*, se realizó un diseño experimental de medidas repetidas de dos factores con medidas repetidas en un factor, con el objetivo de comparar resultados y establecer si son significativamente distintos entre ellos.

Se analizaron 7 tratamientos (T1 a T7), cada tratamiento contó con 3 repeticiones (R1 a R3) y por cada repetición se prepararon 6 bolsas, para un total de 126 bolsas. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA) para efectos del cultivo del hongo. La determinación de la actividad enzimática se realizó en 6 tiempos de producción micelial del hongo *P. ostreatus* correspondiente a los días 7, 14, 24, 32, 39 y 46. Para lo cual se muestreó la primera bolsa de cada repetición en todos los tiempos de producción.

Para el tratamiento de los datos se empleó un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con *medidas repetidas* (MR), utilizando el programa SPSS.20.

Se trató, por tanto, de un diseño de dos factores: un factor inter-sujetos (al que se le denominó *sustrato*) con siete niveles (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7) y un factor intra-sujetos (al que se le denominó *tiempo*) con seis niveles (*día 7, día 14, día 24, día 32, día 39, día 46*). Como variable dependiente se utilizó la *actividad enzimática* (tanto para Lac, MnP y LiP).

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1. SUSTRATOS EMPLEADOS PARA EL CULTIVO DEL HONGO *P.ostreatus*.

Tabla 4. Composición química de celulosa y lignina en los sustratos empleados para el cultivo del hongo *P.ostreatus* (ver anexo B).

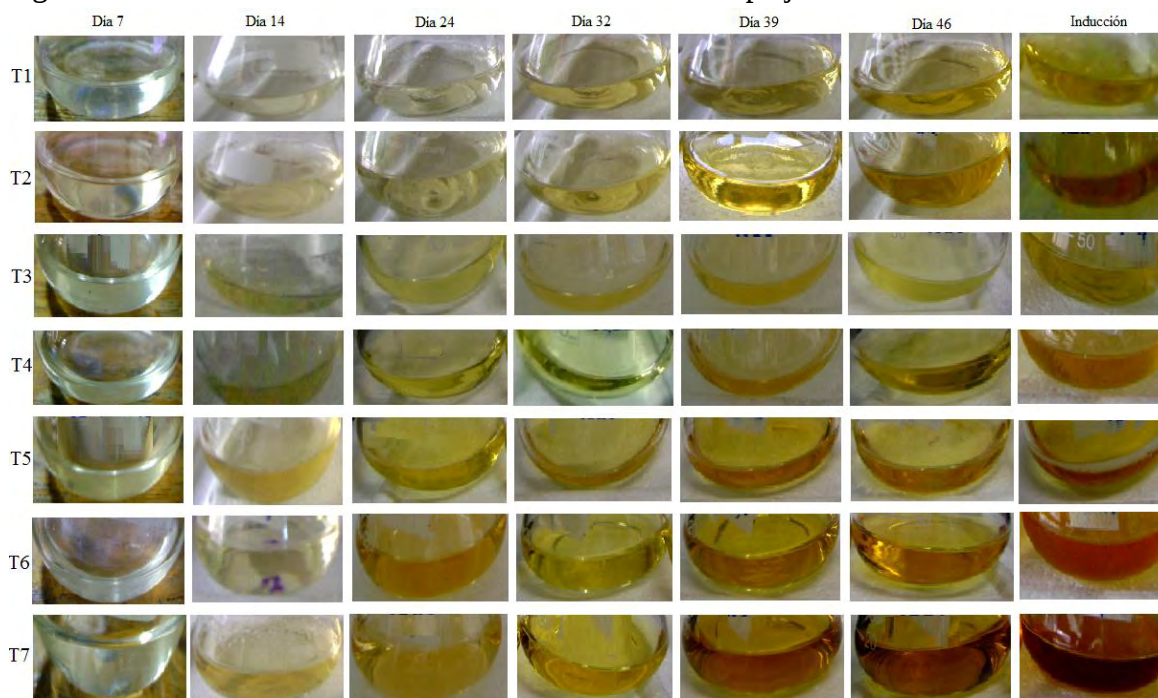
Sustratos	Parámetro		
	Humedad g/100g	Celulosa g/100g	Lignina g/100g
T1	74,9	31,8	21,8
T2	55,5	16,9	29,5
T3	37,3	44,5	15,7
T4	41,1	14,0	10,3
T5	56,3	19,5	10,0
T6	35,6	41,6	20,4
T7	13,1	23,2	7,26

Fuente: Esta investigación.

Estos sustratos presentan un alto contenido de lignina y celulosa (Tabla 4), por lo que se pueden considerar como residuos agroindustriales lignocelulósicos ideales para el cultivo en medio sólido del hongo comestible *P. ostreatus*, que es un hongo de pudrición blanca que degrada la lignina y la celulosa. Los hongos de pudrición blanca como el *P. ostreatus* degradan en primer lugar la lignina presente en la pared celular y dejan un tejido de color blanco compuesto principalmente de celulosa (Garzón, *et al.*, 2008).

En la figura 33 se observa el cambio en la intensidad de color en los extractos obtenidos en los diferentes días en los que se midió la actividad enzimática. El cambio de color está asociado al estado de maduración del sustrato (Manjarrés, *et al.*, 2010).

Figura 33. Intensidad de color de los extractos con el complejo enzimático.

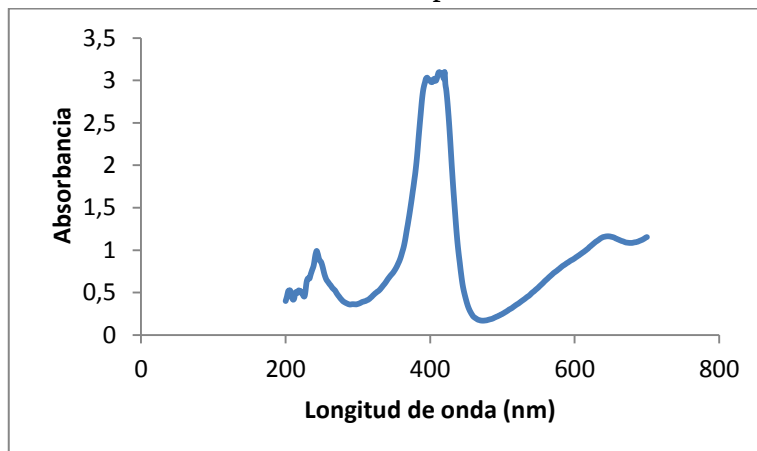


Fuente: Esta investigación.

5.2. DETERMINACIÓN DE MÁXIMOS DE ABSORCIÓN.

Una vez obtenidos los extractos enzimáticos de cada sustrato se determinó los máximos de absorción para cada enzima. La figura 34 muestra el espectro UV-Visible correspondiente a la oxidación enzimática del ABTS obtenida con la lacasa, en el espectro se observaron señales con máximos en $\lambda_1 = 420 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 646 \text{ nm}$, por lo que estas dos señales corresponden a los picos de máxima absorción del sustrato ABTS oxidado.

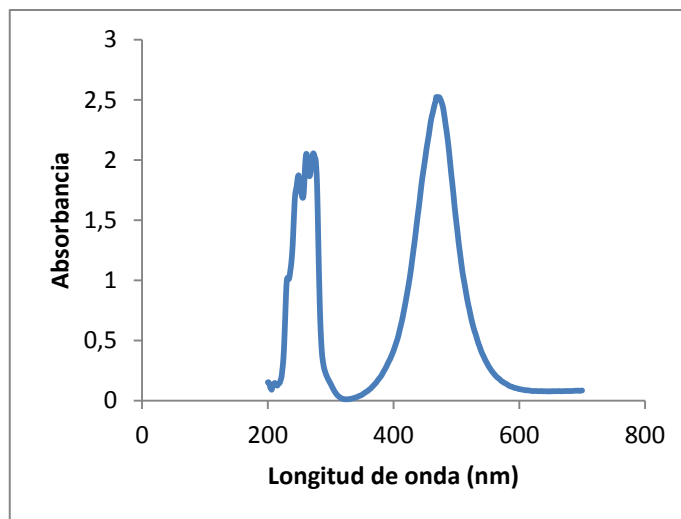
Figura 34. Espectros UV-Visible del ABTS oxidado por acción de la lacasa.



Fuente: Esta investigación.

La figura 35 indica el espectro UV-Visible que corresponde a la oxidación enzimática del 2,6 DMP por acción de la MnP, en el espectro se observan señales con máximos de absorción en $\lambda_1 = 272$ nm, $\lambda_2 = 468$ nm, estas dos señales corresponden a los picos de máxima absorción del 2,6 DMP oxidado.

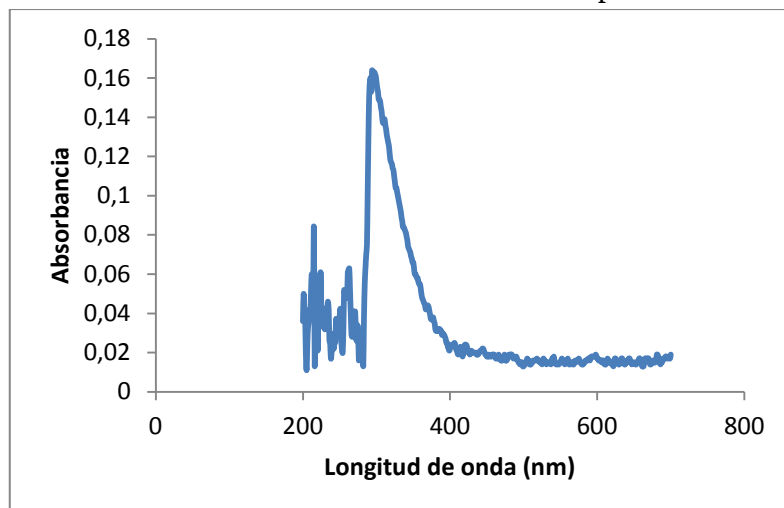
Figura 35. Espectros UV-Visible del 2,6 DMP oxidado por acción de la MnP.



Fuente: esta investigación.

La figura 36 indica el espectro UV-Visible que corresponde a la oxidación enzimática del alcohol veratrílico por acción de la LiP, en el espectro se observa una señal de máxima absorción correspondiente a una $\lambda=310$ nm, esta señal corresponde al pico de máxima absorción del aldehído veratrílico.

Figura 36. Espectros UV-Visible del alcohol veratrílico oxidado por acción de la LiP.



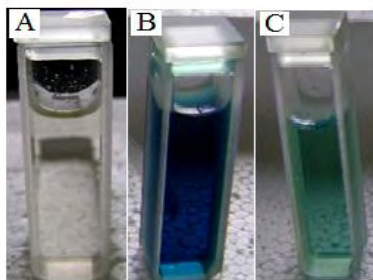
Fuente: Esta investigación.

5.3. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LACASA (Lac).

La determinación de la actividad enzimática es una forma de medir la cantidad de enzima que se forma durante el cultivo sólido en un sustrato determinado.

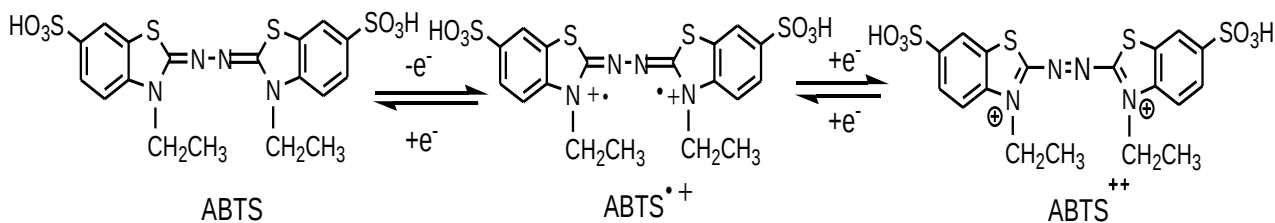
Para la determinación de la actividad enzimática de lacasa, se empleó ABTS. El ABTS fue oxidado por la enzima, la formación del producto de oxidación fue monitoreada a 420nm. Se generó una coloración azul debido a la oxidación del ABTS (Figura 37).

Figura 37. Medición de la actividad enzimática lacasa: A) Blanco de la medición. B) Coloración generada por la oxidación del ABTS. C) Dilución.



Fuente: Esta investigación.

Figura 38. Oxidación del ABTS.



Fuente: Wong, D., 2009.

En la figura 39 se presenta el comportamiento de la actividad lacasa del hongo *P. ostreatus* en los diferentes sustratos durante el tiempo de experimentación.

Tabla 5. Valores* de la actividad enzimática lacasa (U/L).

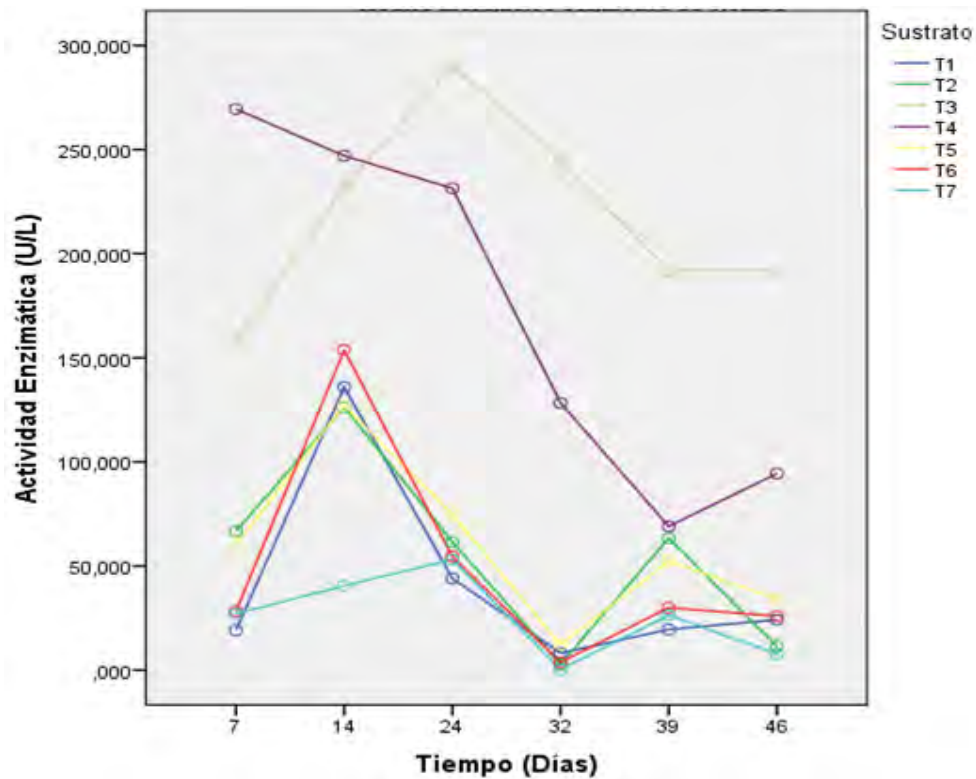
Días Sustratos	7	14	24	32	39	46
T1	19,119±0,543	135,983±0,785	44,033±0,785	8,225±0,346	19,496±0,876	24,187±1,085
T2	66,647±1,567	126,337±1,730	61,523±0,873	2,814±0,479	63,323±1,236	11,322±1,769
T3	157,711±1,980	231,996±1,999	290,123±0,931	244,959±1,784	191,769±1,958	192,233±1,429
T4	269,474±1,998	247,016±1,675	231,378±1,997	128,292±1,372	69,033±1,789	94,393±1,236
T5	60,084±1,789	127,057±1,259	74,743±1,652	12,212±1,872	52,315±1,942	34,321±1,530
T6	28,179±1,543	153,704±1,512	54,583±1,872	3,776±0,154	29,948±1,157	25,951±1,871
T7	27,066±1,652	40,484±1,694	53,086±0,982	0,334±0,004	26,415±1,621	7,680±1,750

* Corresponden al promedio obtenido a partir de tres réplicas, por cada réplica la medición se realizó por triplicado.

±Desviación estándar.

Fuente: Esta investigación.

Figura 39. Actividad de la enzima lacasa producida por *P. ostreatus* en los sustratos: Pulpa de café (T1), pulpa de café con granza de avena (T2), bagazo de fique (T3), bagazo de fique con granza de avena (T4), raquis de palma de aceite (T5), raquis de palma de aceite con granza de avena (T6), granza de avena (T7).



