



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
LIGNOCELULOLÍTICA DE *Pleurotus ostreatus*  
OBTENIDA POR FERMENTACIÓN SÓLIDA  
UTILIZANDO UN SOPORTE INERTE”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a  
**JORGE ÁLVAREZ CERVANTES**

Codirectores:

**DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ  
DRA. CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ**

Tutores:

**DR. OCTAVIO LOERA CORRAL  
DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE**

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2011

# ÍNDICE GENERAL

Pág

Autorización de impresión de tesis

Agradecimientos

Dedicatorias

Resumen

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1 HONGOS DE PUDRICIÓN DE MADERA .....	6
1.2 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO <i>PLEUROTUS</i> .....	6
1.3 COMPUESTOS LIGNINOCELULÓSICOS .....	9
1.3.1 <i>Lignina</i> .....	9
1.3.2 <i>Celulosa</i> .....	11
1.3.3 <i>Hemicelulosa</i> .....	12
1.4 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS .....	13
1.4.1 <i>Enzimas lacasas</i> .....	13
1.4.2 <i>Enzimas celololíticas</i> .....	15
1.4.2.1 <i>Celulasas</i> .....	16
1.4.2.2 <i>Xilanasas</i> .....	17
1.5 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO Y LÍQUIDO .....	19
1.5.1 <i>Espuma de poliuretano</i> .....	20
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>22</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>41</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
5.1 GENERAL .....	42
5.2 ESPECÍFICOS .....	42
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>43</b>
6.1 MICROORGANISMO DE ESTUDIO .....	44
6.2 OBTENCIÓN DEL INÓCULO .....	44
6.3 MEDIO DE CULTIVO Y DESARROLLO MICELIAL .....	44
6.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMÁTICO Y DETERMINACIÓN DE BIOMASA .....	45
6.4.1 <i>Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y de producción enzimática</i> .....	45
6.5 DETERMINACIÓN DE pH .....	46
6.6 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES RESIDUALES .....	46
6.7 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES .....	46
6.8 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN ECE .....	46
6.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	47
6.9.1 <i>Lacasas</i> .....	47
6.9.2 <i>Celulasas</i> .....	47
6.9.3 <i>Xilanasas</i> .....	47
6.10 ZIMOGRFÍA .....	48
6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	48
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
7.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON GLUCOSA .....	49
7.1.1 <i>Determinación de Biomasa</i> .....	49
7.1.2 <i>Cuantificación de azúcares residuales</i> .....	49
7.1.3 <i>Perfiles de pH</i> .....	50
7.1.4 <i>Contenido de proteína soluble en el ECE</i> .....	50
7.1.5 <i>Evaluación de la actividad de lacasas</i> .....	51
7.1.6 <i>Evaluación de celulasas</i> .....	51
7.1.7 <i>Evaluación de xilanasas</i> .....	51

7.1.8 Evaluación de proteasas.....	52
7.1.9 Zimograma de lacasas.....	52
7.1.10 Zimograma de xilanasas.....	53
7.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON GLUCOSA, XILANO Y CARBOXIMETILCELULOSA.....	54
7.2.1 Determinación de Biomasa.....	54
7.2.2 Cuantificación de azúcares totales.....	54
7.2.3 Perfiles de pH.....	55
7.2.4 Contenido de proteína soluble en el ECE.....	55
7.2.5 Evaluación de la actividad de lacasas.....	56
7.2.6 Evaluación de celulasas.....	56
7.2.7 Evaluación de xilanasas.....	57
7.2.8 Evaluación de proteasas.....	57
7.2.9 Zimograma de lacasas.....	58
7.2.10 Zimograma de xilanasas y celulasas.....	59
7.3 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON XILANO Y CARBOXIMETILCELULOSA.....	60
7.3.1 Determinación de Biomasa.....	60
7.3.2 Cuantificación de azúcares totales.....	60
7.3.3 Perfiles de pH.....	61
7.3.4 Contenido de proteína soluble en el ECE.....	61
7.3.5 Evaluación de la actividad de lacasas.....	62
7.3.6 Evaluación de celulasas.....	62
7.3.7 Evaluación de xilanasas.....	63
7.3.8 Evaluación de proteasas.....	63
7.3.9 Zimograma lacasas.....	64
7.3.10 Zimograma xilanasas y celulasas.....	65
7.4 Parámetros cinéticos.....	65
<b>8. DISCUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>74</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>75</b>

## ANEXOS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida del género <i>Pleurotus</i>	<b>8</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura parcial de la lignina	<b>10</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la celulosa	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la hemicelulosa	<b>13</b>
<b>Figura 5.</b> Oxidación de compuestos fenólicos de lignina por acción de lacasas	<b>15</b>
<b>Figura 6.</b> Diagrama de flujo de la metodología	<b>43</b>
<b>Figura 7.</b> Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida	<b>49</b>
<b>Figura 8.</b> Consumo de glucosa por <i>P. ostreatus</i> en la FMS	<b>49</b>
<b>Figura 9.</b> Perfiles de pH durante el desarrollo por <i>P. ostreatus</i> en FMS	<b>50</b>
<b>Figura 10.</b> Contenido de proteína presente en el ECE	<b>50</b>
<b>Figura 11.</b> Actividad de lacasas obtenida por FMS utilizando glucosa como fuente de carbono	<b>51</b>
<b>Figura 12.</b> Actividad de xilanasas obtenida por FMS utilizando glucosa como fuente de carbono	<b>51</b>
<b>Figura 13.</b> Actividad de proteasas durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en FMS	<b>52</b>
<b>Figura 14.</b> Zimograma de lacasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 4.5 utilizando como sustrato DMP	<b>52</b>
<b>Figura 15.</b> Zimograma de lacasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 6.5 utilizando como sustrato DMP	<b>53</b>

<b>Figura 16.</b> Zimograma de xilanasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 4.5 utilizando como sustrato xilano	<b>53</b>
<b>Figura 17.</b> Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida	<b>54</b>
<b>Figura 18.</b> Consumo de glucosa por <i>P. ostreatus</i> en la FMS	<b>54</b>
<b>Figura 19.</b> Perfiles de pH durante el desarrollo por <i>P. ostreatus</i> en FMS	<b>55</b>
<b>Figura 20.</b> Contenido de proteína presente en el ECE	<b>55</b>
<b>Figura 21.</b> Actividad de lacasas obtenida por FMS utilizando glucosa, xilano y carboximetilcelulosa como fuente de carbono	<b>56</b>
<b>Figura 22.</b> Actividad de celulasas obtenida por FMS utilizando glucosa, xilano y carboximetilcelulosa como fuente de carbono	<b>56</b>
<b>Figura 23.</b> Actividad de xilanasas obtenida por FMS utilizando glucosa, xilano y carboximetilcelulosa como fuente de carbono	<b>57</b>
<b>Figura 24.</b> Actividad de proteasas durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en FMS	<b>57</b>
<b>Figura 25.</b> Zimograma de lacasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 4.5 utilizando como sustrato DMP	<b>58</b>
<b>Figura 26.</b> Zimograma de lacasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 6.5 utilizando como sustrato DMP	<b>58</b>
<b>Figura 27.</b> Zimograma de xilanasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 4.5 utilizando como sustrato xilano	<b>59</b>
<b>Figura 28.</b> Zimograma de celulasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 4.5 utilizando como sustrato CMC	<b>59</b>
<b>Figura 29.</b> Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en fermentación sólida	<b>60</b>
<b>Figura 30.</b> Consumo de azúcares por <i>P. ostreatus</i> en FMS	<b>60</b>
<b>Figura 31.</b> Perfiles de pH durante el desarrollo por <i>P. ostreatus</i> en FMS	<b>61</b>
<b>Figura 32.</b> Contenido de proteína presente en el ECE	<b>61</b>
<b>Figura 33.</b> Actividad de lacasas obtenida por FMS utilizando xilano y carboximetilcelulosa como fuente de carbono	<b>62</b>
<b>Figura 34.</b> Actividad de celulasas obtenida por FMS utilizando glucosa, xilano y carboximetilcelulosa como fuente de carbono	<b>62</b>
<b>Figura 35.</b> Actividad de xilanasas obtenida por FMS utilizando glucosa, xilano y carboximetilcelulosa como fuente de carbono	<b>63</b>
<b>Figura 36.</b> Actividad de proteasas durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en FMS	<b>63</b>
<b>Figura 37.</b> Zimograma de lacasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 4.5 utilizando como sustrato DMP	<b>64</b>
<b>Figura 38.</b> Zimograma de lacasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 6.5 utilizando como sustrato DMP	<b>64</b>
<b>Figura 39.</b> Zimograma de xilanasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 4.5 utilizando como sustrato xilano	<b>65</b>
<b>Figura 40.</b> Zimograma de celulasas de la cepa <i>P. ostreatus</i> a pH de 4,5 utilizando como sustrato CMC	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de diferentes hongos productores de enzimas lignocelulolíticas	<b>22</b>
<b>Tabla 2.</b> Lacasas utilizadas en síntesis orgánica	<b>26</b>
<b>Tabla 3.</b> Lacasas purificadas en hongos	<b>27</b>
<b>Tabla 4.</b> Producción de lacasas en FMS y FML	<b>36</b>
<b>Tabla 5.</b> Especies de basidiomicetos con actividad lignocelulolítica en fermentación sólida	<b>37</b>
<b>Tabla 6.</b> Efecto de la fuente de nitrógeno en FMS por <i>P. ostreatus</i> con hojas de árboles y paja de trigo	<b>38</b>
<b>Tabla 7.</b> Composición basal del medio de fermentación sólida	<b>44</b>
<b>Tabla 8.</b> Parámetros cinéticos del crecimiento y producción de enzimas lignocelulolíticas de <i>P. ostreatus</i>	<b>66</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el planeta presenta diversos cambios ambientales, debido a una alta contaminación que se genera por diversas fuentes. Una de ellas es el deterioro de efluentes con desechos tóxicos y de residuos agro-industriales, ocasionada por una gama de industrias (papelera, textil y agrícola), que utilizan compuestos de difícil degradación, tales como: compuestos fenólicos o colorantes que son descargados al ambiente.

La generación de grandes cantidades de residuos agro-industriales derivados de las actividades del ramo industrial, pueden tener una aplicación útil, estos representan una fuente renovable de energía, y se obtienen en cantidades enormes, constituyendo una materia prima barata. Los polisacáridos que se encuentran en estos materiales, pueden ser transformados, mediante procesos químicos y enzimáticos (Pandey 2003, Viniegra-González y cols. 2003, Romero-Susana 2007).

Por tal motivo, la biotecnología esta utilizando organismos o sus metabolitos para disminuir la concentración de contaminantes, como nuevas alternativas que permitan solucionar este problema. Esta rama ha estudiado hongos basidiomicetos, que produzcan un complejo enzimático capaz de degradar estos compuestos. Debido a su extensa variedad los hongos presentan diversas formas de vida, por lo que existen diferentes clasificaciones; una de ellas se refiere a su capacidad de degradación de sustratos, donde se encuentran los hongos de pudrición: blanda, oscura y blanca (Pointing 2001).

Los hongos de pudrición excretan algunas de las enzimas lignocelulolíticas (celulasas, hemicelulasas y lacasas entre otras), que degradan compuestos ligninocelulósicos (lignina, celulosa y hemicelulosa), presentes en los residuos agro-industriales.

*Pleurotus ostreatus* es un basidiomiceto de pudrición blanca. Bajo distintas condiciones de desarrollo, principalmente sobre bagazo de caña ha mostrado producción de enzimas lignocelulolíticas, este hongo se ha utilizado en la biorremediación para la biodegradación de compuestos químicos liberados en mantos acuíferos y suelos por diversas industrias. La habilidad del micelio del género *Pleurotus* para crecer sobre materiales ligninocelulósicos, se ha atribuido a la secreción de enzimas lacasas, las cuales producen isoenzimas citoplasmáticas o extracelulares que degradan lignina, además de celulasas y xilanasas.

## **1.1 Hongos de pudrición de 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 (Schwarze y cols. 2000).

Los hongos de pudrición blanda son aquellos que degradan carbohidratos sencillos, el nombre es usado por la consistencia suave de la madera después de su degradación por ascomicetes. Los hongos de pudrición oscura degradan polisacáridos tales como la celulosa y hemicelulosa, causada por hongos basidiomicetes principalmente; lleva este nombre porque al degradar los carbohidratos y polímeros presentes en la madera, ésta adquiere un color oscuro y una consistencia quebradiza.

La pudrición blanca es ocasionada principalmente por basidiomicetes y ascomicetes, y pueden degradar hasta lignina. En la naturaleza, los hongos de pudrición blanca se derivan de su capacidad de mineralización de la lignina provocando en la madera un aspecto blanquecino (Pointing 2001). Estos hongos realizan una función natural esencial en la conversión de lignina, éste es un polímero polifenólico heterogéneo que se degrada por oxidación. El reciclaje de lignina por hongos de pudrición blanca, es un factor fundamental del ciclo del carbono en los bosques, una de las mayores reservas de carbono orgánico del suelo. Estos presentan dos patrones de descomposición, la pudrición simultánea donde la celulosa, hemicelulosa y lignina, son removidas simultáneamente y la delignificación, en la cual la lignina es removida antes de la hemicelulosa y celulosa (Schwarze y cols. 2000).

Los hongos de pudrición blanca excretan además de celulasas y hemicelulasas (xilanasas entre otras), una o más de las tres enzimas extracelulares que son esenciales para la degradación de lignina (lacasa, Mn-peroxidasa y Lingnin-peroxidasa), que se combinan con otros procesos para efectuar su mineralización (Pointing 2001).

## **1.2 Descripción del género *Pleurotus***

El género *Pleurotus* comprende especies de color blanco, amarillento o rosado, a veces grisáceo u oscuro. Su forma puede ser de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. Con relación al estípite puede carecer de éste, ser lateral o excéntrico y/o corto, mediano o largo.

Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (muy raramente elipsoides) y son lisas. El género está distribuido en Europa, Asia, África, Australia y Latinoamérica (Sánchez 2010). Es un hongo saprótrofo, 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 varía entre 15 y 28°C. *P. ostreatus* es una de las especies de este género, se desarrolla en climas templados a una temperatura de alrededor de 25°C. Tiene gran importancia ecológica, ya que en su producción se utilizan y reciclan miles de toneladas de residuos agroindustriales, acelerando así su biodegradación y reciclaje en la naturaleza (Sánchez 2010).

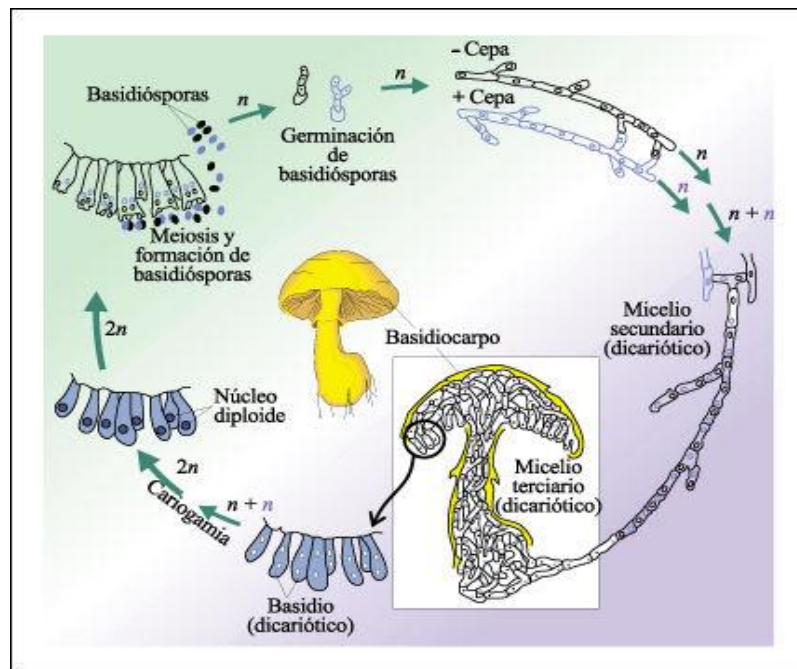
La fase vegetativa de *P. ostreatus* puede ser obtenida relativamente fácil a nivel laboratorio, lo que facilita su estudio en diferentes sistemas de desarrollo, como puede ser sobre agar, fermentación sumergida y/o fermentación sólida utilizando ya sea soportes biodegradables o inertes. Esta es filamentosa porque está constituida por un conjunto de filamentos (hifas) denominado micelio. El crecimiento de éste se realiza sólo en las puntas y es un sistema de biomasa ramificada que se origina de la germinación de esporas o a partir de fragmentos de hifas. Su crecimiento se atribuye a un fenómeno complejo en el que participan vesículas, que son agregados de enzimas hidrolíticas y sintéticas que degradan y restauran fragmentos de la pared celular. Las vesículas se producen a lo largo del segmento sub-apical y se transportan por medio de un mecanismo hasta llegar al centro distribuidor de vesículas conocido como Spitzenkörper. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical dando lugar al crecimiento de las hifas (Viniegra-González y cols. 1997).

El crecimiento de la hifa causa que se formen sitios adicionales para la síntesis de la pared en la región sub-apical, originando ramificaciones laterales que a su vez sintetizan una nueva pared. La formación de las ramificaciones requiere de la producción de un nuevo ápice de la célula madre existente.

El micelio tiene por función, adquirir y distribuir los nutrimentos, así como el crecimiento y la formación de la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos.

En los basidiomicetos existen dos modelos sexuales 1) el homotalismo, término empleado para los hongos que son autocompatibles, es decir, en los que 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 (figura 1), donde las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleíco recíproco (plasmogamia), formando un micelio secundario dicariótico con la presencia de fíbulas, la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero, posteriormente ocurre meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas), que son expulsadas hacia el ambiente.



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



## 1.3 Compuestos ligninocelulósicos

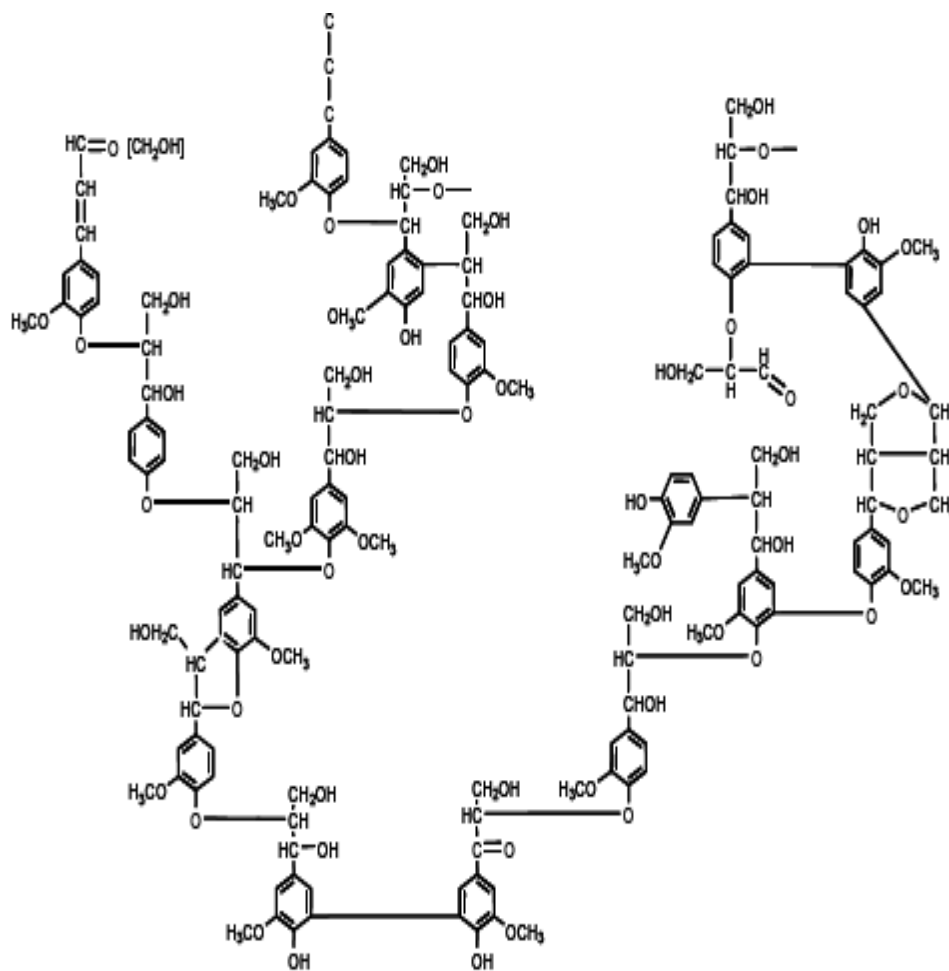
### 1.3.1 Lignina

La lignina es uno de los biopolímeros presentes en la biósfera y es el componente aromático más abundante de plantas vasculares, representa el 25% en peso de la materia seca, es de gran peso molecular, por su estructura confiere a la planta rigidez y unión entre sus células. La mayor parte de ésta se encuentra dentro de las paredes celulares, entremezclada con las hemicelulosas y formando una matriz que rodea las ordenadas microfibrillas de celulosa. Además, protege a los carbohidratos fácilmente degradables (celulosa, hemicelulosa) de la hidrólisis enzimática microbiana. Este biopolímero contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilo fenólicos que le confieren rigidez a la pared celular de las plantas y además las protege del ataque de organismos patógenos. Biosintéticamente, la lignina proviene de tres alcoholes precursores: el alcohol *p*-hidroxicinamílico (cumarílico), el alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinamílico (coniferílico) y el alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamílico. La copolimerización por radicales libres de estos alcoholes, iniciada por peroxidasas vegetales, da lugar al polímero de lignina (figura 2).

El contenido en lignina del tejido leñoso varía entre 18 y 30% del peso seco. Está ubicada en la lámina secundaria de las paredes celulares y es el componente de las plantas degradado más lentamente. No es químicamente uniforme y tiene una estructura muy compleja. La complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. Las diferencias en la composición de las ligninas se manifiestan en el contenido de grupos metoxi: 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto, 14% en gramíneas

Las características estructurales de este heteropolímero vegetal imponen ciertas restricciones para su biodegradación. Definiendo a una molécula de lignina con un peso molecular de entre 600-1000 kDa, es evidente que su tamaño le impide poder ser degradada intracelularmente. Además, por el tipo de enlaces covalentes que presenta (aril-éter, aril-aril y carbono-carbono) y su heterogeneidad, no puede ser degradado por mecanismos típicos de hidrólisis. Por lo tanto, cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben ser además de extracelulares, no hidrolíticas y bastante inespecíficas (Dávila y Vázquez-Duhalt 2006).

La lignina es un producto final inerte del metabolismo vegetal y solamente es degradada por microorganismos. Entre estos se encuentran *Stereum*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Polyporus*, *Xylaria*. La degradación de lignina ocurre en presencia de oxígeno y glucosa. El sistema enzimático contiene peroxidasas que catalizan la ruptura oxidativa de los enlaces  $\beta$ -O-4 éter y los C-C de la lignina y requieren  $H_2O_2$  proveniente de la oxidación por la glucosa-oxidasa. La formación de peroxidasas es promovida por la limitación de nitrógeno y la descomposición de la lignina parece tener como principal objetivo el acceso a los componentes nitrogenados de la madera. El sistema enzimático ligninolítico es poco específico, ya que las peroxidasas y oxidadasas actúan al azar sobre la molécula de lignina, generando radicales libres que son inestables y tienden a polimerizarse (Kirk y Cullen, 1998, Dávila y Vázquez-Duhalt 2006).



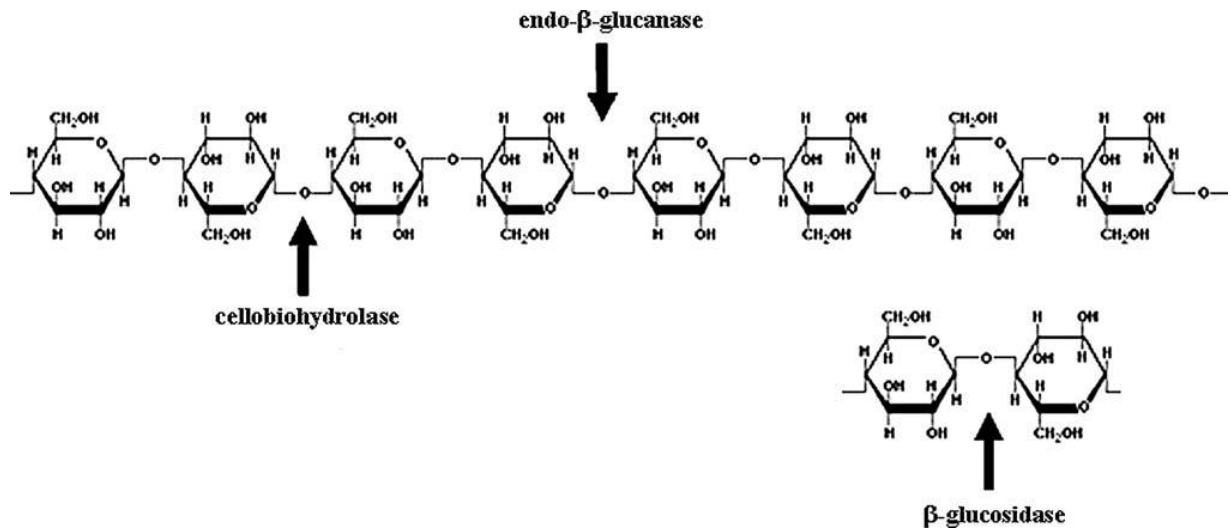
**Figura 2.** Estructura parcial de la lignina

### 1.3.2 Celulosa

La celulosa es el componente básico de los vegetales y consta de unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosas reunidas por enlaces 1,4-glicosídicos (figura 3). La molécula de celulosa tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. La insolubilidad de la celulosa y su alta resistencia mecánica se debe a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de Van der Waals. La celulosa es uno de los materiales más utilizados desde tiempos remotos, y en la actualidad es la fuente de combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales necesarios para cubrir necesidades humanas tales como el papel, la pulpa y las maderas (Martínez-Anaya y cols. 2008).

