



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
LIGNOCELULOLÍTICA DE *Pleurotus ostreatus*  
OBTENIDA POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a  
EDNA MA. HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

Codirectores:  
DRA. MA. DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ  
DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

Tutores:  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL  
DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBÍDE

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2010

# ÍNDICE

Autorización de impresión de tesis

Agradecimientos

Dedicatorias

Resumen

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>1.1 Hongos Basidiomicetos</b> .....	7
<b>1.1.1 Podredumbre oscura</b> .....	8
<b>1.1.2 Podredumbre blanda</b> .....	8
<b>1.1.3 Podredumbre oscura</b> .....	8
<b>1.2 Microorganismos Ligninolíticos</b> .....	8
<b>1.2.1 Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i></b> .....	9
<b>1.2.2 Ciclo de vida de <i>P. ostreatus</i></b> .....	9
<b>1.2.3 Microorganismos que producen enzimas lignocelulolíticas</b> .....	10
<b>1.3 Enzimas Ligninolíticas</b> .....	11
<b>1.3.1 Lacasas</b> .....	11
<b>1.3.2 Celulasas y xilanasas</b> .....	12
<b>1.3.2.1 Aplicaciones de las celulasas y xilanasas</b> .....	13
<b>1.4 Principales componentes de los residuos lignocelulósicos</b> .....	14
<b>1.4.1 Celulosa</b> .....	14
<b>1.4.2 Hemicelulosa</b> .....	16
<b>1.4.3 Lignina</b> .....	17
<b>1.5 Obtención de enzimas</b> .....	18
<b>1.5.1 Fermentación sólida y líquida</b> .....	18
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	31
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	33
<b>5.1 General</b> .....	33
<b>5.2 Específicos</b> .....	33
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	34
<b>6.1 Microorganismo empleado</b> .....	35
<b>6.2 Condiciones de cultivo</b> .....	35
<b>6.3 Caracterización de la fermentación</b> .....	36
<b>6.3.1 Determinación de pH</b> .....	36
<b>6.3.2 Evaluación de biomasa y extracto crudo enzimático</b> .....	36
<b>6.3.3 Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y de producción enzimática</b> .....	36
<b>6.3.4 Evaluación de proteína soluble</b> .....	37
<b>6.3.5 Evaluación de azúcares</b> .....	37
<b>6.3.5.1 Residuales</b> .....	37
<b>6.3.5.2 Residuales totales</b> .....	38
<b>6.3.6. Evaluación de actividad enzimática</b> .....	38
<b>6.3.6.1 Actividad enzimática de lacasas</b> .....	38
<b>6.3.6.2. Actividad enzimática de celulasas</b> .....	38

6.3.6.3 Actividad enzimática de xilanasas .....	38
6.3.6.4 Actividad de proteasas .....	39
6.3.6.5. Geles de electroforesis .....	39
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>7.1 Fermentación con “G”. Medio de fermentación con glucosa como única fuente de carbono. ....</b>	<b>41</b>
7.1.1 Determinación de pH.....	41
7.1.2 Determinación de biomasa.....	41
7.1.3 Determinación de proteína soluble .....	42
7.1.4 Determinación de azúcares .....	42
7.1.5 Actividad de lacasas .....	43
7.1.6 Actividad de proteasas .....	44
7.1.7 Actividad de celulasas .....	44
7.1.8 Actividad de xilanasas .....	45
7.1.9 Zimografía.....	45
7.1.9.1 Geles de electroforesis de lacasas pH 6.5.....	45
7.1.9.2 Geles de electroforesis lacasas pH 4.5.....	46
7.1.9.3 Geles de electroforesis de celulasas .....	46
7.1.9.4 Geles de electroforesis de xilanasas.....	47
<b>7.2 Fermentación con “G, CMC y X”. Medio de fermentación con glucosa, carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono. ....</b>	<b>48</b>
7.2.1 Determinación de pH.....	48
7.2.2 Determinación de biomasa.....	48
7.2.3 Determinación de proteína soluble .....	49
7.2.4 Determinación de azúcares residuales.....	49
7.2.5 Actividad de lacasas .....	50
7.2.6 Actividad de celulasas .....	51
7.2.7 Actividad de xilanasas.....	51
7.2.8 Actividad de proteasas .....	52
7.2.9 Zimografía.....	52
7.2.9.1 Geles de electroforesis de lacasas pH 6.5.....	52
7.2.9.2 Geles de electroforesis de lacasas pH 4.5.....	53
7.2.9.3 Geles de electroforesis celulasas .....	53
7.2.9.4 Geles de electroforesis xilanasas.....	54
<b>7.3 Fermentación con “CMC y X”. Medio de fermentación con carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono. ....</b>	<b>55</b>
7.3.1 Determinación de pH.....	55
7.3.2 Determinación de biomasa.....	55
7.3.3 Determinación de proteína soluble .....	56
7.3.4 Determinación de azúcares residuales.....	56
7.3.5 Actividad de lacasas .....	57
7.3.6 Actividad de celulasas .....	58
7.3.7 Actividad de xilanasas.....	58
7.3.8 Zimografía.....	59
7.3.8.1 Geles de electroforesis de lacasas pH 6.5.....	59

7.3.8.2 Geles de electroforesis de lacasas pH 4.5.....	59
7.3.8.3 Geles de electroforesis celulasas .....	60
7.3.8.4 Geles de electroforesis xilanasas.....	60
8. PARÁMETROS CINÉTICOS .....	61
9. DISCUSIONES .....	62
10. CONCLUSIONES .....	66
11. BIBLIOGRAFÍA .....	67
ANEXOS	

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág</b>
<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
<b>Figura 2:</b> Estructura de la celulosa	14
<b>Figura 3:</b> Estructura de la hemicelulosa	12
<b>Figura 4:</b> Estructura de la lignina	13
<b>Figura 5:</b> Diagrama de bloques que muestra el desarrollo de la investigación	33
<b>Figura 6:</b> pH del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	39
<b>Figura 7:</b> Curva de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	39
<b>Figura 8:</b> Proteína soluble del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	40
<b>Figura 9:</b> Azúcares residuales del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	40
<b>Figura 10:</b> Actividad de lacasas (unidades arbitrarias) del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	41
<b>Figura 11:</b> Actividad de lacasas (unidades internacionales) del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	41
<b>Figura 12:</b> Actividad de proteasas del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	42
<b>Figura 13:</b> Actividad de celulasas del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	42
<b>Figura 14:</b> Actividad de xilanasas del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	43
<b>Figura 15:</b> Perfil de zimogramas de lacasas pH 6.5 en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	43
<b>Figura 16:</b> Perfil de zimogramas de lacasas pH 4.5 en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	44
<b>Figura 17:</b> Perfil de zimogramas de celulasas en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	44
<b>Figura 18:</b> Perfil de zimogramas de xilanasas en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	45
<b>Figura 19:</b> pH del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	46
<b>Figura 20:</b> Curva de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	46
<b>Figura 21:</b> Proteína soluble del medio de fermentación durante el desarrollo	47

de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	
<b>Figura 22:</b> Azúcares residuales del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	47
<b>Figura 23:</b> Actividad de lacasas (unidades arbitrarias) del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	48
<b>Figura 24:</b> Actividad de lacasas (unidades internacionales) del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	48
<b>Figura 25:</b> Actividad de celulasas del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	49
<b>Figura 26:</b> Actividad de xilanasas del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	49
<b>Figura 27:</b> Actividad de proteasas del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	50
<b>Figura 28:</b> Perfil de zimogramas de lacasas pH 6.5 en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	50
<b>Figura 29:</b> Perfil de zimogramas de lacasas pH 4.5 en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	51
<b>Figura 30:</b> Perfil de zimogramas de celulasas en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	51
<b>Figura 31:</b> Perfil de zimogramas de xilanasas en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	52
<b>Figura 32:</b> pH del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	53
<b>Figura 33:</b> Curva de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	53
<b>Figura 34:</b> Proteína soluble del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	54
<b>Figura 35:</b> Azúcares residuales del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	54
<b>Figura 36:</b> Actividad de lacasas (unidades arbitrarias) del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	55
<b>Figura 37:</b> Actividad de lacasas (unidades internacionales) del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> en fermentación líquida	55
<b>Figura 38:</b> Actividad de celulasas del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	56
<b>Figura 39:</b> Actividad de xilanasas del medio de fermentación durante el desarrollo de <i>P. ostreatus</i> en fermentación líquida	56
<b>Figura 40:</b> Perfil de zimogramas de lacasas pH 6.5 en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	57
<b>Figura 41:</b> Perfil de zimogramas de lacasas pH 4.5 en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	57
<b>Figura 42:</b> Perfil de zimogramas de celulasas en fermentación líquida de la cepa <i>P. ostreatus</i> 83	58

**Figura 43:** Perfil de zimogramas de xilanasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* 83 58

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
<b>Tabla 1:</b> Hongos que presentan las lacasas utilizadas en síntesis orgánica	21
<b>Tabla 2:</b> Constantes cinéticas de las isoenzimas de lacasas de <i>P. ostreatus</i> obtenidas por fermentación sólida y líquida	22
<b>Tabla 3:</b> Purificación de la lacasa del medio de cultivo en fermentación sólida de <i>P. ostreatus</i>	23
<b>Tabla 4:</b> Purificación de la lacasa del medio de cultivo en fermentación líquida de <i>P. ostreatus</i>	24
<b>Tabla 5:</b> Lacasas presentes en algunos hongos	25
<b>Tabla 6:</b> Algunos hongos con enzimas ligninocelulolíticas	28
<b>Tabla 7:</b> Composición del medio de cultivo para las fermentaciones	34
<b>Tabla 8:</b> Parámetros cinéticos	59

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los hongos son organismos pluricelulares, unicelulares o dimórficos que carecen de clorofila, por lo tanto son heterótrofos, es decir, obtienen sus alimentos por absorción. El componente principal de sus paredes celulares es la quitina. El talo o cuerpo vegetativo en los hongos filamentosos está constituido por filamentos delgados llamados hifas, las que presentan crecimiento apical y en conjunto integran el micelio (Howard y col. 2003; Tengerty y Szakacs, 2003).

Los hongos se dividen en microscópicos y macroscópicos. En el caso de los hongos macroscópicos, el micelio está representado por la masa de apariencia algodonosa y por lo regular blanquecina que forman un cuerpo de reproducción. Dentro de los hongos macroscópicos se encuentran los Ascomicetos y Basidiomicetos, los cuales presentan una reproducción asexual y/o sexual. Los hongos macroscópicos también llamados hongos Macromycetes presentan distribución cosmopolita debido a que pueden desarrollarse en cualquier tipo de clima, existiendo variedad de géneros que pueden crecer entre 4 y 60°C y en diferentes tipos de maderas (Staments, 2003).

### **1.1 Hongos Basidiomicetos**

Las esporas que dan nombre al grupo son las basidiosporas, producidas exógenamente en órganos especiales, llamados basidios. En los Basidiomicetos superiores se producen cuatro basidiosporas típicamente y los basidios se encuentran en las líneas aserradas o en las laminillas de los grandes basidiocarpos carnosos. Los Basidiomicetos inferiores tienen un ácido vital más complicado y su lugar en la clasificación no es muy seguro. Un buen número de especies de Agaricales pueden desarrollarse en cultivos artificiales (Staments, 2003).

Una actividad muy importante de los Basidiomicetos es la descomposición de la madera, papel y otros derivados de productos naturales. Estos hongos, por lo tanto, son capaces de producir enzimas capaces de degradar la lignina y utilizarla como fuentes de carbono y de energía. La descomposición de la lignina en la naturaleza es difícil y es realizada por un reducido grupo

de hongos Basidiomicetos que producen la llamada podredumbre de la madera. Existen tres tipos de podredumbre: la oscura, la blanda y la blanca (Staments, 2003).

### **1.1.1 Podredumbre oscura**

Estos hongos exhiben preferencia por la celulosa y hemicelulosa, provocando una gran despolimerización de estos polisacáridos de la pared celular de la madera dejando a la lignina intacta lo que le confiere un color oscuro característico al que se debe su nombre. Algunos ejemplos de estos hongos son: *Piptoporus betulinus*, *Coniophora puteana* y *Serpula lacrymans* (Deacon, 2000).

### **1.1.2 Podredumbre blanda**

La pudrición blanda es la de menor importancia ya que se produce a nivel superficial. Se produce un reblandecimiento de los tejidos de la madera acompañado de una pérdida significativa de peso. Los hongos de podredumbre blanda se alimentan de celulosa, hemicelulosa y parte de la lignina presente lo que provoca una consistencia blanda. Los hongos más características de este grupo son *Aspergillus* y *Fusarium* (Anselmo y Ovais, 2002).

### **1.1.3 Podredumbre blanca**

Estos hongos también llamados hongos ligninolíticos se alimentan preferentemente de la lignina dejando intacta la celulosa y hemicelulosa, dando lugar a un color blanco al que se debe su nombre. Algunos ejemplos de estos hongos de podredumbre blanca son: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* (Deacon, 2000).

## **1.2 Microorganismos Ligninolíticos**

La capacidad para catabolizar la celulosa y hemicelulosa es una característica común para diversos hongos y otros microorganismos. Por el contrario, al ser la lignina un heteropolímero muy recalcitrante, solamente es mineralizado (transformado hasta óxido de carbono y agua) en forma limitada por algunas bacterias y extensivamente por un grupo de hongos. Estos hongos ligninolíticos, denominados hongos de la pudrición blanca de la madera, comprenden un grupo de organismos cuya característica es su capacidad para mineralizar eficientemente la lignina. Presumiblemente, esta degradación selectiva les permite tener acceso a la celulosa y

hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de carbono y energía. La mayoría de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo Basidiomicetos y son los microorganismos más eficientes en degradar totalmente la lignina.

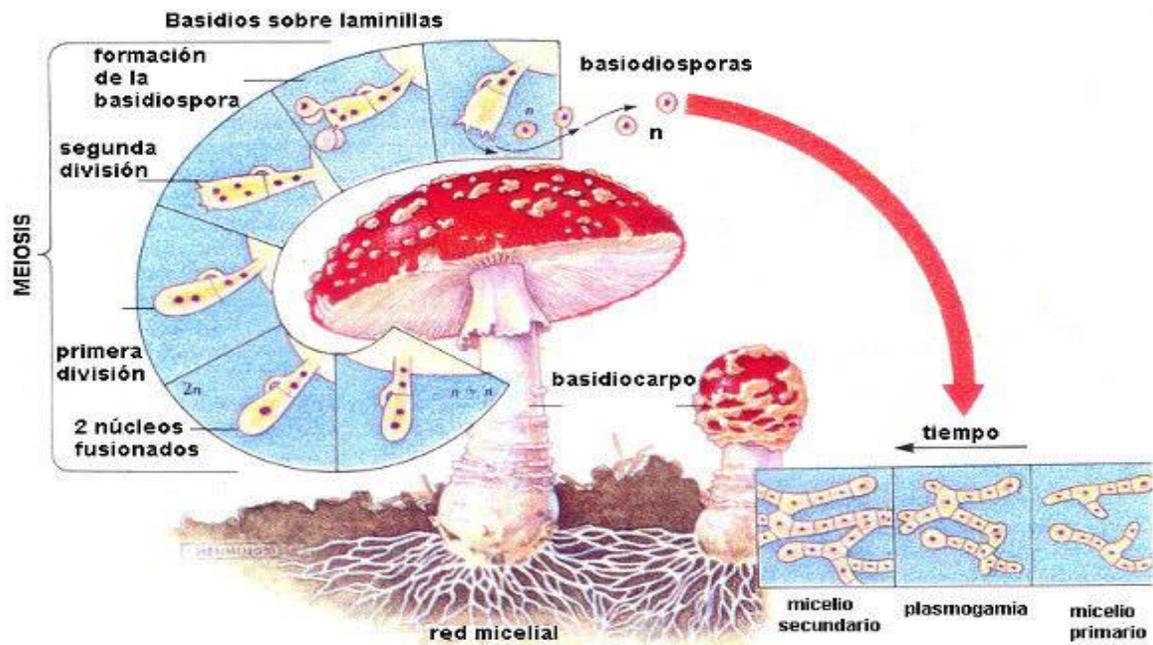
### **1.2.1 Hongo *Pleurotus ostreatus***

*Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*), es un hongo comestible gastronómicamente de calidad. Su color es blanco o castaño, aunque hay variedades azuladas y rosadas. Su carne es compacta en el sombrero y fibrosa y blanca en el pie con sabor y olor agradable (Diamantidis y col. 2000).