Fuente: Esta investigación.

Diferentes estudios llevados a cabo por Nyanhongo, *et al.*, (2002) y Guillén, *et al.*, (1998) han demostrado que la mayor actividad de lacasas y el nivel máximo de producción no es constante, este oscila entre 5 y 24 días de cultivo. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en este trabajo, ya que como se puede observar en la tabla 5 y en la figura 39, es entre el día 7 y el día 24 donde se encontraron los mayores valores de actividad lacasa en los diferentes sustratos, además se pudo constatar que los valores de actividad enzimática no son constantes, estos varían de un día de medición a otro, sin presentar una tendencia lineal de aumento o disminución. Esto sugiere que existen varios factores que pueden afectar la actividad de las lacasas, como el tipo de cepa, el sustrato y el tiempo de cultivo.

A partir del día 7 de cultivo ya se observa un valor en la producción de lacasa. Se obtuvo un máximo de actividad lacasa el día 14; en la pulpa de café, pulpa de café con granza de avena, raquis de palma de aceite y raquis de palma de aceite con granza de avena, por su parte en los sustratos bagazo de fique y granza de avena se alcanza un máximo de actividad lacasa en el día 24, mientras que en el bagazo de fique con granza de avena se alcanza un máximo el día 7. Luego, la actividad comienza a descender en todos los sustratos, aunque en el día 46 hay un leve aumento de esta actividad en los sustratos bagazo de fique y bagazo de fique con granza de avena, en el día 39 y en el día 46 hay un aumento de actividad en la pulpa de café, mientras que para el resto de sustratos este aumento de actividad se observa en el día 39 y luego desciende nuevamente. Este comportamiento es similar al reportado por Murrieta, *et al.* (2002), quienes evaluaron la producción de lacasa utilizando *Pleurotus pulmonarius* y *Trichoderma viride* sobre pulpa de café y al reportado por Manjarrés, *et al.*, (2010), que evaluaron la producción de lacasa utilizando *P. ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña.

En el estudio de Manjarrés, *et al.*, (2010) se encontró que el *P. ostreatus* produce mayor cantidad de lacasa (19.4 U/L) en el día 24 de cultivo utilizando como sustrato cáscara de plátano maduro suplementado con bagazo de caña (50/50) y la mayor actividad de lacasa en el estudio de Murrieta, *et al.* (2002) se obtuvo en el día 12 con un valor de 34.69 U/g sustrato y descendió en el día 16, debido a que el sustrato estaba cubierto completamente con el micelio (masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo), lo que indica el inicio de la fructificación. En esta etapa la producción de lacasa disminuye y comienza la producción de celulasas que se relaciona con el desarrollo de los primordios (cuerpos fructíferos en las primeras etapas de desarrollo) (Manjarrés, *et al.*, 2010). En el presente estudio se encontró un comportamiento parecido, donde la máxima actividad enzimática coincidió con el máximo crecimiento del micelio durante la fase vegetativa y decreció hasta aparecer los cuerpos fructíferos del hongo (Tabla 6).

Esta enzima puede utilizarse como un indicador morfogénético al mostrar el máximo crecimiento del micelio, y de esta manera obtener el tiempo que debe comenzar a fructificar el *P. ostreatus* (Manjarrés, *et al.*, 2010).

Tabla 6. Desarrollo de micelio y fructificación en el cultivo del hongo *P. ostreatus*.

ETAPA	DÍAS
Desarrollo del micelio	0-24
Período de fructificación	24-46

Fuente: Esta investigación.

Los valores de actividad lacasa obtenidos por litro de extracto (U/L) para cada uno de los sustratos de cultivo durante los 46 días se muestran en la tabla 5. Los resultados de la actividad de esta enzima tuvieron diferencias significativas entre sustratos. El sustrato bagazo de fique resultó ser el más adecuado para la producción de lacasa, presentándose una mayor concentración de ésta en un tiempo de 24 días (290,123 U/L), seguido del sustrato bagazo de fique con granza de avena en el cual en un tiempo de 7 días se encontró un valor de 269,474 U/L y en un tiempo de 14 días se encontró un valor de 247,016 U/L. Por otra parte, en el día 32 se obtuvieron los menores valores para la actividad enzimática en los sustratos raquis de palma de aceite con granza de avena (3,776 U/L), pulpa de café con granza de avena (2,814 U/L) y granza de avena (0,334 U/L), siendo este último sustrato el menos adecuado para la producción de lacasas, en la tabla 6 se puede observar que en el día 32 hay fructificación del hongo, es así como se puede decir que los máximos valores de actividad lacasa se obtuvieron en la etapa de desarrollo del micelio y los valores de actividad más bajos en la etapa de fructificación.

Con respecto a los resultados obtenidos, cabe mencionar que el sustrato bagazo de fique hacia el día 14 presentó contaminaciones de color verde (Figura 40), por ello se realizó una caracterización de microorganismos (hongos) en este sustrato (ANEXO F), la prueba para levaduras y bacterias dio negativa, sin embargo, se encontró que el hongo *P. ostreatus* estaba creciendo en co-cultivo con los hongos *Trichoderma spp.* y *Penicillium spp.*

Figura 40. Contaminación en bagazo de fique.



Fuente: Esta investigación.

Los sustratos pueden sufrir contaminaciones por esporas de mohos contaminantes, como los del género *Trichoderma*, durante la siembra. Sin embargo los síntomas de contaminación se pueden observar claramente dos semanas después en la superficie de las bolsas inoculadas, cuando el sustrato ha sido cubierto por ambos antagonistas y las esporas verdes están presentes en la zona invadida por *Trichoderma*, tal como ocurrió en el presente estudio.

Con respecto a esta situación se tiene que la producción de enzimas ligninolíticas (lacasa y manganeso peroxidasa) para su aplicación en la biotecnología ambiental, se ha basado únicamente en la inducción química y en el uso de cepas genéticamente modificadas, ambas estrategias resultan costosas. Por lo tanto, es de interés científico encontrar otras alternativas para la producción de enzimas ligninolíticas. Una de las estrategias poco exploradas, es el co-cultivo de hongos ligninolíticos (HL) con hongos microscópicos de suelo (HMS), como estrategia para la sobreproducción de enzimas ligninolíticas, bajo el fundamento, que en las interacciones interespecíficas, existe una competencia por recursos lo que favorece a algunas rutas metabólicas, y la producción de enzimas, como la lacasa, sin embargo en estos casos la actividad de lacasa únicamente es producida por los HL y no por los HMS.

Se ha reportado entonces, que la adición de ciertos compuestos aromáticos al medio de cultivo, así como los co-cultivos con *Trichoderma spp.* incrementan la formación de la lacasa y/o regulan la síntesis de algunas isoformas (Velázquez, *et al.*, 2007). En estudios previos se observó que en co-cultivos líquidos de *P. ostreatus* CP-50-*Trichoderma viride* se incrementó la actividad de lacasa y se modificó el patrón de isoformas (Murrieta, *et al.*, 2002).

En otro estudio, se evaluó el co-cultivo de *Penicillium oxalicum* mutante SAUE-3.510 y *P. ostreatus* MTCC 1804 para la producción de una mezcla de lacasa-xilanasa bajo condiciones de cultivo en estado sólido. En las condiciones estudiadas, el co-cultivo de *Penicillium oxalicum* mutante y *P. ostreatus* resultó en un incremento en los niveles de producción de xilanasa y lacasa, este aumento fue del 58 y 33%, respectivamente (Dwivedi, *et al.*, 2011), demostrando así que co-cultivos con *Penicillium spp.* también aumentan la actividad lacasa.

Esto justifica que en este estudio el bagazo de fique fuera el mejor sustrato para la producción de la enzima lacasa.

5.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA ACTIVIDAD LACASA (Lac).

En la tabla 7 se indican los resultados del análisis estadístico ANOVA con las correcciones de medidas repetidas.

Tabla 7. Pruebas de efectos intra-sujetos.

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig. (p-valor)
Tiempo	Esfericidad asumida	463969,708	5	92793,942	63,416	0,000
	Greenhouse-Geisser	463969,708	2,529	183439,936	63,416	0,000
	Huynh-Feldt	463969,708	2,943	157672,136	63,416	0,000
	Límite-inferior	463969,708	1,000	463969,708	63,416	0,000
Tiempo * Sustrato	Esfericidad asumida	378469,778	30	12615,659	8,622	0,000
	Greenhouse-Geisser	378469,778	15,176	24939,298	8,622	0,000
	Huynh-Feldt	378469,778	17,656	21436,076	8,622	0,000
	Límite-inferior	378469,778	6,000	63078,296	8,622	0,000
Error(Tiempo)	Esfericidad asumida	409710,547	280	1463,252		
	Greenhouse-Geisser	409710,547	141,639	2892,633		
	Huynh-Feldt	409710,547	164,787	2486,305		
	Límite-inferior	409710,547	56,000	7316,260		

Fuente: Esta investigación.

La tabla de pruebas de efectos intra-sujetos (Tabla 7) muestra los estadísticos univariados referidos al tiempo y a la interacción Tiempo*Sustrato, ya que al tener una $Sig=0,000$, se puede rechazar la hipótesis nula, referida al factor tiempo, por lo tanto se puede afirmar que el efecto del factor tiempo es significativo y concluir que la actividad enzimática no es la misma en los seis días de tratamiento.

Y en lo referente al efecto de la interacción Tiempo*Sustrato se concluye que existe efecto significativo de la interacción y por lo tanto la actividad enzimática no es la misma tanto en el tiempo como en el tipo de sustrato.

Tabla 8. Comparaciones múltiples DHS de Tukey.

Sustrato		Sustratos	p-valor	Sustrato		Sustratos	p-valor
T1*	Vs	T2*	0,884	T4*	Vs	T1	0,000
		T3	0,000			T2	0,000
		T4	0,000			T3	0,003
		T5*	0,649			T5	0,000
		T6*	0,993			T6	0,000
		T7*	0,774			T7	0,000
T2*	Vs	T1*	0,884	T5*	Vs	T1*	0,649
		T3	0,000			T2*	0,999
		T4	0,000			T3	0,000
		T5*	0,999			T4	0,000
		T6*	0,998			T6*	0,958
		T7*	0,126			T7	0,045
T3*	Vs	T1	0,000	T6*	Vs	T1*	0,993
		T2	0,000			T2*	0,998
		T4	0,003			T3	0,000
		T5	0,000			T4	0,000
		T6	0,000			T5*	0,958
		T7	0,000			T7*	0,352

Sustrato		Sustratos	p-valor
T7*	Vs	T1*	0,774
		T2*	0,126
		T3	0,000
		T4	0,000
		T5	0,045
		T6*	0,352

(*) Indica que no existe diferencia significativa entre los sustratos.

Fuente: Esta investigación.

Al rechazar la hipótesis nula que manifiesta que entre las medias no existe diferencia significativa la tabla de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 8), permite comparar las medias para cada par de grupos para poder, así, identificar dónde se producen las diferencias significativas.

Es decir el resultado de estas comparaciones para el caso de la actividad lacasa en la pulpa de café con relación a la actividad lacasa en la pulpa de café enriquecida con granza de avena hace entender que no existen diferencias significativas $p > 0,05$ ($p=0,884$), mientras que con la actividad lacasa en el bagazo de fique si existen diferencias significativas $p < 0,05$ ($p=0,000$). Debido a las diferencias significativas encontradas, se realizó la prueba de análisis de subconjuntos homogéneos de Tukey. En la tabla 9, se exponen los subconjuntos formados para la variable actividad enzimática con relación al tipo de sustrato.

Tabla 9. Subconjuntos homogéneos.

Sustrato	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T7	9	25,84422			
T1	9	41,84041	41,84041		
T6	9	49,35698	49,35698		
T2	9	55,32769	55,32769		
T5	9		60,12198		
T4	9			173,26448	
T3	9				218,13181
Sig.		0,126	0,649	1,000	1,000

Fuente: Esta investigación.

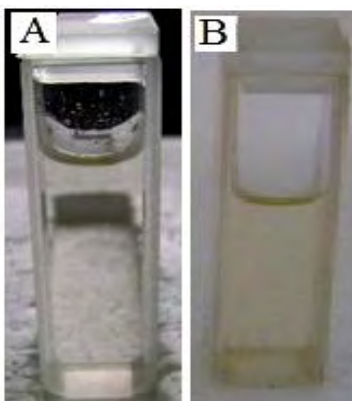
Según la similitud existente entre los valores de actividad enzimática de lacasa se encuentran cuatro subconjuntos de agrupación, en el primer subconjunto se tiene que en la pulpa de café enriquecida con granza de avena se encontró la mayor actividad enzimática del hongo *P. ostreatus*, mientras que en el grupo dos en el raquis de palma de aceite se presentó una mayor actividad, en el subconjunto tres y cuatro es en el bagazo de fique enriquecido y no enriquecido, en los únicos sustratos que no se presentó homogeneidad con relación a los otros subconjuntos y es en los que se encontró la mayor actividad en cada grupo respectivamente.

Se observa también que las actividades enzimáticas en los sustratos pulpa de café, raquis de palma de aceite con granza y pulpa de café con granza se encuentran en dos grupos ya que estadísticamente no existe diferencia significativa en las medias de los valores de dichas actividades y pueden ser considerados en uno u otro grupo.

5.4. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINA PEROXIDASA (LiP).

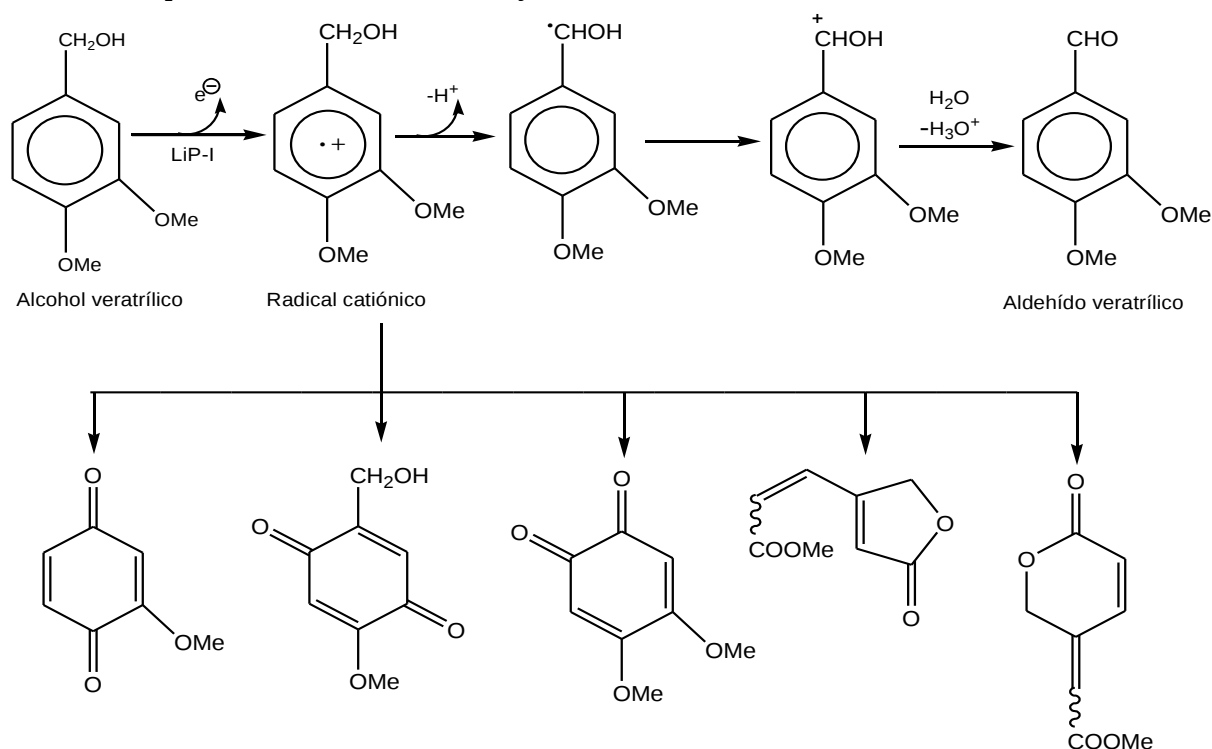
Para la determinación de la actividad enzimática de la LiP, se empleó alcohol veratrílico. El radical catiónico del alcohol veratrílico en ausencia de otros compuestos con los que puede reaccionar, como por ejemplo el polímero de lignina, puede evolucionar descomponiéndose de forma no enzimática dando lugar a varios productos de forma parecida a como lo hacen los dímeros modelo o el polímero de lignina. El aldehído veratrílico es el mayoritario, por ello la formación de este compuesto se monitoreó a 310nm, aunque también se pueden producir quinonas e incluso la apertura del anillo aromático (Wong, D., 2009) (Figura 42).