La celulosa se encuentra embebida en una matriz compuesta de un número de moléculas. Se estima que alrededor de 180 billones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente, por lo que constituye una de las fuentes de carbono renovables más importantes que hay sobre la tierra (Kadla y Gilbert 2000). El contenido de celulosa en las plantas depende del grupo taxonómico al que pertenezcan y oscila entre 35 y 50% en peso seco.

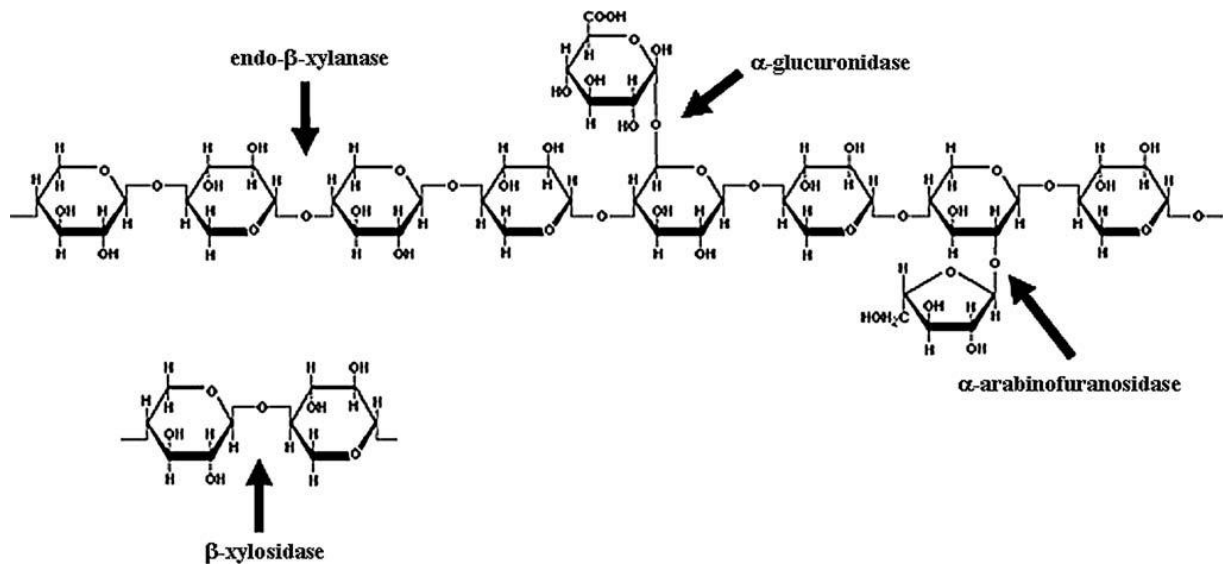
La celulosa es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos tipo  $\beta$  1-4. Los extremos del polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico (C1) libre de la molécula de glucosa pueden reducir a un número de oxidantes (como el cobre, etc.), y se conocen como extremos reductores. Mientras que el C4 con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor. El arreglo de las moléculas de celulosa en la pared celular de las plantas es jerárquico. La configuración tridimensional es estabilizada mediante interacciones de van der Waals, y consiste de 30 moléculas lineales, de entre 10,000 y hasta 14,000 moléculas de glucosa, que forman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar la fibrilla de celulosa. Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Martínez-Anaya y cols. 2008).



**Figura 3.** Estructura química de la celulosa

### 1.3.3 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. A diferencia de la celulosa su estructura no es homogénea. Consisten en polímeros de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) o ácidos urónicos (glucurónico, galacturónico) (figura 4). Son sustancias de soporte o de almacenamiento en las plantas. El xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa. La corteza de los árboles y la paja contienen hasta 30% de xilano, la madera de coníferas 7 - 12% y la de árboles de hojas caducas 20 - 25%. La cadena consta de 30 - 100 unidades de  $\beta$ -D-xilopiranososa con enlaces 1,4-glicosídicos. La frecuencia y composición de las cadenas depende de cada especie vegetal en particular y del método con el que fueron extraídas. Algunos xilanos también presentan arabinosa, glucosa, galactosa y glucuronato en ramas laterales unidas al C<sub>3</sub> de la xilosa. El xilano es degradado más rápidamente que la celulosa. La temperatura óptima para la descomposición es 37°C, y para los actinomicetos termófilos entre 45 y 50°C (Martínez-Anaya y cols. 2008).



**Figura 4.** Estructura química de la hemicelulosa

## 1.4 Enzimas lignocelulolíticas

### 1.4.1 Enzimas lacasas

Este tipo de enzimas se ha estudiado de manera especial desde finales de la década de los 90's y son producidas por una diversidad de organismos en la naturaleza. La actividad de las lacasas fue descrita por primera vez en la savia del árbol *Rhus vernicifera* y descritas por Yoshida en 1883. Estas proteínas se han detectado en plantas como el árbol de la laca – de ahí su nombre- árbol del mango, frijol y pino; (Antorini y cols. 2002); en bacterias, como *Azospirillum lipoferum* y algunos géneros de insectos (*Drosophila*, *Manduca* y *Tenebrio*, por ejemplo). En la actualidad, las lacasas más estudiadas son las concernientes a los hongos basidiomicetes que pertenecen al grupo de los hongos de pudrición blanca (*Agaricus*, *Trametes* y *Pleurotus*) (Kiiskinen y cols. 2004). Son llamados así debido a que degradan la lignina y producen un residuo de color blanco que corresponde a los desechos de celulosa y hemicelulosa que contienen las cortezas (González 2004), indicando que las lacasas están relacionadas con diversas actividades celulares y microbianas. En las plantas se relacionan con la síntesis de lignina; mientras que en los hongos juegan un papel en la degradación de la lignina, la esporulación, la producción de cuerpos fructíferos, producción de pigmentos y la patogénesis en plantas (Márquez-Rocha y cols. 2000, Galhaup y cols. 2002). Las lacasas (bencendiol: oxígeno reductasas, EC 1.10.3.2) pertenecen al grupo de las polifenol oxidasas que contienen cobre en el centro catalítico y se encuentran unidas en tres sitios distintos con

cobre; de manera común se llaman oxidasas multicobre (Baldrian 2006); son capaces de oxidar polifenoles sustituidos y diaminas transformándolos en compuestos más oxidados no tóxicos (quinonas) o mineralizándolos, para el caso de antraceno y fenantreno (Márquez-Rocha y cols. 2000, Suzuki y cols. 2003), también pueden degradar lignina en ausencia de lignina peroxidasa y de manganeso peroxidasa (Mayer y Staples 2002).

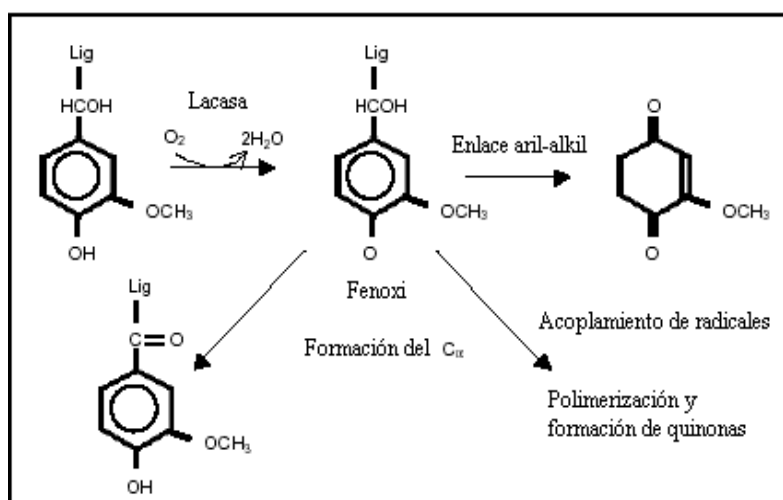
Entre las principales aplicaciones de las lacasas se encuentran la deslignificación y decoloración de lignocelulosa en las industrias papelera y textil, sirviendo como agentes de bioblanqueo; se utilizan en el tratamiento de aguas residuales que contengan compuestos aromáticos contaminantes y en la desulfuración de los combustibles fósiles (Singh y Kaur 2001, Tinoco y cols. 2001, Kiiskinen y cols. 2004).

Entre otras aplicaciones, se manejan como agentes aglutinantes en ensayos enzimáticos e inmunológicos, en menor medida, las lacasas se emplean en productos de cuidado médico y personal para contrarrestar toxinas que producen melanomas y dermatitis (Youngchim y cols. 2004) o como sustitutos del peróxido en los tintes para el cabello (Rodríguez y Toca 2006). De manera más reciente, la lacasa se trata de utilizar en la manufactura de biosensores para detectar fenol, anilina y oxígeno por su capacidad para reoxidarse (Klis y cols. 2006, Nogala y cols. 2006). Por último, en la industria alimentaria, las lacasas se han aplicado para eliminar compuestos fenólicos formados durante el procesamiento de bebidas, es decir, se utilizan para oxidar agentes tóxicos; también pueden proveer de aroma, color, sabor y estabilidad a los jugos u otras bebidas; en los alimentos el uso de lacasas permite eliminar el oxígeno y asegurar condiciones de anoxia (Loera y cols. 2006).

Estas enzimas no son específicas para un solo sustrato, la gama de estos puede variar de una lacasa a otra; sin embargo, se sabe que su sitio activo está constituido por un tripéptido histidina-cisteína-histidina (Baldrian 2006). Las lacasas realizan la oxidación a una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo monofenoles, difenoles y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, aminas aromáticas y ascorbato (Galhaup y cols. 2002, Kiiskinen y cols. 2004). La reducción del oxígeno a agua por esta enzima, está acompañada por la oxidación típica de un sustrato fenólico, generando un radical libre, que generalmente es inestable. También, puede experimentar una segunda oxidación por catálisis enzimática para formar quinonas, o puede ocurrir una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación, y/o podría participar en una reacción de polimerización, dando

un compuesto amorfo insoluble como la melanina (figura 5). Las reacciones oxidativas que pueden llevar a cabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: rompimiento entre enlaces C $\alpha$ -C $\beta$ , hidroxilación, rompimiento de estructuras aromáticas y desmetilación.

Es sabido que especies individuales de hongos pueden expresar diferentes isoformas de lacasas con diversas condiciones para la detección de su actividad: pH, especificidad de sustrato y algunas condiciones de cultivo como son: las fuentes de nitrógeno, carbono, fósforo, etc. Estas formas se diferencian por su peso molecular y localización celular. En la actualidad se estudian lacasas intracelulares y extracelulares. Las propiedades moleculares que poseen estas enzimas varían, sus puntos isoeléctricos (pI) van de 3.0 a 7.0 en lacasas de plantas el pI es por lo regular de 9.0. Mediante las técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida, se ha encontrado que los hongos tienen diferentes unidades de lacasas con pesos moleculares de: a) entre los 60 a 100 kDa (Hublik y Schinner, 2000, Tinoco y cols. 2001, Palmieri y cols. 2002, Téllez-Téllez y cols. 2005, Baldrian 2006); b) entre los 38 a 43 kDa (Tinoco y cols. 2001, Jordaan y Leukes 2003) y c) 16 a 18 kDa (Palmieri y cols. 2002); del 10 - 50% de su peso molecular se atribuye al grado de glicosilación. La glicosilación determina diversos factores en la lacasa como son la secreción la susceptibilidad proteolítica, la actividad, la retención del cobre y termoestabilidad.



**Figura 5.** Oxidación de compuestos fenólicos de lignina por acción de lacasas

#### 1.4.2 Enzimas celulolíticas

Son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, respectivamente. El interés por las celulasas y xilanasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para

convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. Cabe señalar que la lignocelulosa es la fuente de energía renovable más abundante de la tierra. Está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras (Rivers y Emert 1988).

Las celulasas y xilanasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias. La mayoría de los microorganismos celulolíticos son capaces de producir tanto celulasas como xilanasas; sin embargo, algunos otros sólo producen celulasas o xilanasas. La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación. A partir de los estudios realizados tanto en hongos como bacterias se ha propuesto un modelo general de regulación controlado por dos mecanismos principalmente. Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales celulosa y xilano para las celulasas y xilanasas, respectivamente, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa para el caso de las celulasas, y xilosa, arabinosa o xilobiosa para las xilanasas. Este modelo sugiere, además, la existencia de un nivel basal de enzimas; aquí el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas, que inician la hidrólisis del sustrato y producen pequeños oligosacáridos que entran a la célula siendo los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes (Gong y Tsao 1979).

#### **1.4.2.1 Celulasas**

El término celulasas, involucra un complejo de, por lo menos, tres actividades diferentes, las que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa. Las tres enzimas más importantes son: endocelulasas, exocelulasas y  $\beta$ -Glucosidasas (Harris y Smith 2006).

Las endocelulasas (E.C 3.2.1.4) son las celulasas más ampliamente encontradas, hidrolizan la celulosa amorfa (celulosa pretratada con ácido fosfórico concentrado) o derivados solubles tales como la carboximetilcelulosa (CMC). Las endocelulasas también reciben el nombre de endo- $\beta$  1,4-glucanasas, 1,4  $\beta$ -D glucan 4-glucanohidrolasas y CM-celulasas. Se inhiben fuertemente por la presencia de celobiosa (Massadeh y cols. 2001). Las endoglucanasas también juegan un papel importante en el incremento de rendimiento de jugo de frutas, filtración de cerveza, extracciones con aceite, en la mejora de la calidad nutricional de productos de panadería y alimento para ganado (Kaur y cols. 2007).



Las exoglucanasas (E.C 3.2.1.91) son componentes cruciales de la degradación de celulosa cristalina. Estas enzimas son inactivas en CMC, pero hidrolizan la celulosa amorfa al atacar los residuos de celobiosa, con inversión de la configuración anomérica de las terminaciones no reductoras de la cadena de celulosa (Kaur y cols. 2007). La acción de estas enzimas en celulosa cristalina es significativamente amplificada (sinergismo) por la presencia de endoglucanasas. Las exoglucanasas son también conocidas como exocelulasas, 1,4- $\beta$ -glucan celobiohidrolasas y exocelobiohidrolasas. La actividad exoglucanasa no es fácilmente cuantificada, pero su presencia en una mezcla de enzimas celulolíticas es a menudo correlacionada con el poder de sacarificación de celulosa más o menos cristalina como el avicel (actividad de avicelasa) o de papel filtro (actividad con papel filtro) (Massadeh y cols. 2001).

Las  $\beta$ -Glucosidasas (1,4- $\beta$ -D-glucosido glucohidrolasa) (E.C 3.2.1.21) son consideradas elementos que componen los sistemas celulolíticos, hidrolizan la celobiosa a glucosa (Massadeh y cols. 2001), también se cree poseen actividad transglucosilante para convertir la celobiosa en sofrosa (Aro y cols. 2005). Estas enzimas son detectadas empleando como sustrato al *p*-nitrofenol-glucósido y esta actividad es denominada aril- $\beta$ -Glucosidasa. Las  $\beta$ -Glucosidasas son poco específicas y algunas pueden ser activas contra varios  $\beta$ -glucósido.

En general, las celulasas son proteínas bimodulares con un dominio grande catalítico y uno pequeño de unión al sustrato ligado por una secuencia proteica altamente glicosilada, rica en prolina y serina. Las celulasas se utilizan ampliamente en la industria textil para tallar y terminar las fibras celulósicas (“stone washing”) empleadas en la fabricación de ropa “denim”, donde el empleo de celulasas disminuye el teñido y desteñido de colorante índigo, impartiendo apariencia de gastado y mejorar la suavidad de la tela (Kaur y cols. 2007).

#### **1.4.2.2 Xilanasas**

La hemicelulosa se encuentra asociada a la celulosa y lignina y llega a representar hasta el 35% del peso seco de las plantas superiores. La diversidad de azúcares en las hemicelulosas depende de la planta de procedencia. Por lo regular, las hemicelulosas se clasifican de acuerdo al azúcar residual principal en el esqueleto del polímero. El xilano es la hemicelulosa más abundante, está presente en los cereales y maderas blandas y duras (Aro y cols. 2005). Estos polímeros son cadenas de xilosas unidas por enlaces xilosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4); aproximadamente una de cada diez moléculas de xilosa en la cadena tiene una sustitución en su carbono 2 (C2),

al que se une un residuo de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -Dglucurónico por medio de un enlace  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2). Cerca del 70% de las xilosas están acetiladas en C2, C3 ó ambos. La presencia de los grupos acetil es responsable de la solubilidad parcial del xilano en agua. Además, una considerable proporción de las unidades de arabinosa de las cadenas laterales de xilanos está esterificada con ácidos *p*cumárico y ferrúlico (en paja de cebada, 2,9 y 6,7 %, respectivamente), que establecen enlaces con las cadenas de lignina (Khandeparkar y Bhosle 2006).

No obstante su complejidad, la degradación enzimática del xilano está bien descrita y su biodegradación es efectuada por un conjunto complejo de enzimas llamadas genéricamente xilanasas, las cuales son producidas por hongos y bacterias. La distribución de las cadenas laterales en los xilanos, así como su conformación física es de gran importancia para las enzimas que degradan estos sustratos. La hidrólisis del esqueleto de xilano se realiza por la acción de endo- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-xilanasas (EC 3.2.1.8) que liberan xilooligosacáridos de diferente longitud y disminuyen el grado de polimerización del sustrato,  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) xilosidasas (EC 3.2.1.37) (Sapag y cols. 2002, Anthony y cols. 2003, Monti y cols. 2003) y exoenzimas como la  $\alpha$ -glucoronidasa (EC 3.2.1.131) y acetil xilanesterasa (3.1.1.72) que liberan azúcares monoméricos por su acción en los extremos de las cadenas (Aro y cols. 2005). Las xilanasas tienen un número creciente de usos, de manera individual o combinada con otras enzimas.

Existen numerosas investigaciones con endoxilanasas (EC 3.2.1.8) para la producción de xilanos y su empleo en procesos biotecnológicos. La aplicación de xilanasas en la industria papelera durante el blanqueo de papel, se presenta como una alternativa para reducir el uso de compuestos clorados (Anthony y cols. 2003). Por otro lado, junto con otras enzimas hemicelulasas, las xilanasas permiten la obtención de oligosacáridos de xilano provenientes de desechos agrícolas (sacarificación de biomasa lignocelulósica) para su uso como aditivos alimenticios y edulcorantes. Además, empleadas junto con celulasas, son útiles para la modificación de masas en panadería y para el mejoramiento de las dietas de aves y rumiantes, puesto que la hidrólisis enzimática de los arabinoxilanos (en forrajes y cereales) aumenta la digestibilidad de las materias primas de la dieta (Topakas y cols. 2003). Adicionalmente, se ha probado la aplicación de xilanasas en extracción de jugos, sabores, esencias y pigmentos; clarificación de jugos y vinos; y mejoramiento de fibras textiles (Subramanniyan y Prema 2002, Monti y cols. 2003).

## 1.5 Fermentación en medio sólido y líquido

La fermentación en estado sólido (FMS) es un proceso microbiológico, que ocurre en su mayor parte sobre la superficie de un material sólido, éste tiene la propiedad de absorber o contener agua con los nutrientes solubles (Viniestra-González 1997). El material sólido puede ser biodegradable como el bagazo de caña (Trejo-Hernández y cols. 1991, Acuña-Argüelles y cols. 1995), la pulpa de café (Antier y cols. 1993) y celulosa, entre otros, o inerte como la espuma de poliuretano (Díaz-Godínez 2001, Romero-Gómez y cols. 2000). Uno de los requerimientos para la FMS es crecer microorganismos sobre un soporte impregnado de medio nutritivo y que no se vea limitado por oxígeno.

La FMS es “toda aquella en la cual el sustrato no es líquido” (Hesseltine 1972). La FMS puede ser definida más precisamente como una técnica de cultivo de microorganismos sobre la superficie de partículas sólidas humedecidas a un grado tal que permite el crecimiento de dichos microorganismos en contacto con una fase aérea porque el nivel de humedad no excede el nivel de retención máxima de agua de la matriz sólida (Viniestra-González 1997). La FMS se considera como la transformación microbiana en condiciones aerobias de materiales sólidos y que puede definirse en términos de las siguientes propiedades del sustrato que será transformado:

- a) La matriz sólida porosa puede o no ser biodegradable con una gran superficie de área por volumen. En el rango de los  $10^3$  hasta lo  $10^6$   $m^2/L$  que favorece un rápido crecimiento microbiano sobre la interface sólido/gas.
- b) La matriz deberá absorber agua varias veces su peso seco para presentar una alta actividad de agua ( $A_w$ ) con respecto a la interface sólido/gas y de esta manera facilitar los procesos bioquímicos.
- c) Se podrá suministrar una corriente convectiva de una mezcla de oxígeno y otros gases o se permitirá el intercambio pasivo de gases entre una capa delgada y porosa del material fermentable.
- d) La interface sólido/gas deberá permitir el rápido crecimiento de cepas específicas de hongos, levaduras o bacterias, ya sea en forma aislada o mezclas de microorganismos.
- e) Las propiedades mecánicas de la matriz sólida pueden permitir la agregación de cajas de material poroso sin comprimirse. La mejor estructura podría ser compuesta de pequeñas

partículas fibrosas o granulares que no tiendan a romperse o a compactarse entre ellas. De otra manera se necesitará usar capas delgadas no compactas.

f) La matriz sólida no deberá estar contaminada ni presentar inhibidores de crecimiento microbiano, y deberá absorber nutrientes para los microorganismos, tales como carbohidratos (celulosa, almidón, azúcares, etc.), fuentes de nitrógeno (amonio, urea, péptidos, etc.) y sales minerales (Viniegra-González 1997).

La FMS, se ha usado tradicionalmente para la manufactura de varios productos como son el pozol, que se produce en algunas áreas de México por la fermentación del maíz; quesos madurados como el Roquefort y Camembert, que son fermentados con esporas de *Penicillium roquefortii* y *Penicillium camemberti*, respectivamente (Pandey 1992). A escala industrial se le da aplicación a la FMS para producción de enzimas de uso en la tecnología de alimentos, diagnóstico clínico, análisis químico, para la producción de metabolitos como ácidos de gran demanda industrial como son el ácido cítrico, ácido gálico, ácido glucónico, antibióticos y proteína de origen microbiano, por mencionar algunos (Hesseltine 1972).

La fermentación sumergida o fermentación en medio líquido (FML), incluye una gran variedad de procesos microbiológicos con agitación y sin ella, donde la biomasa esta rodeada completamente por el medio de cultivo líquido.

Las principales diferencias entre la FMS y FML son:

- La mezcla y difusión de sustratos y productos con relación a la biomasa, son muy insignificantes para la FMS (Viniegra-González 1997).
- La solubilidad y difusión de oxígeno y otros gases no polares son muy grandes en FMS (Viniegra-González 1997).
- El contenido de agua libre es pequeño en FMS (Viniegra-González 1997).
- La FML permite cuantificar directamente la biomasa (Díaz-Godínez y cols. 2001).
- Se ha reportado mayor rendimiento de enzimas para FMS (Díaz-Godínez y cols. 2001, Viniegra-González 2003).

### **1.5.1 Espuma de poliuretano**

En la búsqueda de materiales inertes para los microorganismos y de utilidad como soportes en la FMS, se ha estudiado a la espuma de poliuretano (PUF) como un buen candidato, ya que presentan elevada higroscopicidad y alta porosidad, no es biodegradable y permite la medición

de la biomasa. PUF es uno de los polímeros de uretano, formado típicamente por medio de reacción de un diisocianato y un glicol.

Además de espumas, a través de esta reacción se pueden obtener fibras, elastómeros y recubrimientos. Las PUF poseen un elevado porcentaje de enlaces cruzados, lo que les confiere una elevada termorresistencia.

En la producción de las espumas de uretano, los grupos isocianato en exceso del polímero reaccionan con agua o ácidos carboxílicos para producir dióxido de carbono, que origina la espuma, al mismo tiempo que se efectúa el entrecruzamiento.

Las espumas de uretano pueden hacerse en forma flexible o rígida, según la naturaleza del polímero y el tipo de enlaces cruzados producidos. Además, se hacen en varias etapas. Un intermediario básico de peso molecular alrededor de 1000 Da es un poliéster formado a partir de poli (1,4-butilenglicol), poliésteres de sorbitol u otros. El intermediario básico es bifuncional si se desean espumas flexibles y polifuncional si lo que deben hacerse son espumas rígidas. Se hacen reaccionar al intermediario con un diisocianato aromático, usualmente toluendiisocianato, para dar un prepolímero, se adicionan catalizadores basadas en aminas terciarias o en jabones de estaño para lograr la producción rápida de espuma. El entrecruzamiento se produce por medio de la formación de uniones de urea.