Esta especie es cosmopolita y crece saprofiticamente en ambientes naturales sobre troncos de árboles caídos y otras plantas leñosas en descomposición. Es un hongo semi anaerobio que soporta un 32% de CO<sub>2</sub> y fija el nitrógeno atmosférico. Debido a sus pocos requerimientos nutricionales y a su fácil adaptación a los ambientes de cultivo, requiere de técnicas simples y baratas para su cultivo y sus desechos, con capacidad para degradar materiales lignocelulósicos, por lo que quedan convertidos en pienso animal (Palmieri y col. 1997).

### **1.2.2 Ciclo de vida de *P. ostreatus***

En los basidiomicetos existen dos modelos sexuales: 1) el homotalismo: los que pertenecen a este grupo son auto compatibles, es decir la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio y 2) el heterotalismo: son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción. El género *Pleurotus* está dentro de este modelo. En éste las basidiosporas con un núcleo germinan (micelio primario monocariótico) y se fusionan dos micelios primarios compatibles, en los cuales hay un intercambio nucleico recíproco (plasmogamia), formando el micelio secundario dicariótico con la presencia de hifas, la fusión nuclear (cariogamia) ocurre en los basidios, que se encuentran en las laminillas del cuerpo fructífero, posteriormente ocurre la meiosis, dando origen a células haploides (basidiosporas), que son expulsadas hacia el ambiente (Figura 1).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *P. ostreatus*

### 1.2.3 Microorganismos que producen enzimas lignocelulolíticas

Las enzimas lignocelulolíticas están presentes en un gran número de microorganismos, por Ejemplo, las celulasas son secretadas por hongos y bacterias los cuales pueden ser mesófilos, termófilos o también mesófilos anaeróbios, como en el caso de las bacterias que habitan el rumen de los animales. Para producir celulasas a gran escala se han utilizado principalmente los hongos mesófilos y termófilos por su capacidad de secretar cantidades considerables de enzimas al medio de producción (Howard y col. 2003; Ovando y Waliszewski, 2005). Las xilanasas están distribuidas ampliamente en una gran variedad de organismos, entre los cuales se encuentran las algas, los crustáceos, los insectos, las plantas, las levaduras, las bacterias y los hongos. De estos, los microorganismos más utilizados a nivel industrial para producir xilanasas son las bacterias, los hongos mesófilos y termófilos (Beng y col. 2001; Howard y col. 2003; Polizeli y col. 2005). Por su parte, las lacasas y peroxidasas sólo se han detectado en plantas, hongos de pudrición blanca y, ocasionalmente en bacterias, siendo los segundos los más estudiados para la producción de lacasas y peroxidasas (Diamantidis y col. 2000; Mayer y Staples, 2002).

### **1.3 Enzimas Ligninolíticas**

#### **1.3.1 Lacasas**

Las fenoloxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminor aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua. La lacasa es una fenol oxidasa que debe su nombre a que fue descubierta, hace más de un siglo, en el árbol japonés de la laca: *Rhus ernicifera*. Esta enzima contiene átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias. Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares e intracelulares con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, y del 15 al 20% de su peso molecular está dado por carbohidratos (Maheshwari y col. 2000; Ovando y Waliszewski, 2005).

La lacasa fúngica (bencendiol:oxígeno oxidoreductasa, E.C. 1.10.3.2) es una fenol oxidasa extracelular producida por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos. Los mejores productores de esta enzima son los hongos ligninolíticos. Cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos aminor aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y radicales aminor, respectivamente. Este grupo de enzimas, posee cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación  $P^{2+}$  que les confieren una coloración azul (Polizeli y col. 2005; Battan y col. 2006).

La enzima lacasa oxida no solamente ácidos fenólicos y metoxifenólicos, sino que también los descarboxila y ataca sus grupos metoxilo mediante la desmetilación o desmetoxilación. Todas estas reacciones pueden representar un paso importante en la transformación inicial de la lignina. La lacasa también reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina, los cuales, pueden ser polimerizados o despolimerizados, o incluso actuar como mediadores redox de bajo peso molecular. La utilización de sistemas mediador-lacasa es una alternativa promisoría para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel, la decoloración de colorantes textiles y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos (Rodríguez-Couto y col. 2003).

### 1.3.2 Celulasas y xilanasas

Las celulasas y xilanasas 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 D. y Emert H., 2006).

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 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 G. 2002).

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. De esta manera las endo- $\beta$ -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4) rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo- $\beta$ -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la  $\beta$ -glucosidasa

(E.C. 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa (Montenecourt, 2003).

Las xilanas son heteropolisacáridos y su degradación total para producir xilosa y/o arabinosa es llevada a cabo, como en la celulosa, por un grupo de enzimas que participan sinérgicamente. Las más conocidas son las endo- $\beta$ -D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8), las cuales rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula. La arabinofuranosidasa (E.C. 3.2.1.55) hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, mientras que las acetil xilan esterasas (E.C. 3.1.1.72) liberan grupos acetatos. La glucoronidasa (E.C. 3.2.1.139) remueve las cadenas laterales de ácido glucorónico a partir de unidades de xilosa. Las  $\beta$ -xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa (Montenecourt, 2003).

### **1.3.2.1 Aplicaciones de las celulasas y xilanasas**

En la industria textil las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de mezclilla ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido/deslavado. Tradicionalmente el desteñido de este tipo de prendas se efectuaba con piedra pómez (stone wash). Una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedras. Con la reducción de las piedras se produce menos daño a las telas, menos desgaste de las lavadoras y menos polvo de piedra pómez en el ambiente de la lavandería (Kulkarni, 2005).

El biostoning ha abierto nuevas posibilidades en el acabado de tela vaquera, aumentando la variedad de tratamientos de acabado. También se incrementa la productividad del proceso de deslavado, ya que las lavadoras contienen menos piedras y más prendas. Por otro lado, las celulasas se añaden a los detergentes quita pelusas, la enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original. Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Asimismo se usan en la hidrólisis parcial de materiales

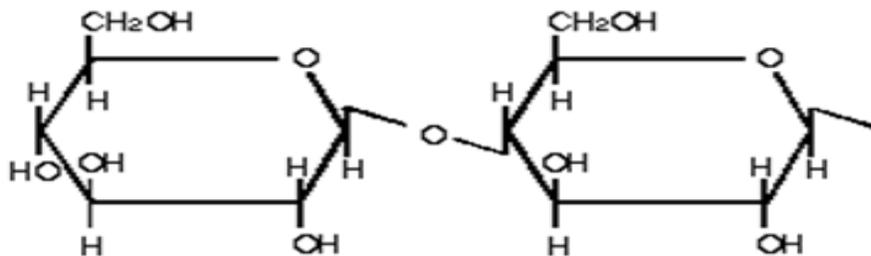
lignocelulósicos para mejorar la digestión de rumiantes. Por otra parte, los dominios de unión a celulosa se han usado con gran éxito sobre una matriz de celulosa para facilitar la purificación de proteínas recombinantes (Pérez-Avalos, 2006).

Una de las aplicaciones más importantes de las xilanasas es en la industria de la pulpa y del papel. El pulpeo Kraft involucra el cocimiento alcalino de la pulpa para remover el 95% de la lignina presente en la madera. El 5% remanente le confiere a la pulpa el color café pardo oscuro. Por razones estéticas y para mejorar las propiedades del papel es necesario un paso de blanqueo, el cual tradicionalmente se hacía por un proceso multietapas, que utiliza cloro o dióxido de cloro. Los productos alternos de estos compuestos químicos son sustancias orgánicas cloradas, algunas de las cuales son tóxicas, mutagénicas, persistentes y bioacumulativas que causan numerosos daños en los sistemas biológicos (Poutanen T. 2004).

## 1.4 Principales componentes de los residuos lignocelulósicos

### 1.3.1 Celulosa

La celulosa (Figura 2) es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa; es rígido, insoluble en agua y contiene desde varios cientos hasta varios miles de unidades de  $\beta$ -glucosa. La celulosa es la biomolécula más abundante ya que forma parte de la biomasa terrestre. La celulosa se forma por la unión de moléculas de  $\beta$ -glucosa mediante enlaces  $\beta$ -1,4-O-glucosídico. Por hidrólisis de glucosa, la celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , con un valor mínimo de  $n= 200$  (Tengerdy y Szakacs, 2003).



**Figura 2:** Estructura de la celulosa.

La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, lo que hace que sea insoluble en agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (Howard y col., 2003).

La celulosa es un polisacárido estructural en las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén. La pared de una célula vegetal joven contiene aproximadamente un 40% de celulosa; la madera un 50 %, mientras que el ejemplo más puro de celulosa es el algodón con un porcentaje mayor al 90% (Howard y col., 2003).

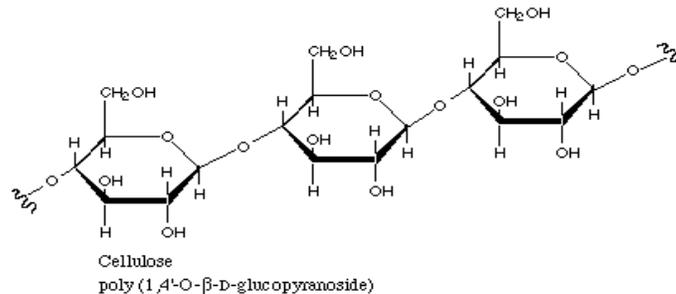
A pesar de que está formada por glucosas, los animales no pueden utilizar la celulosa como fuente de energía, ya que no cuentan con la enzima necesaria para romper los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, es decir, no es digerible por los animales; sin embargo, es importante incluirla en la dieta humana (fibra dietética) porque al mezclarse con las heces, facilita la digestión y defecación, así como previene los malos gases (Martínez y col. 2005).

En el intestino de los rumiantes, de otros herbívoros y de termitas, existen microorganismos, muchos metanógenos, que poseen una enzima llamada celulasa que rompe el enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico y al hidrolizarse la molécula de celulosa queda disponible la glucosa como fuente de energía (Martínez y col. 2005).

Hay microorganismos (bacterias y hongos) que viven libres y también son capaces de hidrolizar la celulosa. Tienen una gran importancia ecológica, pues reciclan materiales celulósicos como papel, cartón y madera. De entre ellos, es de destacar el hongo *Trichoderma reesei*, capaz de producir cuatro tipos de celulasas: las 1,4- $\beta$ -D-glucancelobiohidrolasas CBH I y CBH II y las endo-1,4- $\beta$ -D- glucanasa EG I y EG II. Mediante técnicas biotecnológicas se producen esas enzimas que pueden usarse en el reciclado de papel, disminuyendo el coste económico y la contaminación (Martínez y col. 2005).

### 1.4.2 Hemicelulosa

Las hemicelulosas (Figura 3) son heteropolisacáridos (polisacárido compuesto por más de un tipo de monómero), formado, en este caso un tanto especial, por un conjunto heterogéneo de polisacáridos (fundamentalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucorónico) a su vez formados por un solo tipo de monosacáridos unidos por enlaces  $\beta$  (1-4), que forman una cadena lineal ramificada. Entre estos monosacáridos destacan la glucosa, la galactosa o la fructosa (Polizeli y col. 2005).

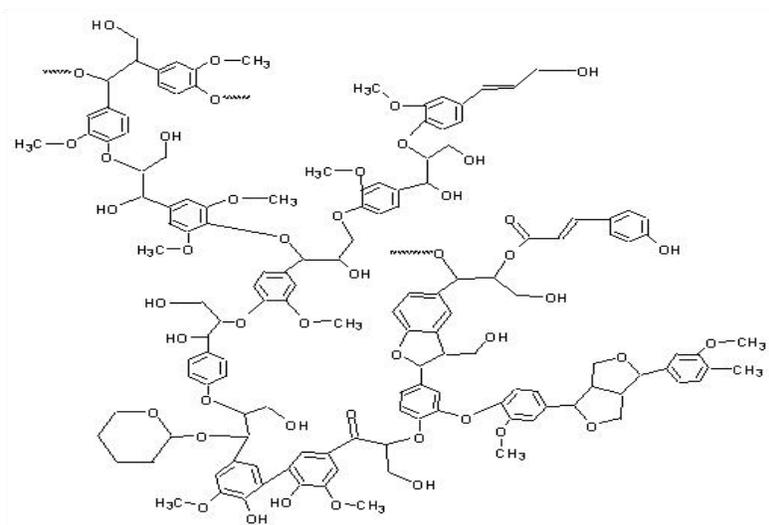


**Figura 3:** Estructura de la hemicelulosa.

La hemicelulosa es parte de las paredes de las diferentes células de los tejidos del vegetal, actúa recubriendo la superficie de las fibras de celulosa y permitiendo el enlace de pectina. En la madera del pino insigne, las hemicelulosa, que forman parte de la matriz, junto a la lignina, donde reside la celulosa, representan entre un 27 y un 29% de la misma, mientras que en la corteza solo alcanzan un 15%. También es importante considerar que este compuesto varía dependiendo de la edad y variabilidad de las especies cultivadas y mejoradas (Beg. y col. 2001). La hemicelulosa se caracteriza por ser una molécula con ramificaciones, como lo es el ácido urónico, capaz de unirse a las otras moléculas mediante enlaces que constituyen la pared rígida que protege a la célula de la presión ejercida sobre esta por el resto de las células que la rodean (Martínez y col. 2005).

### 1.4.3 Lignina

La lignina (Figura 4) es un biopolímero aromático complejo; es el segundo polímero en abundancia después de la celulosa, constituye cerca del 15% de la biomasa terrestre y su fuente natural es la madera, donde se encuentra en una proporción del 20 al 35%. En la degradación enzimática de la lignina intervienen una serie de reacciones inespecíficas que originan la formación de radicales libres en el biopolímero y dan como resultado la desestabilización de los enlaces y finalmente la ruptura de la macromolécula (Barr y Aust, 2000).



**Figura 4:** Estructura de la lignina.

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 (Martínez y col. 2005).

## **1.5 Obtención de enzimas**

Actualmente uno de los métodos más usados para la obtención de enzimas es la fermentación que es un proceso catabólico de oxidación incompleta totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico. Esta puede llevarse a cabo de dos maneras: en cultivo sólido y cultivo líquido (Mayer y Staples, 2002).