Figura 41. Medición de la actividad enzimática lignina peroxidasa. A) Blanco de la medición. B) Después de la reacción de oxidación.



Fuente: Esta investigación.

Figura 42. Mecanismo de oxidación del alcohol veratrílico por la LiP, que resulta en una variedad de productos de reacción incluyendo el aldehído veratrílico.



Fuente: Basado en Ruiz, F., 1998, Wong, D., 2009.

En trabajos realizados, mediante cultivo en medio sólido con *P. ostreatus*, por Gupte, *et al.*, (2007), Guillén, *et al.*, (1998), Vyas, *et al.*, (1995) no se detectó actividad enzimática de la LiP para el hongo *P. ostreatus*. Gupte, *et al.*, (2007) utilizaron como sustrato paja de trigo, paja de arroz, rastrojo de maíz y cáscaras de coco. Guillén, *et al.*, (1998), trabajaron con cultivo en medio sólido en un biorreactor con sustrato sólido compuesto por dextrosa, extracto de levadura y agar. Vyas, *et al.*, (1995) utilizaron cultivo en medio sólido con paja como sustrato. En los tres trabajos realizados, la actividad lignina peroxidasa se midió por el método de Tien, *et al.*, (1984).

Según Lankinen, P., (2004), *P. ostreatus* no es un hongo productor de LiP, esto es apoyado por Vyas, *et al.*, (2007) quienes no detectaron esta enzima utilizando el mismo hongo en un cultivo sólido empleando como sustrato paja, de igual manera ocurrió en el trabajo realizado por Ha, *et al.*, (2001) quienes utilizaron extracto de salvado como medio de producción de enzimas ligninolíticas, encontrando que la LiP no se expresó bajo las condiciones de cultivo estandarizadas; sin embargo, los datos

generados en el estudio de Fernández , *et al.*, (2007) mostraron que *P. ostreatus* produjo aproximadamente 0,18 U/L de LiP durante la remoción de color de NR5 a 150 ppm, del mismo modo ocurrió en el ensayo realizado por Moreno, *et al.*, (2008) donde se tuvo una expresión enzimática constante en todos los tratamientos con un valor aproximadamente de 2,8 U/L.

En otro estudio realizado por Vaca, *et al.*, (2014), quienes cultivaron en rastrojo de maíz las cepas 404 y 2171 del hongo comestible *P. ostreatus*. La actividad lignina peroxidasa en ninguno de los casos presentó valores altos, en comparación con las otras actividades medidas (celulolítica, MnP), sino que se mantuvo con valores que tendían a cero.

La producción de MnP y Lac es mayor que la producción de LiP con *P.ostreatus*. Baldrian, *et al.*, (2006) reportaron valores de 22 ± 6 U/L para Lac y de $1,6 \pm 0,3$ U/L para MnP después de 28 días, confirmando al mismo tiempo que no se encontró actividad de LiP. Aunque autores como Palmieri, *et al.*, (1997), manifiestan que los hongos del género *Pleurotus* no son productores de LiP, en la tabla 10 se muestra que hay hongos de este género que si la producen, incluyendo *P. ostreatus*.

Tabla 10. Tipos de enzimas oxidativas producidas por hongos de pudrición blanca.

Hongos de pudrición blanca	Enzimas oxidativas			
	LiP	MnP	Lac	AAO
<i>Coriolus versicolor</i>	X	X	X	
<i>Cyathus bulleri</i>	X	X	X	
<i>Oudemansiella radicata</i>	X		X	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	X	X		
<i>Phlebia radiata</i>	X	X	X	
<i>Phlebia tremellosus</i>	X		X	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	X	X	X	
<i>Pleurotus eryngii</i>	X	X	X	X
<i>Pleurotus floridae</i>				
<i>Pleurotus ostreatus</i>	X	X	X	X
<i>Pleurotus sajoi-caju</i>	X	X	X	X
<i>Trametes versicolor</i>	X	X	X	X
<i>Bjerkandera adusta</i>	X	X		X
LiP: Lignina Peroxidasa, MnP: Manganese Peroxidasa, Lac: Lacasa, AAO: Aril alcohol oxidasa, X: Indica presencia de actividad enzimática.				

Fuente: Duarte, A., 2004

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con trabajos realizados previamente, ya que como se puede observar en la tabla 11 y en la figura 43, la actividad LiP medida durante los seis días de muestreo presentó valores con tendencia a cero, se puede mencionar entonces que se alcanzó una máxima actividad para LiP (1,053 U/L) el día 46 en el sustrato bagazo de fique, siendo este sustrato el que mejor se comportó durante todas las mediciones. Por otra parte en el sustrato raquis de palma de aceite fue en el que se presentó valores más bajos de actividad LiP. Este hecho indica que posiblemente el metabolismo de este género de hongos no produce en las condiciones de estudio mayores actividades para la LiP (Manjarres, *et al.*, 2011).

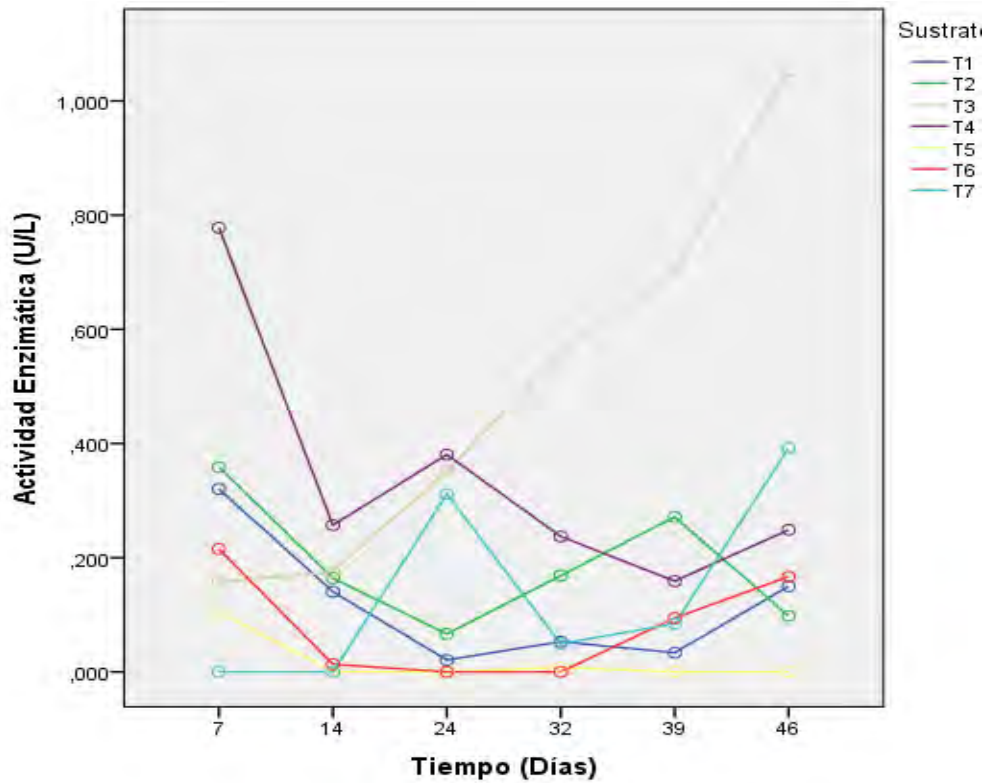
Tabla 11. Valores* de la actividad enzimática lignina peroxidasa (U/L).

Días Sustratos	7	14	24	32	39	46
T1	0,320±0,030	0,140±0,045	0,021±0,001	0,053±0,015	0,034±0,003	0,150±0,006
T2	0,359±0,032	0,164±0,016	0,066±0,009	0,169±0,015	0,271±0,005	0,098±0,008
T3	0,158±0,064	0,175±0,029	0,352±0,012	0,558±0,016	0,705±0,024	1,053±0,019
T4	0,778±0,011	0,257±0,018	0,381±0,009	0,237±0,032	0,159±0,013	0,249±0,002
T5	0,105±0,022	0,000±0,000	0,000±0,000	0,008±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000
T6	0,215±0,066	0,013±0,002	0,000±0,000	0,000±0,000	0,094±0,014	0,169±0,002
T7	0,0000±0,000	0,000±0,000	0,311±0,003	0,049±0,004	0,084±0,001	0,392±0,003

* Corresponden al promedio obtenido a partir de tres réplicas, por cada réplica la medición se realizó por triplicado.
±Desviación estándar.

Fuente: Esta investigación.

Figura 43. Actividad de la enzima lignina peroxidasa producida por *P. ostreatus* en los sustratos: Pulpa de café (T1), pulpa de café con granza de avena (T2), bagazo de fique (T3), bagazo de fique con granza de avena (T4), raquis de palma de aceite (T5), raquis de palma de aceite con granza de avena (T6), granza de avena (T7).



Fuente: Esta investigación.

Debido a que la menor generación enzimática se da para esta enzima, la LiP producida por el hongo *P. ostreatus* no podría tener aplicabilidad comercial.

La enzima LiP se descubrió en cultivos ligninolíticos de *Phanerochaete chrysosporium*, y parece ser la enzima de mayor proporción en el complejo enzimático de las ligninasas (Duarte, A., 2004), por ello el empleo de *P. chrysosporium*, podría ser una mejor opción para la producción de esta enzima.

Tabla 12. Aplicaciones potenciales de las enzimas y microorganismos ligninolíticos.

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

Fuente: Duarte, A., 2004.

5.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA ACTIVIDAD LIGNINA PEROXIDASA (LiP).

En la tabla 13 se indican los resultados del análisis estadístico ANOVA con las correcciones de medidas repetidas.

Tabla 13. Pruebas de efectos intra-sujetos.

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig. (p-valor)
Tiempo	Esfericidad asumida	1,790	5	,358	14,378	0,000
	Greenhouse-Geisser	1,790	3,066	,584	14,378	0,000
	Huynh-Feldt	1,790	3,611	,496	14,378	0,000
	Límite-inferior	1,790	1,000	1,790	14,378	0,000
Tiempo * Sustrato	Esfericidad asumida	8,711	30	,290	11,665	0,000
	Greenhouse-Geisser	8,711	18,396	,474	11,665	0,000
	Huynh-Feldt	8,711	21,668	,402	11,665	0,000
	Límite-inferior	8,711	6,000	1,452	11,665	0,000
Error(Tiempo)	Esfericidad asumida	6,970	280	,025		
	Greenhouse-Geisser	6,970	171,698	,041		
	Huynh-Feldt	6,970	202,233	,034		
	Límite-inferior	6,970	56,000	,124		

Fuente: Esta investigación.

La tabla de pruebas de efectos intra-sujetos (Tabla 13) muestra los estadísticos univariados referidos al tiempo y a la interacción Tiempo*Sustrato, se presenta una $Sig=0,000$, por lo cual se puede rechazar la hipótesis nula, referida al factor tiempo, por lo tanto es posible afirmar que el efecto del factor tiempo es significativo y concluir que la actividad enzimática no es la misma en los seis días de tratamiento.

Y en lo referente al efecto de la interacción Tiempo*Sustrato se concluye que existe una diferencia significativa en la interacción y por lo tanto la actividad enzimática no es la misma tanto en el tiempo como en el tipo de sustrato.

Tabla 14. Comparaciones múltiples DHS de Tukey.

Sustrato		Sustratos	p-valor	Sustrato		Sustratos	p-valor
T1*	Vs	T2*	0,131	T4*	Vs	T1	0,000
		T3	0,000			T2	0,000
		T4	0,000			T3	0,000
		T5	0,004			T5	0,000
		T6*	0,757			T6	0,000
		T7*	0,987			T7	0,000
T2*	Vs	T1*	0,131	T5*	Vs	T1	0,004
		T3	0,000			T2	0,000
		T4	0,000			T3	0,000
		T5	0,000			T4	0,000
		T6	0,002			T6*	0,202
		T7*	0,504			T7	0,000
T3*	Vs	T1	0,000	T6*	Vs	T1*	0,757
		T2	0,000			T2	0,002
		T4	0,000			T3	0,000
		T5	0,000			T4	0,000
		T6	0,000			T5*	0,202
		T7	0,000			T7*	0,287

Sustrato		Sustratos	p-valor
T7*	Vs	T1*	0,987
		T2*	0,504
		T3	0,000
		T4	0,000
		T5	0,000
		T6*	0,287

(*) Indica que no existe diferencia significativa entre los sustratos.

Fuente: Esta Investigación.

Al rechazar la hipótesis nula que menciona que entre las medias no existe diferencia significativa, la tabla de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 14), permite comparar las medias correspondientes a cada par de grupos para poder así, identificar dónde se producen las diferencias significativas.

Por ejemplo el resultado de estas comparaciones indica que la actividad LiP en la pulpa de café con relación a la actividad LiP en la pulpa de café con granza de avena no presenta diferencias significativas $p > 0,05$ ($p=0,131$), mientras que con relación a la actividad en el bagazo de fique indica que por lo menos un tratamiento es significativamente diferente $p < 0,05$ ($p=0,000$).

Debido a las diferencias significativas encontradas, se realizó la prueba de análisis de subconjuntos homogéneos de Tukey. En la tabla 15, se expone los subconjuntos formados para la variable actividad enzimática con relación al tipo de sustrato.

Tabla 15. Subconjuntos homogéneos.

Sustrato	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
T5	9	,01887				
T6	9	,08163	,08163			
T1	9		,11963	,11963		
T7	9		,13954	,13954		
T2	9			,18785		
T4	9				,34335	
T3	9					,50019
Sig.		0,202	0,287	0,131	1,000	1,000

Fuente: Esta Investigación.

Según la similitud existente entre los valores de actividad enzimática de LiP se encuentran cinco subconjuntos de agrupación entre los cuales no presentan diferencias estadísticamente significativas, en el primer subconjunto se tiene que en el raquis de palma de aceite con granza de avena se presentó una mayor actividad enzimática, mientras que en el grupo dos, es en la granza de avena donde se presentó una mayor actividad LiP, en el subconjunto tres, en la pulpa de café con granza de avena se presentó una mayor actividad enzimática y en los subconjuntos cuatro y cinco es en el bagazo de fique enriquecido y no en los únicos sustratos que no se presentó homogeneidad con relación a los otros subconjuntos y es en los que se encontró la mayor actividad en cada grupo respectivamente.

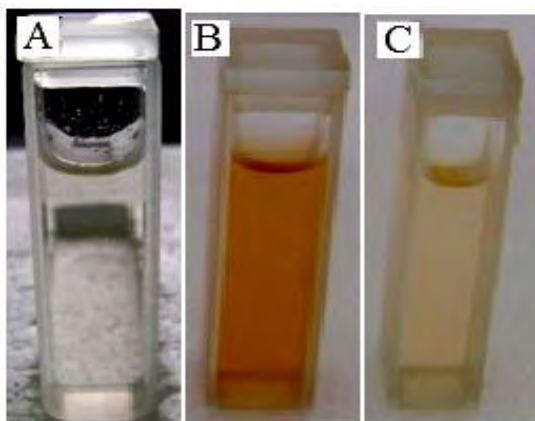
Se observa también que las actividades LiP en los sustratos raquis de palma de aceite con granza de avena, pulpa de café y granza de avena se encuentran en dos grupos

ya que estadísticamente no existe diferencia significativa en las medias de los valores de estas actividades y pueden ser considerados en uno u otro grupo.

5.5. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MANGANESO PEROXIDASA (MnP).