Existen espumas flexibles y rígidas. La densidad varía de 0.03 kg/L a 0.8 kg/L; la conductividad térmica es baja hasta 0.11, sirven como retardadores de la llama y como aislantes térmicos.

a) Espumas flexibles. Las espumas flexibles de uretano se utilizan para cojines en muebles y automóviles, desplazando a la espuma de caucho de estas aplicaciones, por su mayor resistencia, menor densidad y más fácil fabricación.

b) Espumas Rígidas. Las espumas de uretano rígidas son resistentes a la compresión y pueden utilizarse para reforzar unidades estructurales huecas con un mínimo de peso. Además, consisten en células cerradas y tienen por ello bajos índices de transmisión de calor. Desarrollan una excelente adhesión cuando forman huecos o entre láminas de material. Finalmente, son resistentes a los aceites y la gasolina y no absorben cantidades apreciables de agua.

## 2. ANTECEDENTES

La degradación de residuos lignocelulósicos se inicia principalmente por microorganismos como hongos y bacterias. Los hongos como: *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* producen grandes cantidades de enzimas extracelulares celulolíticas, mientras que las bacterias y algunas de las cepas de hongos anaeróbios producen estas enzimas en el celulosoma, que se asocia a la pared celular. En los hongos filamentosos, las enzimas lignocelulolíticas trabajan sinérgicamente en la degradación de estos residuos. Las enzimas lignocelulolíticas que producen los hongos incluyen a las especies de los ascomicetos (*T. reesei*), basidiomicetos de pudrición blanca (*P. chrysosporium*), de pudrición oscura (*Fomitopsis palustris*), la degradación de la biomasa de estos hongos se realiza por la mezcla de celulasas, hemicelulasas y enzimas ligninolíticas. En la Tabla (1) se resumen algunos hongos productores de estas enzimas (Dashtban y cols. 2009).

**Tabla 1.** Ejemplos de diferentes hongos productores de enzimas lignocelulolíticas.

	Grupo	Hongos	Enzimas
Hongos aeróbicos (Enzimas celulolíticas Extracelulares)	Ascomicetos	<i>T. reesei</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ - glucosidasas), hemicelulasas (xilanasas)
		<i>T. harzianum</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ - glucosidasas, $\beta$ -1,3- glucanasas)
		<i>A. Niger</i>	Celulasas y xilanasas
		<i>Postalotiopsis sp.</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ - glucosidasas), lacasas
	Basidiomicetos	<i>P. chrysosporium</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ - glucosidasas), xilanasas
		<i>F. palustris</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ - glucosidasas)
		<i>Lentinus edodes</i>	Celulasas y xilanasas

		<i>Trametes sp.</i>	Celulasas y xilanasas
Hongos anaeróbicos (Chytridiomycetes)	<i>Anaeromyces</i>	<i>Anaeromyces mucronatus</i> 543	Celulasas (carboximetilcelulasas), Hemicelulasas (xilanasas)
Hongos asociados a la pared celular	<i>Caecomyces</i>	<i>Caecomyces comunis</i>	Celulasas, Hemicelulasas (xilanasas, $\beta$ -D xilosidasa)
	<i>Cyllamyces</i>	<i>Cyllamyces aberensis</i>	Celulasas y xilanasas
	<i>Neocallimastix</i>	<i>Neocallimastix frontalis</i>	Celulasas, hemicelulasas (xilanasas)
	<i>Orpinomyces</i>	<i>Orpinomyces sp.</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas, $\beta$ -1,3-glucanasas), xilanasas
	<i>Piromyces</i>	<i>Piromyces sp.</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas, $\beta$ -1,3-glucanasas), xilanasas

Los basidiomicetos ligninolíticos, causantes de la pudrición blanca producen varias isoenzimas oxidoreductasas, como peroxidasas, manganeso-peroxidasa y lignin-peroxidasa. Otro grupo de enzimas son las oxidasas que contienen cobre, como las lacasas que reducen el oxígeno disuelto en agua, y oxidan sustratos fenólicos y no fenólicos formando radicales catiónicos, quinonas o radicales fenoxi. Estos hongos también producen un sistema complejo de hidrolasa, que degradan pectinas, hemicelulosas y celulosas (Shan y Nerud 2002). El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos tiene como propósito principal el crecimiento y transporte de nutrientes hacia el ápice hifal, siendo ésta, el área activa de secreción enzimática (Papinutti 2003).

Las enzimas extracelulares son producidas dentro de la célula, pero actúan fuera de ella. En general las enzimas degradadoras de polisacáridos están sujetas a mecanismos de regulación de sus síntesis. Es decir no se producen de modo constante, constitutivo, su síntesis es inducida por el sustrato adecuado y es reprimida por azúcares fácilmente utilizables, como la glucosa. El inductor más eficiente es el polímero-sustrato de las enzimas que serán

sintetizadas, sin embargo, debido a su alto peso molecular, no son capaces de penetrar en las células y ejercer su efecto. Las enzimas extracelulares del complejo celulolítico y ligninolítico existen en múltiples formas. Las síntesis de isoenzimas pueden deberse a productos de genes diferentes, aunque también pueden deberse a cambios postraduccionales como proteólisis, glicosilación. Se pueden sintetizar como consecuencia de estados fisiológicos diferentes (composición del medio de cultivo, pH, temperatura, etc.) a partir de genes regulados diferencialmente. En medios de cultivo ligeramente diferentes se sintetizan diferentes formas de una misma enzima, que a pesar de poseer características catalíticas similares, difieren notablemente de sus características fisicoquímicas. En la naturaleza el hongo se encuentra con distintos sustratos, distintas condiciones ambientales, pueden entonces producirse distintas formas enzimáticas, con propiedades más adecuadas a las nuevas circunstancias que les permitan degradar al polímero de la manera más eficiente. Sin embargo, también el producto de un gen puede ser modificado diferencialmente mediante glicosilaciones o digestiones proteolíticas luego de la secreción (Carlile y cols. 2001). Las lacasas son secretadas al medio extracelular por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos, siendo los basidiomicetos de pudrición blanca los que más lacasa producen. Así mismo, la producción de lacasas está muy extendida en especies de hongos saprófitos del suelo, y también en hongos ectomicorrizógenos (Luis y cols. 2004).

Hasta finales del siglo XX, las lacasas se habían encontrado únicamente en organismos eucariotas, sin embargo, actualmente existen datos que evidencian la existencia de lacasas intracelulares o periplasmáticas en procariontes. Se describieron por primera vez en *Azospirillum lipoferum* y posteriormente se han hallado en bacterias como *Marinomonas mediterranea*, *Mycobacterium tuberculosis* o en las esporas de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus subtilis* (Claus 2004). Probablemente, las lacasas bacterianas mejor caracterizadas sean las de *B. subtilis* y *Sinorhizobium meliloti* (Martins y cols. 2002, Rosconi y cols. 2005).

Las lacasas son proteínas muy estables, con temperaturas óptimas entre 50 y 70°C (Morozova y cols. 2007), aunque se pueden encontrar enzimas muy termoestables como la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, con un tiempo de inactivación de 3 horas a 75°C (Litthauer y cols. 2007). Poseen un punto isoeléctrico (pI) entre 2,6 y 4,5 y presentan actividad en un amplio



rango de pH, entre 2,0 y 8,5 aunque el máximo se encuentra entre 3,0 y 5,0 (Leonowicz y cols. 2001, Morozova y cols. 2007). Poseen potenciales de óxido-reducción entre 0,5 y 0,8, catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos, desde compuestos fenólicos (*orto* y *para* difenoles, metoxifenoles, etc.) a aminas aromáticas e incluso iones inorgánicos (Morozova y cols. 2007).

Otras reacciones que pueden llevar a cabo las lacasas son desmetilaciones (Kirk y cols. 1987) y deshalogenaciones en el caso de compuestos sustituidos. Su actividad frente a compuestos fenólicos es muy dependiente del pH, ya que el potencial redox de estos compuestos disminuye a medida que se incrementa el pH. Sin embargo, a pH superior a 6 se produce inhibición de la actividad catalítica (Xu 1997). La actividad lacasa también puede ser inhibida por iones inorgánicos como cloruros y fluoruros o por compuestos orgánicos como cisteína o ácido tioglicólico (Morozova y cols. 2007).

Las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las lacasas fúngicas codifican una cadena polipeptídica de entre 520 y 550 aminoácidos. El plegamiento estructural de las lacasas está configurado en tres dominios de tipo cupredoxina con arquitectura tipo barril- $\beta$ , estabilizados por varios puentes disulfuro. Esta estructura está muy relacionada con la de pequeñas proteínas de cobre como la azurina o la plastocianina, sugiriendo su evolución a partir de un antecesor único (Murphy y cols. 2000, Claus 2004).

Las lacasas catalizan la oxidación de las unidades fenólicas de la lignina liberando H<sub>2</sub>O al utilizar el O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones. Su importancia en el proceso de deslignificación se manifiesta por su presencia en la práctica totalidad de los hongos ligninolíticos. Es más, algunos de estos hongos como *P. cinnabarinus* o *Coriolopsis rigida* sólo producen lacasa como única enzima ligninolítica (Saparrat y cols. 2002), sugiriendo la existencia de mecanismos no enzimáticos iniciados por estas enzimas en el proceso biodegradativo (Saparrat y cols. 2001, Camarero y cols. 2005, Nikitina y cols. 2005).

La amplia especificidad de sustrato de las lacasas y el elevado potencial oxidativo del sistema lacasa-mediador ha dirigido su estudio hacia la degradación de compuestos aromáticos problemáticos para el medioambiente, entre los que se encuentran colorantes textiles, bifenilos policlorados (PCBs), clorofenoles, fitosanitarios o hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Nyanhongo y cols. 2002, Kang y cols. 2002, Rodríguez y cols. 2004, Keum y cols. 2004).

El uso de las lacasas en síntesis orgánica se muestra como una prometedora alternativa a la oxidación química clásica con una amplia gama de sustratos. En un futuro próximo, el uso práctico de las lacasas de hongos para las transformaciones problemáticas (digestión de lignocelulosa para utilizarla como fuente de carbono, las modificaciones de lignosulfonatos para la producción de emulsionantes, surfactantes y adhesivos; síntesis de polímeros con propiedades redox como películas para dispositivos bioelectrónica, la síntesis de antibióticos y mucho más) se ampliará la necesidad de este biocatalizador. En la Tabla 2, se muestran algunas lacasas que se han utilizado en la síntesis orgánica (Baldrian 2006).

**Tabla 2.** Lacasas utilizadas en síntesis orgánica.

Lacasa fuente	Aplicación
<i>Coriolus hirsutus</i>	Síntesis de un colorante indamine Síntesis de la realización de polianilina
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Síntesis de 3 - (3,4-dihidroxifenil) derivados del ácido propiónico-
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Polimerización de polímeros funcionales
<i>Pyricularia oryzae</i>	acoplamiento oxidativo de hidrazona 3-metil-2 benzotiazolinona y methoxyphenols
<i>Trametes versicolor</i>	Síntesis de los aldehídos aromáticos Polimerización de 1-naftol Síntesis de imidazoles sustituidos y los productos de dimerización La polimerización de la catecol La reticulación de una proteína Síntesis de 3,4-dihidro-7 ,8-dihidroxi-2H-1-los dibenzofuranos

<i>Trametes villosa</i>	Polimerización de bisfenol A
<i>Trametes hirsuta</i>	Oligomerización de la proteína
<i>Trametes pubescens</i>	La oxidación de los derivados de azúcares
	La oxidación de los glucósidos naturales
	Síntesis de totarol
<i>Pyricularia oryzae</i>	Entrecruzamiento de las proteínas recombinantes
<i>Agaricus bisporus</i>	Síntesis de 3,4-dihidro-7,8-dihidroxi-2H-1-los dibenzofuranos
<i>Myceliophthora</i>	Síntesis de poli (catequinas)

La actividad y purificación de las enzimas lacasas se han demostrado en varios microorganismos, sin embargo se ha observado que no todos los hongos producen cantidades significativas de estas enzimas. Los hongos de pudrición blanca presentan actividad de lacasas en cantidades diferentes. Hasta ahora, más de 100 lacasas han sido purificadas a partir de hongos (Tabla 3) (Baldrian 2006).

**Tabla 3.** Lacasas purificadas en hongos

Especies	MW (kDa)	pI	pH óptimo				Km (M)				Temperatura óptima (° C)
			ABTS	DMP	GUA	SYR	ABTS	DMP	GUA	SYR	
<i>Agaricus bisporus</i>	96										
<i>Agaricus bisporus</i>	65				5.6						
<i>Agaricus blazei</i>	66	4.0	2.0	5.5		6.0	63	1026	4307	4	
<i>Agrocybe praecox</i>	66	4.0									
<i>Albatrella dispansus</i>	62		4.0								70
<i>Armillaria mellea</i> me Lac	59	4.1		3.5				178			
<i>Armillaria mellea</i> Lac II											
<i>Armillaria mellea</i>	80	3.1									
<i>Aspergillus nidulans</i> II	80			6.5							55
<i>Botrytis cinerea</i>	74	4.0		3.5				100			57
<i>Cantharellus cibarius</i>	92		4.0								50
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> L1	71	3.4	3.0	4.0	3.0		30	2900	1600		
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> L2	68	4.8	3.0	4.0	5.0		20	7700	440		
<i>Cerrena máximos</i>	57-67	3.5							160-300		50
<i>Cerrena unicolor</i>	66	4.0									
<i>Cerrena unicolor</i>	58										
<i>Chaetomium termophilum</i>	77	5.1					190	96	400	34	60
<i>Chalara paradoxa</i>	67		4.5	4.5	6.5	6.5	770	14	10	3400	
								720	230		
<i>Colletotrichum graminicola</i>	85					6.0				214	

<i>Coniothyrium minitans</i>	74	4.0		3.5				100			60
<i>Coprinus cinereus</i>	58	4.0	4.0			6.5	26				60-70
<i>Coprinus friesii</i>	60	3.5	5.0	8.0			41				
<i>Corioloopsis fulvocinnerea</i>	54-65	3.5								70-90	
<i>Corioloopsis gallica</i>	84	4.2-4.3	3.0								70
<i>Corioloopsis rigida</i> I	66	3.9	2.5	3.0			12	328			
<i>Corioloopsis rigida</i> II	66	3.9	2.5	3.0			11	348			
<i>Coriolus hirsutus</i>	55	4.0									
<i>Coriolus hirsutus</i>	78	4.2					8				45
<i>Coriolus máximos</i>	57										
<i>Coriolus zonatus</i>	60	4.6									55
<i>Cryptococcus neoformans</i>	77										
<i>Cyathus stercoreus</i>	70	3.5	4.8								
<i>Daedalea quercina</i>	69	3.0	2.0	4.0	4.5	7.0	38	48	93	131	70, 55
<i>Dichomitus squalens</i> 1	66	3.5		3.0							
<i>Dichomitus squalens</i> 2	66	3.6		3.0							
<i>Fomes fomentarius</i>											52
<i>Ganoderma lucidum</i>	67						4				25
<i>Ganoderma tsugae</i>											
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	190	5.6		4.5				26	510		
<i>Hericium echinaceum</i>	63		5.0								50
<i>Junghuhnia separabilima</i>	58-62	3.4-3.6									
<i>Lactarius piperatus</i>	67										
<i>Lentinula edodes</i> Lcc1	72	3.0	4.0	4.0	4.0		108	557	917		40
<i>Lentinus edodes</i>	65	3.0									
<i>Magnaporthe grisea</i>	70					6.0				118	30
<i>Marasmius quercophilus</i> *	60	4.0-4.4				5.0					80
<i>Marasmius quercophilus</i> †	60	4.8-5.1				5.0					80
<i>Marasmius quercophilus</i>	65	3.6				4.5				7	75
<i>Marasmius quercophilus</i> ‡	65		2.6			6.2	8			50	80
<i>Marasmius quercophilus</i> §	60		4.0			4.5	113			4.2	80
<i>Mauginiella</i> sp.	63	4.8-6.4	2.4	3.5	4.0						
<i>Melanocarpus albomyces</i>	80	4.0	3.5		5.0-7.5	6.0-7.0					65
<i>Monocillium indicum</i>	100										
<i>Myrothecium verrucaria</i>	62										
<i>Neurospora crassa</i>	64										
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	79	5.1	2.8		6.0	6.0					
<i>Panaeolus papilionaceus</i>	60		3.0	8.0			51				
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	60		3.0	7.0			32				
<i>Panus tigrinus</i>	64	2.9-3.0									
<i>Panus tigrinus</i>	63										

<i>Phanerochaete flavido-alba</i>	94		3.0									30
<i>Phanerochaete chryosporium</i>	47											
<i>Phellinus noxius</i>	70											
<i>Phellinus ribis</i>	152		5.0	4.0-6.0		6.0	207	38		11		
<i>Phlebia radiata</i>	64	3.5										
<i>Phlebia tremellosa</i>	64											
<i>Pholiota mutabilis</i>												
<i>Physisporinus rivulosus</i> LACC un	66	3.3	2.5	3.0	3.5	3.5						
<i>Physisporinus rivulosus</i> LACC 2	67	3.3	2.5	3.0	3.5	3.5						
<i>Physisporinus rivulosus</i> LACC 3	68	3.2	2.5	3.0	3.5	3.5						
<i>Physisporinus rivulosus</i> LACC 4	68	3.1	2.5	3.0	3.5	3.5						
<i>Pleurotus eryngii</i> I	65	4.1	4.5					1400	7600			55
<i>Pleurotus eryngii</i> II	61	4.2	4.5					400	8000			55
<i>Pleurotus florida</i>	77	4.1							30000			
<i>Pleurotus ostreatus</i>	67	3.6				5.8						50
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1b	62	6.9	3.0	4.5		6.0	370	260		220		
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1w	61	6.7	3.0	3.0-5.0	NA	6.0	90	2100	NA	130		45-65
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA2	67	4.0	3.0	6.5	6.0	6.0	120	740	3100	140		25-35
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA3a	83-85	4.1	3.6	5.5	6.2		70	14000		36		35
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA3b	83-85	4.3	3.6	5.5	6.2		74	8800		79		35
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXC	59	2.9	3.0	3.0-5.0	6.0	6.0	280	230	1200	20		50-60
<i>Pleurotus pulmonarius</i> Lcc2	46		4.0-5.5		6.0-8.0	6.2-6.5	210		550	12		50
<i>Pleurotus sajor-caju</i> IV	55	3.6	2.1				92					
<i>Podospora la pata de ganso</i>	383											
<i>Polyporus anceps</i>						5.0-5.5						
<i>Polyporus anisoporus</i>	58	3.4										
<i>Polyporus pinsitus</i>	66		3.0	5.0			22					
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	63	3.0			4.0-4.5	4.4-5.0			330	30		
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	81	3.7			4.0							
<i>Pycnoporus coccineus</i>	70											
<i>Rhizoctonia solani</i> 4	170											
<i>Rigidoporus lignosus</i> B	55	3.7	3.0	6.2			80	480				
<i>Rigidoporus lignosus</i> S	60	3.1	3.0	6.2			49	108				
<i>Russula delica</i>	63											
<i>Schizophyllum municipio</i>	62-64											
<i>Sclerotium rolfsii</i> SRL1	55	5.2	2.4									62
<i>Sclerotium rolfsii</i> SRL2	86											
<i>Stropharia</i>	67	4.4										

<i>coronilla</i>									
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	66		2.5	3.5					
<i>Thelephora terrestres</i>	66		3.4		4.8	5.0	16	121	3
<i>Trametes gallica</i> me Lac	60	3.1	2.2	3.0	4.0		12	420	405
<i>Trametes gallica</i> Lac II	60	3.0	2.2	3.0	4.0		9	410	400
<i>Trametes hirsuta</i>	64-68	3.7-4.0							63
<i>Trametes multicolor</i> II	63	3.0							
<i>Trametes ochracea</i>	64	4.7						90	
<i>Trametes pubescens</i> LAP 2	65	2.6					14	72	360
<i>Trametes sanguinea</i>	62	3.5							
<i>Trametes trogii</i>	70	3.3, 3.6					30	410	
<i>Trametes versicolor</i>	68		2.5	3.5		4.0	37	15	
<i>Trametes villosa</i> un	63	3.5	2.7			5.0-5.5			55
<i>Trametes villosa</i> 3	63	6.0-6.5	2.7			5.0-5.5			
<i>Trametes</i> sp. AH28-2 A	62	4.2			4.5		25	25	420
<i>Trichoderma</i> sp.	71								
<i>Tricholoma giganteum</i>	43		4.0						70
<i>Volvariella volvacea</i>	58	3.7	3.0	4.6		5.6	30	570	10

ABTS, 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazol-6-sulfónico); DMP, 2,6-dimethoxyphenol; GUA, 2-metoxifenol (guayacol); SYR, 4-hidroxi-3,5-dimethoxybenzaldehyde [(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) metileno] hidrazona (siringaldazina). NA: no activa. \*Cepa 17, forma constitutiva. †Cepa 17, inducida con *p*-hidroxibenzoico ácido. ‡ cepa C7, forma constitutiva. § cepa 19, inducida con ácido ferúlico.

Téllez-Téllez y cols. (2005), Palmieri y cols. (2003) describen que el número y tipo de isoformas de lacasa que se producen dependen de la especie del hongo, medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento.

Estudios realizados en la producción de lacasas por hongos como *Aspergillus niger* y por dos transformantes (C28eco3 y C28eco3-13) del gen de lacasas IV de *Trametes versicolors* se estudiaron en fermentación sólida y líquida utilizando diferentes concentraciones de glucosa y maltodextrina. Las actividades de lacasas fueron mayores cuando la glucosa se utilizó como fuente de carbono. Sin embargo, la represión de la producción de lacasa fue evidente en la fermentación en medio líquido al aumentar la glucosa de 10 a 50 g/L. En contraste la producción de la mayor actividad de lacasas para las cepas C28eco3 (362 U/L) y C28eco3-13

(592 U/L) se muestra cuando la glucosa se utilizó como fuente de carbono en una concentración de 50 g/L en la fermentación sólida (Téllez-Téllez y cols. 2008).

Diferentes residuos agroindustriales sintéticos o naturales se han utilizado como fuentes de carbono en la producción de enzimas celulolíticas. El aumento de la concentración del sustrato hasta en un 12% en fermentación sólida utilizando *Aspergillus niger* aumento la producción de celulasas. Otro estudio similar realizado con *Chaetomium globosum* para la producción de glucosidasa demostraron que la paja de cereales o carboximetilcelulosa (1%, w/w) son la mejor fuente de carbono en comparación del aserrín. Por otro lado, se ha indicado que las celulasas son enzimas inducibles, se han utilizado diferentes fuentes de carbono para el estudio de la actividad. Un estudio realizado con *Nectria catalinensis* utilizan a la celobiosa (2,95 mM) como inductor en la síntesis de celulasas, sin embargo altas concentraciones de estas fuentes carbono como celobiosa o glucosa añadida al medio de cultivo puede inhibir entre un 60-80% la actividad de estas enzimas (kumar y cols. 2008).

Los factores ambientales tales como la temperatura, pH, actividad de agua, O<sub>2</sub>, la concentración de nutrientes y los productos en el medio pueden afectar significativamente el crecimiento microbiano y la formación de productos en fermentación sólida. Los parámetros de cultivo tales como la temperatura de incubación, tiempo de incubación y la concentración del inductor, se optimizaron para mejorar el rendimiento de celulasas por *Trichoderma reesei* RUT C30. En fermentación sólida, utilizando bagazo de caña de azúcar como sustrato. Los resultados obtenidos mostraron que el hongo cuando los factores ya mencionados no se modifican se obtuvo una actividad de celulasas (5.11 U/gss), sin embargo, la celulosa fue más alta (25.6 U/gss) cuando el inductor presento una concentración de 0.331 ml g/ds, la temperatura de incubación y el tiempo fueron de 33°C y 67 h. La temperatura en este estudio resulto tener influencia en la producción de la enzima. Aunque este hongo se ha cultivado a 30°C en este estudio, un rango de temperatura de 32-33°C resultó ser óptima para la producción de celulasas. Aunque esta es diferente a los valores reportados óptimos de temperatura de incubación (Mekala y cols. 2008).

Algunos estudios realizados en diferentes hongos para la producción de enzimas celulolíticas han mostrado diversos resultados según el sistema de producción. Las cepas de *Trichoderma*

*sp.*, produce la xilanasa (Endo-1,4-beta-xilanasa) con un punto isoeléctrico de 9, 190 aminoácidos y un peso molecular de 21 kDa, esta enzima se cristaliza fácilmente en sulfato de amonio, sodio y potasio a través de fosfatos a un pH de 3.5 a 9 (Mekala y col. 2008).

Los hongos de *Trichoderma reesei*, *Trametes sp.*, y *Aspergillus niger* producen grandes cantidades de enzimas celulolíticas extracelulares. Algunos hongos filamentosos, producen enzimas celulolíticas incluyendo endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas que trabajan sinérgicamente (Dashtban y col. 2009).

Otro estudio realizado con *Trichoderma reesei* C-30 se secuenció y se expresó el gen de xilanasa en donde el cDNA fue amplificado por PCR. Encontrando 190 aminoácidos con una masa molecular de 21 kDa. El punto isoeléctrico y la mayor actividad fueron de 7.5 y 1.600 U/mg, respectivamente (Jun y col. 2009).

Las enzimas celulolíticas del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*, presenta dos exoglucanasas (CBH1 Y CBH2), por lo menos cuatro endoglucanasas (EC1,EC2,EG3 EG5), y una glucosidasa. Estas enzimas actúan en sinergia para catalizar la hidrólisis de celulosa. Diferentes parámetros físicos como: pH, temperatura, adsorción, factores químicos como nitrógeno, fósforo, presencia de compuestos fenólicos pueden actuar como inhibidores para la bioconversión de lignocelulosa. La producción de celulasas por células microbianas se rige por controles genéticos y bioquímicos incluyendo la inducción, represión catabólica, o producto final. Varios estudios se han realizado para aumentar la producción de celulasas mediante la mejora de cepas por mutagenesis. Varios métodos físicos y químicos se han utilizado para desarrollar cepas de bacterias y hongos sobre productores de estas enzimas, todas con un éxito limitado (Kumar y cols. 2008).