### **1.5.1 Fermentación sólida y líquida**

La fermentación en medio sólido ha surgido como una tecnología potencial y atractiva para la producción de metabolitos microbianos; en aplicaciones como bioprocesos de biorremediación ha tenido avances considerables, así como la producción de enzimas, antibióticos, surfactantes, biocidas, etc. La utilización de residuos agroindustriales como sustrato promueve una alternativa de usos. Hoy en día, gracias a aspectos bioquímicos e ingenieriles, particularmente modelos matemáticos de biorreactores (fermentadores) es posible un escalamiento del proceso y algunos diseños han sido desarrollados para su comercialización (Pandey, 2002; Raghavarao y Ranganathan, 2003).

El cultivo sólido se define como el proceso donde los microorganismos crecen sobre la superficie de materiales sólidos con niveles de actividad de agua de 0.4 a 0.9, el material sólido puede ser natural o inerte, siendo el primero, el más usado como sustrato para el crecimiento de los microorganismos (Nigam y Robinson, 2004; Krishna, 2005).

La fermentación líquida (FML) o fermentación en medio líquido, incluye una gran variedad de procesos microbiológicos con agitación y sin ella, donde la biomasa está rodeada completamente por el medio de cultivo líquido. Las principales diferencias entre la FMS y FML, según Viniegra-González, 1997, son:

- La mezcla y difusión de sustratos y productos con relación a la biomasa, son muy insignificantes para la FMS.
- La solubilidad y difusión de oxígeno y otros gases no polares son muy grandes en FMS.
- El contenido de agua libre es pequeño en FMS.

## 2. ANTECEDENTES

Los niveles de humedad afectan la producción de enzimas, niveles mayores al 90% y menores al 50 % pueden reducir considerablemente la producción de las enzimas (Azin y col. 2007). Se ha observado que los requerimientos de humedad dependen del tipo de sustrato, microorganismo y, tipo de enzima que se esté produciendo (De Souza y col. 2002; Rosales y col. 2002; Panagiotou y col. 2003; Asgher y col. 2006; Azin y col. 2007).

El pH puede afectar de manera variable los niveles de producción de enzimas lignocelulolíticas, dependiendo del microorganismo utilizado y del tipo de enzima que se produzca, de manera que en la mayoría de los estudios de optimización, el pH se ha tomado en cuenta como una de las variables más relevantes del proceso (Jecu, 2000; Panagiotou y col. 2003; Shah y Madamwar, 2005; Jing y col. 2007). Con lo que se ha observado que, la producción de enzimas lignocelulolíticas se ve afectada drásticamente cuando el pH del cultivo sólido está por abajo de 5 ó por arriba de 7.

La temperatura de cultivo puede ocasionar pérdidas excesivas de agua de los soportes usados para la producción de enzimas, afectando seriamente la producción de estas (Mazutti y col. 2007). Por ello, la temperatura debe ser explorada con el objetivo de elevar la producción de enzimas lignocelulolíticas durante el cultivo sólido.

La producción de enzimas lignocelulolíticas se lleva a cabo con microorganismos mesófilos y termófilos, obteniéndose los niveles de producción de enzimas más altos entre 25 y 32 °C para mesófilos, y para termófilos entre 45 y 55 °C (Chahal, 1984; Tao y col. 1997; Ovando y Waliszewski, 2005; Polizeli y col. 2005; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Yang y col. 2005).

A finales del siglo XX, únicamente se habían encontrado lacasas en hongos eucariotas, sin embargo, actualmente se conoce la existencia de lacasas intracelulares o periplasmáticas en procariotas. Se encontraron 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 col. 2002; Rosconi y col. 2005).

Las lacasas son proteínas muy estables, con temperaturas óptimas entre 50 y 70 °C (Morozova y col. 2007), pero 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 col. 2007). Poseen puntos isoeléctricos (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 col. 2001; Morozova y col. 2007). Poseen potenciales de óxido-reducción entre 0,5 y 0,8 V y 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 col. 2007).

Las lacasas más estudiadas actualmente, son las concernientes a los hongos basidiomicetos que pertenecen al grupo de los hongos de podredumbre blanca (Kiiskinen y col. 2004). La producción de dichas enzimas es afectada en los procesos de fermentación por los factores como son: la composición del medio, la relación carbono y nitrógeno (C/N), el pH, la temperatura, la proporción de aire (Kahraman y Gurdal, 2002; Rodríguez y col. 2002).

Las condiciones de producción pueden ser simuladas en presencia de diversas sustancias inductoras como son compuestos fenólicos, aromáticos, la lignina o derivados de esta tales como el ácido ferúlico, 2,5-xilidina, p-anisidina o alcohol veratrílico (Galhaup y col. 2002).

Las lacasas fúngicas pueden ser constitutivas o inducibles y también, intracelulares o extracelulares (Tellez-Tellez y col. 2005). Estas enzimas han sido detectadas y purificadas de distintas especies de hongos, así mismo se han clonado los genes que las codifican cuyas secuencias muestran un patrón común codificando polipéptidos de aproximadamente 520-550 residuos de aminoácidos, incluyendo el péptido amino terminal de secreción. Así mismo,

poseen cisteínas y residuos de histidinas que envuelven en su sitio catalítico a los cuatro átomos de cobre necesarios para la catálisis (Palmieri y col. 2000; Sonden y Dobson, 2001).

Debido al gran potencial que tienen este tipo de enzimas, en los últimos años han sido ampliamente estudiadas en algunos casos incluso se conocen los genes que las codifican en diferentes hongos de importancia biotecnológica, un ejemplo es el gen *lcc1* del hongo *Trametes sanguinea* M 85-2 que codifica para una lacasa de 518 aminoácidos incluyendo 21 aminoácidos de péptido señal, la cual posee sitios de glucosilación y residuos de cisteína (Hoshida y col. 2001).

Las lacasas en la síntesis orgánica (Tabla 1) es una alternativa en la oxidación química clásica con una amplia gama de sustratos. En un futuro 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) ampliará la necesidad de este biocatalizador (Battan y col. 2006).

**Tabla 1:** Lacasas de origen fúngico utilizadas en síntesis orgánica.

<b>Lacasas fuente</b>	<b>Aplicación</b>
<i>Coriolus hirsutus</i>	síntesis de un colorante indamine
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	síntesis de 3-(3,4-dihidroxifenil) derivados del ácido propiónico
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Polimerización de polímeros funcionales
<i>Pyricularia orizae</i>	Acomplamiento oxidativo de hidrozona
<i>Trametes versicolor</i>	Síntesis de los aldehídos aromáticos, polimerización de la catecol, etc.
<i>Trametes villosa</i>	Polimerización de bisfenol A
<i>Trametes pubescens</i>	Oxidación de los derivados de azúcares
<i>Agaricus bisporus</i>	Síntesis de 3,4-dihidro-7,8-dihidroxi-2H-1-los dibenzofuranos
<i>Myceliophthora</i>	Síntesis de poli (catequinas)

Se desarrolló en cultivo sumergido al ascomicete *Botryosphaeria* sp., para producir lacasas, el medio basal que se utilizó contenía concentraciones de 1 mM de ácido benzoico, ácido 2,6-dimetoxibenzoico, DMP, ácido ferúlico, guaicol, alcoholes veratraldehído y vinílico. La mayor actividad de lacasas se obtuvo en el medio que contenía veratraldehído (8 U/mL aproximadamente). La actividad se evaluó utilizando ABTS como sustrato (Dekker y col. 2002).

Mientras que en *Volvariella volvacea* se evaluó la inducción de lacasas, creciéndola en un cultivo sumergido con glucosa como fuente única de carbono, con alta y baja concentración de nitrógeno (adicionado con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a una concentración de 3.6 y 26  $\mu\text{M}$  respectivamente) y con adición de cobre (50-300  $\mu\text{M}$   $\text{Cu SO}_4$ ) a concentraciones altas de nitrógeno (30UI/L). La actividad de lacasa fue determinada a 32°C usando ABTS (Shicheng y col. 2003).

Al purificar y caracterizar la lacasa excretada por *P. sagur-caju* (MTCC-141) se encontró que la temperatura y el pH óptimos de esta enzima son: 37 °C y 4.5 respectivamente utilizando 2,6 dimetoxifenol como sustrato mostrando una actividad lacasa de 3.8 U/L (Sahay R. y col. 2008). Sin embargo, la producción enzimática óptima de lacasas de *Pleurotus ostreatus* oscila entre 25-30 °C, siendo que entre 32 y 47 °C se genera la pérdida del 50% de actividad enzimática (Snajdr y Baldrian, 2007).

Por otra parte, Ramírez y col. (2003), caracterizaron la lacasa de *P. ostreatus* obtenida por dos métodos de producción donde, evaluaron diferentes métodos de purificación y separación cromatográfica de un caldo rico en enzimas lacasas. Los procesos de producción fueron fermentación sólida y fermentación líquida, obteniendo lo siguiente (Tablas 2, 3 y 4):

**Tabla 2:** Parámetros cinéticos de las isoenzimas de lacasas de *P. ostreatus* obtenidas por FML y FMS.

Parámetros cinéticos de las isoenzimas de lacasas de <i>P. ostreatus</i> obtenidas por FML Y FMS						
Enzima	FMS			FML		
	km (mM)	V.max (U/ml)	V.max/Km	km (mM)	V.max (U/ml)	V.max/Km
Lacasa I	0.17	0.015	0.088	0.77	24.51	31.8
Lacasa II	0.56	1.6	2.85	0.28	94,34	336.9
Lacasa III	1.32	0.42	0.32			

**Tabla 3:** Purificación de la lacasa del medio de cultivo en fermentación sólida de *P. ostreatus*

Purificación de la lacasa del medio de cultivo en fermentación sólida de <i>P. ostreatus</i>							
Etapas	Vol (ml)	Actividad (U/ml)	Actividad (U)	Proteína total (U/mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento %	Purificación
PEG-sal	254	2.1	533.4	45.72	11.7	100	1
Diafiltración	12.4	16.85	208.9	21.5	9.7	39.2	0.8
Source 15Q							
Lacasa I	34	0.8	27.2	1.22	22.2	5.1	1.9
Lacasa II	13	2.44	31.72	1.0	31.7	5.9	2.7
Lacasa III	11	1.52	16.72	1.54	10.9	3.1	0.93
Sefacril S100							
Lacasa I	60	0.45	26.7	0.66	17.6	5.0	1.51
Lacasa II	38.5	0.93	35.7	0.5	17.9	6.7	1.53
Lacasa III	49	0.47	23.2	1.568	36.3	4.3	3.11

**Tabla 4:** Purificación de la lacasa del medio de cultivo en fermentación sólida de *P. ostreatus*.

<b>Purificación de la lacasa del medio de cultivo en fermentación líquida de <i>P. ostreatus</i></b>							
<b>Etapa</b>	<b>Vol (ml)</b>	<b>Actividad (U/ml)</b>	<b>Actividad (U)</b>	<b>Proteína total (U/mg)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>	<b>Rendimiento %</b>	<b>Purificación</b>
Cultivo	273	17.3	4709.3	85.9	54.8	100	1
Diafiltración/ concentración	60	13.9	795	21.3	37.3	17	0.7
Amicon (10 kDa)	8.8	61.9	544.6	14.9	36.6	12	0.7
Source 15Q							
Lacasa I	18	1.9	33.4	2.5	13.4	1	0.2
Lacasa II	22	6.5	143.2	7.3	19.6	3	0.4
Sefacril S100							
Lacasa I	20	1.0	20.3	2.0	20.8	0.4	0.4
Lacasa II	38	2.5	95.3	1.0	48.1	2	0.9

En *P. ostreatus* se ha evaluado el aumento en la producción de lacasas en la cepa CP-50 mediante la optimización del medio de cultivo y el uso simultáneo del cobre y de la lignina como inductores, encontrándose que en estas condiciones se mejoró el crecimiento, la actividad volumétrica de lacasa, y la productividad de proceso por 4, 6 y diez veces, respectivamente (Tinoco y col. 2010).

En otro estudio, Snajdr y Baldrian (2007), evaluaron el efecto de la temperatura en la producción enzimática de *P. ostreatus* y *Trametes versicolor*, encontrando que la temperatura óptima donde los hongos podían crecer y producir lacasas y Manganese-peroxidasa (MnP) oscilaba entre 5-35 °C, la producción más alta se registró entre los 25-30 °C en *P. ostreatus* y 35 °C en *T. versicolor*. Las temperaturas que causan la pérdida del 50% de actividad después de 24 h fueron a 32 y 47 °C para las lacasas, y para MnP de 36 y 30 °C.

De Souza y col. (2002) evaluaron a *P. pulmonarius* crecido sobre paja de trigo, encontrando que la máxima producción de lacasas del extracto crudo enzimático fue de 8600 U/g de sustrato a los cinco días de crecimiento. La enzima lacasa fue la única fenoloxidasa producida por este hongo en fermentación sólida, lo cual indica que la paja de trigo es un excelente medio para la producción de lacasas, mientras que, Souza y Peralte (2003) purificaron la principal isoenzima que se presentó en estas condiciones de crecimiento de *P. pulmonarius*, y determinaron los parámetros cinéticos utilizando siringaldazina, ABTS y guayacol como sustrato. La enzima Lcc2 presentó un bajo valor de Km (12 mM con siringaldazina, 210 mM con ABTS y 550 mM con guayacol).

Mikiash y col. (2006), evaluaron el efecto del carbono y nitrógeno en la actividad enzimática de lacasas de *P. ostreatus*, encontrando que la producción máxima de lacasa del *ostreatus* 98 y del *ostreatus* 108 varió dependiendo de la fuente de carbón a partir de 5 a 62 U l<sup>-1</sup> y a partir del 55 a 390 U l<sup>-1</sup>.

Al evaluar la actividad de lacasas de *P. ostreatus* y *Trametes versicolor* crecidos en tomate por medio de fermentación sólida se encontró que ambos hongos alcanzaron un valor máximo de actividad de lacasas de 36 U/g, sin la necesidad de enriquecer el medio de fermentación. El zimograma de *Pleurotus ostratus* reveló dos bandas de lacasas que hasta el momento no se habían encontrado (Landolo y col. 2010). En la tabla 5 se resumen algunas lacasas presentes en hongos.

**Tabla 5:** Lacasas presentes en algunos hongos.

Organismo	Enzimas ligninolíticas	Referencias
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, LiP	Paszczynski y col. 2000
<i>Trametes versicolor</i>	MnP, lacasas	Paice y col. 2002
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	MnP, lacasas	Urzua y col. 2002
<i>Cyanthus stercoreus</i>	MnP, lacasas	Sethuraman y col. 2005
<i>Phlebia radiate</i>	MnP, LiP, lacasas	Van Aken y col. 2000
<i>Nematoloma frowardii</i>	MnP, LiP, lacasas	Schnnegab y col. 2008
<i>P. eryngii, ostreatus y pulmonarius</i>	MnP, VP, lacasas	Martinez y col. 2005
<i>Bjerkandera sp.</i> BOS55	VP	Mester y Field. 2006
<i>Bjerkandera adusta</i> UAMH 8258 y 7308	VP	Wang y col. 2006

Para la producción de biomasa y enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus* en medio sintético las mejores condiciones de cultivo son: concentración de glucosa de 5 g/l, pH entre 5-6 y una temperatura de incubación entre 26-29°C (Gricelda y col. 2000).

Membrillo y col. (2010), evaluaron la proporción geométrica del tamaño de partícula de sustrato para *Pleurotus ostreatus* encontrando que la forma y tamaño de las fibras de bagazo de caña tienen gran influencia en la densidad de embalaje para el sustrato, con un impacto en la producción de enzimas extracelulares, las tasas de crecimiento y cambios en la composición del sustrato. Demostrando también que la lignina y la celulosa se degradan mejor en partículas pequeñas.