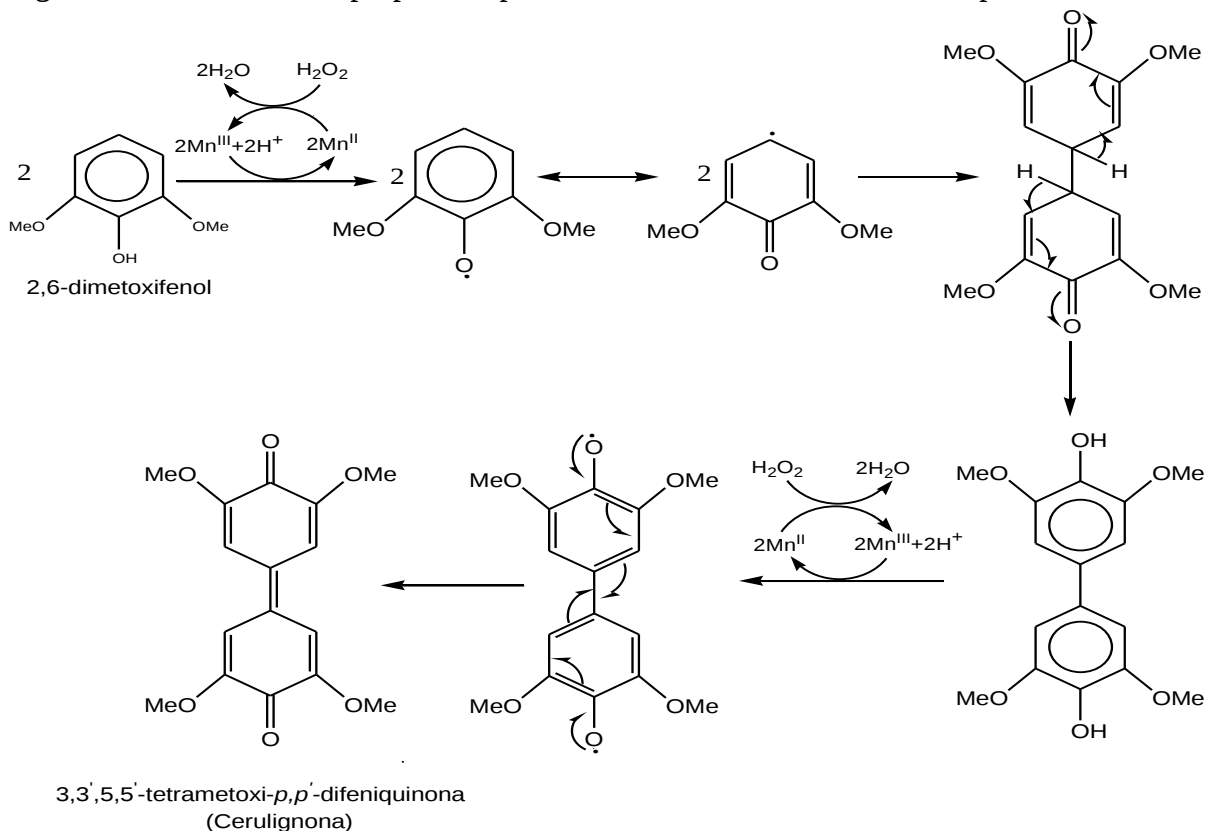
Para el caso de la MnP, la valoración de la actividad enzimática fue indirecta (oxidación del 2,6-DMP dependiente de Mn^{2+}) usando H_2O_2 como sustrato. La enzima oxida el sulfato de manganeso ($MnSO_4$) a Mn^{3+} , este último es el encargado de oxidar dos moléculas de 2,6-DMP. En la reacción se forma un dímero denominado cerulignona (3,3',5,5'-tetrametoxi-*p,p'*-difeni quinona), resultado de la oxidación de las dos moléculas de 2,6-DMP (Figura 45), cuya formación fue seguida a 468 nm, producto de la oxidación se generó una coloración anaranjada (Figura 44).

Figura 44. Medición de la actividad enzimática manganeso peroxidasa: A) Blanco de la medición. B) Coloración generada por la oxidación del 2,6-DMP. C) Dilución.



Fuente: Esta investigación.

Figura 45. Mecanismo propuesto para la oxidación del 2,6-DMP por la MnP.



Fuente: Wariishi, *et al.*, 1992.

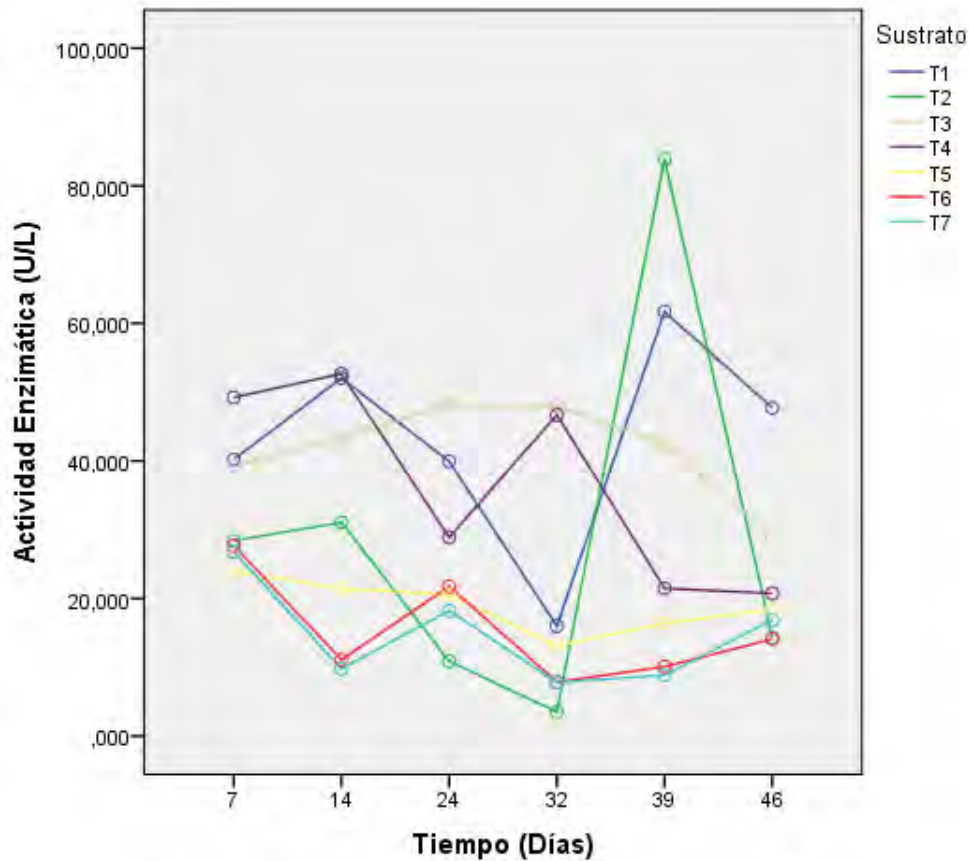
Tabla 16. Valores* de la actividad enzimática manganeso peroxidasa (U/L).

Días Sustratos	7	14	24	32	39	46
T1	40,214±1,049	52,056±1,009	39,928±0,789	16,007±1,754	61,710±1,908	47,711±1,344
T2	28,422±1,340	31,058±1,232	10,885±1,499	3,535±1,641	83,873±1,989	14,318±1,901
T3	39,309±1,940	43,372±0,132	48,168±0,366	47,990±1,575	42,470±1,680	28,911±1,564
T4	49,231±1,850	52,662±0,768	28,891±1,890	46,693±1,822	21,476±1,564	20,747±1,749
T5	23,980±1.450	21,400±0,543	20,600±0,677	13,138±1,442	16,398±1,901	18,413±1,866
T6	27,698±1,450	11,097±1,965	21,770±0,954	7,848±1,957	10,095±1,297	14,115±1,804
T7	26,772±1,721	9,785±1,561	18,235±1,980	7,813±1,879	8,839±1,483	16,862±1.111

* Corresponden al promedio obtenido a partir de tres réplicas, por cada réplica la medición se realizó por triplicado.
±Desviación estándar.

Fuente: Esta investigación.

Figura 46. Actividad de la enzima manganeso peroxidasa producida por *P. ostreatus* en los sustratos: Pulpa de café (T1), pulpa de café con granza de avena (T2), bagazo de fique (T3), bagazo de fique con granza de avena (T4), raquis de palma de aceite (T5), raquis de palma de aceite con granza de avena (T6), granza de avena (T7).



Fuente: Esta investigación.

A partir del día 7 de cultivo ya se observa un valor en la producción de MnP. Se obtuvo un máximo de actividad MnP el día 39; en la pulpa de café y en la pulpa de café con granza de avena, en el sustratos bagazo de fique con granza de avena se alcanzó un máximo de actividad MnP el día 14, por su parte en los sustratos raquis de palma de aceite, raquis de palma de aceite con granza de avena y granza de avena se alcanzó un máximo de actividad en el día 7, mientras que en el bagazo de fique se alcanzó un máximo de actividad MnP el día 24. Como se puede observar en la figura 46, los valores de actividad enzimática son variables, no se puede establecer un patrón de aumento o descenso de esta actividad, sin embargo cabe mencionar que las actividades enzimáticas

del hongo *P. ostreatus* cultivado en el bagazo de fique fueron las únicas que se comportaron de manera robusta durante todas las mediciones.

Los valores de actividad MnP obtenidos por litro de extracto (U/L) para cada uno de los sustratos de cultivo durante los 46 días se muestran en la tabla 16. Los resultados de la actividad de esta enzima tuvieron diferencias significativas entre sustratos. El sustrato pulpa de café con granza de avena resultó ser el más adecuado para la producción de MnP, teniendo una mayor concentración de ésta en un tiempo de 39 días (83,873 U/L), seguido del sustrato pulpa de café que para el mismo tiempo de producción del hongo reportó un valor de 61,710 U/L. Por otra parte, entre los días 32 y 46 se obtuvieron los menores valores para la actividad MnP.

Vaca, *et al.*, (2014) determinaron los días de máxima producción de las enzimas celulolítica, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa en los extractos obtenidos durante el cultivo en rastrojo de maíz de las cepas 404 y 2171 del hongo comestible *P. ostreatus*. En este estudio la actividad manganeso peroxidasa presentó sus máximos valores en el período de desarrollo del micelio, resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo, a excepción de lo ocurrido con los sustratos pulpa de café con granza de avena y pulpa de café, por otra parte cabe mencionar que es entre los días 32 y 46 (etapa de fructificación del hongo) en donde se obtuvieron los valores más bajos de actividad MnP.

Por otra parte, Montoya, *et al.*, (2009) evaluaron las actividades enzimáticas de Lac y MnP de los hongos *Pleurotus spp.* y *Lentinula edodes* sobre varios residuos agroindustriales. Cuando se cultivó *P. ostreatus* en aserrín de roble, se encontró que las mediciones enzimáticas comprendidas entre los días 6 y 28 de cultivo arrojaron valores bajos para MnP (valores comprendidos entre 2 y 3 UE/g s.s. min), mientras que para el día 37 se presentó un máximo de actividad MnP (13 UE/g s.s. min), estos resultados son equiparables a los obtenidos en el presente trabajo (Tabla 16), ya que para el sustrato pulpa de café con granza de avena durante los primeros cuatro días de muestreo, se obtuvieron valores bajos de MnP y para el día 39 esta actividad creció notoriamente.

Sobre sustratos lignocelulósicos, los hongos crecen a tasas lineales ya que enfrentan impedimentos estéricos y de accesibilidad. Para ello deben ponerse en íntimo contacto con el sustrato. Por una parte, lo hacen prolongando sus hifas hasta los lugares donde se encuentran los nutrientes, lo penetran y colonizan, valiéndose de estructuras especializadas. Por otra parte, secretan al medio una gran cantidad y variedad de enzimas

que son las responsables de transformar las grandes moléculas del medio en moléculas más simples y así poder absorberlas e ingresarlas en su metabolismo. Aquí la especificidad del sustrato es crítica para el desarrollo del cultivo en fase sólida ya que las cantidades de celulosa y lignina y su disposición son inherentes al sustrato y su biodegradación depende de la capacidad del organismo. Respecto de esto último es de destacar que los hongos de la podredumbre blanca, *Pleurotus* entre ellos, poseen enzimas capaces de degradar lignina no para su consumo sino que lo hacen para poder acceder a la celulosa. Como todo organismo en primera instancia toma los compuestos más simples mientras que ataca a los compuestos complejos para disponer de ellos cuando los simples se agoten.

Las anteriores enzimas son expresadas por hongos de la podredumbre blanca como un proceso idiofásico, el cual está ligado a la limitación de carbono y/o nitrógeno o sulfato en el medio y su síntesis es particularmente activa con altas tensiones de oxígeno (Gómez, *et al.*, 2005). Diferencias en cuanto al contenido de lignina y celulosa de los diferentes sustratos, así como también diferencias en cuanto a propiedades físicas, hicieron que las actividades enzimáticas tanto para lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa variaran dependiendo del sustrato que se utilizó para el cultivo del hongo *P. ostreatus*.

5.5.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDASA (MnP).

En la tabla 17 se presentan los resultados del análisis de varianza con medidas repetidas realizados para determinar la actividad enzimática de la enzima MnP, con relación al tipo de sustrato y al tiempo de producción del hongo.

Tabla 17. Pruebas de efectos intra-sujetos. Resultados del análisis estadístico ANOVA con las correcciones de Medidas repetidas.

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig. (p-valor)
Tiempo	Esfericidad asumida	11095,889	5	2219,178	12,467	0,000
	Greenhouse-Geisser	11095,889	2,400	4623,956	12,467	0,000
	Huynh-Feldt	11095,889	2,783	3986,801	12,467	0,000
	Límite-inferior	11095,889	1,000	11095,889	12,467	0,001
Tiempo * Sustrato	Esfericidad asumida	55150,828	30	1838,361	10,328	0,000
	Greenhouse-Geisser	55150,828	14,398	3830,473	10,328	0,000
	Huynh-Feldt	55150,828	16,699	3302,655	10,328	0,000
	Límite-inferior	55150,828	6,000	9191,805	10,328	0,000
Error(Tiempo)	Esfericidad asumida	49839,663	280	177,999		
	Greenhouse-Geisser	49839,663	134,381	370,884		
	Huynh-Feldt	49839,663	155,857	319,779		
	Límite-inferior	49839,663	56,000	889,994		

Fuente: Esta investigación.

La tabla de pruebas de efectos intra-sujetos (Tabla 17) muestra los estadísticos univariados referidos al tiempo y a la interacción Tiempo*Sustrato, ya que al tener una $Sig=0,000$, se puede rechazar la hipótesis nula, referida al factor tiempo, por lo tanto se puede afirmar que el efecto del factor tiempo es significativo y concluir que la actividad enzimática no es la misma en los seis días de tratamiento.

Y en lo referente al efecto de la interacción Tiempo*Sustrato se concluye que existe efecto significativo de la interacción y por lo tanto la actividad enzimática no es la misma tanto en el tiempo como en el tipo de sustrato.

Tabla 18. Comparaciones múltiples DHS de Tukey.

Sustrato		Sustratos	p-valor	Sustrato		Sustratos	p-valor
T1*	Vs	T2	0,018	T4*	Vs	T1*	0,727
		T3*	1,000			T2*	0,477
		T4*	0,727			T3*	0,879
		T5	0,000			T5	0,001
		T6	0,000			T6	0,000
		T7	0,000			T7	0,000
T2*	Vs	T1	0,018	T5*	Vs	T1	0,000
		T3	0,040			T2*	0,242
		T4*	0,477			T3	0,000
		T5*	0,242			T4	0,001
		T6	0,034			T6*	0,977
		T7	0,021			T7*	0,944
T3*	Vs	T1*	1,000	T6*	Vs	T1	0,000
		T2	0,040			T2	0,034
		T4*	0,879			T3	0,000
		T5	0,000			T4	0,000
		T6	0,000			T5*	0,977
		T7	0,000			T7*	1,000

Sustrato		Sustratos	p-valor
T7*	Vs	T1	0,000
		T2	0,021
		T3	0,000
		T4	0,000
		T5*	0,944
		T6*	1,000

(*) Indica que no existe diferencia significativa entre los sustratos.

Fuente: Esta Investigación.

Al rechazar la hipótesis nula que entre las medias no existe diferencia significativa, la tabla de comparaciones múltiples de Tukey (Tabla 18), permite comparar las medias para cada par de grupos y así identificar dónde se producen las diferencias significativas.

Por lo tanto el resultado de estas comparaciones indican que en algunas actividades enzimáticas si hay diferencias significativas, es decir comparando la actividad MnP en la pulpa de café con respecto a la actividad MnP en la pulpa con granza, se encuentra $p < 0,05$ ($p=0,018$), mientras que con respecto a la actividad enzimática en el bagazo de fique indica que no existe diferencia significativa $p > 0,05$ ($p=1,000$).