El pH es un factor importante para la producción de celulasas. Un estudio realizado con *Aspergillus niger*, se observó que el pH 5.5 fue el óptimo para la máxima producción enzimática. Por otro lado con *Penicillium rubrum* el rango de pH fue 5.5-6.5 en la producción de glucosidasa. Por otra parte el comportamiento de adsorción máxima de celulasas por *Aspergillus phoenicus* ocurrió en un pH de 4.8-5.5 (Kumar y cols. 2008).



La capacidad que presentan las cepas *Aspergillus fumigatus* RP04 y *Aspergillus niveus* RP05 en la producción de enzimas xilanolíticas fueron analizadas, en fermentación líquida durante 4-5 días a 40°C, utilizando diferentes fuentes de carbono. *A. fumigatus* produce altos niveles de xilanasa con xilano obtenido de (salvado de trigo y maíz), mientras que *A. niveus* produce más xilanasa cuando el xilano fue obtenido de la madera de abedul. La temperatura óptima para ambas cepas fue alrededor de 60-70°C. Las enzimas se mantuvieron estables por 30 min a 60°C, manteniendo el 95-98% de actividad. El pH de las xilanasas resulto ser ácido (4.5-5.5). El pH estable de la xilanasa de *A. fumigatus* fue mayor a pH de 6.0 a 8.0, mientras que la enzima de *A. niveus* era más estable a un pH de 4.5 a 6.5 (Peixoto y cols. 2009).

Leite y cols. (2007), utilizaron a la levadura *Aureobasidium pullulans*, para la producción de celulasa y xilanasa en fermentación sólida, utilizando salvado de trigo. La actividad enzimática reportada en este sistema para endoglucanasa (1.05 U/ml),  $\beta$ -glucosidasa (1.3 U/ml) y xilanasa (5.0 U/ml). El pH y la temperatura óptima para xilanasa, endoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa fueron 5 y 50, 4.5 y 60, 4.0 y 75°C, respectivamente. Estas enzimas se mantuvieron estables en un amplio rango de pH. La  $\beta$ -glucosidasa fue la enzima más termoestable cuando se incubo a 75°C durante 1 h.

La bacteria *Bacillus subtilis*, produce altos niveles de xilanasa, el sustrato utilizado para la producción de estas enzimas en fermentación sólida fue el salvado de trigo. La producción de esta enzima fue alta después de 72 h de incubación a 37°C y en un sustrato con una porcentaje de humedad de 1:2 (w/v). La producción de la enzima se estimulo por la adición de nutrientes como extracto de levadura, peptona y extracto de carne. Por el contrario la adición de altas concentraciones de glucosa y xilosa en el medio reprimió la actividad la enzima. El porcentaje de represión de la glucosa (10% w/v) fue del 81% y esta era dependiente de la concentración. La adición del 4% de xilosa en el medio causo el 59% de represión. Bajo condiciones óptimas, la producción de xilanasa fue de 8.964 U/gss (Sanghi y cols. 2008).

En la industria *Trichoderma spp.*, y *Aspergillus* se utilizan en la producción a escala de estas enzimas. El contenido de humedad, tiempo de cultivo, tamaño del inóculo y la concentración del medio de cultivo se optimizo en fermentación sólida para la producción de xilanasas por

una mutante de *Aspergillus niger*, resultando que el tiempo de cultivo y la concentración del medio fueron los factores más importantes que afectaron la actividad de xilanasas. En condiciones óptimas, la actividad y la productividad obtenida después de 5 días de fermentación fueron 5.07 U/g en paja de arroz y 14 790 U/hL (Park y cols. 2002).

Las xilanasas microbianas son enzimas termostables activas a pH alcalino. Un estudio realizado en la producción de xilanasas donde aislaron hongos marinos resultando *Aspergillus niger*, en fermentación sólida con bagazo de caña de azúcar tener alta actividad de xilanasas (580 U/L), el extracto enzimático presentó actividad de xilanasas en pH 3.5 y 8.5. La enzima resultó ser termoestable a una temperatura de 55°C durante 4 h y mantuvo la actividad del 60%. Los geles de electroforesis mostraron dos isoenzimas de xilanasas con pesos moleculares de 13 y 18 KDa (Raghukumar y cols. 2004).

Otro estudio sobre la producción de enzimas lignocelulolíticas fue realizado por Kumaran y cols. (1997), encontrando que en fermentación sólida la utilizar la fibra de palma de sagu que se obtiene al retirar al almidón, resultaba ser un excelente sustrato para la producción de estas enzimas, utilizando a *P. sajor-caju*. El hongo fue crecido sobre el sustrato con un ajuste de carbono: nitrógeno (35:1). Las actividades encontradas de celulasas (0.3 a 2.8 U/g) y xilanasas (0.9 a 10.1 U/g), la actividad de lacasa producida fue de aproximadamente (17.7 U/g).

El género *Pleurotus* es un hongo de pudrición blanca debido a su capacidad para producir enzimas extracelulares ligninolíticas. Las fuentes de carbono en el medio son importantes en la producción de estas enzimas. Estudios realizados utilizando fructosa en vez de glucosa incremento 100 veces la actividad específica de lacasas de hongos basidiomicetos. Las enzimas ligninolíticas se producen durante el metabolismo secundario en condiciones limitadas de nitrógeno. *P. eryngii*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*, producen enzimas lacasas tanto en fermentación sólida (FMS) y líquida (FML), con diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno. Los niveles más altos de actividad fueron encontrados en *P. eryngii* en FML con cascara de mandarina como sustrato y en *P. ostreatus* cepa No. 294, en condiciones de FMS utilizando aserrín. Estos sustratos resultaron las mejores fuentes de carbono. *P.*

*eryngii* y *P. ostreatus* cepa No. 294, mostraron la mayor actividad de lacasas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , como fuente de nitrógeno, en una concentración de 20-30 mM (Stajic` y cols. 2006).

*P. ostreatus* produce varias isoenzimas de lacasa extracelular, estas son enzimas específicas y pueden oxidar una amplia gama de sustratos estructuralmente diferentes, tales como compuestos fenólicos y colorantes azoicos. Se ha reportado que varios hongos tienen más de un gen que codifican la enzima lacasa. Cuatro secuencias de DNA se ha encontrado en *Rhizoctonia solani*, cinco genes de lacasa se han encontrado en *Trametes villosa*, tres secuencias genómicas se encontraron en *Pleurotus ostreatus* y dos genes en *Agaricus bisporus*. Por otro lado, la diversidad bioquímica de las isoenzimas de lacasa parece ser debido a la multiplicidad de genes de lacasas. Por otra parte, la regulación de la expresión de estos genes es diferente en cada especie. *P. ostreatus* produce lacasas en varias isoenzimas y fenol oxidasa (POXC) es la isoenzima más abundante producida bajo todas las condiciones de crecimiento que ha sido estudiado este hongo. Otras tres isoenzimas purificadas y caracterizadas por este hongo son POXA1w, POXA2 y POXA1b. POXA1w exhibe diferencias propias en su contenido de metales, esta enzima contiene átomos de zinc por molécula, un átomo de hierro y un átomo de cobre por molécula. La adición de  $\text{CuSO}_4$  en el medio de cultivo aumenta la actividad de lacasa y la producción total de la isoenzima POXA1b, mientras que POXA1w se ve afectada cuando el cobre se añade. Las principales características de POXA1b son muy similares a los de POXA1w, pero POXA1b produce la lacasa clásica de luz visible de espectro UV y contiene cuatro átomos de cobre por molécula. Ambos POXA1w y POXA1b son mucho más estables que POXA2 Y POXAC en *P. ostreatus*. Los tres genes que se han identificado hasta el momento en este hongo son: POXC (antes POX2), POX1 y POXA1b (Palmieri y cols. 2000).

La producción de lacasas durante las de crecimiento de *P. ostreatus* en fermentación líquida fue evaluada. La velocidad específica de crecimiento fue de  $0.02 \text{ h}^{-1}$  la mayor cantidad de biomasa que se obtuvo después de 480 h de crecimiento fue de 7.8 g/L. Cuatro isoformas de lacasas fueron secretadas por el hongo. Estas se produjeron en la fase estacionaria del hongo, una de estas isoenzimas se produjo durante todas las fases de crecimiento. La máxima actividad de lacasa (12 200 U/L) se observó al comenzar la fase estacionaria. La enzima que

estuvo presente en toda la fase de crecimiento fue purificada encontrando un peso molecular de 43.7 KDa, esta isoenzima mostro actividad en un amplio rango de pH y temperatura, que puede ser útil en la biodegradación de compuestos fenólicos (Tlecuitl-Beristain y cols. 2008). *P. ostreatus* en un estudio en los sistemas de fermentación sólida (FMS) y líquida (FML) mostro resultados atípicos. Los cultivos crecidos en fermentación líquida produjo actividades de lacasa (13,000 U/L) con una producción de biomasa de 5.6 g/L y cuatro isoformas de lacasa. Sin embargo, los cultivos en estado sólido mostraron una actividad de lacasa menor (2,430 U/L), la producción de biomasa de 4.5 g/L, y tres isoformas de lacasa. Estos resultados demuestran que *P. ostreatus* presenta mejor resultados de actividad lacasa en fermentación líquida, en la tabla 4, se muestran los resultados obtenidos (Téllez-Téllez y cols. 2008).

**Tabla 4.** Producción de lacasas en FMS y FML

<b>Sistema</b>	<b><math>E_{max}</math> (U l<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>E_{spec}</math> (U mg<sup>-1</sup> proteína)</b>	<b><math>Y_{e/x}</math> (U g<sup>-1</sup> X)</b>	<b>P (U l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>qP (U h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> X)</b>
<b>FML</b>	13,000 (456 h)	162	2,363	28.5	51.9
<b>FMS</b>	2,430 (312 h)	30	540	7.8	17.8

Elisashvilli y cols. (2008), evaluaron la actividad enzimática lignocelulolítica por siete hongos de pudrición blanca en fermentación sólida y líquida utilizando diversos residuos agroindustriales, como fuente de carbono; para la fermentación líquida se utilizaron pellets de los residuos, además de evaluar el efecto de la adición de nitrógeno en el medio. Encontrando que la producción de enzimas lignocelulolíticas y la concentración de estas en el medio depende de la especie de hongo, sustratos lignocelulósicos y del método de cultivo. Los residuos de fruta resultaron ser los mejores sustratos para la producción de estas enzimas. Los resultados obtenidos demostraron que estos hongos basidiomicetos tienen la capacidad de producir al mismo tiempo las enzimas hidrolíticas y ligninolíticas en fermentación. Las actividades de celulasas y xilanasas fueron más altas en la fermentación sólida por los hongos *T. versicolor* seguido por *F. trogii* y *T. pubescens*, (Tabla 5). En la fermentación líquida la actividad de estas enzimas cambio entre las especie de hongos, variando de 2 a 6 veces. Todos los sustratos utilizados permitieron el crecimiento de los hongos, el crecimiento se observó a partir del segundo día después de la inoculación, y la colonización del sustrato se completo a 7-9 días. La utilización de residuos agroindustriales favoreció la producción de enzimas

hidrolasas y lacasas en ambos sistemas, resultando que la fermentación líquida presentó los mejores resultados de actividad.

La adición de nitrógeno en los medios de cultivo aumentó el contenido de proteína, incrementando el rendimiento de la enzima, en la tabla 6, se indican los resultados obtenidos en fermentación sólida.

**Tabla 5.** Especies de basidiomicetos con actividad lignocelulolítica en fermentación sólida

<b>Especie</b>	<b>Sustrato</b>	<b>CMCase (Uml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Xilanasa (Uml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Lacasas (UI<sup>-1</sup>)</b>
<b><i>C. maxima</i></b>	Hojas de árboles	19	35	253
	Paja de trigo	4	3	33
	Cascara de manzana	24	53	183
	Cascara de plátano	21	41	273
<b><i>C. polizona</i></b>	Hojas de árboles	9	7	119
	Paja de trigo	5	3	27
	Cascara de manzana	16	17	173
	Cascara de plátano	21	23	290
<b><i>F. trogii</i></b>	Hojas de árboles	10	16	458
	Paja de trigo	24	23	760
	Cascara de manzana	35	47	211
	Cascara de plátano	55	51	988
<b><i>P. coccineus</i></b>	Hojas de árboles	17	18	167
	Paja de trigo	18	19	252
	Cascara de manzana	18	17	404
	Cascara de plátano	32	37	573
<b><i>P. ostreatus</i></b>	Hojas de árboles	26	29	289
	Paja de trigo	13	15	339
	Cascara de manzana	12	17	231
	Cascara de plátano	17	26	183
<b><i>T. pubescens</i></b>	Hojas de árboles	29	26	205
	Paja de trigo	13	15	162
	Cascara de manzana	24	28	280
	Cascara de plátano	45	64	188
<b><i>T. versicolor</i></b>	Hojas de árboles	22	38	662
	Paja de trigo	5	3	137
	Cascara de manzana	45	64	188
	Cascara de plátano	62	58	203

**Tabla 6.** Efecto de la fuente de nitrógeno en fermentación sólida por *P. ostreatus* con hojas de árboles y paja de trigo

<b>Fuentes de nitrógeno</b>	<b>Aumento de la proteína (mg/frasco)</b>	<b>CMCase (Uml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Xilanasa (Uml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Lacasa (UI<sup>-1</sup>)</b>
<b>Control</b>				
<b>Hojas de árboles</b>	18	20	20	281
<b>KNO<sub>3</sub></b>	27	17	26	234
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	30	13	17	329
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	29	23	25	336
<b>Peptona</b>	34	28	35	252
<b>Control</b>				
<b>Paja de trigo</b>	16	10	15	311
<b>KNO<sub>3</sub></b>	25	13	13	275
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	27	12	18	551
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	28	15	17	293
<b>Peptona</b>	33	13	20	357

Dentro de todos los factores que determinan la actividad de estas enzimas se encuentra el tamaño de la partícula del sustrato y la concentración adicional de nitrógeno para la producción de enzimas lignocelulolíticas. Un estudio realizado con dos cepas de *P. ostreatus* encontraron que la cepa CP-50 incremento el contenido de proteínas en un 48% cuando el tamaño de la partícula fue de 1.68 mm. Sin embargo, la cepa IE-8 produjo altos niveles de xilanasas 5.79 IU/gss y celulasas 0.40 IU/gss cuando las partículas fueron heterogéneas y cuando el medio fue adicionado con sulfato de amonio (Membrillo y cols. 2008).

Por otra parte, la degradación de lignocelulosa por *P. ostreatus* en presencia de cobre, manganeso, plomo y zinc, por este hongo se encontró que bajo estas condiciones produce enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, durante el crecimiento en paja de trigo en la presencia y la ausencia de Cu, Mn, Pb y Zn. Las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas eran propensas a un efecto de metal, excepto en el aumento de la endo-β-1,4-glucanasa y β-1,4-glucosidasa en presencia de Zn (Baldrian y cols. 2005).

El micelio de *P. ostreatus* produce celulasas extracelulares cuando este es crecido en paja de trigo. Este no presenta actividad de estas enzimas cuando en el medio se encuentra la glucosa, y fue sustituida por la paja de trigo. La actividad específica de celulasas excretada no fue muy significativa aún cuando se incrementó la concentración de la paja de trigo. Las propiedades hidrolíticas se evaluaron con (carboximetilcelulosa, celobiosa), después de una purificación parcial de estas enzimas. Los resultados indicaron que este hongo produce este tipo de enzimas, entre las que se encuentran las  $\beta$ -glucosidasas, endocelulasas, exoglucohidrolasas (Garzillo y cols. 1994).

La importancia de encontrar nuevas especies de microorganismos celulolíticos altamente productores reside en el hecho de que aunque se han aislado una gran variedad de bacterias y hongos capaces de utilizar la celulosa, no todos pueden producir altos niveles de enzimas extracelulares que permitan degradar “in vitro” la celulosa insoluble. Se puede realizar la: 1) Búsqueda de nuevos productores activos en condiciones naturales, 2) Obtención de nuevas cepas, del resultado de una selección de los cultivos ya conocidos, luego de mejorar su producción de celulasas ya sea por optimización de las condiciones de cultivo o por mutación (Ali y cols. 1991).

En consecuencia, la obtención de mejores microorganismos celulolíticos y su posterior cultivo “in vitro” nos permitirá contar con una fuente fácilmente disponible de enzimas celulolíticas para ser utilizadas en la hidrólisis de residuos celulósicos. Además de la producción de celulasa, los organismos degradadores de celulosa son usados para la producción de biomasa y/o en la sacarificación de lignocelulósicos a azúcares simples los que pueden luego ser usados para varios propósitos (Wei y cols. 1992). Los preparados enzimáticos de los microorganismos pueden ser usados para la agricultura en la producción de forrajes y alimentos para animales, aumentando el contenido proteico de los residuos lignocelulósicos, en el tratamiento de grano forrajero para incrementar su digestibilidad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las especies del genero *Pleurotus*, tienen un gran interés biotecnológico por su capacidad de producir enzimas que degraden compuestos lignocelulósicos. Las enzimas lignocelulolíticas son excretadas por hongos de pudrición blanca, entre ellos, las especies del género *Pleurotus*. Se tienen antecedentes que la producción de estas enzimas depende de la cepa, composición del medio de cultivo y de las condiciones de desarrollo. Por otro lado, se sabe que algunas de estas enzimas son constitutivas y otras inducibles, además los sistemas de producción han sido principalmente por sistemas de cultivo líquido y cultivo sólido utilizando soportes biodegradables, los cuales representan un medio complejo que no permite identificar en esa cepa, que enzimas se inducen y cuales se producen de manera constitutiva.

Por lo que en este estudio se desarrolló la cepa de *P. ostreatus* por fermentación sólida, utilizando un soporte inerte y un medio de cultivo con diferentes fuentes de carbono, donde se evaluó la actividad extracelular de las enzimas lignocelulolíticas, identificando cuales son constitutivas e inducibles. Con lo que se espera contribuir al conocimiento fisiológico del hongo y las condiciones de producción de estas enzimas.



#### **4. HIPÓTESIS**

El tipo y proporción de fuente de carbono en el medio de cultivo modificará los patrones de producción de las enzimas lignocelulolíticas (lacasas, celulasas, xilanasas) de *P. ostreatus*, en fermentación sólida usando un soporte inerte.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

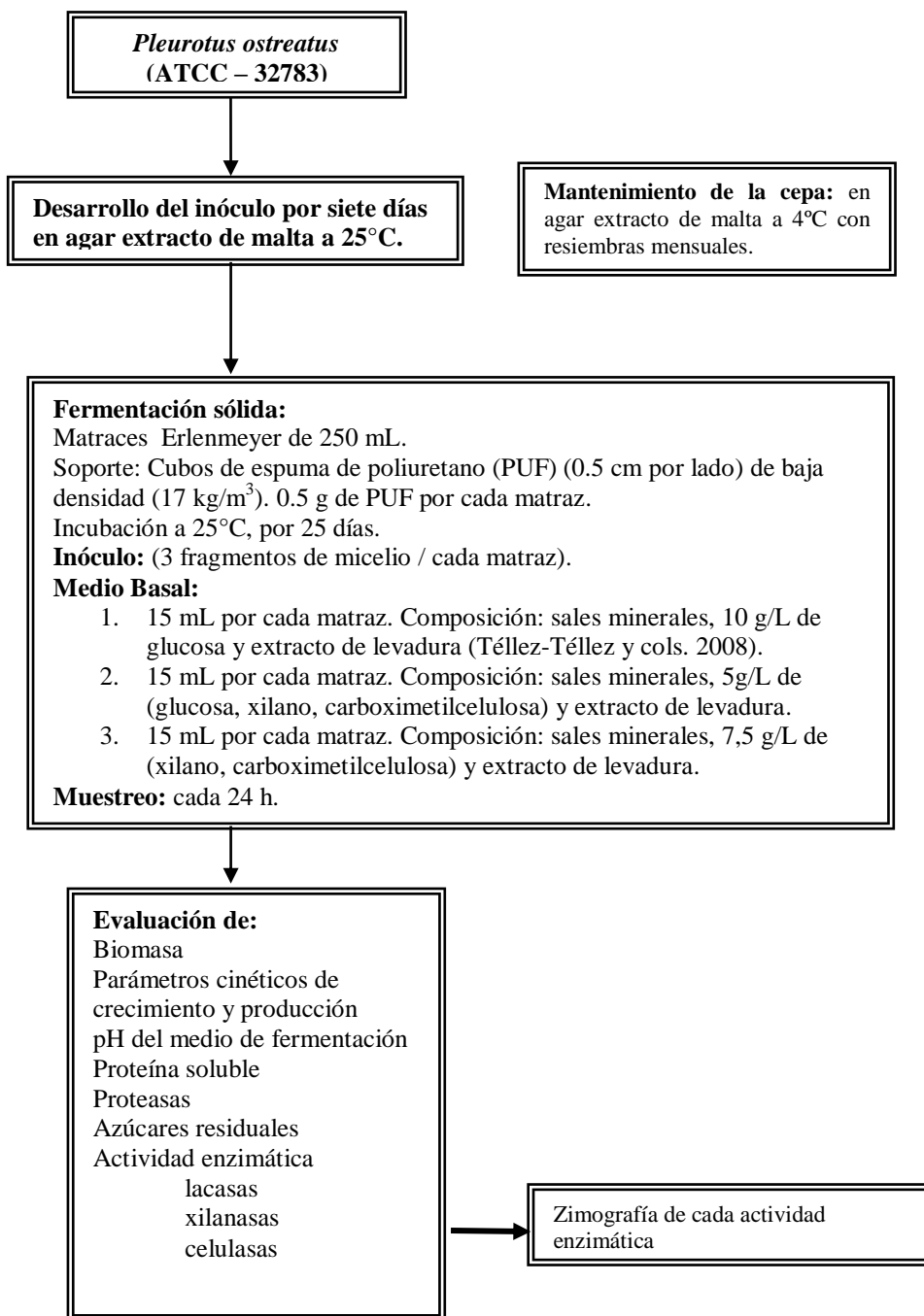
Evaluar el efecto de la presencia de xilano y carboximetilcelulosa, además de glucosa en el medio de cultivo sobre la actividad lignocelulolítica de *P. ostreatus*, obtenida por FMS sobre espuma de poliuretano.

### **5.2 Específicos**

- Caracterizar el bioproceso del desarrollo de *P. ostreatus* en FMS utilizando espuma de poliuretano como soporte, al usar tres diferentes mezclas de fuentes de carbono en el medio de cultivo.
- Evaluar la actividad enzimática obtenida en cada fermentación.
- Identificar el número de isoformas de lacasas, celulasas y xilanasas obtenidas en cada fermentación.

## 6. METODOLOGÍA

En la figura 6 se muestra la secuencia de la investigación.



**Figura 6.** Diagrama de flujo de la metodología

### 6.1 Microorganismo de estudio

Se utilizó la cepa *P. ostreatus* de la American Type Culture Collection (ATCC-32783). La cepa se resembró mensualmente a 25°C por siete días en agar extracto de malta (EMA, Bioxón), y se mantuvo en refrigeración a 4°C.

### 6.2 Obtención del inóculo

El inóculo fue de aproximadamente 4 mm de diámetro, el cual se tomó de la periferia de la colonia que fue resembrada a 25°C, mediante un horador, y se colocaron tres fragmentos como inóculo a cada uno de los matraces para la fermentación.

### 6.3 Medio de cultivo y desarrollo micelial

La fermentación en medio sólido se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml cada uno, con 0.5 g de PUF en cubos de 0.5 cm, para su uso, se cortó y se lavo dos veces con agua destilada y se colocó en un horno a 45°C por 24 horas y posteriormente se impregnaron con 15 mL de medio de cultivo estéril, cuya composición se describe en la tabla 7 y fue inoculado con 3 pellets de 4 mm de diámetro, la fermentación se llevo a cabo a 25°C durante 25 días. Todas las operaciones se llevaron a cabo en condiciones estériles. Tomando muestras cada 24 horas a partir del tercer día para realizar los análisis los cuales se realizaron por triplicado.

**Tabla 7.** Composición basal del medio de fermentación sólida

Componente (g l <sup>-1</sup> )	(FMS 1)	(FMS 2)	FMS 3)
Extracto de levadura	5	9	9
Glucosa	10	5	0
Xilano	0	5	7.5
Carboximetilcelulosa	0	5	7.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4	0.4	0.4
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.001	0.001	0.001
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6	0.6	0.6
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.05	0.05	0.05
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.05	0.05	0.05
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.5
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O *	0.25	0.25	0.25

## 6.4 Obtención del extracto crudo enzimático y determinación de biomasa

En cada muestreo, el caldo de fermentación se obtuvo por un prensado ligero de la espuma de poliuretano, y se consideró como el extracto crudo enzimático (ECE), a la espuma de poliuretano que contenía la biomasa producida e inmovilizada se le realizó varios lavados para eliminar los residuos de medio de cultivo y se secó en un horno a 45°C durante 24 h. Esta se reportó en g de biomasa seca (X) por litro de medio (g/L) (Téllez-Téllez y cols. 2008).

### 6.4.1 Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. ostreatus* y de producción enzimática

El desarrollo de biomasa en función del tiempo  $X = f(t)$  se ajustó con la ecuación logística (1) por la minimización del error cuadrático, utilizando la herramienta Solver de la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y cols. 2001, Viniegra-González y cols. 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X$$

La solución de la ecuación logística se muestra a continuación (2):

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + C e^{-\mu t}} \quad (2)$$

Donde:

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ).