Estudios realizados en diferentes hongos para la producción de enzimas celulolíticas han mostrado diferentes resultados debido al 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 (Mekala y col. 2008). Los hongos de *Trichoderma reesei*, *Trametes sp.*, y *Aspergillus niger* producen grandes cantidades de enzimas celulolíticas extracelulares (Dashtban y col. 2009; Márquez-Arenque y col. 2007).

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). 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 xilanasas con xilano obtenido de (salvado de trigo y maíz), mientras que *A. niveus* produce más xilanasas 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 resultó ser ácido (4.5-5.5). El pH estable de la xilanasas 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 col. 2009).

Leite y col. (2007), utilizaron a la levadura *Aureobasidium pullulans*, para la producción de celulasa y xilanasas en fermentación sólida, utilizando salvado de trigo. La actividad enzimática reportada en este sistema para endoglucanasa (1.05 U/L),  $\beta$ -glucosidasa (1.3 Uml<sup>-1</sup>) y xilanasas (5.0 Uml<sup>-1</sup>). El pH y la temperatura óptima para xilanasas, 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 incubó a 75 °C durante 1 h.

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. 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 optimizó 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<sup>-1</sup> en paja de arroz y 14 790 U/L (Park y col. 2002).

Al evaluar la actividad de xilanasas en una nueva cepa de termófilos se encontró que el pH y la temperatura óptima es de 75 °C y 8.0, esta enzima mostró una notable estabilidad y conserva el 100% de su actividad original a 50 °C durante 7 días a un pH entre 7.0-8.0 (Romdhane y col. 2010).

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 UI<sup>-1</sup>), 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 col. 2004).

Al evaluar a *Pleurotus sp.*, en la producción de enzimas lignocelulolíticas en fermentación líquida y sólida sobre varios residuos lignocelulósicos con las mismas condiciones de cultivo, se encontraron amplias diferencias en los rendimientos de carboximetil-celulasas (62,3 ml/U) y xilanasas (84,1 ml/U). Existen factores que determinan la expresión de estas enzimas por hongos lignocelulolíticos, como son: la naturaleza del sustrato, del método de cultivo y la relación de dichas enzimas. La fermentación en medio sólido resultó ser el mejor sistema para la producción de enzimas hidrolíticas (Elisashvili y col. 2007).

Los parámetros de cultivo, como la temperatura de incubación, tiempo de incubación y la concentración de inductor carboximetil-celulosa, fueron optimizados para mejorar el rendimiento de las celulasas de *Trichoderma reesei*. Los resultados mostraron que la producción de celulasas fue la más alta (25,6 U/gss) cuando la concentración del inductor fue 0.331 ml/g de carboximetil-celulosa, y la temperatura y el tiempo de incubación fueron 33° C y 67 h, respectivamente (Mekala y col. 2008).

**Tabla 6:** Algunos hongos con enzimas ligninocelulolíticas.

	Grupo	Hongos	Enzimas	Referencias	
Hongos aeróbicos (Enzimas celulolíticas Extracelulares)	Ascomicetos	<i>T. reesei</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas), hemicelulasas (xilanasas)	Dashtban y col. 2009; Mekala y col. 2008; Jun y col. 2009	
		<i>T. harzianum</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas, $\beta$ -1,3-glucanasas)	Dashtban y col. 2009;	
		<i>A. Niger</i>	Celulasas y xilanasas	Dashtban y col. 2009; Márquez-Arenque y col. 2007; Nava y col. 2008	
	Basidiomicetos	<i>Postalotiopsis sp.</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas)	Dashtban y col. 2009	
		<i>P. chrysosporium</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas), xilanasas	Dashtban y col. 2009	
		<i>F. palustris</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas)	Dashtban y col. 2009	
		<i>Lentinus edodes</i>	Celulasas y xilanasas	Elisashvili y col. 2007	
			<i>Trametes sp.</i>	Celulasas y xilanasas	Márquez-Arenque y col. 2007
	Hongos anaeróbicos (Chytridiomycetes)	<i>Anaeromyces</i>	<i>Anaeromyces mucronatus</i> 543	Celulasas (carboximetilcelulasas), Hemicelulasas (xilanasas)	Dashtban y col. 2009
	Hongos asociados a la pared celular	<i>Caecomyces</i>	<i>Caecomyces comunis</i>	Celulasas, Hemicelulasas (xilanasas, $\beta$ -D xilosidasa)	Dashtban y col. 2009
<i>Cyllamyces</i>		<i>Cyllamyces aberensis</i>	Celulasas y xilanasas	Dashtban y col. 2009	
<i>Neocallimastix</i>		<i>Neocallimastix frontalis</i>	Celulasas, hemicelulasas (xilanasas)	Dashtban y col. 2009	
<i>Orpinomyces</i>		<i>Orpinomyces sp.</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas, $\beta$ -1,3-glucanasas), xilanasas	Dashtban y col. 2009	
<i>Piromyces</i>		<i>Piromyces sp.</i>	Celulasas (endoglucanasas, $\beta$ -glucosidasas, $\beta$ -1,3-glucanasas), xilanasas	Dashtban y col. 2009	

En *P. ostreatus* (Po 83) se ha evaluado lo siguiente, por un lado Juárez-Hernández (2006), optimizó el medio de cultivo para producir lacasas en fermentación sumergida modificando la cantidad de glucosa como fuente de carbono, la cantidad de inóculo y la cantidad de sulfato de cobre como inductor, incrementando significativamente la actividad. Con el fin de estudiar la producción de lacasas al modificar los medios de cultivo (Tlecuilt-Beristain y col. 2008) purificó una enzima lacasa con altos valores de actividad y afinidad por el sustrato utilizado obteniendo una actividad máxima de 12 196 U/L a las 432 h, usando para ello un medio de cultivo con glucosa, extracto de levadura y alta concentración de cobre, mientras que Téllez-Téllez y col. (2005), determinó el efecto del extracto enzimático, de varias cepas del género *Pleurotus* que presentaron actividad intracelular y extracelular sobre diversos sustratos, encontrando diferente número de isoformas obtenidas en cada cepa, las diferencias encontradas en el valor de la actividad dependieron de la cantidad de enzima en cada extracto enzimático.

### 3. JUSTIFICACIÓN

- Se ha mostrado que los hongos del género *Pleurotus* son capaces de degradar compuestos lignocelulósicos y que las enzimas ligninolíticas se producen en diferentes niveles dependiendo principalmente de la cepa y las condiciones de desarrollo del organismo. Por lo que en este estudio se evaluará la actividad de lacasas, xilanasas y celulasas de *Pleurotus ostreatus* desarrollado por fermentación sumergida.

#### **4. HIPÓTESIS**

La producción de enzimas ligninocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus* se incrementará por la presencia de CMC y/o xilano en el medio de cultivo.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

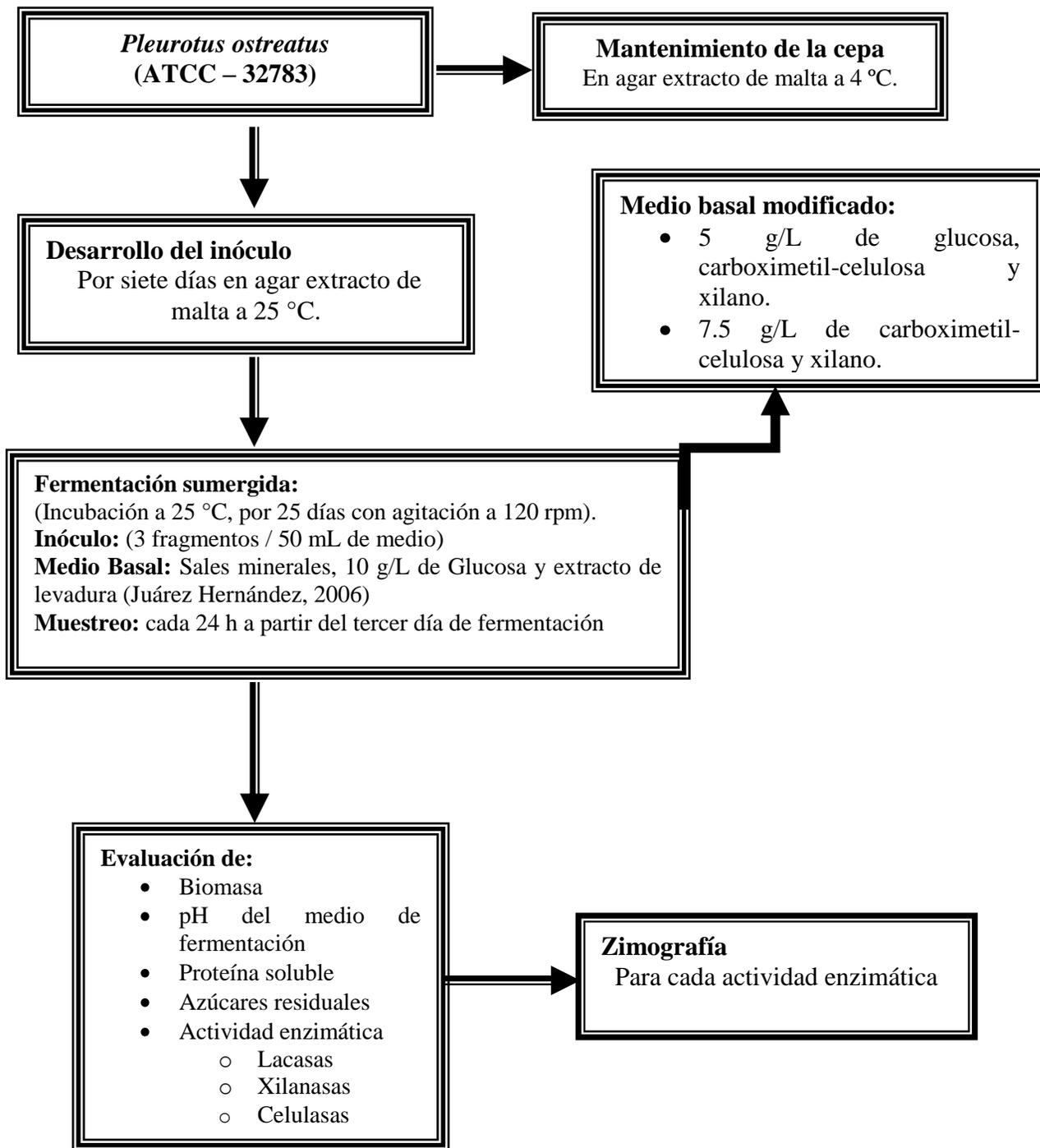
- Evaluar la actividad lignocelulolítica de *Pleurotus ostreatus* producida por fermentación sumergida.

### **5.2 Específicos**

- Caracterizar el desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida con tres combinaciones de glucosa, xilano y carboximetil-celulosa como fuentes de carbono.
- Evaluar la actividad de lacasas, celulasas y xilanasas.
- Identificar el número de isoformas de cada enzima producida.

## 6. METODOLOGÍA

El desarrollo de la presente investigación se llevará a cabo en base a la Figura 5. Sin embargo los detalles se muestran en los siguientes apartados.



**Figura 2:** Diagrama de bloques que muestra el desarrollo de la investigación.

## 6.1 Microorganismo empleado

La cepa utilizada para llevar a cabo este proyecto es la cepa *P. ostreatus* 32783, registrada en American Type Culture Collection, ATCC Maryland, U.S.A. Esta cepa se desarrolló sobre agar extracto de malta (EMA, Bioxón), se incubó durante 7 días a una temperatura de 25 °C. Se almacenó a 4 °C.

## 6.2 Condiciones de cultivo

La composición del medio de cultivo para las fermentaciones se muestran en la tabla 7, el pH inicial de la fermentación se ajustó a 6.5 con NaOH 0.1 M. el inóculo se tomó con un horador de 4mm de diámetro de la periferia de la colonia de *P. ostreatus*. Se colocaron 3 fragmentos de micelio para cada matraz de la fermentación.

**Tabla 7.** Composición del medio de cultivo para las fermentaciones.

Componente	Concentración (g/L)		
	FML 1	FML 2	FML 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

## 6.3 Caracterización de la fermentación

### 6.3.1 Determinación de pH

Todas las determinaciones del pH se realizaron utilizando un potenciómetro marca Conductronic Pc 45.

### 6.3.2 Evaluación de biomasa y extracto crudo enzimático

En cada muestreo, el extracto crudo enzimático (ECE) se obtuvo por filtrado y retención de la biomasa a través de papel filtro Whatman No. 4 a peso constante. La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó a una temperatura constante de 50 °C para su cuantificación. Esta se reportó en gramos de biomasa seca (X) por litro de medio (g l<sup>-1</sup>) (Téllez-Téllez y col. 2008).

### 6.3.3 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 col. 2001, Viniegra-González y cols. 2003).

(1)

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

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<sup>-1</sup>).

$X_{\max}$  = 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:

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

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

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

### 6.3.4 Evaluación de proteína soluble

La proteína total en los extractos crudos extracelulares se midió por el método de Bradford (Bradford, 1976). A 50  $\mu$ l de ECE se le adicionaron 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford (Sigma), el volumen se ajustó a 750  $\mu$ l con agua destilada, y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se usó albúmina sérica bovina como proteína estándar (Díaz-Godínez y col. 2001).

### 6.3.5 Evaluación de azúcares

#### 6.3.5.1 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.

### **6.3.5.2 Residuales 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.

## **6.3.6 Evaluación de actividad enzimática**

### **6.3.6.1 Actividad enzimática de lacasas**

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

### **6.3.6.2 Actividad enzimática de celulasas**

La actividad de celulasas se determinó para cada uno de los ECE, utilizando carboximetilcelulosa 1 % como sustrato. La mezcla de reacción contenía 950 µL de sustrato (carboximetilcelulosa en buffer de acetato a 0.1 M a pH 4.8) y 50 µL de ECE. La reacción se incubó a 50 °C durante 15 minutos, el volumen se ajustó con 2 ml de DNS y se colocaron los tubos de ensayo en agua en ebullición durante 5 minutos, se dejaron enfriar y se leyó la absorbancia a 575 nm. Una unidad Internacional de actividad de celulasas (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de glucosa por minuto por mL o por L, bajo las condiciones descritas.

### **6.3.6.3 Actividad enzimática de xilanasas**

La actividad de xilanasas se determinó para cada uno de los ECE, a 575 nm, utilizando xilano 0.5 % como sustrato. La mezcla de reacción contenía 950 µL de sustrato (xilano en buffer de acetato a 0.1 M a pH 5.3) y 50 µL de ECE. La reacción se incubó a 50 °C durante 15 minutos, el volumen se ajustó con 2 ml de DNS y se colocaron tubos de ensayo en agua en ebullición

durante 5 minutos, se dejaron enfriar y se leyó la absorbancia a 575 nm. Una unidad Internacional de actividad de xilanasas (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de xilosa por minuto por mL o por L, bajo las condiciones descritas.

#### **6.3.6.4 Actividad de proteasas**

La determinación de Proteasas se llevó a cabo para cada uno de los ECE's, se midió absorbancia con un espectrofotómetro Jemway a 280 nm, utilizando caseína como sustrato. La mezcla de reacción contuvo 450 µL de sustrato (caseína en buffer de fosfato a 0.1 M pH 6.5) y 50 µL de ECE y se centrifugo a 14,000 rpm durante 15 min y se leyó a una absorbancia de 280 nm.