Al encontrar que existe diferencia significativa, se realizó la prueba de análisis de subconjuntos homogéneos de Tukey. En la tabla 19, se exponen los subconjuntos formados para la variable actividad enzimática con relación al tipo de sustrato.

Tabla 19. Subconjuntos homogéneos.

Sustrato	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
T7	9	14,71776			
T6	9	15,43728			
T5	9	18,98828	18,98828		
T2	9		28,68187	28,68187	
T4	9			36,61694	36,61694
T3	9				41,70352
T1	9				42,93767
Sig.		,944	,242	,477	,727

Fuente: Esta investigación.

Según la similitud existente entre los valores de actividad enzimática de MnP se han formado cuatro subconjuntos de agrupación, en el primer subconjunto se tienen tres actividades enzimáticas, en el raquis de palma de aceite la actividad MnP fue mayor, mientras que en el grupo dos se encuentran dos actividades enzimáticas, siendo ésta mayor en la pulpa de café enriquecida con granza de avena, en el subconjunto tres en el bagazo de fique con granza de avena se encontró mayor actividad MnP y en el grupo cuatro es en la pulpa de café donde se presentó un máximo valor de actividad enzimática.

Se observa también que las actividades MnP en los sustratos raquis de palma de aceite, pulpa de café con granza y el bagazo de fique enriquecido con granza se encuentran en dos grupos ya que estadísticamente no existen diferencias significativas en las medias de los valores y pueden ser consideradas en uno u otro grupo.

Como se puede observar en las figuras 39, 43 y 46, la actividad enzimática (actividad Lac, actividad MnP y actividad LiP) del hongo *P. ostreatus* medida a lo largo del tiempo en los diferentes sustratos, no es constante. En general las enzimas ligninolíticas no se producen de modo constante, sino que su síntesis es inducida por el sustrato adecuado y es reprimida por azúcares fácilmente utilizables, en particular glucosa (Montoya, S., 2008).

La mayor actividad lacasa del hongo *P. ostreatus* se presentó en el bagazo de fique (290,123 U/L), sin embargo no se debe descartar que también se obtuvo un máximo de actividad enzimática en el bagazo de fique con granza de avena (231,378U/L) para el mismo tiempo de producción (día 24).

La actividad lignina peroxidasa medida fue baja en todos los tiempos de producción del hongo con relación a las actividades lacasa y manganeso peroxidasa, destacándose que en el bagazo de fique y bagazo de fique con granza de avena se encontraron los valores más altos de actividad lignina peroxidasa (1,053 y 0,778 U/L, día 46 y día 7, respectivamente), independientemente del tipo de sustrato empleado en trabajos previos se reporta una baja o nula actividad lignina peroxidasa del hongo *P. ostreatus*. Gil, L., (2012), emplearon raquis de palma de aceite para el crecimiento de *P. ostreatus* encontraron que la actividad lignina peroxidasa fue casi nula en el sustrato sin suplemento.

La mayor actividad manganeso peroxidasa del hongo *P. ostreatus* se presentó en la pulpa de café con granza de avena (83,873 U/L), sin embargo se destaca también que se obtuvo un máximo de actividad enzimática en la pulpa de café (61,710U/L) para el mismo tiempo de producción (día 39).

No se encontraron trabajos previos en los que se haya empleado bagazo de fique, raquis de palma de aceite, pulpa de café o granza de avena (a excepción del estudio realizado por Gil, L., 2012) para el cultivo del hongo *P. ostreatus* y para la medición de la actividad enzimática (Lac, LiP y MnP). Las comparaciones que se hicieron a lo largo del presente trabajo van enfocadas a asociar el comportamiento de la actividad enzimática con las etapas de desarrollo del micelio y periodos de fructificación del hongo, así como también se tuvo en cuenta las contaminaciones que aparecieron en el cultivo, sin embargo el sustrato empleado es fundamental en este tipo de estudios.

La estructura química y el grado de entrecruzamiento de los componentes que forman los materiales lignocelulósicos, están relacionadas con el material de origen del cual proceden. Igualmente, la estructura de los materiales lignocelulósicos determina sus

propiedades mecánicas, la resistencia al ataque de microorganismos, enzimas, agentes químicos y establece la dificultad de degradar este tipo de materiales. Por lo que se puede asegurar, que la naturaleza del sustrato y el método de pretratamiento usado, influye sobre la eficiencia de degradación del material lignocelulósico cuando se utilizan enzimas (Salcedo, *et al.*, 2011).

La velocidad y extensión de la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos se ve influenciada no solamente por la eficiencia de las enzimas, sino también por las características fisicoquímicas y morfológicas, expresada en la heterogeneidad de los sustratos lignocelulósicos. Por esto, se hace necesaria la utilización de sistemas muy selectivos (enzimas), para la degradación de este tipo de materiales (Salcedo, *et al.*, 2011).

Por lo anterior se debería realizar una microscopía electrónica de barrido (MEB) de las fibras de bagazo de fique, pulpa de café, raquis de palma de aceite y granza de avena para apreciar la estructura interna que tienen las fibras y de esta manera comparar la disposición de las fibras en los diferentes residuos y ver de qué manera la disposición de estas fibras afecta la actividad enzimática.

Por otra parte se encontró que la presencia de macronutrientes y micronutrientes en los diferentes sustratos lignocelulósicos influye tanto en la producción del hongo *P. ostreatus* como en la producción de enzimas ligninolíticas.

Ciertos minerales son necesarios para el crecimiento del hongo *P. ostreatus*, como es el caso del azufre (S) (necesario para ciertos aminoácidos como cisteína y metionina) el cual es requerido en pequeñas cantidades alrededor de 10^{-4} M. El fosfato es necesario para formar ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos de membrana, entre otros; siendo requerido en una concentración alrededor de 10^{-3} M, al igual que el potasio y el magnesio (que activan gran número de enzimas), deben de estar presentes en la misma concentración. Cuando el sustrato presenta deficiencia en algunos minerales, estos pueden ser añadidos para completar los valores requeridos.

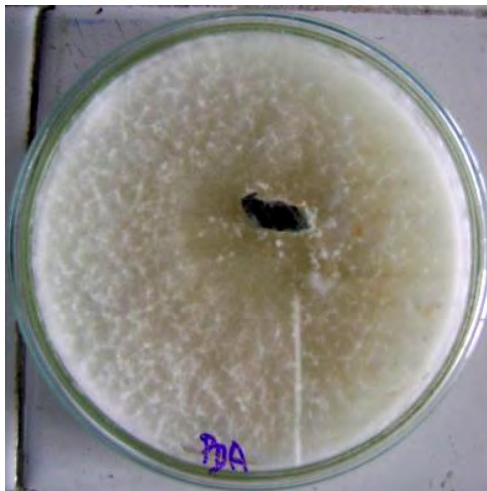
La presencia de metales en el medio juega un rol importante en la regulación de la actividad enzimática extracelular, procesos que son de suma importancia para la adquisición de carbono y de energía por el micelio de los hongos; siendo uno de los factores importantes que afectan el proceso de biodegradación del sustrato. Se ha encontrado que el cobre induce la producción de la enzima lacasa y también afecta la

actividad y estabilidad de la enzima en *P. ostreatus*. En cuanto al cobre, los hongos requieren aproximadamente 10^{-6} M. Otro elemento traza es el zinc, el cual se requiere en una cantidad de alrededor de 10^{-8} M, por su parte el manganeso debe estar presente en una cantidad de 10^{-7} M y el hierro en una cantidad de 10^{-6} M (Heredia, *et al.*, 2014).

5.6. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE *P. ostreatus*.

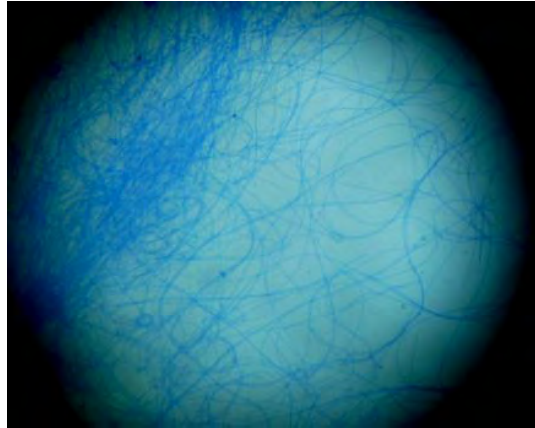
Según las características coloniales del hongo *P. ostreatus* (Figura 47) macroscópicamente se observa que presentan crecimiento micelial de color blanco, una textura algodonosa con abundante micelio aéreo en el medio de cultivo PDA, microscópicamente presenta hifas de paredes delgadas con fíbulas (Figura 48) (Pérez, R., 2006). Las morfologías coinciden con lo reportado por Pedroza, A., (2007) y Fernández, *et al.*, (2007), quienes trabajaron con *P. ostreatus*.

Figura 47. Macroscopía de *P. ostreatus*. Cultivo de 6 días, PDA, residuo pulpa de café.



Fuente: Esta investigación.

Figura 48. Microscopía de *P. ostreatus*.



Fuente: Esta investigación.

5.7. MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DEL SUSTRATO DE FIQUE.

5.7.1. *Penicillium spp.*

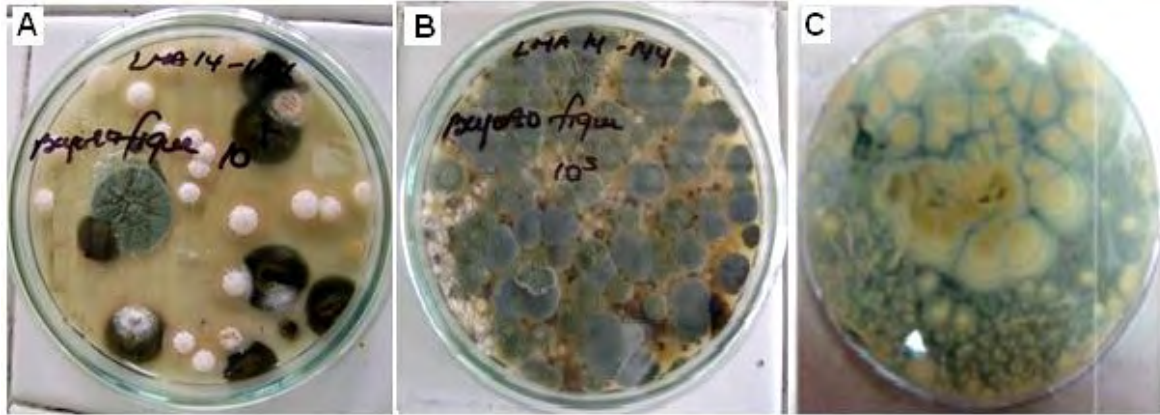
Es un microorganismo proveniente del reino fungi, del orden *Eurotiales*, de la clase *Eurotiomycetes*, de la familia *Trichocomaceae* y del género *Penicillium* (Ramón, P., 2012).

Es un hongo filamentoso, heterótrofo, aerobio facultativo, que se desarrolla en un rango de temperatura entre 22 y 30 °C y en un pH óptimo de 5.6, además producen sustancias antimicrobianas (Baquero, J., 2005).

Las colonias inicialmente son blancas y vellosas, las esporas son pigmentadas, de color verde, azul verdoso, amarillas, la superficie de la colonia puede ser: algodonosa, aterciopelada o pulverulenta, presentan exudados en la superficie y pigmentación en el reverso (Ramón, P., 2012).

Sus características microscópicas consisten en un conidióforo hialino, tabicado libremente y ramificado dando lugar a fialidades bifurcadas con cadenas de esporas (Ramón, P., 2012).

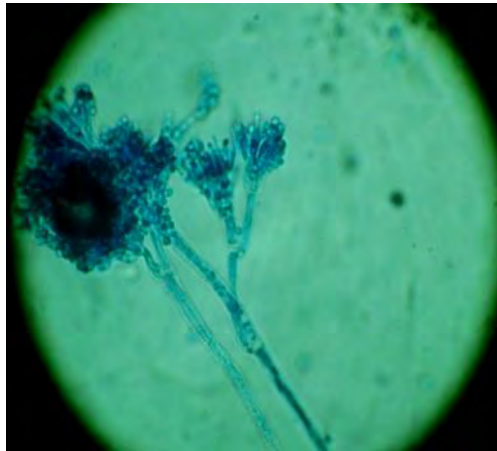
Figura 49. Colonia de *Penicillium spp.* A) Dilución 10^5 . B) Dilución 10^3 . C) Reverso de la caja Petri de la dilución 10^3 .



Fuente: Esta investigación.

La colonia que se observa en la figura 49 presenta un color verde, la superficie de la colonia tiene un aspecto aterciopelado y en el reverso de la caja Petri tiene una pigmentación amarillenta, características propias de una colonia de *Penicillium spp.*, en la figura 49. También se puede observar una colonia de *P. ostreatus*, la cual presenta un color blanco.

Figura 50. Estructura microscópica de una colonia de *Penicillium spp.*



Fuente: Esta investigación.

La estructura microscópica que se observa en la figura 50, presenta un conidióforo hialino, tabicado libremente, se puede evidenciar unas fialidades ramificadas

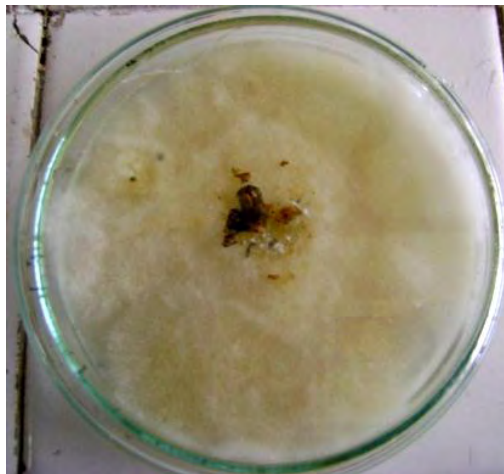
seguidas de esporas agrupadas en forma de cadena, características que generalmente presenta una estructura de *Penicillium spp.*

La colonia del hongo antes descrita se encontró presente en el bagazo de fique, en las diluciones 10^3 y 10^5 .

5.7.2. *Trichoderma spp.*

Este género pertenece al grupo de hongos Deuteromicetes u hongos imperfectos, al orden hifales (Moniliales) y se caracteriza por presentar conidióforos hialinos no verticilados, muchas veces blanquecinos, presenta micelio septado, conidias generalmente ovaladas, fíalides singulares, conidias unicelulares coloreadas, de rápido crecimiento (Hermosa, *et al.*, 2000). Este hongo es un agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo. Estos hongos aparecen en forma de manchas de color verde, amarillentas o negras sobre el sustrato, invade rápidamente el sustrato y obstaculiza el crecimiento del micelio de *P. ostreatus* mediante la producción de toxinas y antibióticos, al tiempo que ocasionan un descenso del nivel de pH hasta valores de 4-5 que son más favorables para su desarrollo.

Figura 51. Colonia de *Trichoderma spp.*



Fuente: Esta investigación.

La figura 51 presenta una colonia con pigmentación amarilla-verdosa en algunas zonas, comprobándose la presencia de contaminación, el revés de las colonias es usualmente no coloreado, amarillo, ámbar o amarillo-verde, y muchas especies producen

grandes cantidades de clamidosporas en cultivo sumergido. Su presencia se ve favorecida por alta humedad en el ambiente y en el sustrato, así como por la alta temperatura, luz directa, entre otros (Howell, C., 2003). Al realizar una tinción con azul de lactofenol se identificaron principalmente estructuras típicas de *Trichoderma spp.* como conidióforos e hifas septadas, hialinias (Fernandes, L.,2005) (figura 52).

Figura 52. Estructura microscópica de una colonia de *Trichoderma spp.*



Fuente: Esta investigación.