$X_{\max}$  = Valor de biomasa máxima o de equilibrio (g/L).

$X_0$  = Valor de biomasa inicial (g/L).

$C$  = valor que presenta la relación entre la diferencia de  $X_{\max}$  y  $X_0$ :

$$C = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0}$$

Se calcularon además los siguientes parámetros:

$Y_{X/S}$  = Rendimiento teórico de la biomasa producida con respecto al consumo de sustrato.

$Y_{E/X}$  = Rendimiento teórico de la actividad de lacasa con respecto a la biomasa producida, estimada como la relación de la máxima actividad ( $E_{\max}$ )(U/L) y  $X_{\max}$  (g/L).

$Y_{E/S}$  = Rendimiento teórico de la actividad de lacasa con respecto al consumo de sustrato, estimada como la relación de la  $E_{max}$  (U/L) y azúcar inicial (g/L).

P = Productividad en el pico máximo de actividad, dada por la siguiente expresión:

$P = E_{max} / \text{tiempo de fermentación}$

$q_p$  = Tasa específica de la formación de la enzima,  $q_p = \mu * Y_{E/X}$

$q_s$  = Tasa específica de consumo de sustrato,  $q_s = \mu / Y_{X/S}$

### **6.5 Determinación de pH**

Se determinó el pH del ECE de cada día de muestreo durante la fermentación mediante potenciometría.

### **6.6 Cuantificación de azúcares residuales**

Para determinar la concentración de azúcares residuales a lo largo de la fermentación, se evaluaron los azúcares reductores utilizando la técnica de Miller (1959), a 50  $\mu$ L de ECE se le adicionaron 950  $\mu$ L de agua destilada y el volumen se ajustó con 2 mL de DNS (ácido dinitrosalisílico) se colocaron por 5 minutos en agua en ebullición, se dejaron enfriar y se leyó la absorbancia a 575 nm, se utilizó una curva de calibración con glucosa.

### **6.7 Cuantificación de azúcares totales**

Para determinar la concentración de azúcares totales a lo largo de la fermentación, se evaluaron utilizando el método de antrona (Loewus 1952). Leyendo la absorbancia a 625 nm. Se utilizó una curva de calibración con glucosa.

### **6.8 Determinación de concentración de proteína soluble en ECE**

La proteína total excretada se determinó en los ECE libres de células por el método de Bradford (1976). A 50  $\mu$ L de ECE se le adicionaron 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford, el volumen se ajustó a 750  $\mu$ L con agua destilada y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA, SIGMA) como proteína estándar.

## **6.9 Determinación de la actividad enzimática**

### **6.9.1 Lacasas**

La actividad de lacasas se determinó para cada uno de los ECE, siguiendo una cinética de reacción durante 1 minuto a 40°C de temperatura en un espectrofotómetro Jemway a 468 nm, utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP) 2 mM como sustrato. La mezcla de reacción contenía 950  $\mu$ L de DMP en buffer de fosfatos a 0.1 M pH (4.5 y 6.5) y 50  $\mu$ L de ECE. Una unidad arbitraria (UA) se define como la cantidad de enzima que provocó un incremento de una unidad de absorbancia por minuto. Una Unidad Internacional (UI) se definió como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto.

### **6.9.2 Celulasas**

La actividad de celulasas se determinó para cada uno de los ECE, utilizando carboximetilcelulosa al 1% como sustrato. La mezcla de reacción contenía 950  $\mu$ L de sustrato (carboximetilcelulosa en buffer de acetato a 0.1 M pH 4.8) y 50  $\mu$ L de ECE. La reacción se incubó a 50°C por 15 minutos, el volumen se ajustó con 2 mL de DNS y se colocaron los tubos en agua en ebullición durante 5 minutos, estos se dejaron enfriar y se leyó en un espectrofotómetro Jemway a 575 nm.

### **6.9.3 Xilanasas**

La actividad de xilanasas se determinó para cada uno de los ECE, en un espectrofotómetro Jemway a 575 nm, utilizando xilano al 0.5% como sustrato. La mezcla de reacción contenía 950  $\mu$ L de sustrato (xilano en buffer de acetato a 0.1 M pH 5.3) y 50  $\mu$ L de ECE. La reacción se incubó a 50°C por 15 minutos, el volumen se ajustó con 2 mL de DNS y se colocaron los tubos en agua en ebullición durante 5 minutos, estos se dejaron enfriar y se leyó en un espectrofotómetro Jemway a 575 nm.

Una unidad de actividad de celulasa y xilanasas (UI) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de glucosa o xilosa por minuto por mL o por L, bajo las condiciones descritas.

## 6.10 Zimografía

En cada muestreo de la fermentación se determinó el número de isoformas presentes en los ECE a través de zimografía. La actividad de lacasas, celulasas y xilanasas se realizó *in situ*, usando zimogramas, basados en la técnica modificada SDS-PAGE de Laemmli (1970). Los zimogramas se realizaron con alícuotas de ECE. El gel de separación contenía 10% de acrilamida, 2.7% de *bis*-acrilamida. El gel de empaquetamiento 4 % de acrilamida y 2.7% de *bis*-acrilamida. La concentración de SDS fue de 0.1% en el gel. La composición del buffer de corrida fue de: 0.5% M Tris-HCL pH 6.8, 35% glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Se usaron geles de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini-Protean III (BioRad) a 100 voltios por 1-1.25 horas.

Después de la corrida los geles de lacasa se lavaron con agua desionizada con ayuda de un agitador orbital (20-30 rpm) por 45 minutos, se cambio el agua cada 10 minutos para eliminar el SDS y renaturalizar a las proteínas. Posteriormente los geles se incubaron por 18-24 horas a temperatura ambiente en DMP 2 mM en buffer de acetatos 0.1 M a pH 4.5 y 6.5, donde se mostraron bandas de color café. Los geles se lavaron con agua desionizada y se colocaron en acetatos para la identificación de las isoenzimas.

Para los geles de celulasas y xilanasas se lavaron una sola vez con agua desionizada para retirar el SDS, posteriormente se incubaron en baño maría a 50°C durante 30 minutos en carboximetilcelulosa al 1% o xilano al 0.5% en buffer de acetatos a pH de 4.5. Una vez incubados se retiro el sustrato, se levaron con agua desionizada para retirar restos de sustrato y se colocaron en colorante rojo congó al 0.2% durante una hora para teñir el gel que contenía las isoenzimas, una vez transcurrido el tiempo se realizaron lavados por 15 minutos con solución de cloruro de sodio 1 M, hasta que en el gel se mostraron bandas blancas, la cuales se identificaron como las isoenzimas de celulasas y xilanasas.

## 6.11 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se reportaron las Medias y desviación estándar.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON GLUCOSA

#### 7.1.1 Determinación de Biomasa

En la figura 7, se muestran los resultados de biomasa ( $X$ ). Se observaron las diferentes fases de crecimiento, la fase de adaptación tardó aproximadamente 110 h, la fase de crecimiento exponencial concluyó antes de las 250 h, empezando la fase estacionaria. La  $X_{\max}$  fue de 4.66 g/L, y una  $\mu$  de 0.022/h.

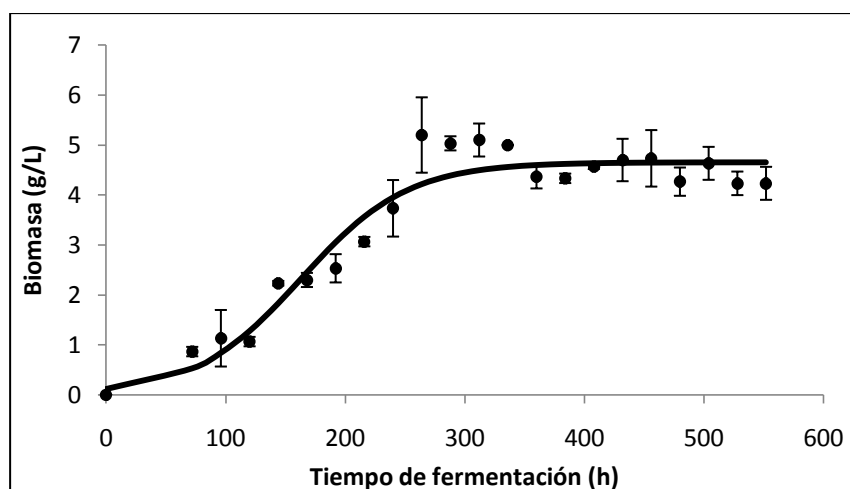


Figura 7. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en fermentación sólida.

#### 7.1.2 Cuantificación de azúcares residuales

En la figura 8, se muestra el consumo de glucosa aproximadamente a las 280 h que coincide con la transición de fase exponencial a estacionaria.

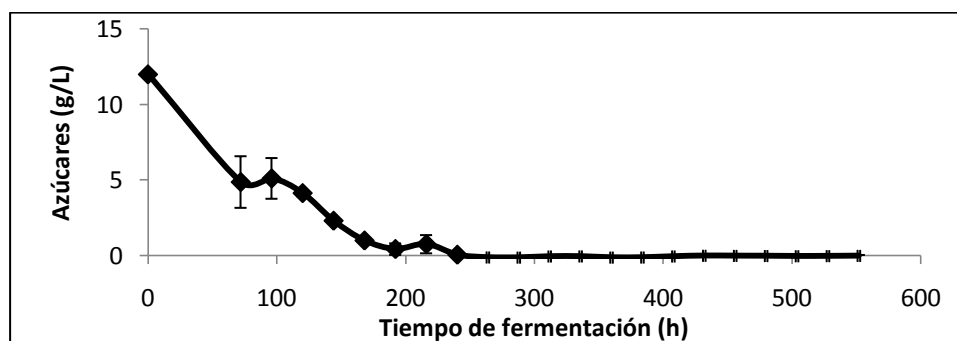
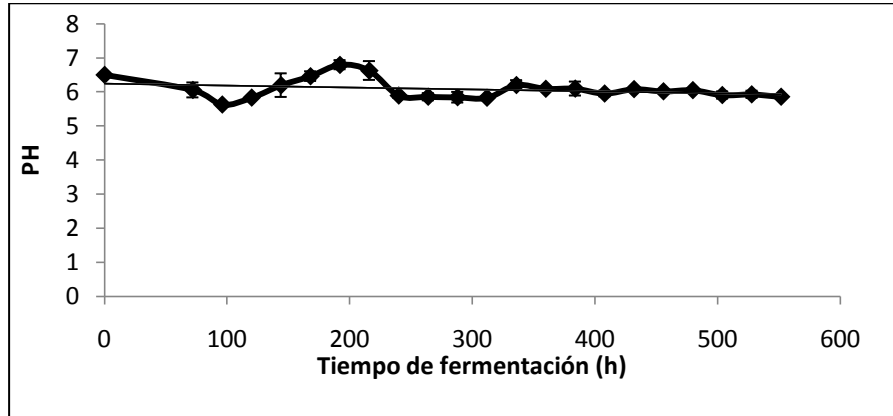


Figura 8. Consumo de glucosa por *P. ostreatus* en la FMS

### 7.1.3 Perfiles de pH

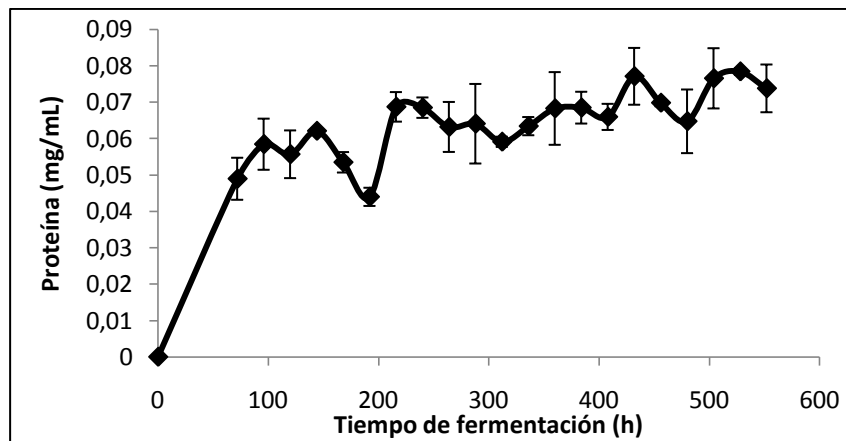
Los valores de pH que se obtuvieron a lo largo de la fermentación se muestran en la figura 9, se observa que el pH mostro una variación mínima durante la fase exponencial manteniéndose entre los valores de 6.1 y 5.8.



**Figura 9.** Perfiles de pH durante el desarrollo por *P. ostreatus* en FMS

### 7.1.4 Contenido de proteína soluble en el ECE

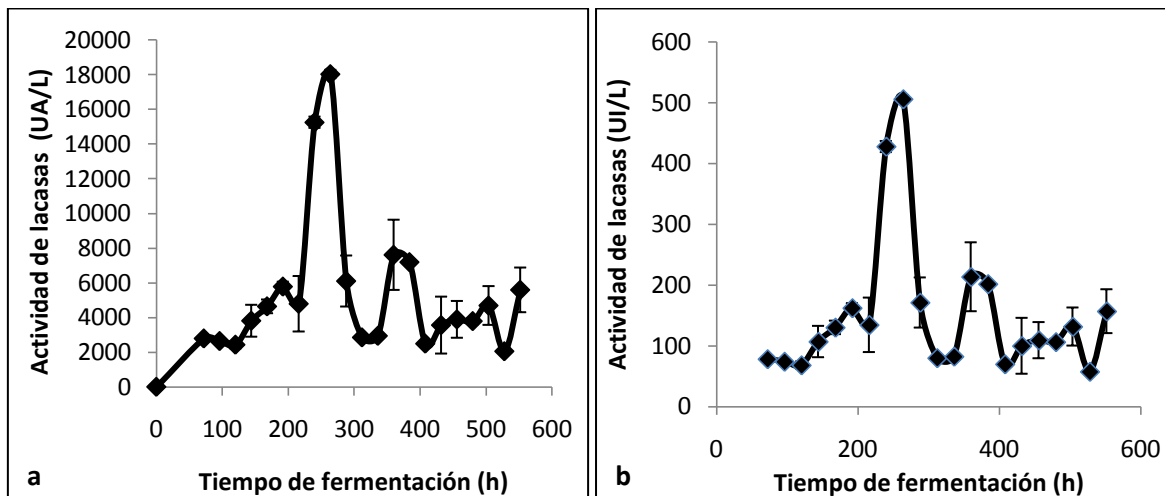
Los valores que se obtuvieron de proteína soluble se muestran en la figura 10, se observó un incremento en la proteína a través de la fermentación relacionándose con la fase exponencial.



**Figura 10.** Contenido de proteína presente en el ECE

### 7.1.5 Evaluación de la actividad de lacasas

Las actividades de lacasas se muestran en las figuras. 11a y 11b en UA y UI, en donde a las 250 h de la fermentación se obtiene una actividad máxima 18,030 U/L (UA) de lacasas.



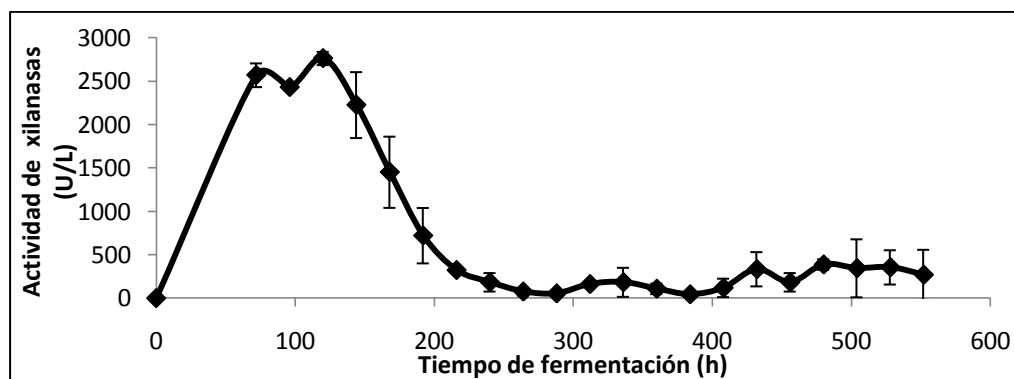
**Figura 11.** Actividad de lacasas obtenida por FMS utilizando glucosa como fuente de carbono, reportada en UA (a) y UI (b)

### 7.1.6 Evaluación de celulasas

No se encontró actividad en este medio de fermentación.

### 7.1.7 Evaluación de xilanasas

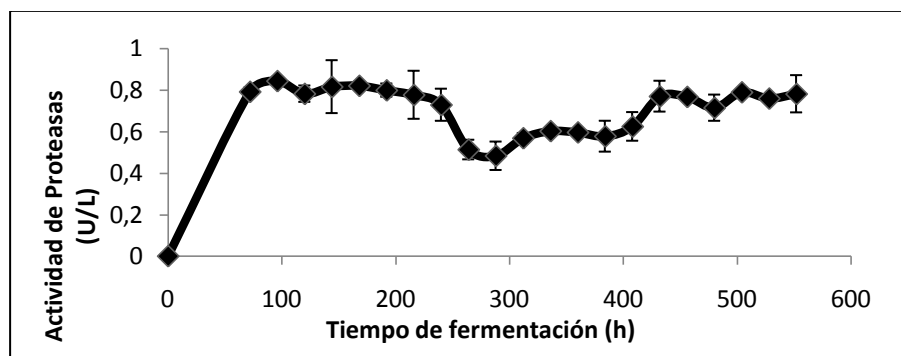
La actividad de xilanasas se muestra en la figura 12, en donde a las 150 h se disminuye, sin embargo, se observa que la actividad se mantiene constante en la fermentación con una actividad de 100-400 U/L.



**Figura 12.** Actividad de xilanasas obtenida por FMS utilizando glucosa como fuente de carbono

### 7.1.8 Evaluación de proteasas

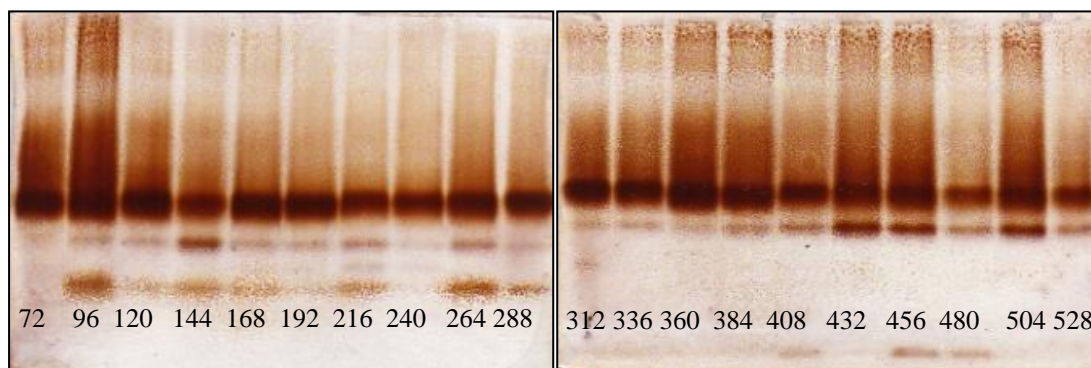
La actividad de proteasas de *P. ostreatus*, se muestra en la figura 13, se observó que la presencia de estas enzimas se puede relacionar con la fase exponencial del hongo, estas disminuyen cuando el hongo se encuentra en la fase estacionaria, posteriormente aumenta la actividad esto se puede deber a la falta de nitrógeno en el medio.



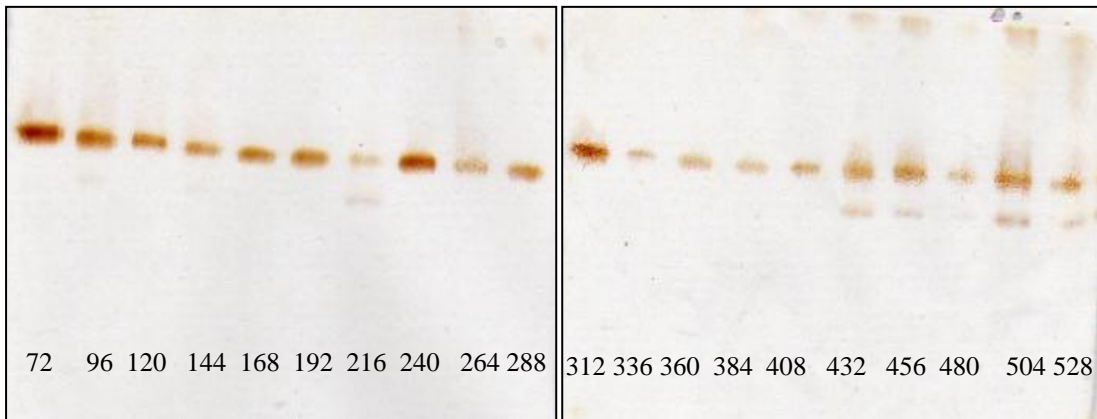
**Figura 13.** Actividad de proteasas durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FMS

### 7.1.9 Zimograma de lacasas

En las figuras 14 y 15 se muestra el patrón zimográfico de actividad de enzimas lacasas a pH de 4.5 y 6.5. Todos los extractos crudos enzimático (ECE) de *P. ostreatus* presentaron un patrón similar, con dos y tres bandas de actividad en la misma posición sobre el gel, pero en algunos casos la banda se presentó más intensa que en el otro ECE, lo que sugiere diferente actividad por cantidad de esa isoforma. Se pudo observar que el pH modifica los patrones zimográficos de las enzimas mostrando bandas de menor intensidad, las lacasas mostraron mayor afinidad por pHs ácidos que alcalinos.



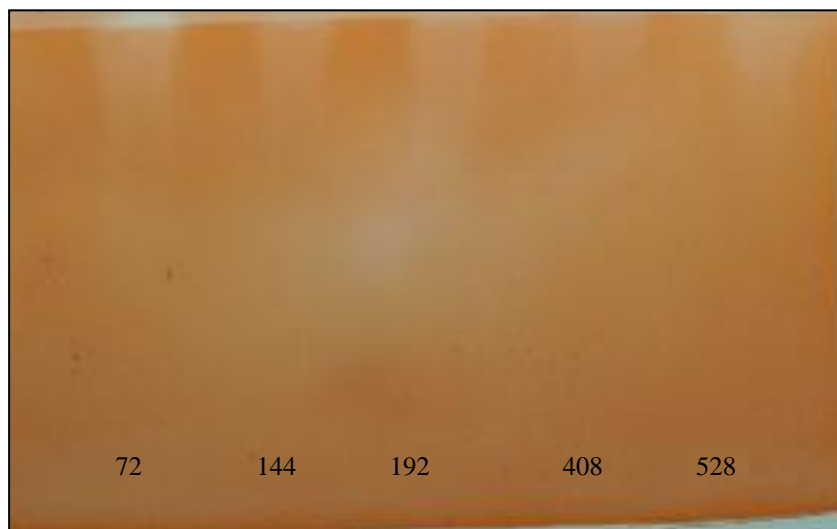
**Figura 14.** Zimograma de lacasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 4.5 utilizando como sustrato DMP



**Figura 15.** Zimograma de lacasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 6.5 utilizando como sustrato DMP

#### 7.1.10 Zimograma de xilanasas

En la figura 16, se muestra el patrón zimográfico de xilanasas pH de 4.5. Todos los (ECE) de *P. ostreatus* presentaron un patrón similar. En este medio con glucosa solo se pudo determinar la presencia de xilanasas. En el zimograma se observan bandas blancas con una isoforma.

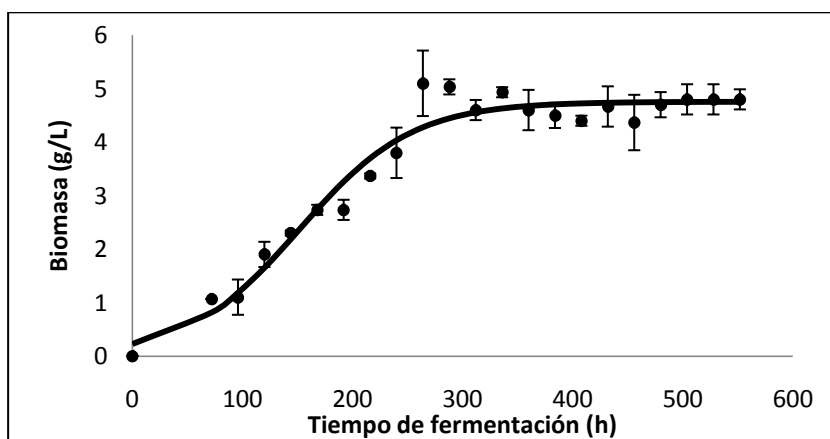


**Figura 16.** Zimograma de xilanasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 4.5 utilizando como sustrato xilano.