#### **6.3.6.5 Geles de electroforesis**

Se determinó el número de isoformas presentes en los ECE de todos los días de fermentación a través de zimografía. La actividad de lacasas, celulasas y xilanasas se realizó *in situ*, utilizando 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 contenía 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 utilizaron 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, cambiando el agua cada 10 minutos para eliminar el SDS y renaturalizar a las proteínas. Posteriormente los geles se incubaron de 18 a 24 horas a temperatura ambiente en DMP 2 mM en buffer de acetatos 0.1 M a pH's de 4.5 y 6.5, donde se mostraron bandas de color café aproximadamente al momento en que se colocaba el sustrato. Los geles se lavaron con agua desionizada y se colocaron en acetatos para la identificación de las isoenzimas. Mientras que 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 retiró el sustrato, se lavaron con agua desionizada para retirar restos de sustrato y se tiñeron en colorante rojo congo al 0.2% durante una hora, posterior a esto se realizaron lavados durante 15 minutos con solución de cloruro de sodio 1 M hasta que el gel mostrara bandas blancas, la cuales se identificaron como las isoenzimas de celulasas y xilanasas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Fermentación con “G”. Medio de fermentación con glucosa como única fuente de carbono.

#### 7.1.1 Determinación de pH

En la figura 6 se muestran los valores obtenidos por la determinación de pH durante los 21 días de fermentación, observando que no se presentaron modificaciones drásticas durante la fermentación.

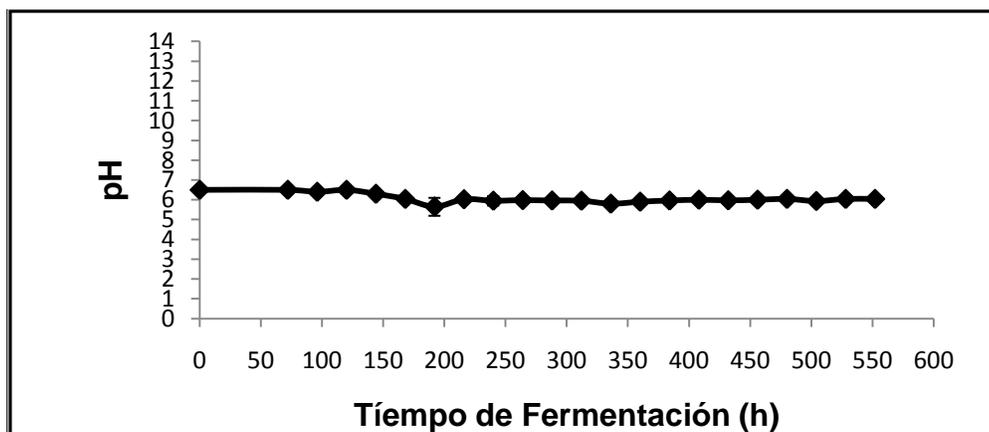


Figura 6: pH del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

#### 7.1.2 Determinación de biomasa

En la figura 7 se muestran los valores obtenidos por la determinación de Biomasa (X) en FML durante los 21 días de fermentación, se observa que el hongo creció a partir de las 150 h, alcanzando la fase estacionaria a las 500 h. La  $X_{max}$  fue de 5.92 g/L y una  $\mu = 0.016/h$ .

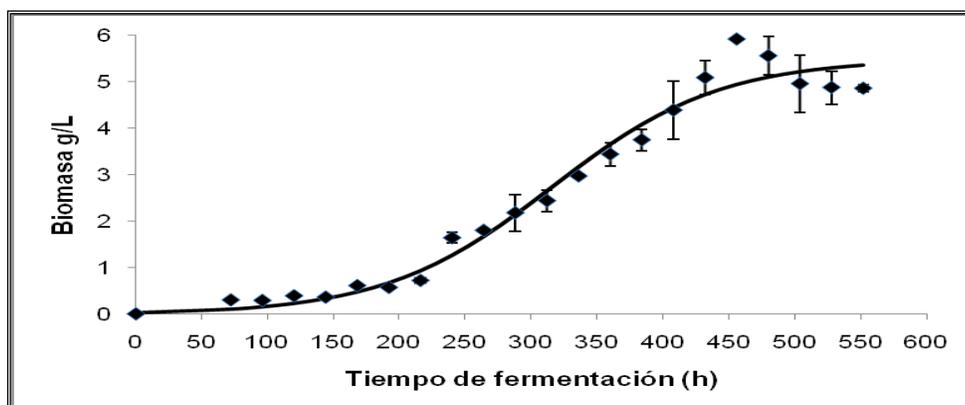
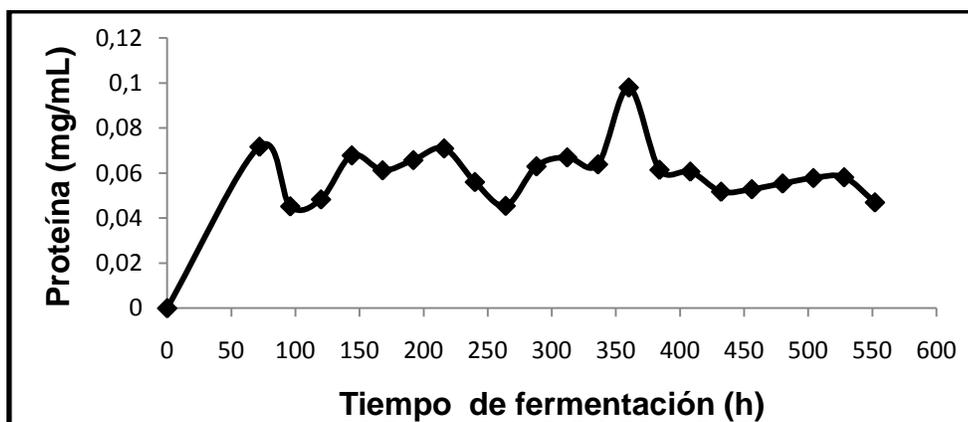


Figura 7: Curva de crecimiento de *P. ostreatus* en FML.

### 7.1.3 Determinación de proteína soluble

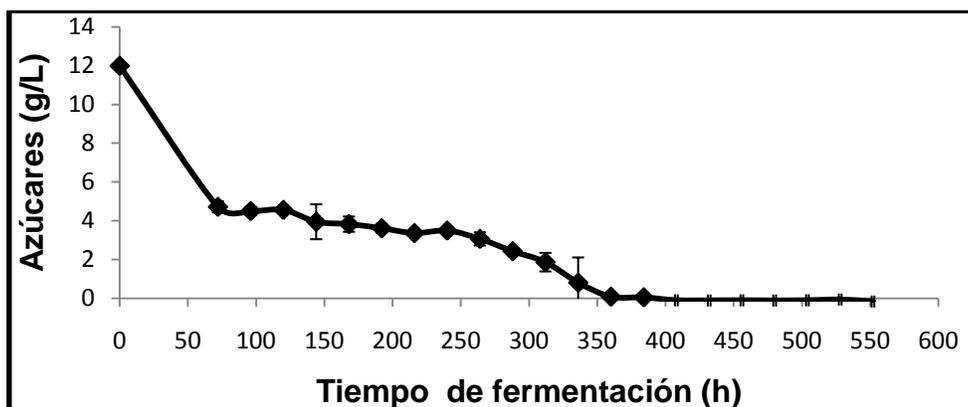
En la figura 8 se muestran los valores obtenidos por la determinación de proteínas solubles, observando que la cantidad de proteína soluble no permaneció constante durante la fermentación, obteniendo el máximo valor de proteína a las 370 horas de fermentación con un valor de 0.097 mg/mL.



**Figura 8.** Proteína soluble del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.1.4 Determinación de azúcares

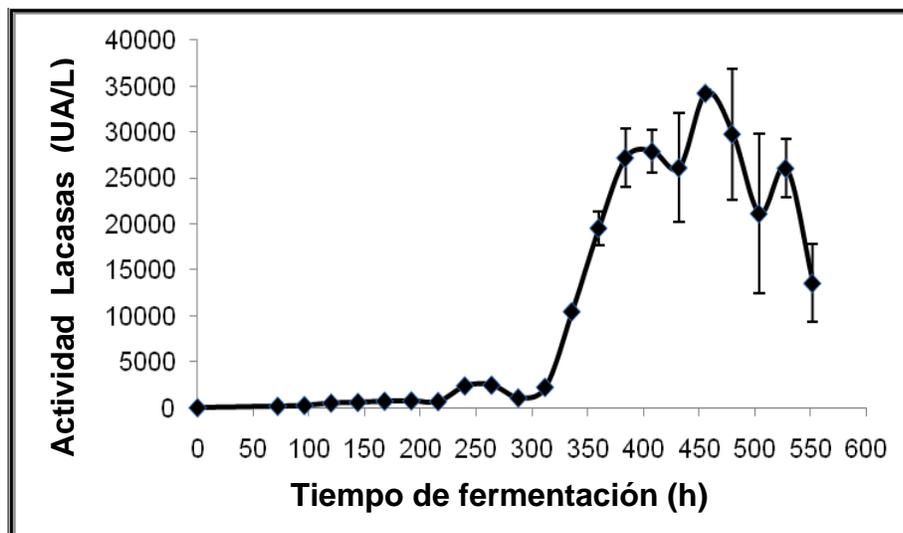
En la figura 9 se muestra los valores obtenidos por la determinación de azúcares residuales, se observa que los azúcares residuales comenzaron a disminuir a partir de las 80 horas de fermentación con un valor de 5 g/L, llegando al consumo total de azúcar por el hongo a las 380 horas de la fermentación.



**Figura 9.** Azúcares residuales del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

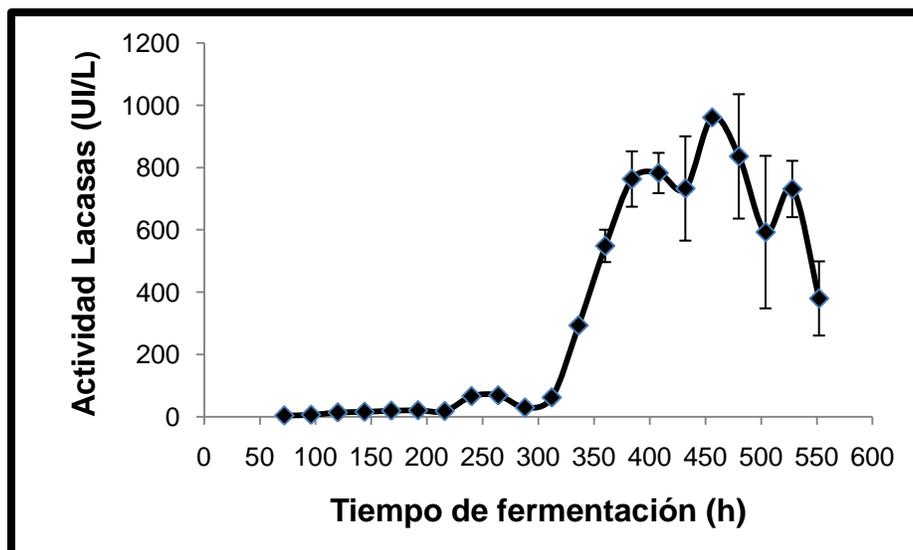
### 7.1.5 Actividad de lacasas

En la figura 10 se muestran los valores obtenidos de la actividad de lacasas (UA), donde se observa un valor máximo alcanzado de 34,240 U/L a las 360 horas de fermentación.



**Figura 10.** Actividad de lacasas del medio de fermentación con glucosa, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

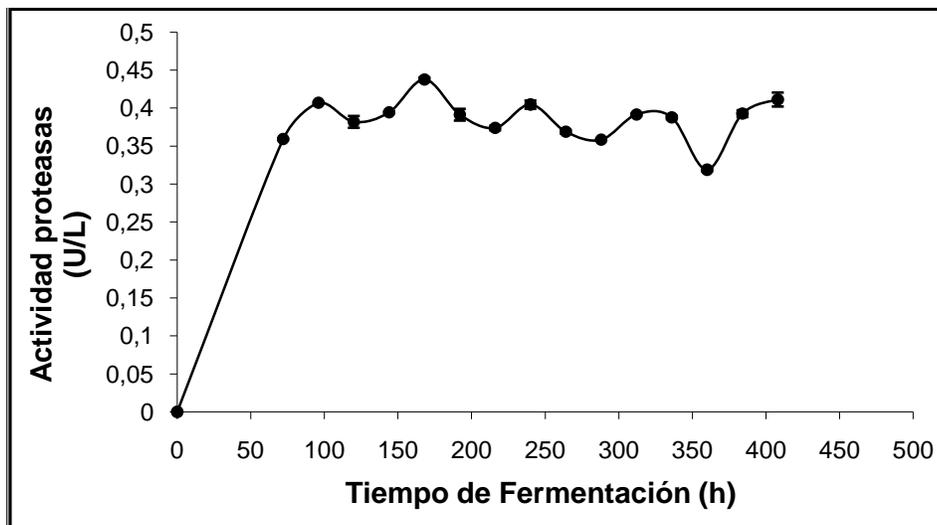
En la figura 11 se muestran los valores obtenidos de la actividad de lacasas (UI), donde se observa un valor máximo alcanzado de 980 U/L a las 360 horas de fermentación.



**Figura 11.** Actividad de lacasas del medio de fermentación con glucosa durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.1.6 Actividad de proteasas

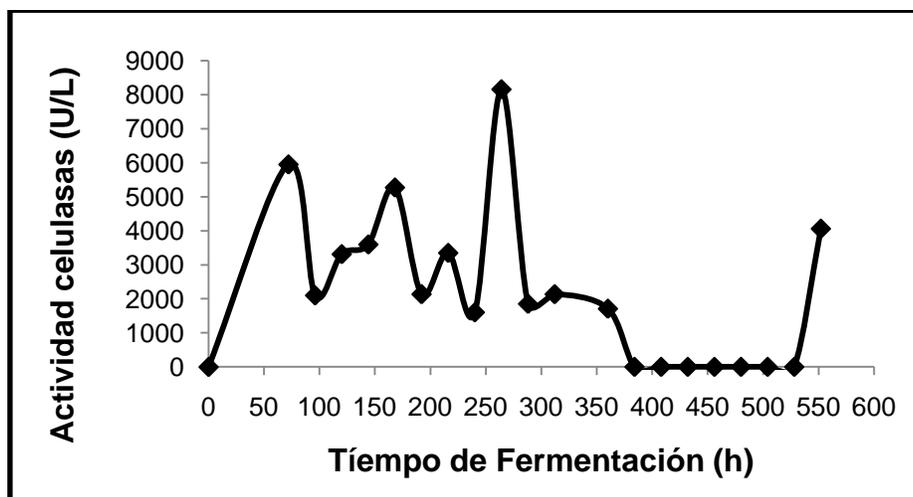
En la figura 12 se muestran los valores obtenidos de la actividad de proteasa, donde se observa un valor máximo alcanzado de 4.5 U/L a las 180 horas de fermentación.