5.8. INDUCCIÓN SEGUNDA COSECHA.

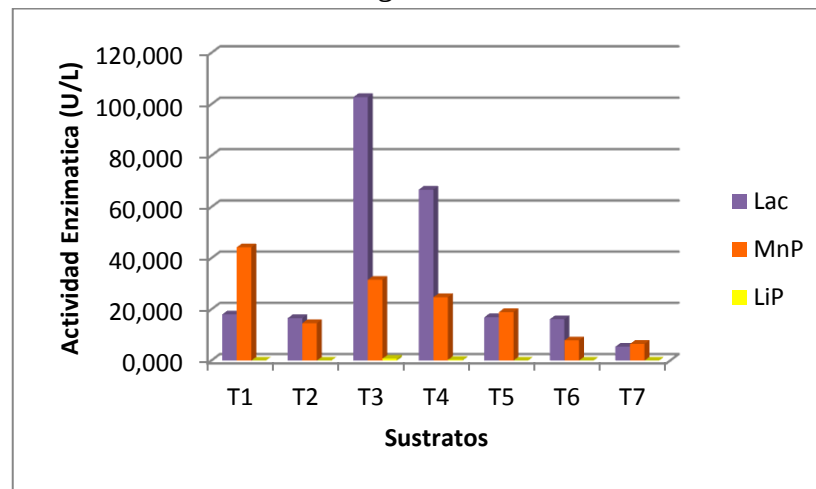
Tabla 20. Valores* de actividad enzimática (U/L) correspondientes a la inducción segunda cosecha.

Sustrato \ (U/L)	Lac	MnP	LiP
T1	18,020±1,067	44,262±1,123	0,000±0,000
T2	16,569±0,987	14,603±0,987	0,000±0,000
T3	102,752±0,862	31,571±0,769	0,725±0,002
T4	66,770±0,977	24,761±0,675	0,286±0,001
T5	16,929±1,235	18,937±0,865	0,000±0,000
T6	16,157±1,342	7,874±0,076	0,000±0,000
T7	5,422±0,156	6,495±0,048	0,000±0,000

* Corresponden al promedio obtenido a partir de tres réplicas, por cada réplica la medición se realizó por triplicado.
±Desviación estándar.

Fuente: Esta investigación.

Figura 53. Actividad enzimática inducción segunda cosecha.



Fuente: Esta investigación.

En la figura 53 se encuentran valores correspondientes a la inducción segunda cosecha donde se evidencia claramente valores altos para la enzima lacasa, seguido de la manganeso peroxidasa y valores completamente bajos para la lignina peroxidasa. En el sustrato T3 se presentó un valor de 102,752 U/L, y en el sustrato T4 un valor de 66,770 U/L para la enzima Lac, cabe aclarar que esta actividad bajó proporcionalmente con relación al cultivo inicial; también se puede observar que en el sustrato T1 seguido del sustrato T3 se presentaron valores de actividad MnP de 44,262 U/L y 31,571 U/L respectivamente, estas actividades disminuyen una vez los hongos van actuando sobre la lignina y la van degradando y con relación a la LiP se encuentran valores bajos en todos los sustratos de cultivo.

CONCLUSIONES.

→ El hongo *P. ostreatus* produjo mayor concentración de la enzima lacasa (290,123 U/L) en el día 24 de cultivo utilizando como sustrato bagazo de fique. Además, cuando se desarrolla completamente el micelio se presenta la mayor actividad de lacasa, y posteriormente desciende debido al desarrollo de los cuerpos fructíferos del hongo. Siendo este residuo agroindustrial significativo en la producción de esta enzima, la cual presenta grandes aplicaciones biotecnológicas a nivel ambiental.

→ El sustrato bagazo de fique suplementado con granza de avena presentó también un alto valor en la producción de la enzima lacasa con respecto a la pulpa de café, pulpa de café con granza de avena, raquis de palma de aceite, raquis de palma de aceite con granza de avena y granza de avena, obteniéndose un valor de 231,996 U/L.

→ El co-cultivo del hongo *P. ostreatus* con hongos como *Trichoderma spp.* y/o *Penicillium spp.* incrementaron la actividad de la enzima lacasa cuando se empleó como sustrato de cultivo bagazo de fique. Lo cual confirma que estos hongos compiten por el sustrato favoreciendo a algunas rutas metabólicas y aumentando significativamente la producción de esta enzima.

→ La actividad de la enzima lignina peroxidasa medida durante los seis días de muestreo presentó valores con tendencia a cero en la mayoría de los sustratos empleados, sin embargo, se alcanzó una máxima actividad para LiP (1,053 U/L) el día 46 en el sustrato bagazo de fique, siendo este sustrato el que mejor se comportó durante todas las mediciones.

→ El sustrato pulpa de café con granza de avena empleado en el cultivo del hongo *P. ostreatus* fue el más adecuado para la producción de la enzima manganeso peroxidasa presentando una concentración de 83,873 U/L, en un tiempo de 39 días.

→ Al emplear como sustrato bagazo de fique en la determinación de la concentración de la enzima MnP, ésta presentó una tendencia constante es decir que no hubo una variación grande con respecto a su actividad enzimática durante todo el tiempo de cultivo por lo cual podría ser un buen sustrato para obtener y caracterizar esta enzima.

→ Para la producción del hongo *P. ostreatus* cultivado sobre siete sustratos lignocelulósicos, la enzima que presentó mayor actividad enzimática fue la lacasa,

mientras que la que presentó menor actividad fue la enzima lignina peroxidasa, luego de haber encontrado diferencias significativas en cada uno de los sustratos empleados.

RECOMENDACIONES.

La gran importancia de utilizar residuos agroindustriales presentes en el departamento de Nariño genera mucha investigación ya que con algo tan simple se crea algo tan interesante e importante para ser empleado en nuestro medio como una alternativa más en beneficio del ambiente.

Es por tal motivo que a partir del conocimiento generado en este trabajo de grado, se pueden desarrollar nuevas opciones de investigación:

→ Identificar y cuantificar los compuestos presentes en el complejo enzimático obtenido, con el objetivo de emplear este complejo en procesos de degradación de materiales lignocelulósicos para la obtención de azúcares fermentables. Estos compuestos son producidos por la degradación de los monosacáridos obtenidos en la hidrólisis de la hemicelulosa y el fraccionamiento de la lignina. Basados en su origen, se pueden clasificar en tres grupos: derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y compuestos fenólicos, puesto que al realizar el análisis en tres de los sustratos empleados en el cultivo del hongo *P. ostreatus* se obtuvieron unas señales las cuales se las podría identificar y cuantificar con la ayuda de patrones (Anexo 8).

→ Emplear otros sustratos agrícolas del departamento de Nariño para el crecimiento del hongo *P. ostreatus* variando el tamaño de partícula de los residuos lignocelulósicos que se vayan a emplear como fuente de carbono para establecer el impacto sobre la actividad enzimática.

→ Cultivar el hongo *P. ostreatus* en fase líquida para incrementar los valores de actividad enzimática

→ El empleo de hongos de podredumbre blanca es una alternativa para realizar la decoloración de efluentes. Debido a que este microorganismo posee una maquinaria enzimática compleja que le permite degradar sustancias tales como lignina, celulosa y hemicelulosa para lo cual sería importante purificar la enzima a partir de *P. ostreatus* y remover diversos contaminantes aromáticos y colorantes de naturaleza “azo” ampliamente utilizados por la industria textil.

→ Determinar el número de isoformas presentes en los extractos enzimáticos a través de zimografía, debido a que la síntesis de isoenzimas puede deberse a productos de genes

diferentes, aunque también pueden deberse a cambios postraduccionales como proteólisis, glicosilación y agregados cuaternarios. Se pueden sintetizar como consecuencia de estados fisiológicos diferentes (composición del medio de cultivo, pH, temperatura) a partir de genes regulados diferencialmente.

→ Determinar la composición química de los residuos lignocelulósicos empleados (celulosa, hemicelulosa, lignina total, humedad, cenizas, lignina residual), realizar también un análisis de micronutrientes (hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu)) y macronutrientes (nitrógeno total (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S)). La determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa se debería hacer al inicio del cultivo y en cada uno de los días que se determine la actividad enzimática.

→ Evaluar el efecto que tienen las enzimas lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP) y lignino peroxidasa (LiP) sobre la estructura de los diferentes materiales lignocelulósicos que se utilicen para el cultivo del hongo *P. ostreatus*, a través de técnicas de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido (MEB), para establecer de qué manera la disposición de las fibras de los diferentes materiales lignocelulósicos afectan la actividad enzimática.

BIBLIOGRAFÍA.

Archibald, F., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M., y Reid, I. (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 53: 215-336.

Bacocchi, E., Biatti, M., Gerini, M., Lanzalunga, O., y Mancinelli, S. (2001). Oxidation of non-phenolic β -O-aryl-lignin model dimers catalyzed by lignin peroxidase. Comparison with the oxidation induced by potassium 12-tungstocobalt(III)ate. *Journal of the Chemical Society*, 41: 1506–1511.

Baldrian, P., y Snajdr, J. (2006). Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 1023-1029.

Baquero, J., y Torrenegra, R. (2005). Un metabolito secundario antibacteriano de *Penicillium verrucosum*. Pontificia Universidad Javeriana. 61.

Benavides, O. (2013). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para el cultivo de orellanas (*Pleurotus ostreatus*). Trabajo de Grado Maestría en Ciencias Agrarias. Énfasis en Producción de cultivos. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, 26.

Bezalel, L., Hadar, Y., y Cerniglia, C. (1996). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 292-295.

Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P., Freeman, J., y Cerniglia, C. (1997) Initial oxidation products in metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothophene by the white rot fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2554-2559.

Bommarius, A., y Riebel, B. (2004). Biocatalysis. Atlanta, USA: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Bossert, I., y Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in the soil ecosystems. In: Atlas R. M., editor; *Petroleum microbiology*. New York: Macmillan, 435-473.

Cañas, A. (2009). Diseño de nuevos sistemas lacasa-mediador: empleo de mediadores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida. Memoria para optar al grado de Doctora en Ciencias Ambientales por la Universidad de Alcalá. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Departamento de Microbiología y Parasitología, 12.

Cardona, L. (2001). Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus Ostreatus*. Crónica Forestal del Ambiente, No. 16, 99-118.

Carlile, M., Watkinson, S., y Gooday, G. (2001). *The fungi* ed.Segunda.London: Academic Press.

Carvajal, G. (2010). Evaluación de la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre cinco tipos de sustratos (Tamo de trigo, Tamo de cebada, Tamo de vicia, Tamo de avena y paja de páramo); enriquecidos con tuza molida, afrecho de cebada y carbonato de calcio. Tesis de pregrado ingeniería agropecuaria, Ibarra-Ecuador: Pontificia universidad católica del Ecuador, Escuela de ciencias agrícolas y ambientales, 26.

Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. Archives Microbiology, 179: 145-150.

Claus, H. (2004). Laccase: structure, reactions, distribution. Micron, 35: 93-96.

Cullen, D., y Kersten, J. (1996). Enzymology and molecular Biology of lignin degradation. Essert K, Lemke PA (Eds.) The Mycota (Vol III). New Cork, Springer Verlag, 13: 295-301.

Das, N., Sengupta, S., y Mukherjee, M. (1997). Importante of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. Applied and Environmental Microbiology. 63: 4120-4122.

Dávila, G., y Vásquez, R. (2001) .Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Díaz, R. (2009). Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas. Instituto Politécnico Nacional centro de investigación en biotecnología aplicada CIBA-IPN Tlaxcala. Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala, 8: 22-24.

Domínguez, D., (2006). Evaluación de la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* en tres tipos de sustrato con tres densidades de siembra. Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra. Escuela de Ciencias Agrícolas y ambientales.

Duarte, A. (2004). Evaluación de la producción de enzimas ligninolíticas por hongos de pudrición blanca en fermentación semisólida, utilizando desechos agroindustriales como sustrato. Trabajo de grado para optar el título de Maestría en Química. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química, 31.

Durán, E. (2007). Evaluar la capacidad de remover el colorante azul índigo en aguas residuales, empleando una cepa nativa de *Pleurotus ostreatus*. Trabajo de investigación para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad de Antioquia. Facultad de ingeniería. Departamento de Ingeniería Química. Grupo de bioprocesos, 15-16.

Edens, W., Goins, T., Dooley, D., y Henson, J. (1999). Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 3071-3074.

Fernandes, L., Loguercio, C., Espocito, E., y Menezes, M. (2005). In vitro wood decay of *Eucalytus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. International Biodeterioration and Biodegradation, 55:187-193.

Fernández, J., y Henao, L. (2007). Evaluación de tres hongos basidiomycetos inmovilizados en *luffa Cylindrica* y fotocátalisis con TiO₂ Para la remoción del Negro reactivo 5. Microbiólogo industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá, 154.

Gaitán, R., Salmones, D., Pérez, R., y Mata, G. (2006). Manual práctico del cultivo de Setas. Aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología, A.C. Veracruz, México.

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C., Strauss, J., y Haltrich, D. (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiology, 148: 2159-2169.

García, R. (2003). Cultivo de Setas y Trufas. Edición Mundi-Pres. 4ta. Ed.-España.

Garzón, J., y Cuervo, J. (2008). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia, *NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 6 (10), 126-140.

Gayosso, M., Leal, E., y Rodríguez, R. (2004). Evaluación de la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en presencia de bifenilospoliclorados. *Revista Iberoamericana*, 23:76-81.

Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., y Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*, 341: 655-663.

Gil, L., Manjarres, K., Piñeros, Y., y Rodríguez, E. (2012). Influencia de la adición de una fuente de nitrógeno en la producción de ligninasas. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol. 10, No. 1 (173-181), enero-junio, 173.

Gómez, C., Martínez, M., Mosquera, D., Pedroza, A., Rodríguez, R., y Rosas, J. (2005). Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas manganeso peroxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Universitas Scientiarum*, 10: (2) 37-45.

Guillén, G., Márquez, F., y Sánchez, J. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: 302-306.

Gupte, A., Gupte, S., y Patel, H. (2007). “Ligninolytic enzyme production under solid-state fermentation by white rot fungi”, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 66: 611-614.

Ha, H., Honda, C., Watanabe, Y., y Kuwahara, M. (2001). Production of Manganese Peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 704-711.

Hadar, Y., y Cohen, E. (1986). Chemical Composition of the edible mushroom *Pleurotus Ostreatus* produced by fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 51:

1352-1354.

Hadar, Y., y Dosoretz, G. (1991). Mushroom mycelium as a potential source of food flavour. *Trends in Food Science & Technology*. Amsterdam, 214-218.

Have, R., y Franssen, M. (2001). On a revised mechanism of side product formation in the lignin peroxidase catalyzed oxidation of veratryl alcohol, *FEBS Letters*, 487,313–317.

Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., y Anke, T. (1998). Characterization of laccase and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1601-1606.

Heredia, A., Esparza, E., Romero, L., Cabral, F., y Bañuelos, R. (2014). Bagazos de *Agave salmiana* y *Agave weberi* utilizados como sustrato para producir *Pleurotus ostreatus*. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. México, Vol. 1, No.5, 104-110.

Hermosa, M., Grondona, E., Iturriaga, E., Diaz, J., Castro, C., y Monte, E. (2000). Molecular characterization and Identification of Biocontrol isolates of *Trichoderma spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66 No. 5: 1809-1898.

Hernández, R., y López, C. (2005). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Tesis de pregrado Microbiólogo industrial, Bogotá: Pontificia universidad Javeriana, Facultad de ciencias, 34-35.

Herrera, L. (2008). Análisis estructural y producción de la estabilidad de la lacasa. Memorias para obtener el grado de Especialista en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, 5.

Hofrichter, M., Lundell, T., y Hatakka, A. (2001). Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Appl Environ Microbiol*, 67:4588–93.

Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 454-466.

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., y Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus Ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, 39: 1415-1419.

Howel, C. (2004). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts Plant disease. Vol. 87 No. 29: 4-10.

Kapich, A., Steffen, K., Hofrichter, M., y Hatakka, A. (2005). Involvement of lipid oxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 371–377.

Kerem, Z., Friesem, D., y Hadar, Y. (1992). Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus Ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1121-1127.

Kirk, T., y Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetic of wood degradation by white-rot fungi. En *Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry*. Young, A., Akhtar, M., (eds.). John, W., Sons, Inc. New York, 273-307.

Lankinen, P. (2004). Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media. Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki. Division of Microbiology. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Helsinki, 54.

Levin, L. (1998). Biodegradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii* (*Aphylllophorales*, *Basidiomycetes*). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires Argentina.

Li, K., Xu, F., y Eriksson, L. (1999). Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2654-2660.

López, A., Huerta, G., y Sánchez, E. (1996). Contamination during cultivation of *Pleurotus Ostreatus* in Tropical Mexico. Royse DJ (Eds.) second International Conference on Mushrooms Products, Pennsylvania, 495 – 502.

López, M., Del Postigo., García, M., Pérez, R., y Alvarez, G. (2001). Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaen, España, p. 69-106.

López, E. (2002). Hongos comestibles. Orellanas: deliciosa medicina. Visión Chamánica. Bogotá-Colombia.