## 7.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON GLUCOSA, XILANO Y CARBOXIMETILCELULOSA

### 7.2.1 Determinación de Biomasa

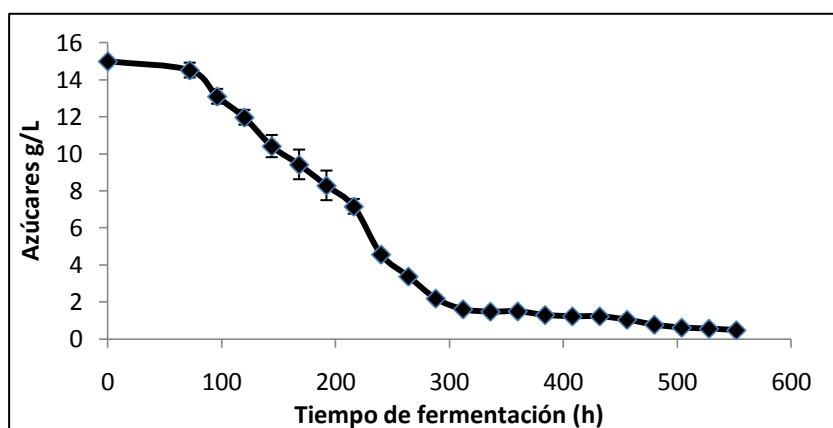
En la figura 17, se muestran los resultados de biomasa (X). Se observaron las diferentes fases de crecimiento, la fase de adaptación tardó aproximadamente 100 h, la fase de crecimiento exponencial concluyó antes de las 250 h, empezando la fase estacionaria. La  $X_{\max}$  fue de 4.68 g/L, y una  $\mu$  de 0.021/h.



**Figura 17.** Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en fermentación sólida.

### 7.2.2 Cuantificación de azúcares totales

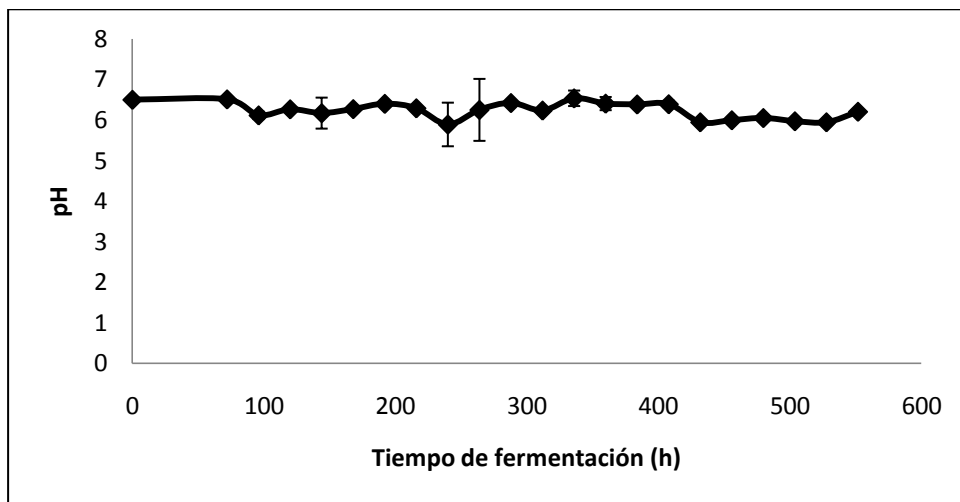
En la figura 18, se puede observar que la concentración de glucosa casi se reduce a cero aproximadamente a las 510 h que es prácticamente al término de la fermentación.



**Figura 18.** Consumo de glucosa por *P. ostreatus* en la FMS

### 7.2.3 Perfiles de pH

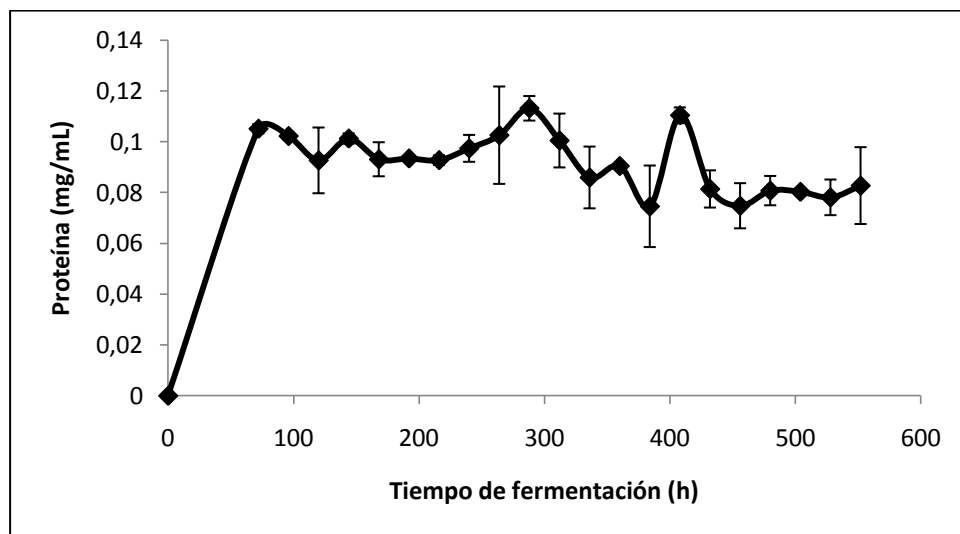
Los valores de pH que se obtuvieron a lo largo de la fermentación se muestran en la Figura 19, aquí el pH no se modifica manteniéndose entre los valores de 6.1 y 5.8, mostrando el efecto amortiguador del extracto de levadura.



**Figura 19.** Perfiles de pH durante el desarrollo por *P. ostreatus* en FMS

### 7.2.4 Contenido de proteína soluble en el ECE

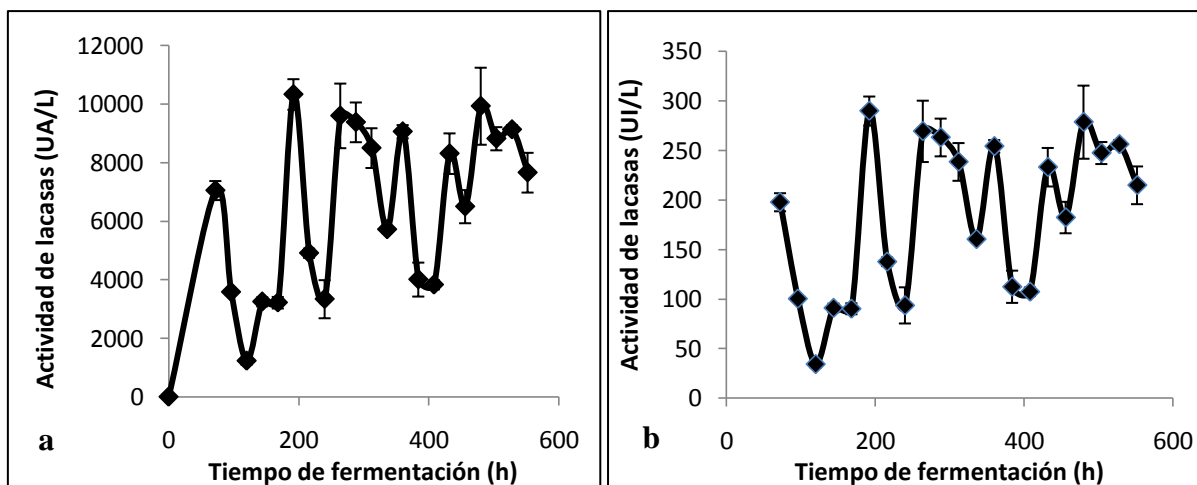
Los valores que se obtuvieron de proteína soluble se muestran en la figura 20, se observó la formación de proteína constante en los primeros tiempos de la fermentación disminuyendo aproximadamente a las 380 h cuando el hongo ya se encuentra en la fase estacionaria.



**Figura 20.** Contenido de proteína presente en el ECE

### 7.2.5 Evaluación de la actividad de lacasas

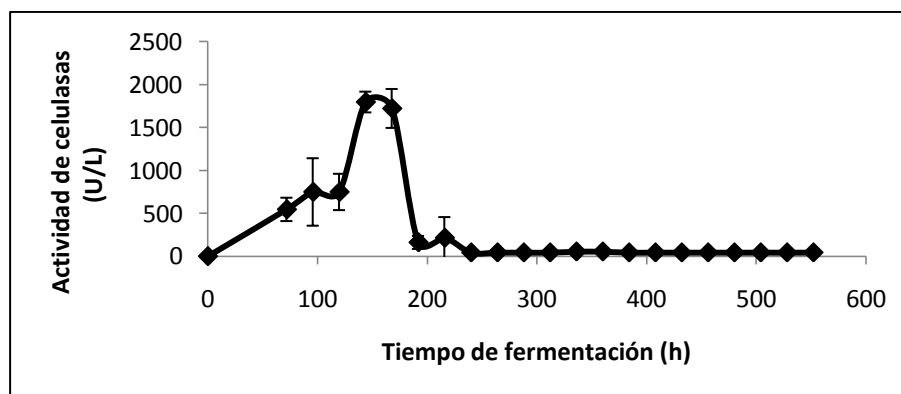
Las actividades de lacasas se muestran en las figuras 21a y 21b reportadas en UA y UI, durante toda la fermentación la actividad no es constante y se alcanza una actividad máxima de 10,330 U/L (300 U/L) a las 200 h, esta inestabilidad de la enzima puede ser ocasionada por la presencia de fuentes de carbono como el xilano y la carboximetilcelulosa o a la presencia de proteasas en el medio.



**Figura 21.** Actividad de lacasas obtenidas por FMS utilizando glucosa, xilano y carboximetilcelulosa como fuentes de carbono reportada en UA (a) y UI (b)

### 7.2.6 Evaluación de celulasas

La actividad de celulasas se muestra en la figura 22, se puede observar que aproximadamente a las 200 h cuando el hongo se encuentra a la mitad de la fase exponencial disminuye su actividad alcanzado cerca de 1,700 U/L.

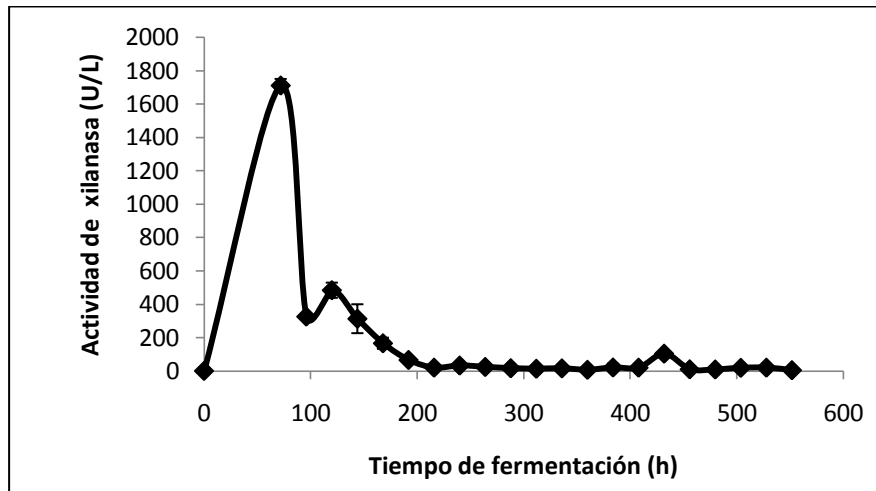


**Figura 22.** Actividad de celulasas obtenida por FMS utilizando glucosa xilano y carboximetilcelulosa como fuentes de carbono



### 7.2.7 Evaluación de xilanasas

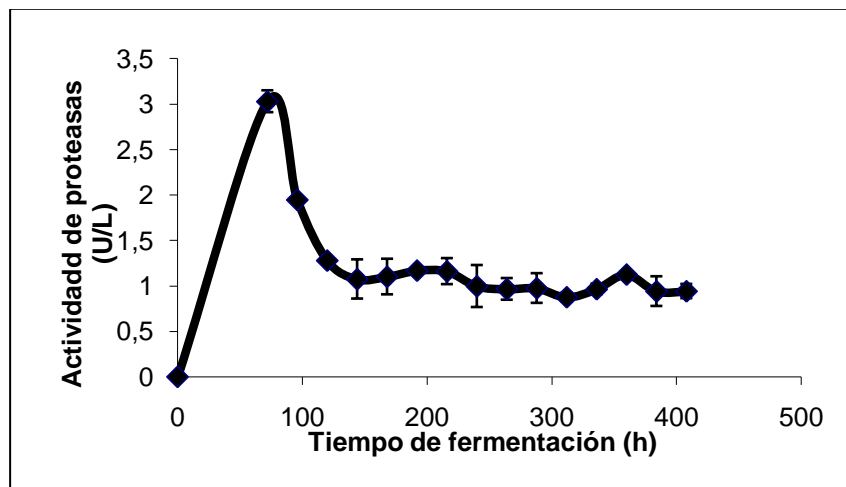
La actividad de xilanasas se muestra en la figura 23, a las 110 h disminuye, obteniendo al inicio de la fermentación la mayor actividad de 1,700 U/L.



**Figura 23.** Actividad de xilanasas obtenida por FMS utilizando glucosa, xilano y carboximetilcelulosa como fuentes de carbono

### 7.2.8 Evaluación de proteasas

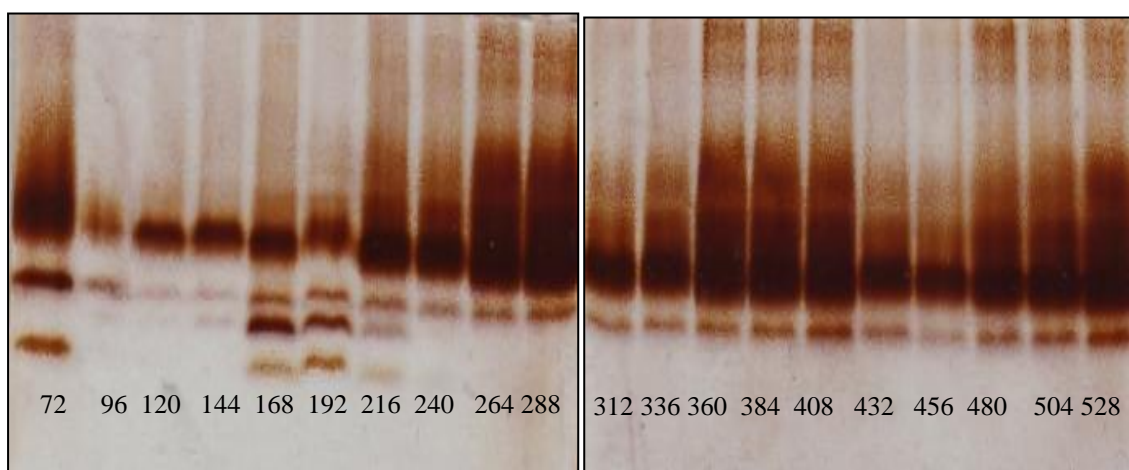
La actividad de proteasas de *P. ostreatus*, se muestra en la figura 24. Se observó que la alta actividad de estas enzimas se presenta al inicio de la fermentación cuando el hongo se encontraba en la fase de adaptación y disminuye al cambiar a la fase exponencial.



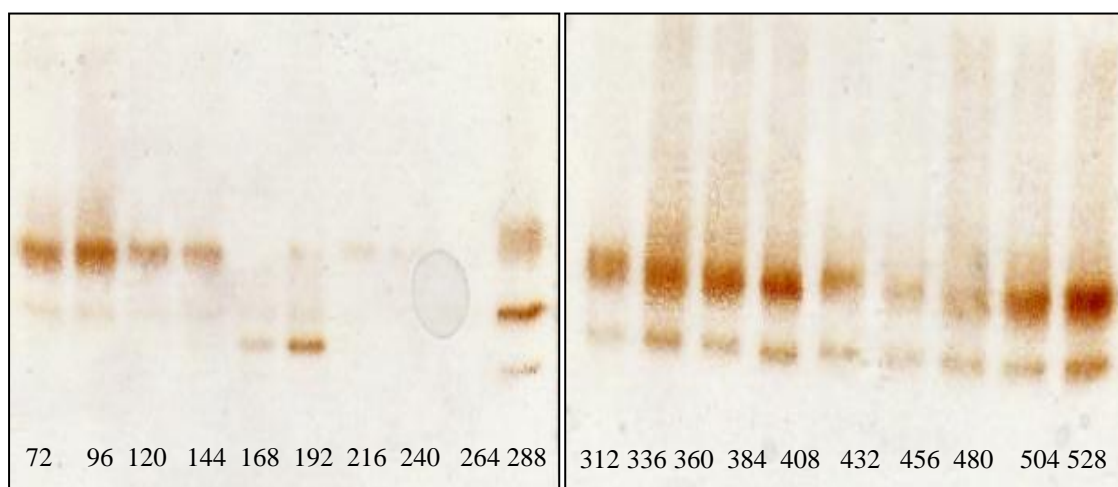
**Figura 24.** Actividad de proteasas durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FMS

### 7.2.9 Zimograma de lacasas

En las figuras 25 y 26 se muestra el patrón zimográfico de actividad de enzimas lacasas a pH de 4.5 y 6.5. Todos los ECE de *P. ostreatus* presentaron un patrón similar, con dos y hasta 4 bandas de actividad en la misma posición sobre el gel, pero en algunos casos la banda se presentó más intensa que en el otro ECE, lo que sugiere diferente actividad por cantidad de esa isoforma. Se pudo observar que el pH modifica los patrones zimográficos de las enzimas mostrando bandas de menor intensidad debido a que las lacasas prefieren pHs ácidos que alcalinos.



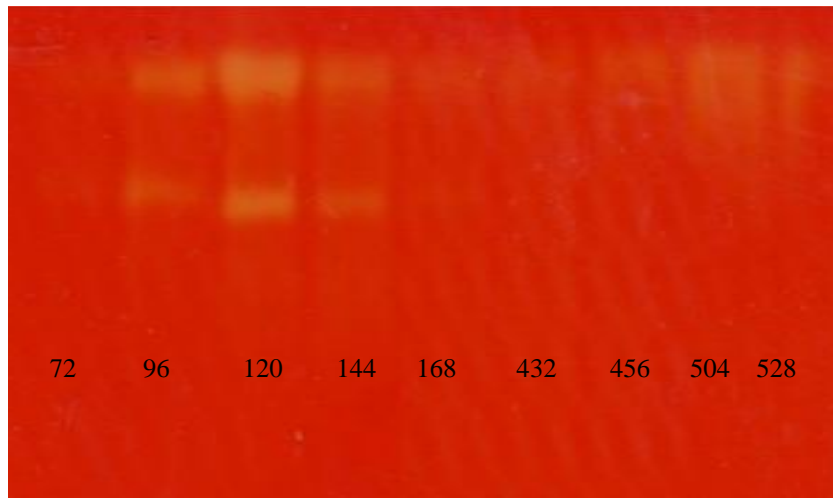
**Figura 25.** Zimograma de lacasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 4.5 utilizando como sustrato DMP



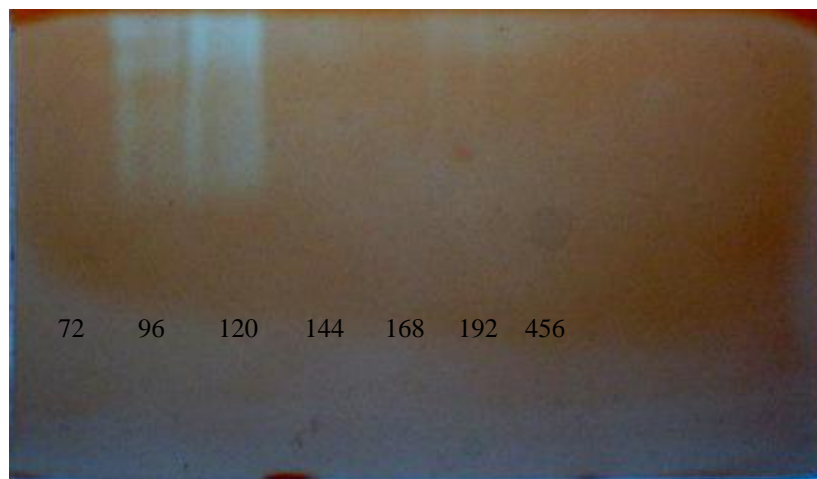
**Figura 26.** Zimograma de lacasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 6.5 utilizando como sustrato DMP

### 7.2.10 Zimograma de xilanasas y celulasas

En las figuras 27 y 28 se muestra el patrón zimográfico de xilanasas y celulasas a pH de 4.5. Todos los extractos ECE de *P. ostreatus* presentaron un patrón similar, con dos y tres bandas de actividad en la misma posición sobre el gel, pero en algunos casos la banda se presentó más intensa que en el otro ECE, lo que sugiere diferente actividad por cantidad de esa isoforma.



**Figura 27.** Zimograma de xilanasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 4.5 utilizando como sustrato xilano



**Figura 28.** Zimograma de celulasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 4.5 utilizando como sustrato carboximetilcelulosa

## 7.3 CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO CON XILANO Y CARBOXIMETILCELULOSA

### 7.3.1 Determinación de Biomasa

En la figura 29, se muestran los resultados de la biomasa (X). Se observaron las diferentes fases de crecimiento, la fase de adaptación tardó aproximadamente 110 h, la fase de crecimiento exponencial concluyó antes de las 250 h, empezando la fase estacionaria. La  $X_{\max}$  fue de 4.79 g/L, y una  $\mu$  de 0.026/h.

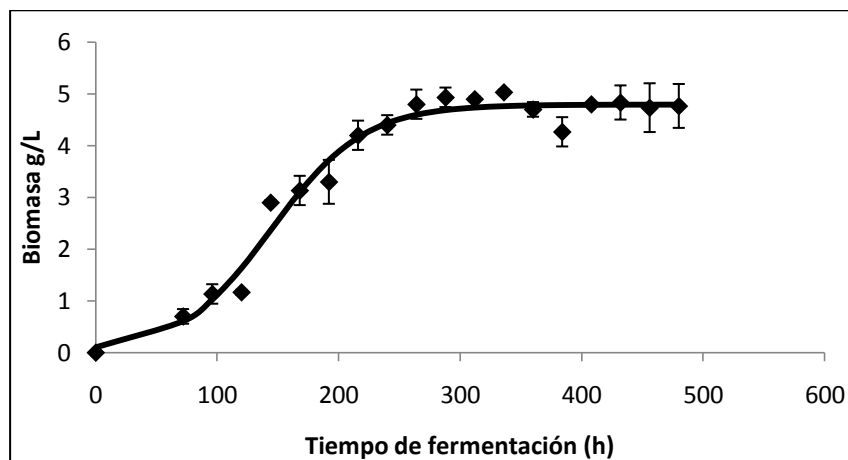


Figura 29. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en fermentación sólida

### 7.3.2 Cuantificación de azúcares totales

En la figura 30, se puede observar que la concentración de glucosa se consume aproximadamente a las 480 h que es prácticamente al término de la fermentación.

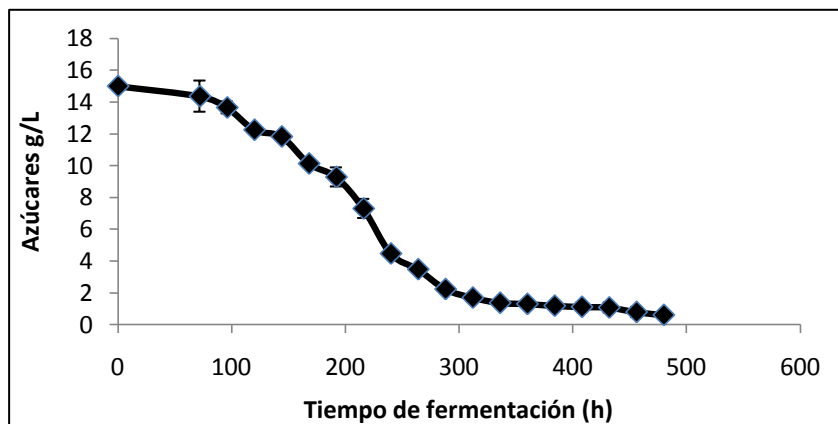
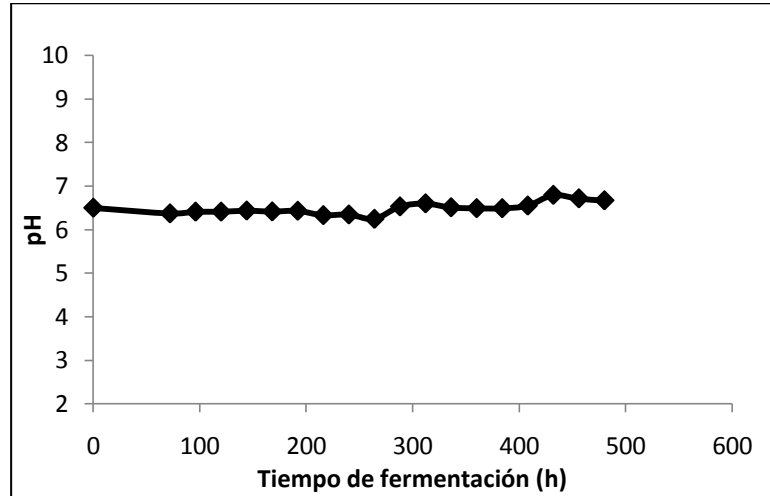


Figura 30. Consumo de azúcares por *P. ostreatus* en FMS

### 7.3.3 Perfiles de pH

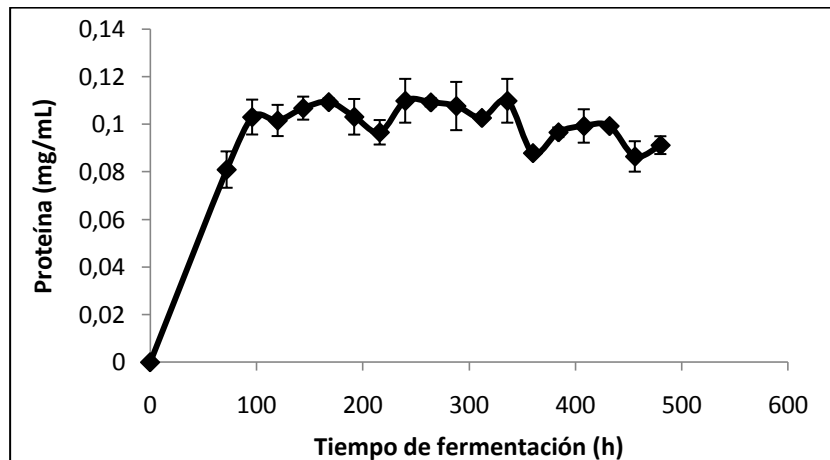
Los valores de pH que se obtuvieron a lo largo de la fermentación se muestran en la figura 31, se observa que el pH no se modifica manteniéndose entre los valores de 6.1 y 5.8, mostrando el efecto amortiguador del extracto de levadura.