**Figura 12.** Actividad de Proteasas del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.1.7 Actividad de celulasas

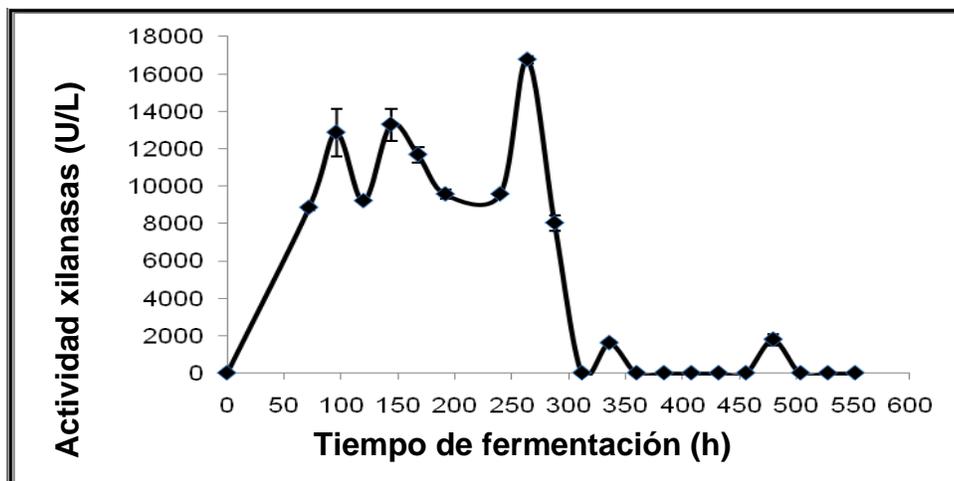
En la figura 13 se muestran los valores obtenidos de la actividad de celulasas, donde se observa un valor máximo alcanzado de 8,158 U/L a las 288 horas de fermentación.



**Figura 13:** Actividad de celulasas del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.1.8 Actividad de xilanasas

En la figura 14 se muestran los valores obtenidos de la actividad de xilanasas, donde se observa un valor máximo alcanzado de 16,765 U/L a las 264 horas de fermentación.

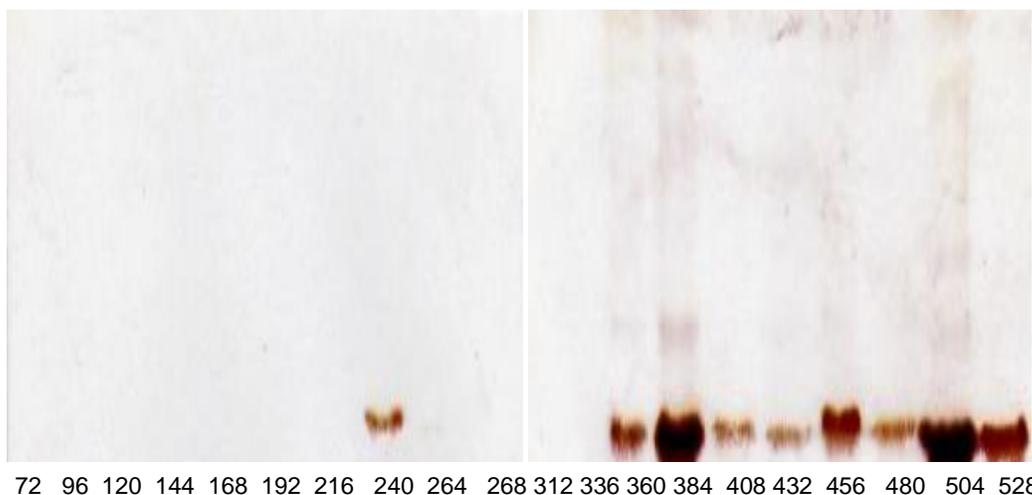


**Figura 14.** Actividad de xilanasas del medio de fermentación con glucosa durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.1.9 Zimografía

#### 7.1.9.1 Geles de electroforesis de lacasas pH 6.5

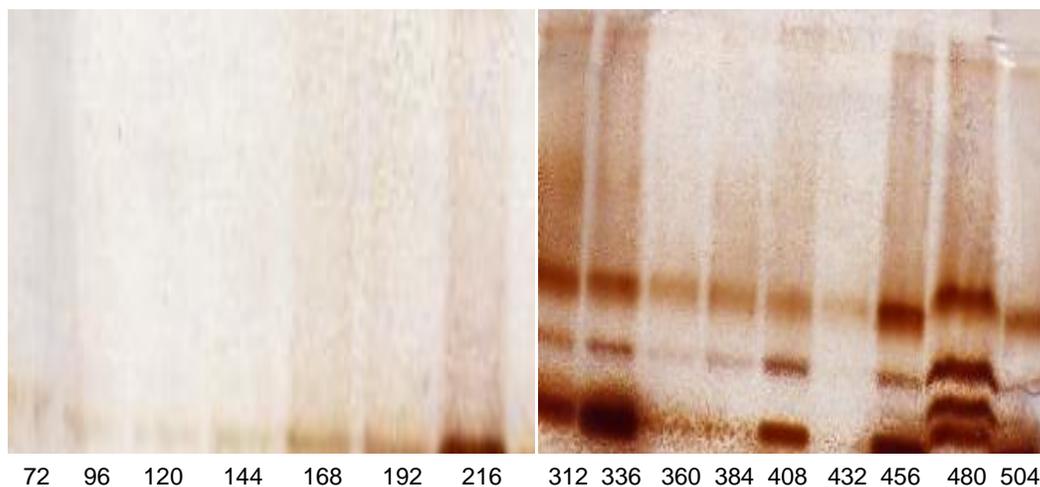
La figura 15 muestra las isoformas encontradas en cada día de la fermentación. Se observó que las primeras horas de fermentación no hay presencia de lacasas, no así a partir de las 360 horas donde se muestra una sola isoforma.



**Figura 15:** Perfil de zimogramas de lacasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

### 7.1.9.2 Geles de electroforesis lacasas pH 4.5

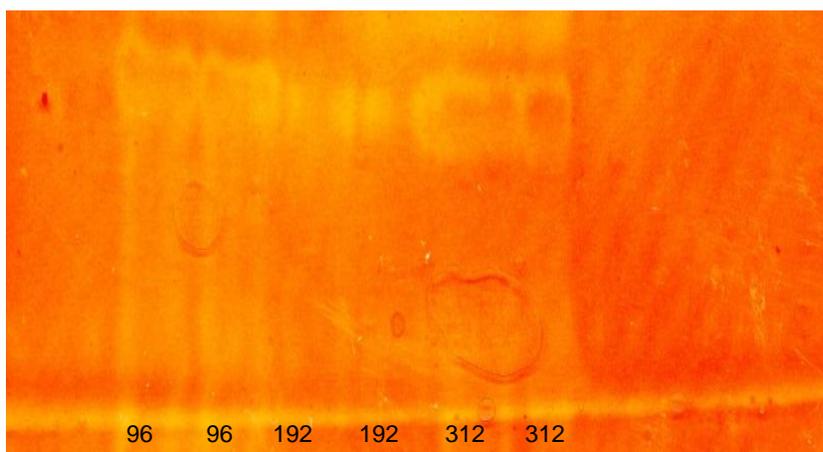
La figura 16 muestra las isoformas encontradas en cada día de la fermentación. Se observó durante toda la fermentación la presencia de lacasas, a partir de las 312 h se muestran cuando menos tres isoformas, mientras que a las 480 h se muestran hasta 4 isoformas.



**Figura 16:** Perfil de zimogramas de lacasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

### 7.1.9.3 Geles de electroforesis de celulasas

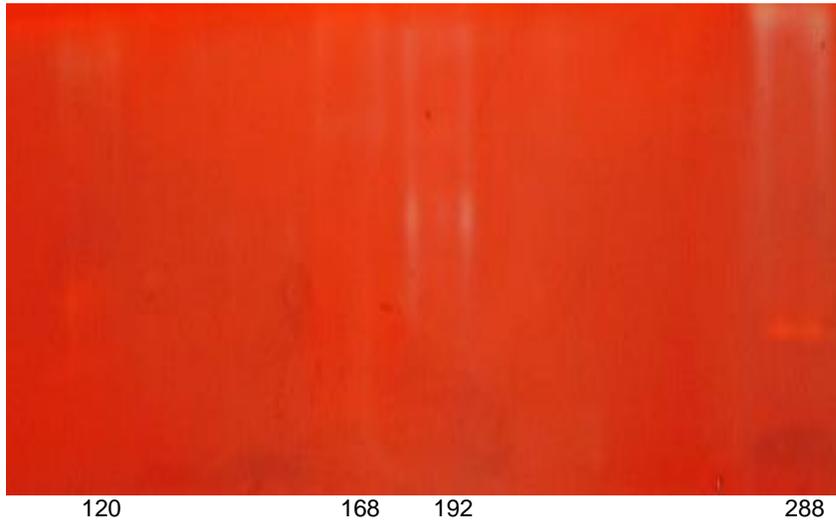
La figura 17 muestra las isoformas y su replica encontradas en las horas que presentaron la actividad más alta de celulasas durante la fermentación. Se observó que solamente se presenta dos isoforma de dicha enzima.



**Figura 17:** Perfil de zimogramas de celulasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

#### 7.1.9.4 Geles de electroforesis de xilanasas

La figura 18 muestra las isoformas encontradas en las horas que presentaron la actividad más alta de xilanasas durante la fermentación. Se observó que solamente se presenta dos isoforma de dicha enzima.



**Figura 18:** Perfil de zimogramas de xilanasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

## 7.2 Fermentación con “G, CMC y X”. Medio de fermentación con glucosa, carboximetilcelulosa y xilano como fuentes de carbono.

### 7.2.1 Determinación de pH

En la figura 19 se muestran los valores obtenidos por la determinación de pH durante los 21 días de fermentación, observando que no se presentaron modificaciones drásticas durante la fermentación.

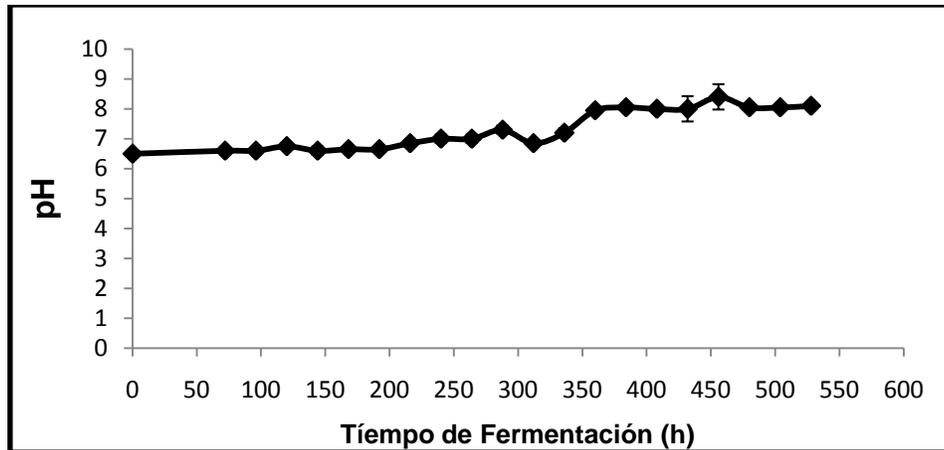


Figura 19: pH del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.2.2 Determinación de biomasa

En la figura 20 se muestran los valores obtenidos por la determinación de Biomasa (X) en FML durante los 21 días de fermentación, se observa que el hongo creció a partir de las 120 h, alcanzando la fase estacionaria a las 400 h. La  $X_{max}$  fue de 3.12 g/L y una  $\mu = 0.018/h$ .

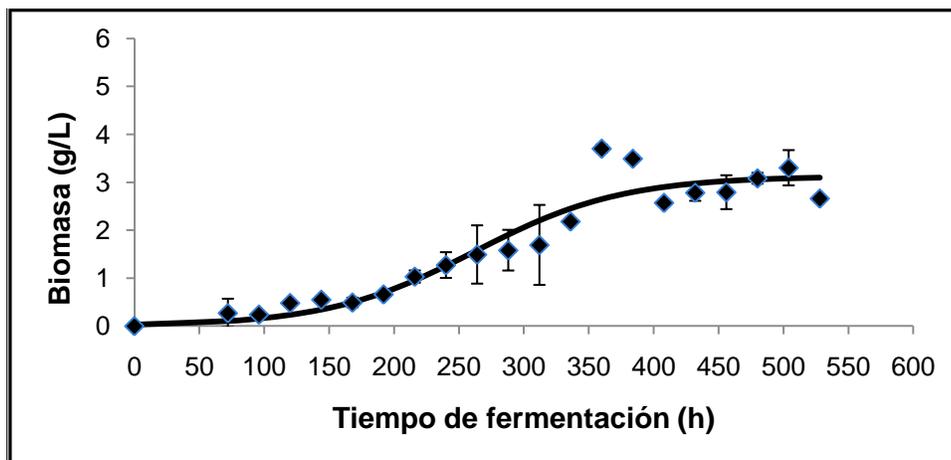
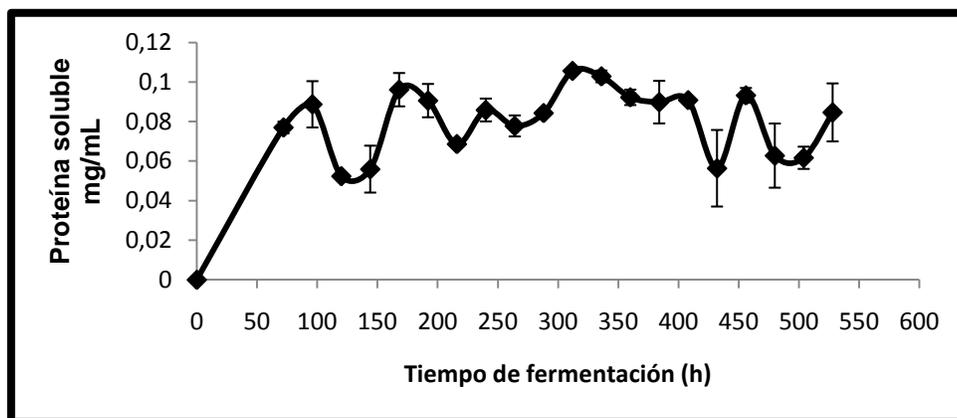


Figura 20. Curva de crecimiento de *P. ostreatus* en FML.

### 7.2.3 Determinación de proteína soluble

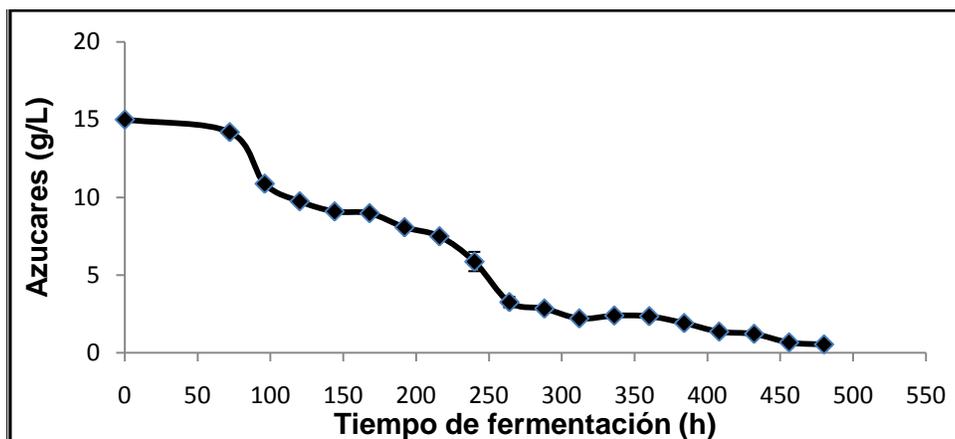
En la figura 21 se muestran los valores obtenidos por la determinación de proteínas solubles durante los 21 días de FML, observando que la cantidad de proteína soluble no permaneció constante durante la fermentación, obteniendo el máximo valor de proteína a las 560 horas de fermentación con un valor de 0.15 mg/mL.