Manjarrés, K., Castro, A., y Rodríguez, E. (2010). Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. Revista Lasallista de Investigación, Corporación Universitaria Lasallista. Antioquia, Colombia, Vol. 7, No. 2, julio-diciembre, 9-15.

Manjarrés, K., Castro, A., Rodríguez, E., y Gil, L. (2012). Influencia de la adición de una muestra de nitrógeno en la producción de ligninasas. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 10, No. 1: 173 - 181.

Mansur, M., Suárez, T., Fernández, J., Brisuela, M., y González, A. (1997). Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology, 63: 2637-2646.

Molwitz, M., Silva, S., Ribeiro, D., Roberto, C., Prata, R., y Mancilla, M. (1996). "aspects of the cell growth of candida guilliermondii in sugar cane bagasse hydrolysis". Journal of biosciences, 51, (5-6), 404-408.

Montoya, S. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del micromiceto *Grifola frondosa*. Tesis de grado Maestría en ingeniería-ingeniería química. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, 23-25.

Montoya, S., y Restrepo, G. (2009). Evaluación del desarrollo vegetativo y la producción de carpóforos de las cepas de los hongos *Pleurotus spp.* y *Lentinula edodes* sobre varios residuos agroindustriales. Universidad Católica de Manizales. Centro de investigación, proyección y desarrollo. Facultad de ciencias de la salud. Grupo de investigaciones biológicas (GIBI), 32-37.

Moore, D. (1998). Fungal Morphogenesis. New York, United States of America: Cambridge University Press.

Moreira, M., Feijoo, G., Sierra, R., y Field, J. (1999). Revaluation of the manganese requirement for the biobleaching of kraft pulp by white rot fungi. Bioresource

Technology, 70: 255-260.

Moreno, N., y Ospina, X. (2008). Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. Tesis de pregrado Microbiólogo Industrial. Bogotá: Pontificia universidad Javeriana, Facultad de ciencias, 53.

Murrieta, D., y Mata, G. (2002). Iglesias, A. Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (FR), cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* pers., un hongo contaminante. Foresta. Veracruzana, Vol. 4. No. 1, 47-52.

Niladevi, K. (2009). Ligninolytic enzymes. In P. Singh & A. Pandey (Eds.) Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Dordrecht: Springer Netherlands.

Nyanhongo, G., Gomes, J., Gübitz, G., Zvaunya, R., Read, J., y Steiner, W. (2002). Decolorization of textile dyes by Laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*, 36: 1449-1456.

Páez, M. (2012). Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Trabajo de investigación para optar al título de Ingeniero en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de ciencias de la vida. Ingeniería en biotecnología, 9.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., y Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 31301-31307.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., y Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 920-924.

Pandey, A., Selvakumar, P., Soocol, C., y Nigam, C. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77(1), 149-153.

Pedroza, A. (2007). Tratamiento de aguas residuales de la industria papelera mediante un sistema secuencial: hongos ligninolíticos y un proceso fotocatalítico nanoestructurado de $\text{TiO}_2/\text{Ru}_x\text{Se}_y$. Doctora en Ciencias. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzado del Instituto Politécnico Nacional unidad Zacatenco. Depto Biotecnología y Bioingeniería. Departamento de biotecnología y Bioingeniería. México D.F, 219.

Pérez, B. (2006). Descripción de las características macroscópicas, de cultivo in vitro de cepas de *Pleurotus* aisladas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de ciencias Químicas y Farmacia, 11-14.

Petr, B., y Jirí, G. (2002). Copper and Cadmium increase laccase activity in *Pleurotus Ostreatus*. FEMS Microbiology letters, 206: 69-74.

Quevedo, B. (2011). Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. Universidad Nacional de Colombia. Área Curricular de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá, Colombia, 44-45.

Quintero, J., Feijoo, G. y Lema J. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, revista de la facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín – Colombia, 61.

Raaska, L. (1990). Production of *Lentinula edodes* mycelia in liquid media: improvement of mycelial growth by medium modification. Mushroom Journal Tropics, 10: 79-92.

Ramón, P., y Ramón, D. (2012). “Análisis de la capacidad degradativa de residuos lignocelulósicos utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus* var. *Florida*”. Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Ambiental. Cuenca, 61-62.

Rangel, S. (2012). Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá D.C., Colombia, 5.

Reddy, G., Sridhar, M., y Gold, M. (2003). Cleavage of nonphenolic β -1 diarylpropane lignin model dimers by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Biochemistry*, 270, 284–292.

Redin, A. (2010). Efecto de la inducción con extractos acuosos de paja de trigo sobre la producción de enzimas lignolíticas en *Pleurotus ostreatus*. Universidad Pública de Navarra. Escuela técnica superior de ingenieros agrónomos, 26.

Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R., y Morris, H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp.* *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 164-168.

Rodríguez, N., y Gómez, F. (2001). Cultive hongos comestibles en pulpa de café. *Avances Técnicos Cenicafé*, 285: 1-8.

Rodríguez, E. (2006). Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromática. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid, 6.

Rosas, D., y Chaparro, D. (2006). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural la montaña del ocaso, Quimbaya- Quindío. Trabajo de investigación para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 8.

Ruiz, F. (1998). Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas, 19-26.

Salcedo, J., López, J., y Flórez, L. (2014). Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Medellín, Dyna*, año 78, No. 169, 182-190.

Schwarze, F., Engels, J., y Mattheck, C. (2000). Fundamental aspects. En *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer, 5-31.

Suárez, C., y Jeannette, N. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1):1-8

Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). Fisiología Vegetal. Vol 1. Série Ciências Experimentals. Universitat Jaume I. Publicacions; Castelló de la Plana.

Thurston, C. (1994). "The structure and function of fungal laccases", *Microbiology*, 140, 19-26.

Tien, M., y Kirk, T. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci*, 587-594.

Usnayo, P. (2007). "Optimización de medios de cultivo, para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fúngicas aisladas del altiplano Boliviano" Tesis pregrado, Universidad Mayor de San Andres, Facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, 12.

Vaca, M., Izurieta, B., y Espín, N. (2014). Obtención de extractos enzimáticos con actividad Celulolítica y Ligninolítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 en Rastrojo de Maíz. Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Quito, Ecuador, Revista EPN, Vol. 33, No. 2.

Vares, T., y Hatakka, A. (1997). Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: effects of manganese and malonate. *Can. J. Bot.* 75(1), 61-71.

Varneo, M., Quiroz, M., y Álvarez, C. (2010). Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Información tecnológica*, 21(2): 13-20.

Velázquez, M., Farnet, Billette, C., Mata, G., y Savoie, J. (2007). Interspecific interactions with *Trichoderma longibrachiatum* induce *Pleurotus ostreatus* defence reactions base on the production of laccase isozymes. *Biotechnol Lett*, 29:1583-1590.

Vyas, B., y Molitoris, H. (1995). Involvement of an extracellular H_2O_2 – dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus Ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue R. *Appl. Envirom. Microbiol*, 61: 3019-3927

Vyas, R., Stepler, H., y Housing, D. (2007). Involvement of an Extracellular H.sub.2 O.sub.2 -Dependent Ligninolytic Activity of the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* in the Decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1):3919-3927.

Wariishi, H., Valli, K., y Gold, M. (1992) Manganese (II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. The journal of Biological Chemistry , Vol. 267, No. 33, 23689-23695.

Wilkolazka, A., Kochmanska, J., Malarczyk, E., Wardas, W., y Leonowicz, A. (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:566-572.

Wong, D. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 157:174–209.

Zabel, R., y Morrel, J. (1992). Decay and its Prevention. San Diego, California: Academic Press.

ANEXOS.

ANEXO A. MAPA DE CAMPO CULTIVO DE *P. ostreatus*.

$T_iR_1, i = 1....7$	$T_iR_2, i = 1....7$	$T_iR_3, i = 1....7$
T_1R_1	T_6R_2	T_3R_3
T_4R_1	T_3R_2	T_7R_3
T_2R_1	T_5R_2	T_1R_3
T_5R_1	T_7R_2	T_6R_3
T_7R_1	T_1R_2	T_4R_3
T_3R_1	T_4R_2	T_2R_3
T_6R_1	T_2R_2	T_5R_3

ANEXO B. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE LIGNINA Y CELULOSA.

Se determinó la FDA para lo cual, se pesó 0,5 g de muestra seca y tamizada en un balón de digestión. Se agregó 100 mL de solución de detergente ácida (bromuro de cetil-trimetil-amonio acidificado con H_2SO_4 1N). La solución se dejó en ebullición y se mantuvo el reflujo durante 60 minutos. Se filtró al vacío usando un crisol con filtro de vidrio, previamente pesado. La muestra se lavó repetidamente con agua caliente. Se secó el crisol en estufa a 105°C durante 12 horas, se enfrió en desecador y se pesó. Se ubicó el crisol con el contenido de FDA en una bandeja de vidrio con agua fría, sin permitir que la fibra se humedezca. Se adicionó al crisol aproximadamente 20 mL de solución combinada de permanganato de potasio, previamente preparada. Se dejó reposar el crisol por 90 minutos a 20°C, Se filtró a vacío y el crisol con el sólido se llevó a la bandeja de vidrio llena con solución desmineralizadora (solución ácido-etanólica) y se dejó en contacto hasta la pérdida de color café del sólido. Se lavó el contenido del crisol con etanol al 80% y se filtró. Se secó el crisol durante 12 horas a 105°C se dejó enfriar en un desecador y se pesó. El contenido de lignina se calculó teniendo en cuenta la pérdida de peso original de la fibra obtenida por el método FDA. Para hallar la celulosa se incineró la muestra procedente de la determinación de lignina, en crisol a 500°C, durante 3 horas. Luego, se dejó enfriar en desecador y se pesó. La cantidad de celulosa presente en la muestra se calculó por la diferencia de peso entre el residuo de permanganato y el residuo

de la incineración, respecto al peso inicial de la muestra. El procedimiento se realizó por triplicado.

ANEXO C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIDAS REPETIDAS Lac.

Contrastes multivariados^a

Efecto		Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig. (p-valor)
Tiempo	Traza de Pillai	,771	35,104 ^b	5,000	52,000	,000
	Lambda de Wilks	,229	35,104 ^b	5,000	52,000	,000
	Traza de Hotelling	3,375	35,104 ^b	5,000	52,000	,000
	Raíz mayor de Roy	3,375	35,104 ^b	5,000	52,000	,000
Tiempo * Sustrato	Traza de Pillai	2,007	6,261	30,000	280,000	,000
	Lambda de Wilks	,032	9,544	30,000	210,000	,000
	Traza de Hotelling	7,372	12,385	30,000	252,000	,000
	Raíz mayor de Roy	4,736	44,204 ^c	6,000	56,000	,000

a. Diseño: Intersección + Sustrato

Diseño intra-sujetos: Tiempo

b. Estadístico exacto

c. El estadístico es un límite superior para la F el cual ofrece un límite inferior para el nivel de significación.

Teniendo en cuenta que los p-valores asociados a cada uno de los cuatro estadísticos son menores que el nivel de significación todas las pruebas indican que se rechazó la hipótesis nula es decir hubo diferencia significativa a través del tiempo y hubo diferencia significativa entre la interacción Tiempo * Sustrato.

En la tabla de contrastes multivariados se encuentra el estadístico F (el cual compara la variabilidad debida a las diferencias entre grupos con la debida a las diferencias dentro de los grupos). Cuanto mayor sea el valor de F y menor su significación, más probabilidad de que existan diferencias significativas entre los grupos. En consecuencia, si el *p-valor* < 0,05 se rechaza la hipótesis nula por lo tanto *Sig* = 0,000 < 0,05, indica que hay diferencia significativa con relación a la actividad enzimática al variar el tipo de sustrato con relación al tiempo de cultivo.

ANEXO D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIDAS REPETIDAS LiP.

Contrastes multivariados^a

Efecto		Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig. (p-valor)
Tiempo	Traza de Pillai	,811	44,494 ^b	5,000	52,000	,000
	Lambda de Wilks	,189	44,494 ^b	5,000	52,000	,000
	Traza de Hotelling	4,278	44,494 ^b	5,000	52,000	,000
	Raíz mayor de Roy	4,278	44,494 ^b	5,000	52,000	,000
Tiempo * Sustrato	Traza de Pillai	1,926	5,849	30,000	280,000	,000
	Lambda de Wilks	,053	7,567	30,000	210,000	,000
	Traza de Hotelling	4,990	8,383	30,000	252,000	,000
	Raíz mayor de Roy	2,524	23,555 ^c	6,000	56,000	,000

a. Diseño: Intersección + Sustrato

Diseño intra-sujetos: Tiempo

b. Estadístico exacto

c. El estadístico es un límite superior para la F el cual ofrece un límite inferior para el nivel de significación.

La anterior tabla muestra cuatro estadísticos multivariados, los cuales permiten contrastar la hipótesis nula donde no existen diferencias significativas en las actividades enzimáticas con relación al sustrato y al tiempo de producción del hongo.

Dichos resultados demuestran que los análisis son significativamente diferentes, ya que todas las pruebas coinciden en señalar que el efecto del factor tiempo con la interacción Tiempo * Sustrato es significativo ($\text{Sig}=0,000<0,05$).

ANEXO E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDIDAS REPETIDAS M_nP.

Contrastes multivariados^a

Efecto		Valor	F	Gl de la hipótesis	Gl del error	Sig.
Tiempo	Traza de Pillai	,589	14,923 ^b	5,000	52,000	,000
	Lambda de Wilks	,411	14,923 ^b	5,000	52,000	,000
	Traza de Hotelling	1,435	14,923 ^b	5,000	52,000	,000
	Raíz mayor de Roy	1,435	14,923 ^b	5,000	52,000	,000
Tiempo * Sustrato	Traza de Pillai	2,250	7,637	30,000	280,000	,000
	Lambda de Wilks	,016	12,597	30,000	210,000	,000
	Traza de Hotelling	10,162	17,071	30,000	252,000	,000
	Raíz mayor de Roy	6,555	61,176 ^c	6,000	56,000	,000

a. Diseño: Intersección + Sustrato

Diseño intra-sujetos: Tiempo

b. Estadístico exacto

c. El estadístico es un límite superior para la F el cual ofrece un límite inferior para el nivel de significación.

La anterior tabla muestra cuatro estadísticos multivariados, los cuales permiten contrastar la hipótesis nula donde no existen diferencias significativas en las actividades enzimáticas con relación al sustrato y al tiempo de producción del hongo.

Dichos resultados demuestran que los análisis son significativamente diferentes, ya que todas las pruebas indican que el efecto del factor tiempo con la interacción Tiempo * Sustrato es significativo ($Sig=0,000<0,05$).

ANEXO F. CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS (HONGOS) EN LOS RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS TRATADOS.

Preparación del medio de cultivo.

Se preparó Agar-Papa-Dextrosa sus siglas en inglés (Potato-Dextrose-Agar), que es rico en hidratos de carbono debido a la infusión de papa. Es un medio general para aislar la mayoría de hongos, para prepararlo se disolvió 7,8g del medio de cultivo en 200ml de

agua destilada; se autoclavó a una presión de 15 PSI y a una temperatura de 121°C (Ramón, *et al.*, 2012).

Se tomó una pequeña muestra del hongo a analizar y se la colocó en la caja Petri con un medio estéril (PDA), se dejó que la colonia del hongo se desarrollara por un período de 6 días después de comenzar la incubación.

Para observar en el microscopio, se tomó una pequeña cantidad de la colonia del hongo con un asa y se colocó en el portaobjetos, seguido de una gota del colorante lactofenol con azul de algodón para facilitar la identificación de la estructura; al final se colocó el cubre objetos encima de la muestra y su identificación se la realizó con ayuda de un microscopio óptico para observar las estructuras microscópicas de cada uno de las colonias de los hongos.



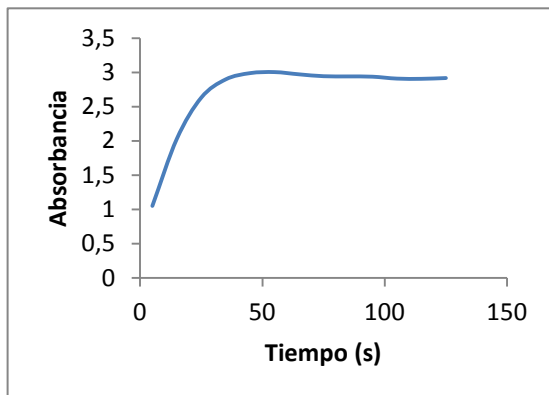
Figura 1. Microscopio empleado para observar las colonias de hongos.