**Figura 31.** Perfiles de pH durante el desarrollo por *P. ostreatus* en FMS

### 7.3.4 Contenido de proteína soluble en el ECE

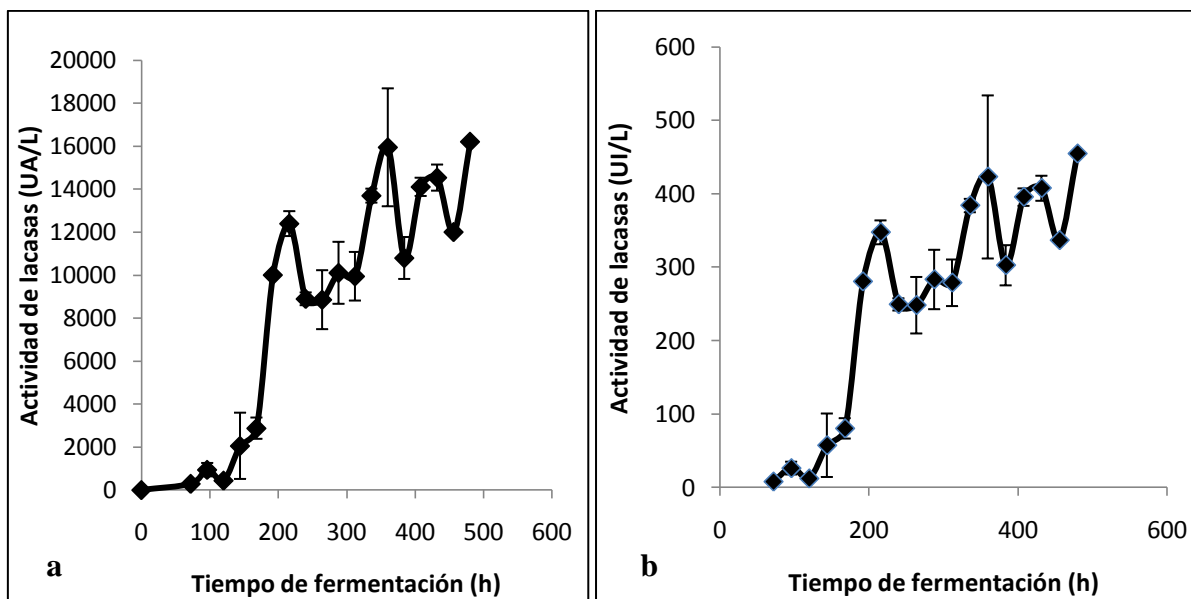
Los valores que se obtuvieron de proteína soluble se muestran en la figura 32, se observó que la formación de proteína a través de la fermentación se mantiene constante.



**Figura 32.** Contenido de proteína presente en el ECE

### 7.3.5 Evaluación de la actividad de lacasas

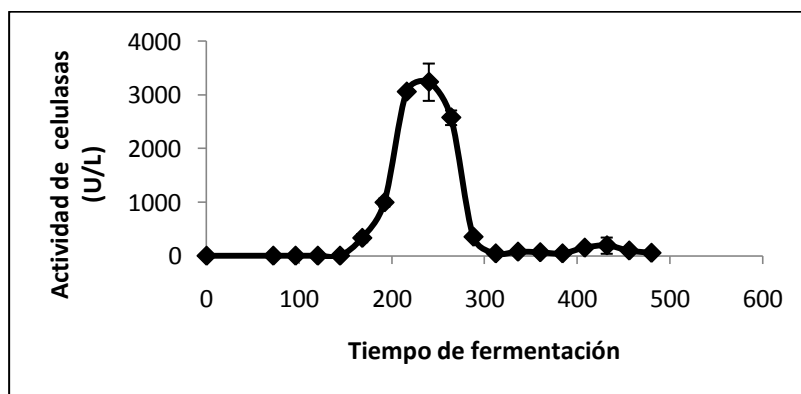
Las actividades de lacasas se muestran en las figuras 33a y 33b reportada en UA y UI, durante la fermentación la actividad aumenta cuando el hongo inicia la fase exponencial y alcanza una actividad máxima de 16,200 U/L (460 U/L) a las 350 h.



**Figura 33.** Actividad de lacasas obtenida por FMS utilizando xilano y carboximetilcelulosa como sustrato reportada en UA (a) y UI (b)

### 7.3.6 Evaluación de celulasas

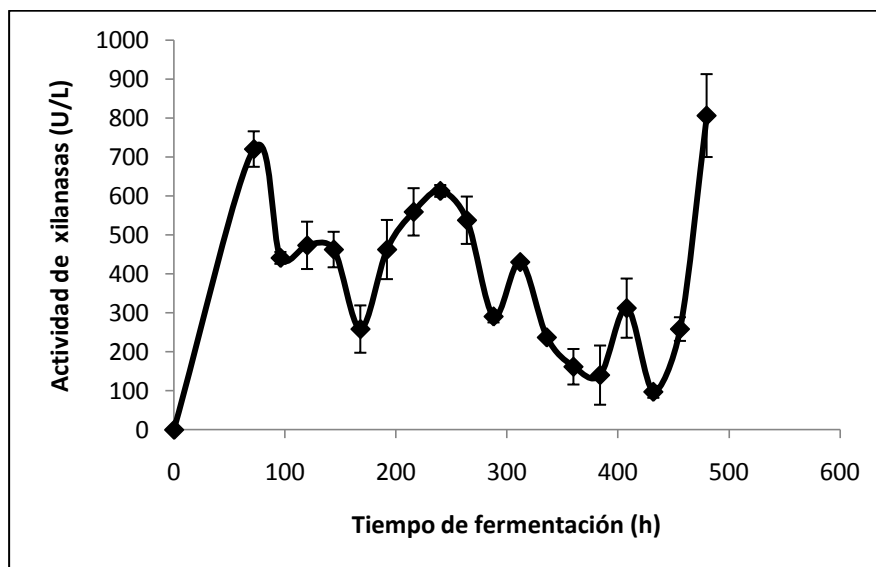
La actividad de celulasas se muestra en la figura 34, presentando su mayor actividad durante las 180-280 h cuando, el hongo se encuentra terminando la fase exponencial. Alcanzando una actividad máxima de 3,500 U/L.



**Figura 34.** Actividad de celulasas obtenida por FMS utilizando xilano y carboximetilcelulosa como sustrato

### 7.3.7 Evaluación de xilanasas

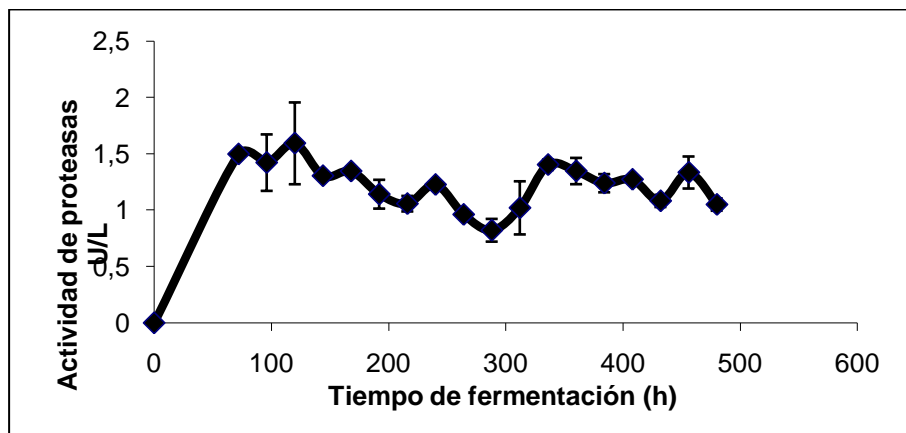
La actividad de xilanasas se muestra en la figura 35, se puede observar que la actividad se presenta durante toda la fermentación, alcanzado dos puntos máximos de actividad, 800 y 750 U/L, esto al final y al inicio de la fermentación.



**Figura 35.** Actividad de xilanasas obtenida por FMS utilizando xilano y carboximetilcelulosa como sustrato

### 7.3.8 Evaluación de proteasas

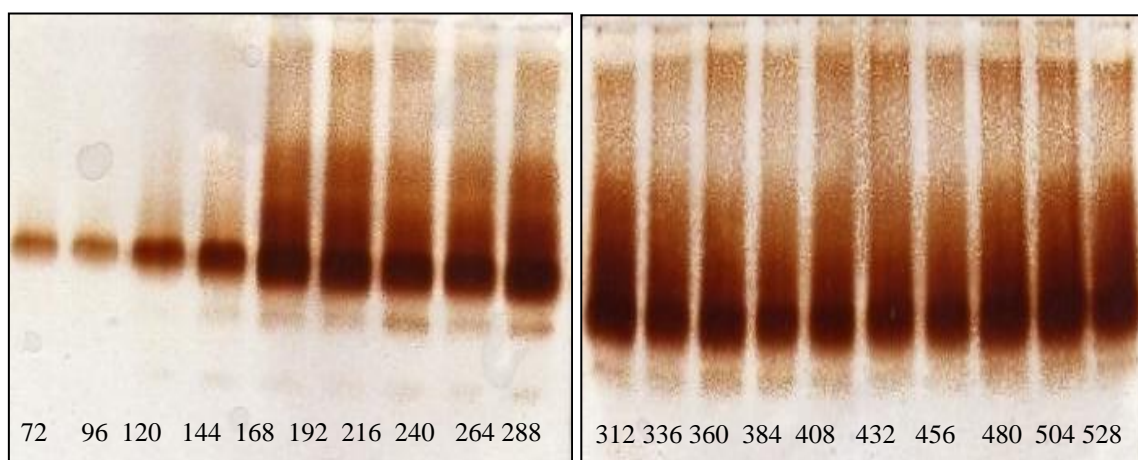
La actividad de proteasas de *P. ostreatus*, se muestra en la figura 36. Se observó que la actividad de estas enzimas se presenta al inicio de la fermentación disminuyendo en la fase exponencial y aumentando en los últimos tiempos de la fermentación.



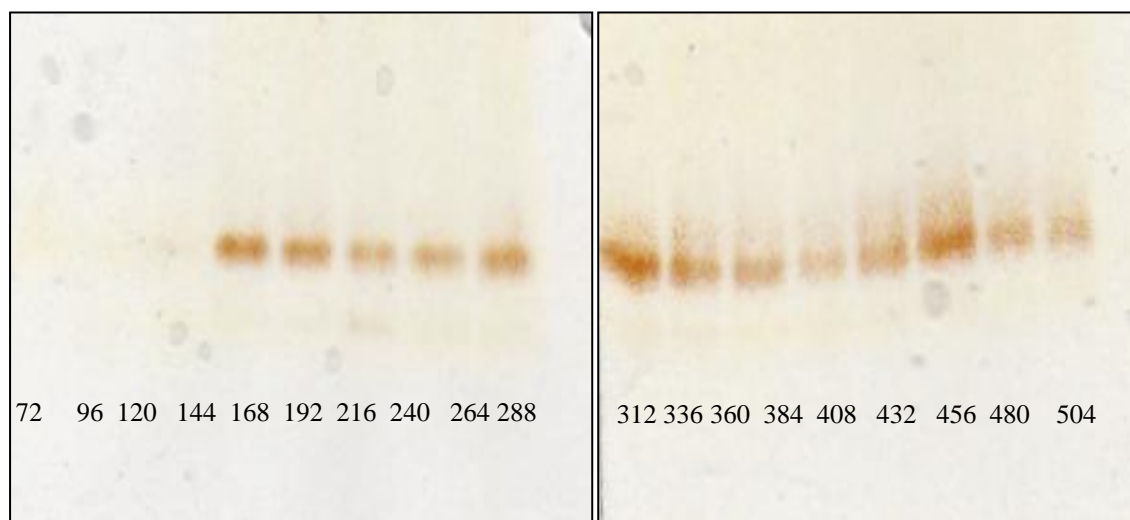
**Figura 36.** Actividad de proteasas durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FMS

### 7.3.9 Zimograma lacasas

En las figuras 37 y 38 se muestra el patrón zimográfico de actividad de enzimas lacasas a pH de 4.5 y 6.5. Todos los ECE de *P. ostreatus* presentaron un patrón similar, con dos y tres bandas de actividad en la misma posición sobre el gel, pero en algunos casos la banda se presentó más intensa que en el otro ECE, lo que sugiere diferente actividad por cantidad de esa isoforma. Se pudo observar que el pH modifica los patrones zimográficos de las enzimas mostrando bandas de menor intensidad, esto se puede deber a que las lacasas prefieren los pHs ácidos que alcalinos.



**Figura 37.** Zimograma de lacasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 4.5 utilizando como sustrato DMP

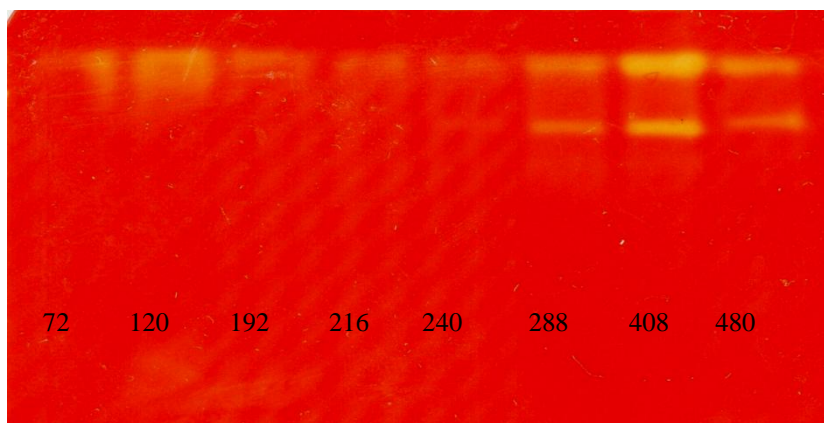


**Figura 38.** Zimograma de lacasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 6.5 utilizando como sustrato DMP

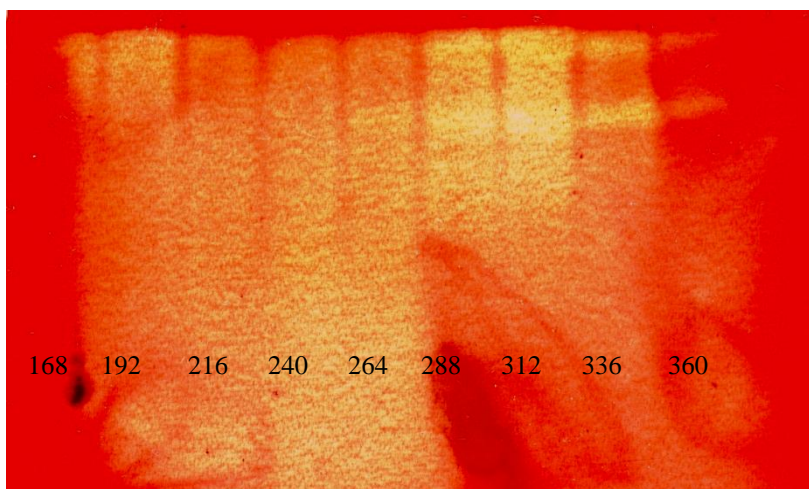


### 7.3.10 Zimograma xilanasas y celulasas

En las figuras 39 y 40 se muestra el patrón zimográfico de xilanasas y celulasas a pH de 4.5. Todos los ECE de *P. ostreatus* presentaron un patrón similar, con dos y tres bandas de actividad en la misma posición sobre el gel, pero en algunos casos la banda se presentó más intensa que en el otro ECE, lo que sugiere diferente actividad por cantidad de esa isoforma.



**Figura 39.** Zimograma de xilanasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 4.5 utilizando como sustrato xilano



**Figura 40.** Zimograma de celulasas de la cepa *P. ostreatus* a pH de 4.5 utilizando como sustrato carboximetilcelulosa

### 7.4 Parámetros cinéticos

En la tabla 8, se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de enzimas lignocelulolíticas de *P. ostreatus*.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos del crecimiento y producción de enzimas lignocelulolíticas de *P. ostreatus*.

Parámetros		FMS g	FMS g, x, cmc	FMS x, cmc
$X_{max}$ (g/L)		4.66	4.68	4.79
$\mu$ ( $h^{-1}$ )		0.022	0.021	0.026
$Y_{X/S}$ (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )		0.39	0.275	0.2817
$E_{max}$ (U/L) *Unidades arbitrarias + Unidades internacionales	lacasas	18,030*, 500 <sup>+</sup>	10,330*, 300 <sup>+</sup>	16,200*, 460 <sup>+</sup>
	xilanasas	2,762	1,710	806
	celulasas	0	1,795	3,238
$Y_{E/S}$ (U/g <sub>s</sub> )	lacasas	1,502.5*, 41.66 <sup>+</sup>	688*, 17.64 <sup>+</sup>	1,080*, 27.05 <sup>+</sup>
	xilanasas	230.16	100.58	47.41
	celulasas	0	105.59	190.47
$Y_{E/X}$ (U/g <sub>x</sub> )	lacasas	3,869.09*, 107.29 <sup>+</sup>	2,207.26*, 64.1 <sup>+</sup>	3,382.04*, 96.03 <sup>+</sup>
	xilanasas	592.7	365.38	168.27
	celulasas	0	383.55	675.99
Pro (U/Lh)	lacasas	32.66*, 0.9 <sup>+</sup>	18.71*, 0.54 <sup>+</sup>	33.75*, 0.958 <sup>+</sup>
	xilanasas	5	3.09	1.68
	celulasas	0	3.25	6.74
$q_s$ (g <sub>s</sub> /g <sub>x</sub> h)		0.056	0.076	0.092
$q_p$ (U/hg <sub>x</sub> )	lacasas	0.013*, 0.0034 <sup>+</sup>	0.000072*, 0.00021 <sup>+</sup>	0.014*, 0.0002 <sup>+</sup>
	xilanasas	0.0019	0.0012	0.00073
	celulasas	0	0.0013	0.003

## 8. DISCUSIONES

La producción de enzimas por diversos microorganismos se ha estudiado en diferentes sistemas de producción, sin embargo, los estudios realizados en hongos para la producción de enzimas lignocelulolíticas han mostrado diversos resultados según el sistema utilizado (Mekala y cols. 2008). Uno de los sistemas más utilizados es la fermentación en medio sólido donde se han utilizado diferentes residuos agroindustriales sintéticos o naturales como fuentes de carbono en la producción de enzimas lignocelulolíticas.

La espuma de poliuretano se ha utilizado últimamente en estos procesos para la producción enzimática por diversos hongos, tal sistema permite alcanzar un nivel en la composición y control del medio, además, de que permite separar fácilmente el producto del soporte inerte (Téllez-Téllez y cols. 2008, Díaz-Godínez y cols. 2001, Kobayashi y cols. 1991). En esta investigación se utilizó un hongo de pudrición blanca para la producción de enzimas lignocelulolíticas, el crecimiento de *P. ostreatus* fue evaluado en este trabajo durante fermentación sólida con espuma de poliuretano como soporte inerte y la biomasa se determinó mediante peso seco. El medio de cultivo fue modificado para las diferentes fermentaciones, las combinaciones entre las fuentes de carbono para los distintos medios no fueron un factor importante durante el crecimiento del hongo.

El crecimiento de *P. ostreatus* fue descrito por el modelo matemático de la ecuación logística, encontrando una correlación entre datos experimentales y los modelos, mayor al 95%. En este estudio se identificó las diferentes fases de crecimiento de la cepa, en los tres medios de fermentación, sin encontrar diferencias en la producción de biomasa ( $X$ ). Al utilizar glucosa en el medio de fermentación la  $X_{\max}$  fue de 4,66 g/L con una  $\mu$  de 0.022 h<sup>-1</sup>. En cambio al utilizar glucosa, xilano y carboximetilcelulosa en el medio la  $X_{\max}$  alcanzó 4.68 g/L, con una  $\mu$  de 0.021 h<sup>-1</sup>. Sin embargo, al utilizar en el medio dos fuentes de carbono: xilano y carboximetilcelulosa, la  $X_{\max}$  fue de 4.78 g/L, con una  $\mu$  de 0.026 h<sup>-1</sup>. Se puede observar que la  $X_{\max}$  no se modifica al utilizar fuentes de carbono diferentes, en donde la velocidad específica de crecimiento no presenta cambios significativos.

Un estudio similar realizado por Téllez-Téllez y cols. (2008) reportaron que al utilizar espuma de poliuretano en la fermentación sólida con glucosa en el medio, la  $X_{\max}$  alcanzó valores de 4.5 g/L con una  $\mu$  de  $0.033 \text{ h}^{-1}$ . Estos resultados nos permiten observar que el crecimiento de la cepa se puede modificar por las fuentes de carbono que el hongo encuentre en el medio y posiblemente variar su actividad enzimática.

El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos tiene como propósito principal el crecimiento y transporte de nutrientes hacia el ápice hifal, siendo ésta, el área activa de secreción enzimática (Papinutti 2003). Las enzimas extracelulares lignocelulolíticas de la cepa de *P. ostreatus* se determinaron mediante el extracto crudo enzimático. Las enzimas extracelulares son producidas dentro de la célula, pero actúan fuera de ella. En general las enzimas degradadoras de polisacáridos están sujetas a mecanismos de regulación de sus síntesis. Es decir, no se producen de modo constante, constitutivo, la síntesis es inducida por el sustrato adecuado y es reprimida por azúcares fácilmente utilizables, como la glucosa. El inductor más eficiente es el polímero-sustrato de las enzimas que serán sintetizadas, sin embargo, debido a su alto peso molecular, no son capaces de penetrar en las células y ejercer su efecto (Carlile y cols. 2001).

La evaluación de la actividad lignocelulolítica durante los tiempos de fermentación, permitió observar el cambio que presentan dichas enzimas al tener fuentes de carbono con distinto peso molecular en el medio, una fuente de carbono asimilable como la glucosa actuó como represora de alguna de las enzimas evaluadas, además, el uso de carboximetilcelulosa y xilano en el medio actuaron como inductores, las cuales fueron responsables de la expresión para la actividad de celulasas y xilanasas. Algunos autores han reportado que las enzimas extracelulares del complejo celulolítico y ligninolítico existen en múltiples formas. Las síntesis de isoenzimas pueden deberse a productos de genes diferentes, aunque también pueden deberse a cambios postraduccionales como proteólisis y glicosilación. Se pueden sintetizar como consecuencia de estados fisiológicos diferentes (composición del medio de cultivo, pH, temperatura, etc.) a partir de genes regulados diferencialmente. En medios de cultivo ligeramente diferentes se sintetizan diferentes formas de una misma enzima, que a

pesar de poseer características catalíticas similares, difirieren notablemente de sus características fisicoquímicas. En la naturaleza el hongo se encuentra con distintos sustratos, distintas condiciones ambientales, pueden entonces producirse distintas formas enzimáticas, con propiedades más adecuadas a las nuevas circunstancias que les permitan degradar al polímero de la manera más eficiente. Sin embargo, también el producto de un gen puede ser modificado diferencialmente mediante glicosilaciones o digestiones proteolíticas luego de la secreción (Carlile y cols. 2001).

En este trabajo se identificó la mayor actividad de lacasas en el medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono, el medio que contenía xilano y carboximetilcelulosa alcanzó actividades muy cercanas al primer medio de cultivo, sin embargo, el medio con las tres fuentes de carbono obtuvo menor actividad enzimática. Los distintos valores de actividad se pueden deber a la presencia de distintas fuentes de carbono en el medio, por lo que el hongo tuvo que expresar otro tipo de enzimas para la degradación de estos carbohidratos, así como a la presencia de proteasas en el medio de cultivo. Se sabe que estos organismos pueden producir varias isoenzimas de lacasas, algunas constitutivas y otras inducibles (Bollang-Leonowicz 1984); dado que el hábitat natural de los hongos del genero *Pleurotus* es sobre sustratos lignocelulósicos, debido a que la hemicelulosa, celulosa y lignina, actúan como inductores directos.

Al comparar la actividad en relación al sistema de fermentación sobre el cual se creció el hongo, Téllez-Téllez y cols. (2008), reportaron una actividad de lacasas de 2,430 U/L. En estudios previos sobre la actividad extracelular de lacasas de *Melanocarpus* encontraron (290 nkat/mg) (Kiiskinen y cols. 2002). También Palonen y cols. (2003) reportaron que en *Mauginiella* sp. La actividad específica fue de (360 nkat/mg). Sethuraman y cols. (1999) evaluaron la actividad de lacasas del hongo de pudrición blanca, *Cyathus stercoreus*, en presencia de diferentes sustratos y encontraron que la mayor actividad se presentó con ABTS (3.5 U/ml) y DMP (3.06 U/ml).