**Figura 21:** Proteína soluble del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.2.4 Determinación de azúcares residuales

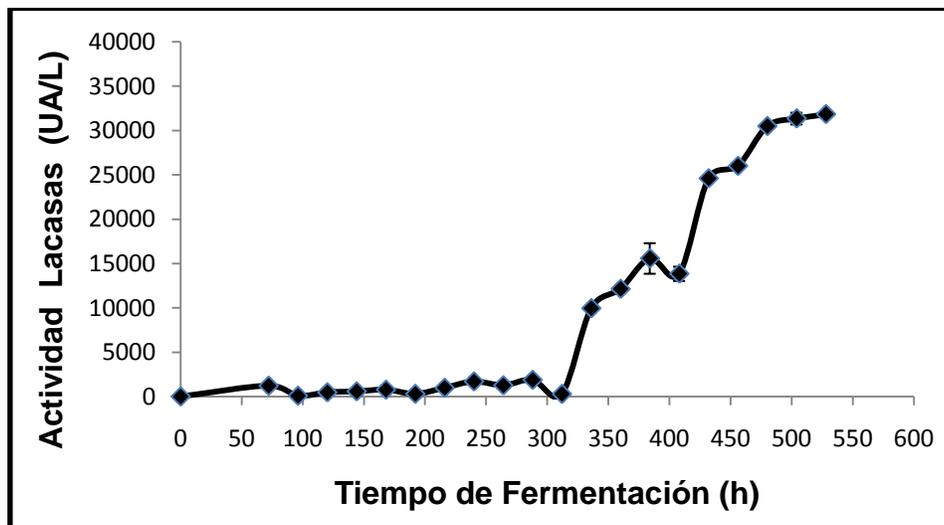
En la figura 22 se muestra los valores obtenidos por la determinación de azúcares residuales durante los 21 días de FML, se observa que los azúcares residuales comenzaron a disminuir a partir de las 80 horas de fermentación con un valor de 14 g/L, llegando al consumo total de azúcar por el hongo a las 460 horas de la fermentación.



**Figura 22:** Azúcares residuales del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

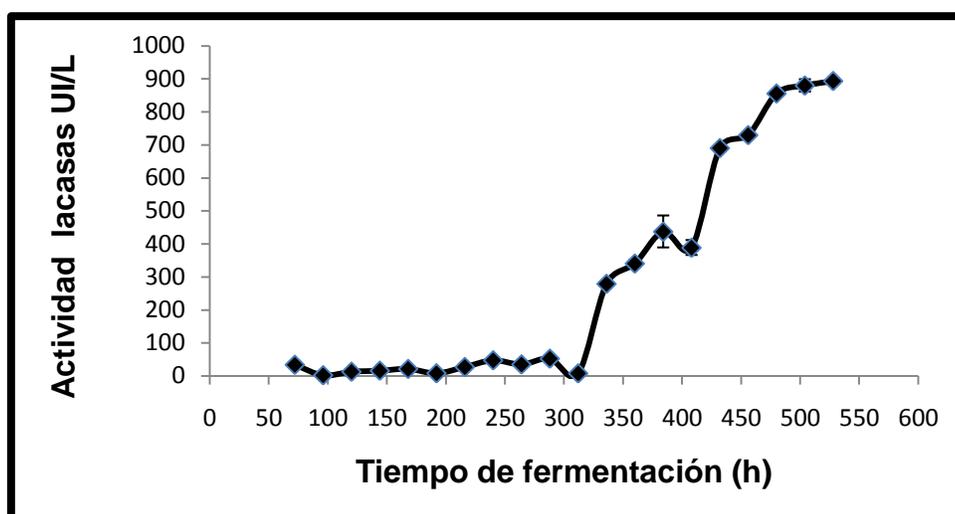
### 7.2.5 Actividad de lacasas

En la figura 23 se muestran los valores obtenidos de la actividad de lacasas (UA), donde se observa un valor máximo alcanzado de 31,840 U/L a las 560 horas de fermentación.



**Figura 23:** Actividad de lacasas del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

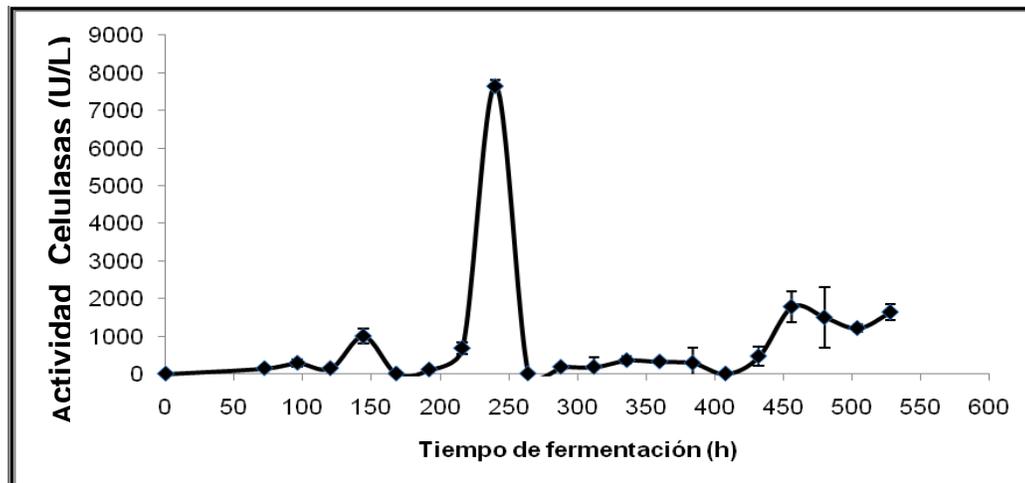
En la figura 24 se muestran los valores obtenidos de la actividad de lacasas en (UI), donde se observa un valor máximo alcanzado de 910 U/L a las 560 horas de fermentación.



**Figura 24.** Actividad de lacasas del medio de fermentación con glucosa, carboximetilcelulosa y xilano, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.2.6 Actividad de celulasas

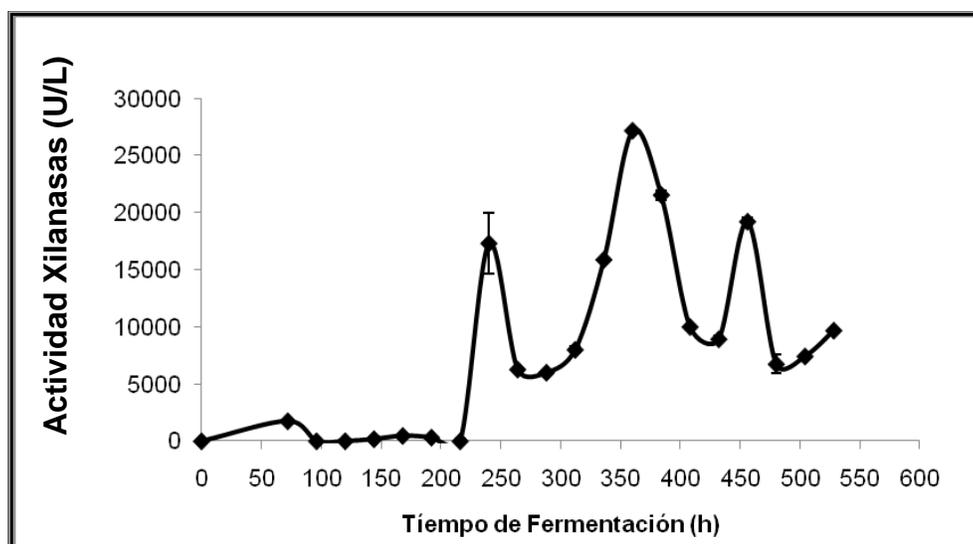
En la figura 25 se muestran los valores obtenidos de la actividad de celulasas, donde se observa un valor máximo alcanzado de 7,656 U/L a las 240 horas de fermentación.



**Figura 25:** Actividad de celulasas del medio de fermentación con glucosa, carboximetilcelulosa y xilano, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.2.7 Actividad de xilanasas

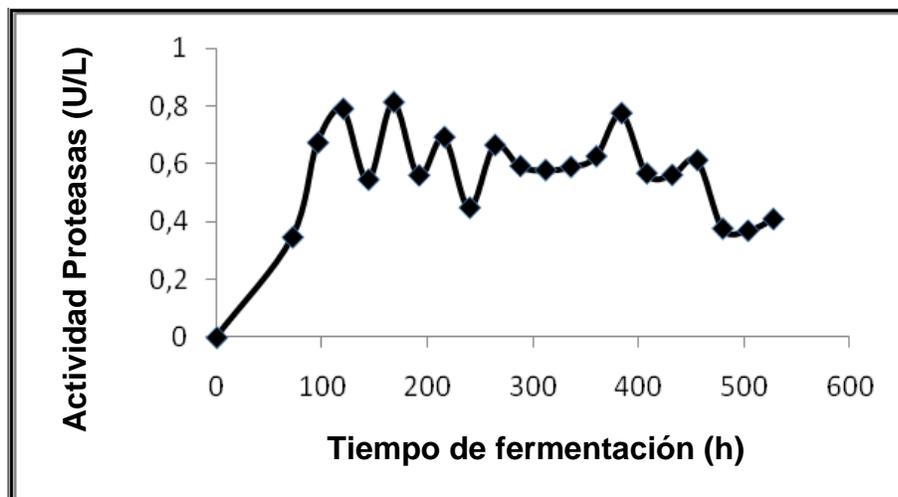
En la figura 26 se muestran los valores obtenidos de la actividad de xilanasas, donde se observa un valor máximo alcanzado de 27,153 U/L a las 240 horas de fermentación.



**Figura 26:** Actividad de xilanasas del medio de fermentación con glucosa, carboximetilcelulosa y xilano, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.2.8 Actividad de proteasas

En la figura 27 se muestran los valores obtenidos de la actividad de proteasas, donde se observa un valor máximo alcanzado de 0.8 U/L a las 180 horas de fermentación.

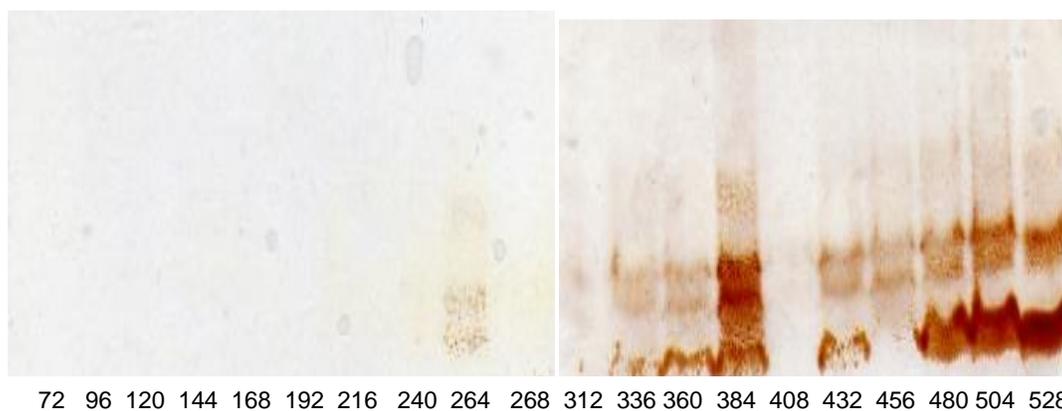


**Figura 27:** Actividad de proteasas del medio de fermentación con glucosa, carboximetilcelulosa y xilano, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.2.9 Zimografía

#### 7.2.9.1 Geles de electroforesis de lacasas pH 6.5

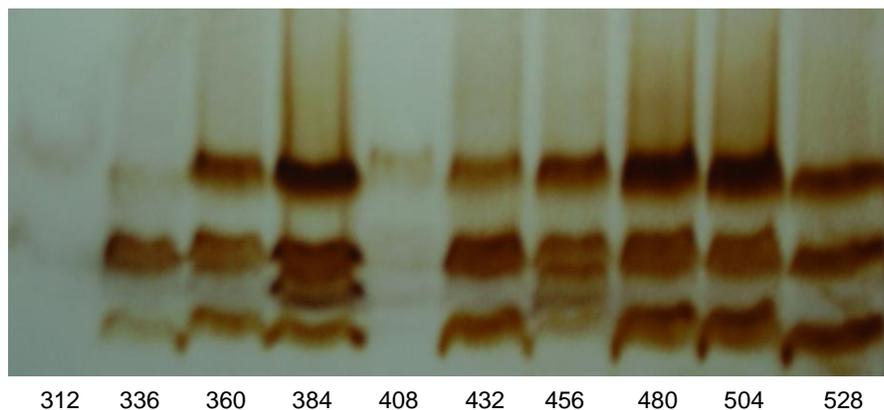
La figura 28 muestra las isoformas de lacasas encontradas en cada día de la fermentación. Se observó que las primeras horas de fermentación no hay presencia de lacasas, no así a partir de las 264 horas donde se observan de una a tres isoformas.



**Figura 28:** Perfil de zimogramas de lacasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* 83.

### 7.2.9.2 Geles de electroforesis de lacasas pH 4.5

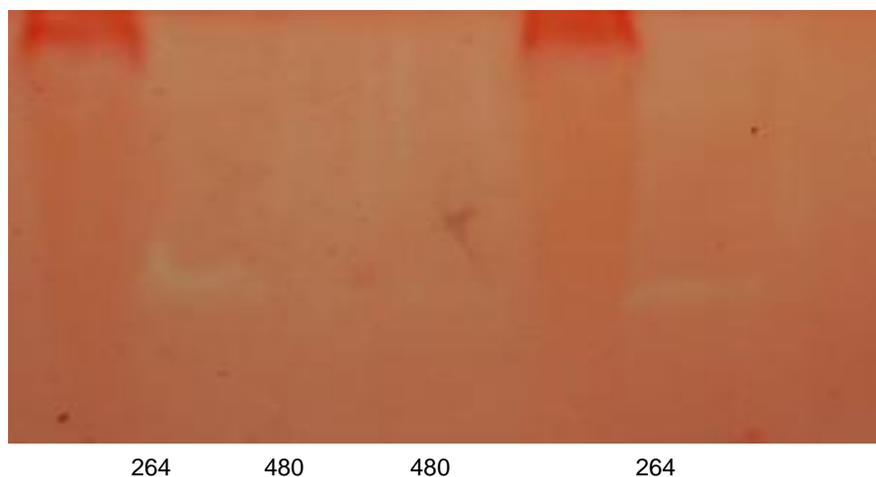
La figura 29 muestra las isoformas de lacasas encontradas a partir de las 312 horas de fermentación, debido a que de las 72-268 no se observo ninguna isoforma de lacasas, no así a partir de las 312 horas donde se observa de tres hasta cinco isoformas.