ANEXO G. CURVAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Lac.

Sustrato T3 Día 24.

a.



b.

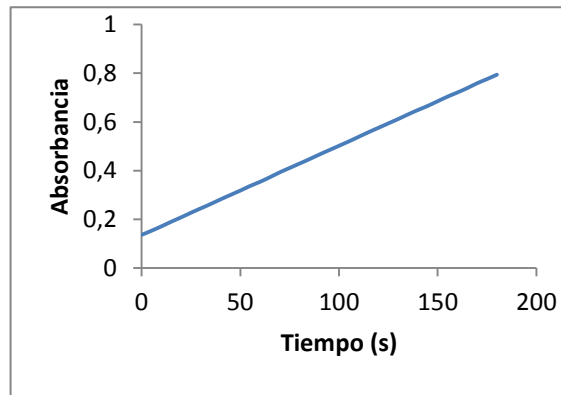
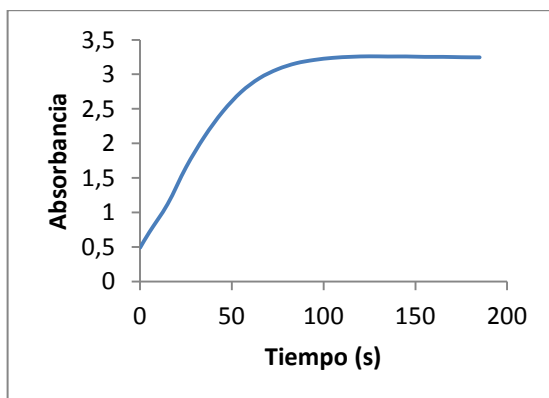


Figura 2. Curva de actividad enzimática de la oxidación del ABTS por acción de la lacasa a 420nm para el bagazo de fique. **a.** Concentrada **b.** Dilución x10.

Sustrato T4 día 7.

a.



b.

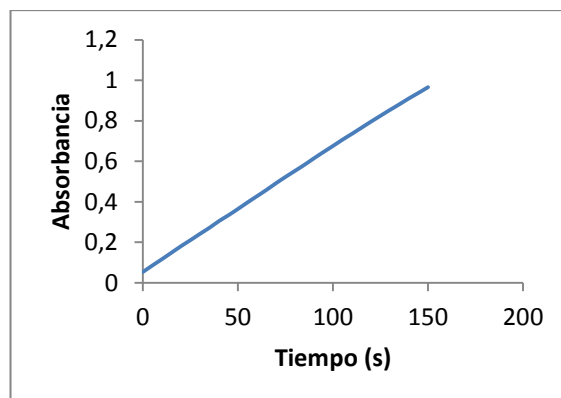
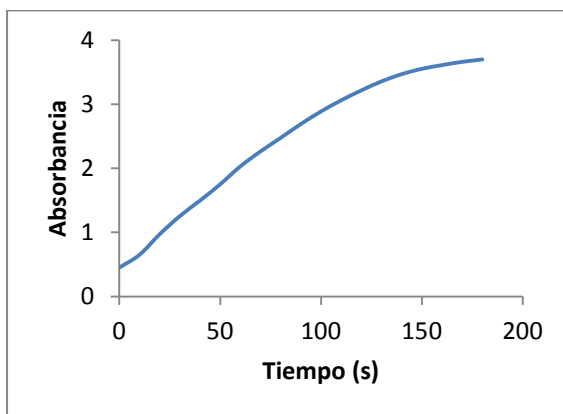


Figura 3. Curvas de actividad enzimática de la oxidación del ABTS por acción de la lacasa a 420nm para el bagazo de fique con granza de avena. **a.** Concentrada **b.** Dilución x20.

MnP.

Sustrato T2 día 39.

a.



b.

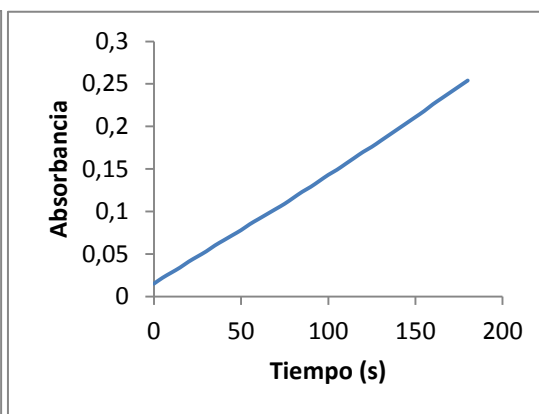
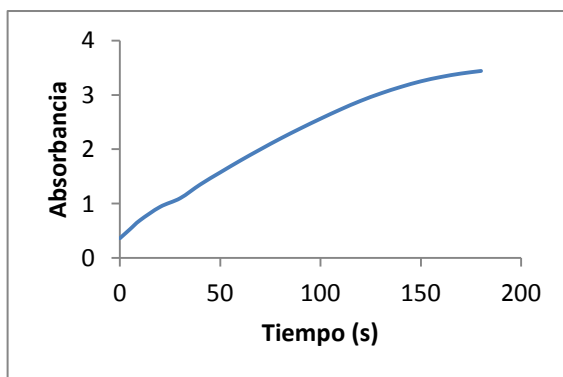


Figura 4. Curva de actividad enzimática de la oxidación del 2,6 DMP por acción de la MnP a 468nm para la pulpa de café con granza de avena. **a.** Concentrada **b.** Dilución x5.

Sustrato T1 día 39.

a.



b.

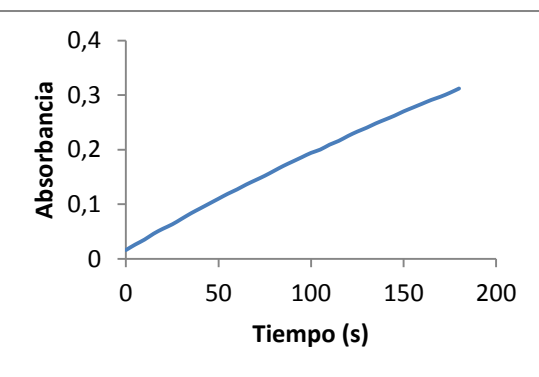


Figura 5. Curva de actividad enzimática de la oxidación del 2,6 DMP por acción de la MnP a 468nm para la pulpa de café. **a.** Concentrada **b.** Dilución x20.

LiP.

Sustrato T4 día 7.

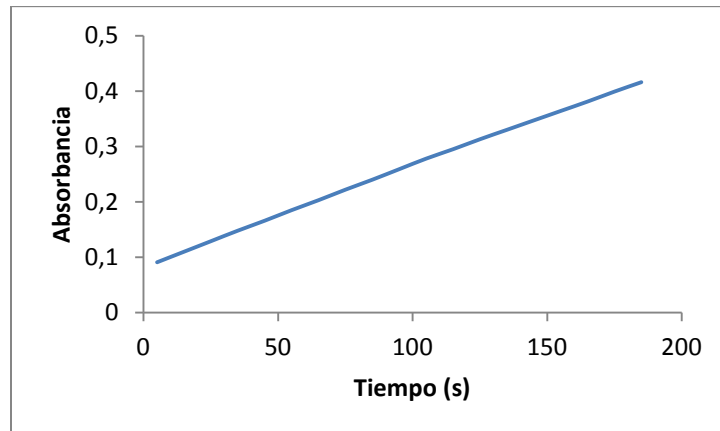


Figura 6. Curva de actividad enzimática de la oxidación del alcohol veratrílico por acción de la LiP a 310nm para el bagazo de fique con granza de avena.

Sustrato T3 día 46.

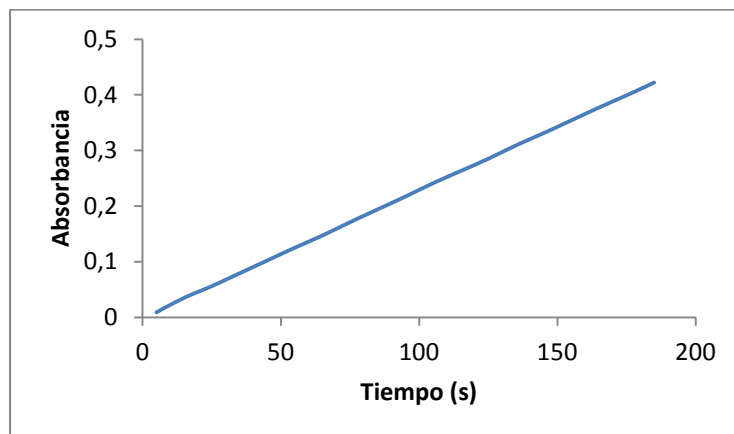


Figura 7. Curva de actividad enzimática de la oxidación del alcohol veratrílico por acción de la LiP a 310nm para el bagazo de fique con granza de avena.

ANEXO H. ANÁLISIS POR HPLC DE ALGUNOS COMPUESTOS PRODUCIDOS EN LA OBTENCIÓN DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO.

El análisis por HPLC del extracto pulpa de café, bagazo de fique y raquis de palma de aceite se muestran a 254 nm.

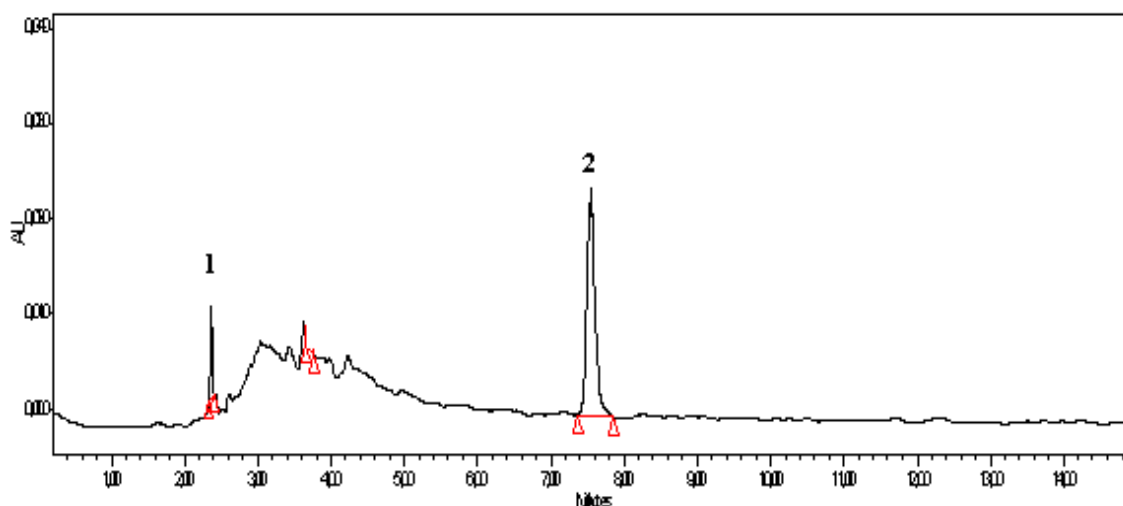


Figura 8. Perfil cromatográfico del extracto pulpa de café con máximo de absorción a 254nm.

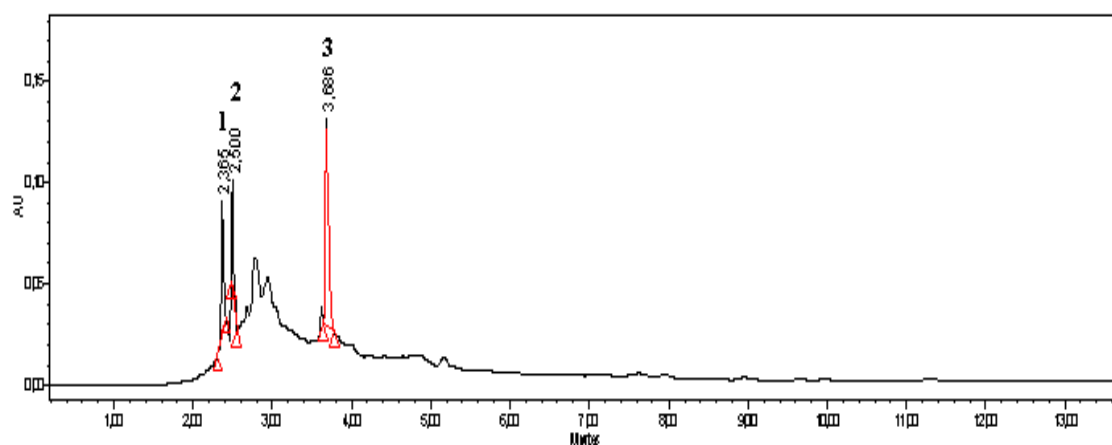


Figura 9. Perfil cromatográfico del extracto bagazo de fique con máximo de absorción a 254nm.

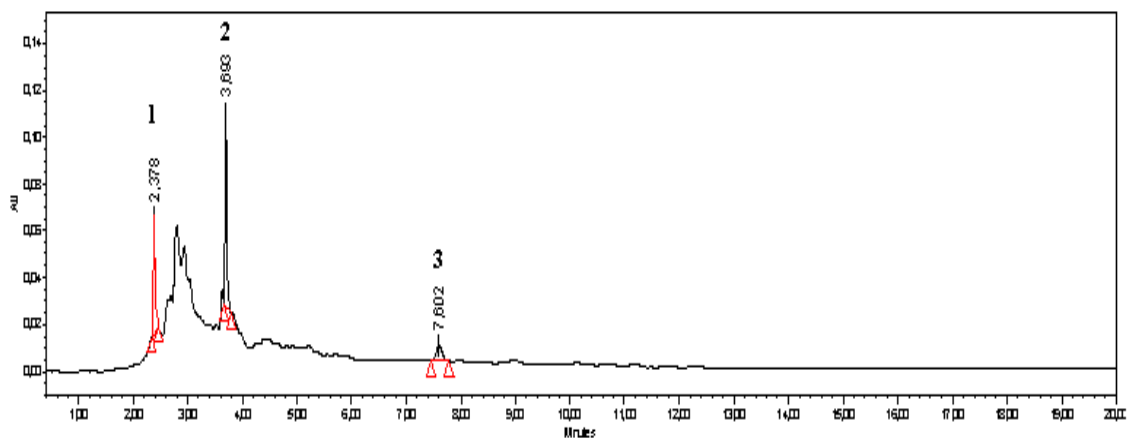


Figura 10. Perfil cromatográfico del extracto raquis de palma de aceite con máximo de absorción a 254nm.

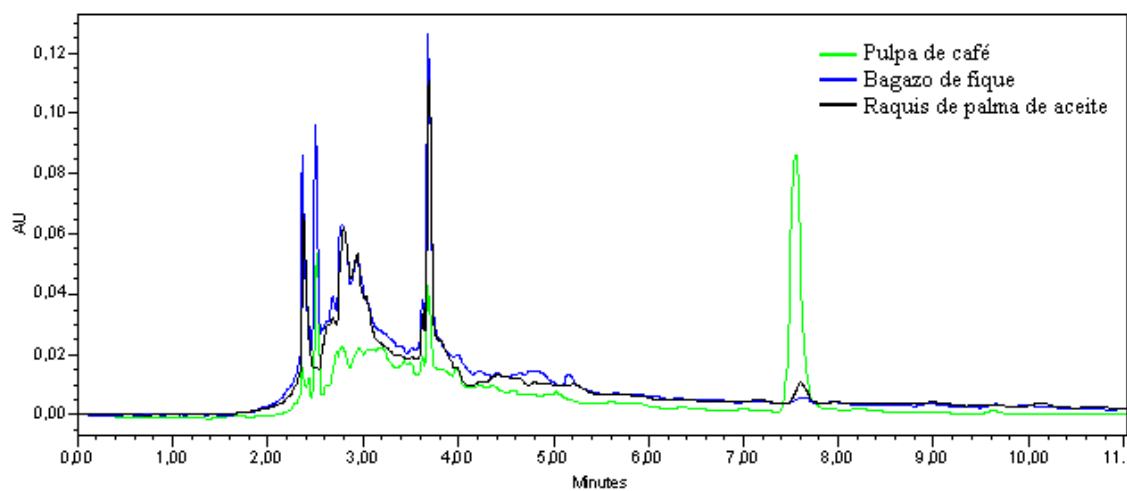


Figura 11. Comparación que se realizó en los tres extractos enzimáticos.