Estudios realizados en la producción de lacasas por hongos como *Aspergillus niger* y *Trametes versicolors* se encontraron actividades de lacasas mayores cuando la glucosa se utilizó como fuente de carbono. En contraste la producción de la mayor actividad de lacasas para las cepas C28eco3 (362 U/L) y C28eco3-13 (592 U/L) se muestra cuando la glucosa se utilizó como fuente de carbono en una concentración de 50 g/L en la fermentación sólida (Téllez-Téllez y cols. 2008).

Estos resultados han demostrado que la producción de estas enzimas depende de la cepa, sustrato, composición del medio de cultivo y las condiciones de desarrollo (Téllez-Téllez y cols. 2008).

La fuente de carbono es una de las variables más importantes para la producción de xilanasas y celulasas, los materiales ligninocelulósicos parecen ser un mejor sustrato que el xilano para la producción de xilanasas. La literatura sugiere que la producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación, una es la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales celulosa y xilano para las celulasas y xilanasas, respectivamente, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa para el caso de las celulasas, y xilosa, arabinosa o xilobiosa para las xilanasas (Gong y Tsao 1979).

La actividad de xilanasas y celulasas evaluada en este estudio en los medios de fermentación con diferentes fuentes de carbono, no mostraron actividades iguales, siendo las xilanasas con mayor actividad en los tres medios, mientras que las celulasas con glucosa en el medio, presentaron un efecto represor en su producción o puede ser que estas enzimas no sean constitutivas. La actividad de celulasas con el medio de xilano y carboximetilcelulosa, presentaron una actividad durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento del hongo, sin embargo, la actividad de celulasas muestra cambios durante la fermentación cuando se utiliza glucosa, xilano y carboximetilcelulosa en el medio, observándose que esta solo se encuentra presente con alta actividad durante las fases de adaptación y exponencial del hongo disminuyendo esta antes de terminar la fase exponencial.

Por otro lado, la actividad de xilanasas al utilizar medio con glucosa se presenta solamente durante la fase de adaptación y exponencial de crecimiento del hongo, disminuyendo al iniciar la fase estacionaria, lo que nos lleva a pensar que la glucosa no causa ningún efecto represor durante la producción de xilanasas y que estas enzimas son constitutivas y que posiblemente su producción disminuye cuando en el medio la fuente de carbono se agota, y el hongo puede utilizar estas enzimas como aporte de proteína. Sin embargo, cuando en el medio se utiliza xilano y carboximetilcelulosa sin glucosa la actividad de estas enzimas se mantiene a lo largo de toda la fermentación, pero al contener glucosa la actividad disminuye antes de concluir la fase exponencial del crecimiento del hongo.

Estudios encontrados hasta el momento sobre la actividad celulolítica por una gran variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos, se han reportado con actividad xilanasas, de los cuales los hongos son más eficientes. La producción de xilanasas por una mutante de *Aspergillus niger*, en condiciones óptimas, la actividad y la productividad obtenida después de 5 días de fermentación fueron 5.07 U/g en paja de arroz y 14 790 U/L, el extracto enzimático presentó actividad de xilanasas en pH 3.5 y 8.5 (Raghukumar y cols. 2004).

Los zimogramas son una herramienta de gran utilidad para caracterizar los extractos crudos enzimáticos (EE) al detectar bandas de actividad específica, debido a que sólo se hacen evidentes las proteínas con actividad catalítica de interés dependiendo del sustrato con el que se revele el gel de poliacrilamida. Esta técnica permite identificar el número de isoformas presentes en cada uno de los EE de los diferentes medios. En los patrones zimográficos con actividad de lacasas revelados con 2,6 dimetoxifenol (DMP) se observó que el pH influyó sobre la presencia de isoenzimas, el mejor pH donde se encontraron mayor isoenzimas, fue a un pH de 4.5 en los tres medios de fermentación, encontrando de tres a cuatro bandas, siendo el medio con glucosa, xilano y carboximetilcelulosa el mejor. Sin embargo, al revelar los zimogramas con un pH 6.5 solo se pudieron observar de 1 a 3 bandas. Se observó que el número de isoformas cambio dependiendo la fuente de carbono que se encontraba en el medio.

Téllez-Téllez y cols. (2008) reportaron que *P. ostreatus* en fermentación en medio sólido, encontraron de una a dos isoenzimas, dependiendo el tiempo de fermentación y a las fases de crecimiento del hongo. Tlecuitl-Beristain y cols. (2008) encontraron cuatro isoformas de lacasas que fueron secretadas por el hongo. Estas se produjeron en la fase estacionaria, una de estas isoenzimas se produjo durante todas las fases de crecimiento.

Los zimogramas de xilanasas y celulasas fueron incubados con xilano y carboximetilcelulosa a un pH de 5 y revelados en rojo congó, en los tres medio de fermentación, encontrando para xilanasas de dos a tres bandas, para celulasas se encontraron de una a dos bandas, siendo el medio con xilano y carboximetilcelulosa el medio de cultivo en donde se observaron mayor número de bandas. Se observó que la intensidad de las bandas dependió del tipo de medio de cultivo así mismo de las etapas de crecimiento del hongo siendo la fase exponencial donde se presentaron mayor número de bandas que en la fase estacionaria. Un estudio realizado en la identificación de isoenzimas de xilanasas en geles de electroforesis mostraron dos isoenzimas de xilanasas con pesos moleculares de 13 y 18 KDa (Raghukumar y cols. 2004).



## 9. CONCLUSIONES

El tipo y proporción de fuente de carbono utilizada en los medios de fermentación, modificaron los patrones de producción de las enzimas lignocelulolíticas. Sin embargo, no modificaron el crecimiento del hongo, durante la fermentación se observaron las diferentes fases de crecimiento del hongo

Todos los medios de cultivo utilizados en la fermentación presentaron actividad de lacasas, xilanasas y celulasas, sin embargo, se presentaron diferencias en la actividad enzimática.

La glucosa como única fuente de carbono en el medio de cultivo, causó represión en la actividad de celulasas. El medio de cultivo con las tres fuentes de carbono presentó la actividad de las tres enzimas, al igual que el medio de cultivo con xilano y carboximetilcelulosa, sin embargo, este último medio de fermentación mostró mayor rendimiento de actividad enzimática. Con esto se puede observar que la combinación de un carbohidrato asimilable con carbohidratos de alto peso molecular afecta la actividad de las enzimas.

La zimografía reveló diferencias entre el número de isoformas en los extractos enzimáticos con respecto a los medios de cultivo. Se observó que el pH influye sobre la presencia de las isoenzimas de lacasa, encontrando que a pH de 4.5 se encontraron de una a cuatro bandas, siendo el medio con glucosa, xilano y carboximetilcelulosa con mayor número de isoformas. Al revelar los zimogramas con un pH 6.5 solo se pudieron observar de 1 a 3 bandas siendo el segundo medio con mayor número. Se encontraron para xilanasas de dos a tres bandas y para celulasas se encontraron de una a dos bandas, siendo el medio con xilano y carboximetilcelulosa el medio de cultivo en donde se observaron mayor número de bandas. Se observó que la intensidad de las bandas dependió del tipo de medio de cultivo, así mismo de las etapas de crecimiento del hongo siendo la fase exponencial donde se presentaron mayor número de bandas que en la fase estacionaria.

## 10. PERSPECTIVAS

Se ha reportado que el pH modifica la actividad de lacasas, se propone desarrollar a *Pleurotus ostreatus* a un pH de 4.5 en fermentación sólida con los medios utilizados en esta investigación, evaluando la actividad e identificando las isoenzimas al mismo pH.

La composición del medio de cultivo modifica la producción de las enzimas, se propone utilizar en el medio de cultivo xilano y/o carboximetilcelulosa como única fuente de carbono para identificar si se ve modificada la producción de enzimas lignocelulolíticas y el crecimiento del hongo en fermentación sólida.

Las enzimas celulolíticas llevan acabo con eficiencia su actividad a pH de 4 a 5, se propone desarrollar el hongo *Pleurotus ostreatus* a estos pH para observar si aumenta la producción de las enzimas.

El hongo *Pleurotus ostreatus* produjo enzimas celulasas y xilanasas, se propone realizar un medio de cultivo optimo para la producción de estas enzimas, para caracterizar bioquímica y molecularmente alguna de las enzimas que presente la mayor actividad.

## 11. REFERENCIAS

- Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniestra-González G. y Favela-Torres E. 1995. Production and properties of the pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:808-814.
- Aidoo KE, Hendry R y Wood BJB. 1982. Solid substrate fermentations. *Advances in Applied Microbiology*. 28:201-237.
- Ali S, Sayed A., Sarker R.I. y Alam R. 1991. Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 7:62-66.
- Anthony T, Raj KC, Rajendran A y Gunasekaran P. 2003. High molecular weight cellulase-free xylanase from álcali-tolerant K *Aspergillus fumigatus* AR1. 32: 647-654.
- Antier P, Minjares A, Roussos S, Raimbault M, Viniestra G. 1993. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25. *Appl Microbiol Biotechnol* for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microbial Technology* 15: 254–260.
- Antorini, M.; Herpoël-Gimbert, I.; Choinowski, T.; Sigoillot, J.C.; Esther, M.; Winterhalter, K.; Piontek, K. 2002. Purification, crystallization and X-ray diffraction study of fully functional laccase from ligninolytic fungi. *Biochimica Biophysica et Acta*. 1594: 109-114.
- Aro N, Pakula T y Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 719-739.
- Ávila H. 2005. Enzimas fibrolíticas de *Pleurotus ostreatus* y su actividad en rastrojo de maíz. Tesis. Colegio de posgraduados. Montecillos, Edo. De México. Pp.92.
- Baldrian P, Valaskoba V, Mehautova V, Gabriel J. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*. 156:670-676.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30: 215–242.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Biely P. 1993. Hemicellulose and hemicellulases, Ed. Coughlan y Hazlewood Portland Press Research Monograph p. 29.
- Bollag J. y Leonowicz A. 1984. Comparatives studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* 48:849-854.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ y Martínez AT. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:1775-1784.
- Carlile MJ, Watkinson SC y Gooday GW. 2001. *The fungi* (Second edition ed.) London: Academic press.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron Technology* 35:93-96.
- Dashtban M, Schraft H, Qin W. 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Jorunal of Biological Sciences*. 5(6):578-595.
- Dávila G, Vázquez-Duhalt R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*. Vol XXX, pp. 29-55.
- Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Augur C y Viniegra-Gonzales G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 271-275.
- Elisashvilli V, Kachlishvilli y Penninckx. 2008. Efect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomicetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35, pp. 1531-1538.

- 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.
- Garzillo AMV, Di Paolo S, Ruzzi M, Buonocore. 1994. Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42:476-481.
- Gong Ch y Tsao GT. 1979. *Ann. Rep. Ferment. Process* 3: 111.
- González. A.M. 2004. “Estructura vegetal” in [<http://www.biologia.edu.ar>].
- Harris P y Smith BG. 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology*.
- Hesseltine CW. 1972. Biotechnology report on solid state fermentations. *Bitechnology and Bioengineering* 14: 517-532.
- Hublik G y Schinner F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial. Technology*. 27: 330-336.
- Jordaan, J.; Leukes, W. D. 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from mesophilic white-rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(2-3): 212-219.
- Jun H, Bing Y, Keying Z, Xuemei D, Daiwen C. 2009. Sequencing and Expression of the Xylanase Gene 2 from *Trichoderma reesei* Rut C-30 and Characterization of the Recombinant Enzyme and Its Activity on Xylan. *Journal Microbiol Biotechnology*. 17:101-109.
- Kadla JF y Gilbert RD. 2000. Cellulose structure: A review, *Cellulose Chemistry and Technology*, 34, pp. 197-216.
- Kang KH, Dec J, Park H y Bollag J M. 2002. Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Reseash*. 36:4907-4915.

- Kaur J, Chadha BS, Kumar BA, Saini AHS. 2007. Purification of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Bioresource Technology Bioelectrochemistry*. 10.1016/j. bioelechem. 2006.09.008.
- Keum Y S. y Li Q X. 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56:23-30.
- Khandeparkar, R.D.S.; Bhosle, N.B. 2006. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 732-742.
- Kiiskinen, L.; Cruz, K.; Bailey, M.; Ylösmäki, E.; Siika-aho, M.; Saloheimo, M. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of a purified enzyme. *Microbiology*. 150: 3065-3074.
- Kiiskinen L-L, Viikari L y Kruus K. 2002. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology Biotechnology* 59: 198-204.
- Kirk TK y Farrell RL. 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annual Review Microbiology*. 41:465-505.
- Kirk-Kent 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 y Akhtar M (eds.). John Wiley y Sons, Inc. New York. pp: 273-307.
- Klis, M.; Rogalski, J.; Bilewicz, R. 2006. Voltammetric determination of catalytic reaction parameters of laccase based on electrooxidation of hydroquinone and ABTS.
- Kumar R, Singh S y Singh OV. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal and Microbiol Biotechnology*. Vol. 35, 377-391.
- Kumaran S, Sastry CA y Vikineswary S. 1997. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago *hampas*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13, pp. 43-49.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-885.
- Lagunas BI. 2006. Producción de extractos enzimáticos por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda. Tesis de maestría. Querétaro (Querétaro) México: Univ Aut de Querétaro.
- Leite RSR, Bocchini DL, Martins EDS, Silva D, Gomez E y Da Silva R. 2007. Production of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes From *Aureobasidium pulluans* on Solid State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 136-140, pp. 281-288.
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, WojtasWasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D y Rogalski J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal Basic Microbiology*. 41:185-227.
- Litthauer D, van Vuuren M J, van Tonder A y Wolfaardt F W. 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbiol Technology*. 40:563-568.
- Loera, O., Barbosa JR, Villaseñor F. 2006. "LACCASES". In: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Ed: RG Guevara and I Torres. Research signpost editorial, Kerala, India. Chapter 15: 323-340.
- Loewus FA. 1952. Improvement in anithronic method for determination of carbohydrates. *Analitical Chemistry*. 24:219.
- Luis P, Walther G, Kellner H, Martin F y Buscot, F. 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology Biochemistry*. 36:1025-1036.
- Márquez-Rocha, F.J., Hernández-Rodríguez, V.Z., Vázquez-Duhalt, R. 2000. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* 22: 469-472.
- Martínez-Anaya C, Balcázar-López E, Dantán-González E, Folch-Mallol JL. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 50(3 y 4), pp. 119-131.

- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH y Henriques AO. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase which occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:18849-18859.
- Marzullo L, Cannio R, Giardina P, Santini MT y Sannia G. 1995. Veratril alcohol oxidasas from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *Journal of Biological Chemistry* 270 (8): 3823-3827.
- Massadeh MI, Yusoff WMW, Omar O y Kader J. 2001. Synergism of cellulose enzymes in mixed solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*.
- Mayer A y Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60(6): 551-565.
- Mekala NK, Singhanian RK, Sukimaran, Pandey A. 2008. Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 151:122-131.
- Membrillo I, Sanchez C, Meneses M, Favela E, Loera O. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*.
- Miller Gail L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31 (3): 426-428.
- Monti R, Cardillo L, Custodio MF, Goulard AJ, Sayama AH y Contiero J. 2003. Production and purification of an endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Humicola grisea* var *thermoidea* by electroelution. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34: 124-128.
- Morozova V, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV y Yaropolov AI. 2007. Blue laccases. *Biochemistry-Moscow* 72:1136-1150.
- Morozova V, Shumakovich GP, Shleev SV y Yaropolov YI. 2007. Laccase-mediator systems and their applications: A review *Applied Biochemistry Microbiology*. 43:523-535.



- Murphy ME, Lindley PF y Adman ET. 2000. Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Science*. 6:761-770.
- Nikitina, O. V., Shleev, S. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Belovolova, L. V., y Yaropolov, A. I. 2005. Isolation and purification of enzymes from ligninolytic complex of the basidial fungus *Trametes pubescens* Schumacher) Pilait and study of their properties. *Biochemistry-Moscow* 70:1274-1279.
- Nogala W, Rozniecka E, Zawisza I, Rogalski J y Opallo M. 2006. Immobilization of ABTS-laccase system in silicate based electrode for bioelectrocatalytic reduction of dioxygen. *Electrochemistry Communications*. 8: 1850-1854.
- Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz GM, Zvauya 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.
- Palonen H, Saloheimo M, Viikari L y Kruus K. 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 854-862.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G y Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 220-230.
- 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.
- Palmieri, G.; Cennamo, G.; Faraco, V.; Amoresano, A.; Sannia, G.; Giardina, P.; 2002. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microbiol Technology*. 33: 220-230.
- Pandey A. 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 27: 109-117.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81–84.

- Papinutti VL, Dorio La y Forchiassin F. 2003. Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: Producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Rev. Iberoamericana de Micología*. 20, pp 16-20.
- Park YS, Kang SW, Lee JS y Hong SI. 2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiol Biotechnology*. Vol. 58, pp 761-766.
- Peixoto- Nogueira SC, Peixoto- Nogueira SC, Michelin M, Almeida BJH, Jorge JA, Terenzi HF y Polizeli MLTM. 2009. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. *Journal ind Microbiol Biotechnology*. Vol. 36, pp. 149-155.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 20-33.
- Raghukumar C, Muraleedharan U, Gaud VR y Mishara R. 2004. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. *Journal ind Microbiol Biotechnology*. Vol. 31, 433-441.
- Rivers DB y Emert HG. 1988. *Biological Wastes* 26: 199.
- Rodríguez E, Nuero O, Guillén F, Martínez AT y Martínez M J. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biochemistry*. 36:909-916.
- Rodríguez CS y Toca HJL. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*. 24: 500-513.
- Romero Susana. 2007. “Ingeniería Metabólica y Residuos Agroindustriales”. *Revista Ciencia y Desarrollo* 33(210): 60-66.
- Romero-Gómez S, Augur C y Viniegra-González G. 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 22: 1255–1258.
- Rosconi F, Fraguas LF, Martinez-Drets G y Castro-Sowinski S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium mehloti*. *Enzyme and Microbial Technology*. 36:800-807.

- Sánchez C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: pp. 1321-1337.
- Sanghi A, Garg N, Sharma J, Kuhar K, Kuhad RC y Gupta VK. 2008. Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. Vol. 24, 633-640.
- Sapag A, Wouters J, Lambert C, de loannes P, Eyzaguirre J y E Depiereux. 2002. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *Journal of Biotechnology*.
- Saparrat, MC N, Guillén F, Arambarri AM, Martínez AT y Martínez MJ. 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the whiterot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:1534-1540.
- Saparrat, MCN, Guillén F, Arambarri AM, Martínez AT y Martínez MJ. 2001. Transformation of non-phenolic substrates and formation of activated oxygen species by *Coriolopsis rigida* laccase. Abs. 10th Eur. Congr. Biotechnol. Madrid, 8-11 July.
- Schwarze F, Engels J y Mattheck C. 2000. Fundamental aspects. En *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer. pp 5-31.
- Shan V y Nerud F. 2002. Lignin degradin system of White-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal Microbiology*. 48: 848-870.
- Singh, D.; Kaur, P. 2001. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*. 77: 89-91
- Sethuraman A, Akin D y Eroksson E. 1999. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Applied Microbiology Biotechnology* 52: 689-697.
- Stajic M, Perky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E y Vukojevic J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, pp. 65-73.

- Subramaniyan S y Prema P. 2002 Biotechnology of microbial xylanases. *Enzymology, Molecular Biology and Application. Critical Reviews in Biotechnology* 22:33-64.
- Suzuki, T.; Endo, K.; Ito, M.; Tsujibo, H.; Miyamoto, K.; Inamori, Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence and expression. *Bioscience and Biotechnology Biochemical*. 6(10): 2167-2175.
- Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-González AM, Sanchez C y Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*.
- Téllez-Téllez M, Sánchez C, Montiel-González AM y Díaz-Godínez G. 2005. Laccases activity of the peripheral and central zones of the vegetative mycelium of colonies of *Pleurotus* spp. *Agro Food Industry Hi-Tech*.
- Tinoco, R.; Pickard M.A.; Vázquez-Duhalt R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32: 331-335.
- Tlecuítl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD y Díaz-Godínez G. 2008. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*.
- Topakas, E.; Katapodis, P.; Kekos, D.; Macris, B.J.; Christakopoulos, P. 2003. Production and partial characterization of xylanase by *Sporotrichum thermophile* under solid-state fermentation. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 19: 195-198.
- Trejo-Hernández MR, Oriol E, López-Canales A, Roussos S, Viniegra-González G y Rambault M. 1991. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micología Neotropical Aplicada* 4: 49-62.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar NC, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G y Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 157-167.
- Viniegra-González G. 1997. Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes on solid substrates. *Advances in Bioprocess Engineering* 2: 123-135.

- Wei DL, Chang SC, Wei YH, Lin YW, Chuang CL. y Jong SC. 1992. Production of cellulolytic enzymes from the *Xylaria* and *Hypoxylon* species of xylariaceae. World Journal Microbiology and Biotechnology, 8:141-146.
- Xu F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. The Journal of Biological Chemistry. 272:924-928.
- Youngchim S, Morris-Jones R, Hay R.J, Hamilton A.J. 2004. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. Journal of Medical Microbiology. 53: 175-181.

# ANEXOS



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

BTN105BIO20091211

# Constancia

A:

*Jorge Alvarez Cervantes; Carmen Sánchez; Octavio Coera; Daniel Méndez; Edna María Hernández Domínguez; Gerardo Díaz Godínez*

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA EXPOSICIÓN DEL TRABAJO LIBRE

Evaluación De La Actividad Lignocelulolítica De *Pleurotus ostreatus* Obtenida Por Fermentación Sólida Utilizando Un Soporte Inerte

**VI** CONGRESO INTERNACIONAL  
INTERNATIONAL CONGRESS

**XVII** CONGRESO NACIONAL  
NATIONAL CONGRESS OF BIOPHARMACEUTICAL ENGINEERING

**VIII** JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR  
BIOMEDICINE AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY SCIENTIFIC MEETING

Acapulco, Gro./ México

Del 24 al 26 de Marzo del 2010



*Dr. Mario Alberto Rodríguez Casas*  
Presidente Honorario



*IBQ. Raúl Chávez Afvirco*  
Presidente del C.M.I.B.Q., A.C.

*Dr. Alejandro Romo Mexía Gutiérrez*  
Presidente del Congreso





COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

BTN107BIO20091211

EXTIENDE LA PRESENTE

# Constancia

A:

*Jorge Álvarez Cervantes; Carmen Sánchez; Octavio Lopera; Daniel Méndez; Edna María Hernández Domínguez; Gerardo Díaz Godínez*

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA EXPOSICIÓN DEL TRABAJO LIBRE

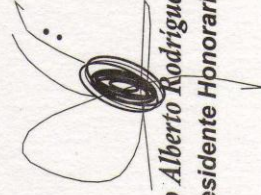
*Producción De Xilanasas, Celulasas Y Lacasas De Pleurotus ostreatus Obtenidas Por Fermentación Sólida Empleando Inductores*

**VI CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**  
INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMICAL ENGINEERING

**VIII JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**  
BIOMEDICINE AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY SCIENTIFIC MEETING

Acapulco, Gro. / México

Del 24 al 26 de Marzo de 2010



**IBQ. Raúl Chávez Alvircio** **IBQ. R. Alejandro Romo Mexía Gutiérrez** **Dr. Mario Alberto Rodríguez Casas**  
Presidente del C.M.I.B.Q., A.C. Presidente del Congreso Presidente Honorario





COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

BTN108BIC20051211

EXTIENDE LA PRESENTE

# Constancia

A:

*Jorge Álvarez Cervantes; Carmen Sánchez; Octavio Loera; Daniel Méndez; Edna María Hernández Domínguez; Gerardo Díaz Godínez*

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA EXPOSICIÓN DEL TRABAJO LIBRE

*Producción De Enzimas Lignocelulolíticas De Pleurotus ostreatus Obtenidas Por Fermentación Sólida Utilizando Xilano Y Carboximetilcelulosa Como Fuentes De Carbono*

**VI CONGRESO INTERNACIONAL  
INTERNATIONAL CONGRESS**

**XVII CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
NATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMICAL ENGINEERING**

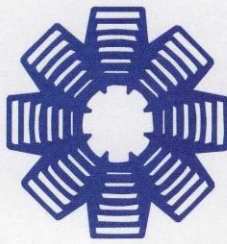
**VIII JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR  
BIOMEDICINE AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY SCIENTIFIC MEETING**

Acapulco, Gro. / México

Del 24 al 26 de Marzo del 2010

**IBQ. Raúl Chávez Alvircio** **IBQ. R. Alejandro Romo Méxía Gutiérrez** **Dr. Mario Alberto Rodríguez Casas**  
Presidente del C.M.I.B.Q., A.C. Presidente del Congreso Presidente Honorario





**S M B B**

LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA  
Y BIOINGENIERÍA, A.C. DELEGACION YUCATAN

Otorga el presente

# Reconocimiento



**S M B B**  
DELEGACIÓN  
YUCATÁN

Por la presentación del trabajo libre en modalidad ORAL

ZIMOGRFÍA DE CELULASAS Y XILANASAS DE *Pleurotus ostreatus*  
OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN SÓLIDA Y LÍQUIDA. \*Jorge Álvarez-  
Cervantes, Carmen Sánchez, Octavio Loera, Daniel Méndez, Edna Ma.  
Hernández-Domínguez y Gerardo Díaz-Godínez.

**V Congreso Regional de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste**  
del 27 al 29 de octubre de 2010  
Mérida Yucatán, a 29 de octubre de 2010.

PRESIDENTE SMBB Yucatán  
Dr. Víctor M. Toledo López

SECRETARIO SMBB Nacional  
Dr. Octavio Loera Corral