**Figura 29:** Perfil de zimograma de lacasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

### 7.2.9.3 Geles de electroforesis celulasas

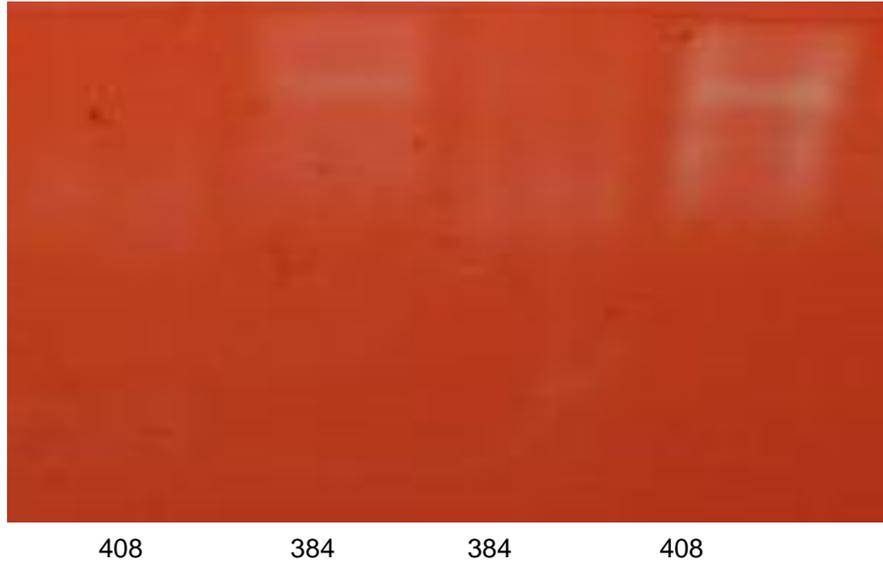
La figura 30 muestra las isoformas de celulasas y su replica encontradas en las horas que presentaron la actividad más alta de celulasas durante la fermentación. Se observo que solamente se presenta una isoforma de dicha enzima.



**Figura 30:** Zimograma de celulasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

#### 7.2.9.4 Geles de electroforesis xilanasas

La figura 31 muestra las isoformas de xilanasas y su replica encontradas en las horas que presentaron la actividad más alta de xilanasas durante la fermentación. Se observó que solamente se presenta una isoforma de dicha enzima.



**Figura 31:** Zimograma de xilanasas en fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

### 7.3 Fermentación con “CMC y X”. Medio de fermentación con carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono.

#### 7.3.1 Determinación de pH

En la figura 32 se muestran los valores obtenidos por la determinación de pH durante los 21 días de fermentación, observando que no se presentaron modificaciones drásticas durante la fermentación.

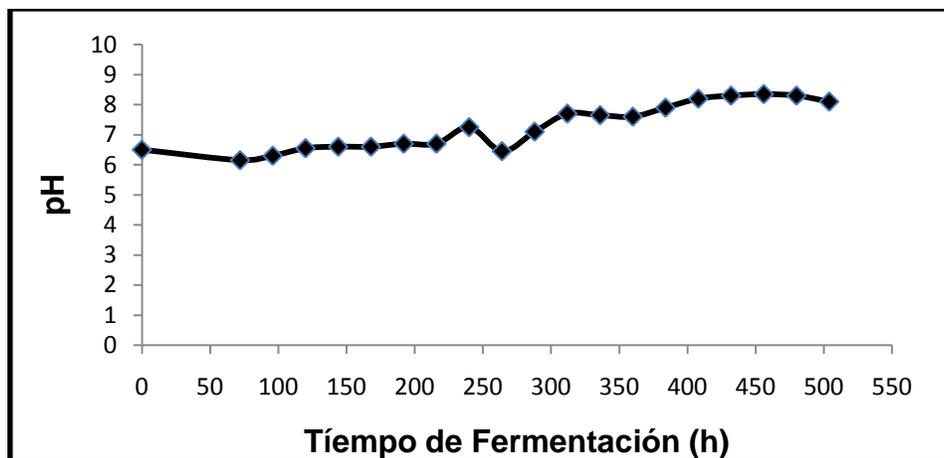


Figura 32: pH del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

#### 7.3.2 Determinación de biomasa

En la figura 33 se muestran los valores obtenidos por la determinación de Biomasa (X) en FML durante los 21 días de fermentación, se observa que el hongo creció a partir de las 100 h, alcanzando la fase estacionaria a las 400 h. La  $X_{max}$  fue de 3.03 g/L y una  $\mu = 0.018/h$ .

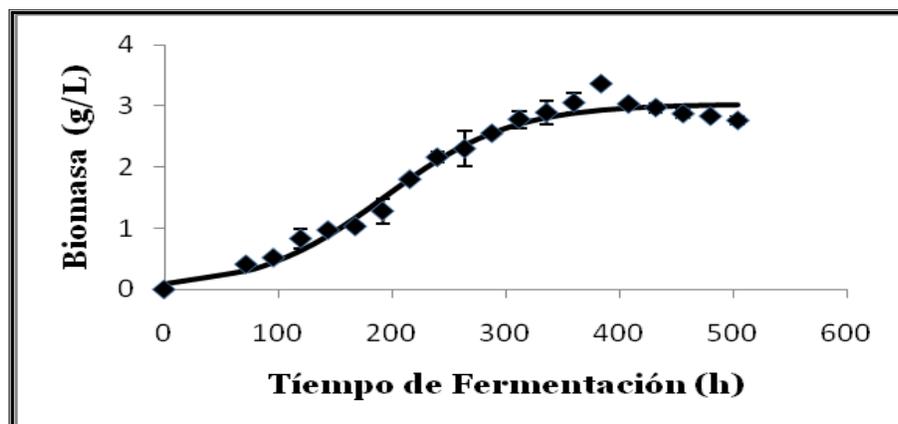
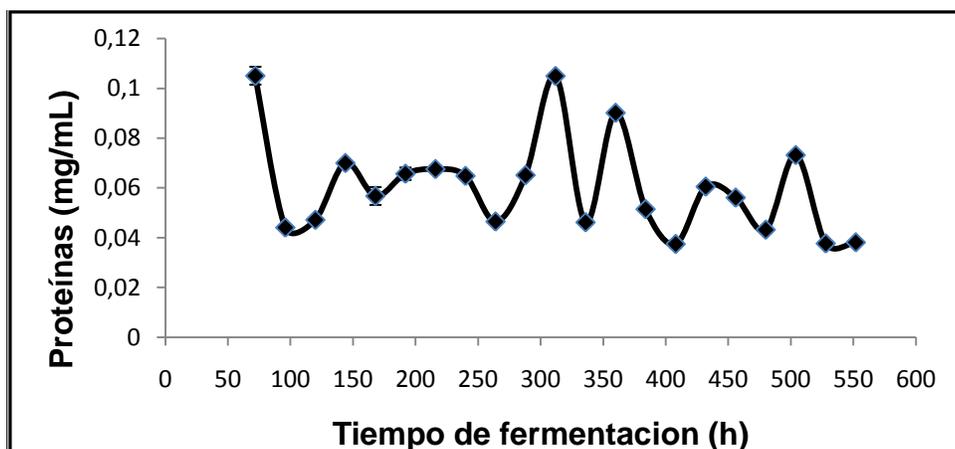


Figura 33: Curva de crecimiento de *P. ostreatus* en FML.

### 7.3.3 Determinación de proteína soluble

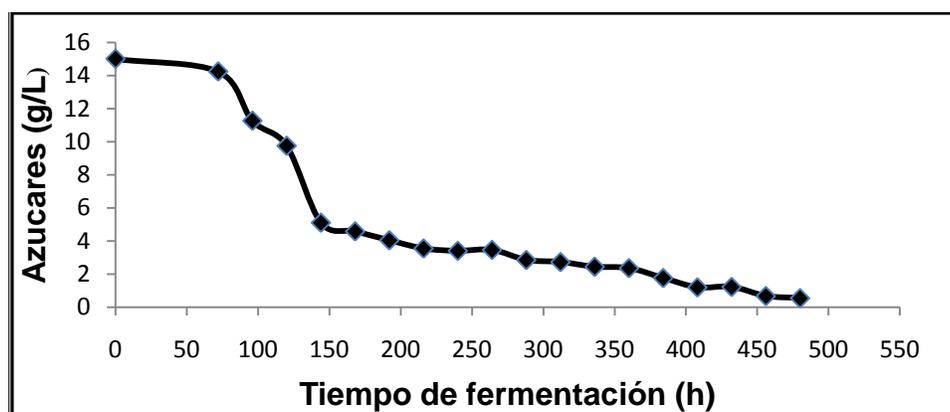
La figura 34 muestra los valores obtenidos por la determinación de proteínas solubles durante los 21 días de FML, observando que la cantidad de proteína soluble no permaneció constante durante la fermentación, obteniendo el máximo valor de proteína a las 80 horas de fermentación con un valor de 0.11 mg/mL.



**Figura 34:** Proteína soluble del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.3.4 Determinación de azúcares residuales

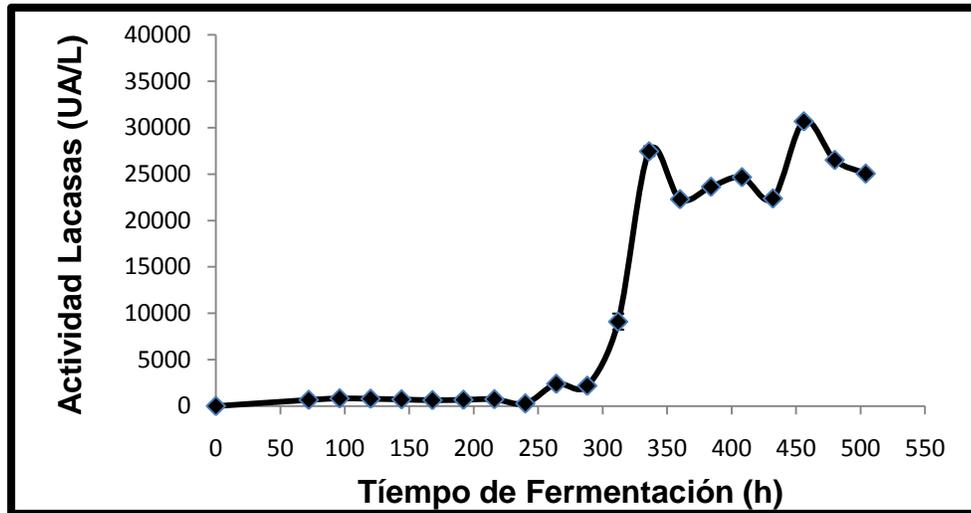
La figura 35 muestra los valores obtenidos por la determinación de azúcares residuales durante los 21 días de FML, se observa que los azúcares residuales comenzaron a disminuir a partir de las 80 horas de fermentación con un valor de 14.5 g/L, llegando al consumo total de azúcar por el hongo a las 480 horas de la fermentación.



**Figura 35:** Azúcares residuales del medio de fermentación durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

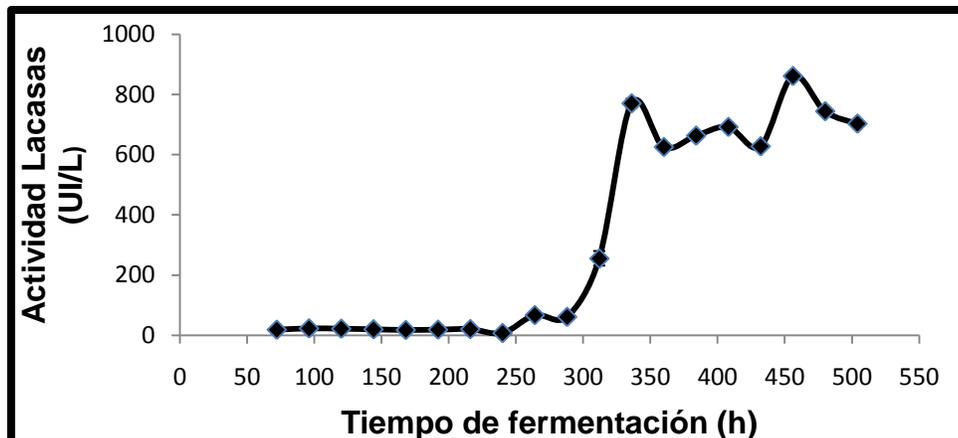
### 7.3.5 Actividad de lacasas

En la figura 36 se muestran los valores obtenidos de la actividad de lacasas (UA), donde se observa un valor máximo alcanzado de 30,680 U/L a las 456 horas de fermentación.



**Figura 36:** Actividad de lacasas del medio de fermentación con carboximetilcelulosa y xilano, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

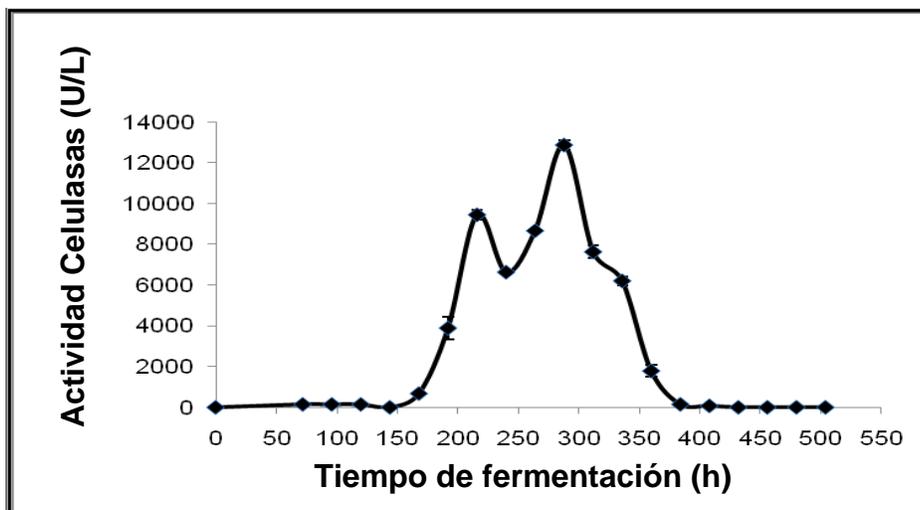
En la figura 37 se muestran los valores obtenidos de la actividad de lacasas (UI), donde se observa un valor máximo alcanzado de 900 U/L a las 456 horas de fermentación.



**Figura 37:** Actividad de lacasas del medio de fermentación con carboximetilcelulosa y xilano, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.3.6 Actividad de celulasas

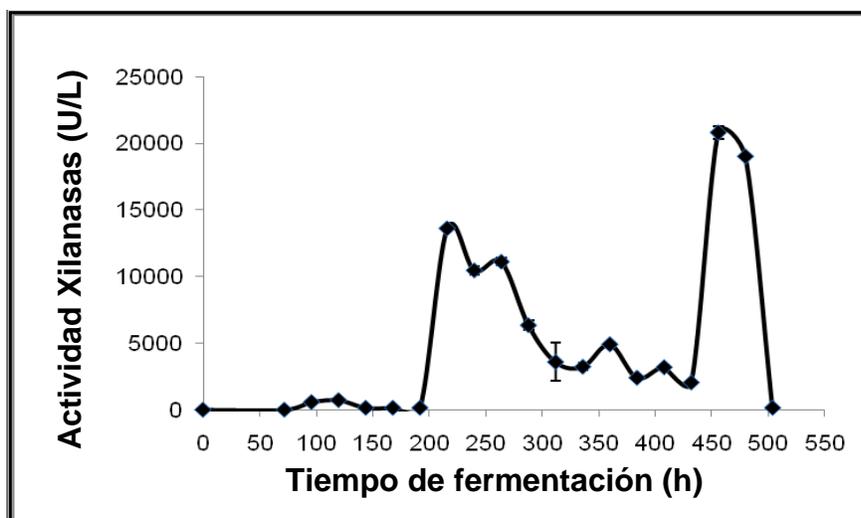
En la figura 38 se muestran los valores obtenidos de la actividad de celulasas, donde se observa un valor máximo alcanzado de 12,858 U/L a las 288 horas de fermentación.



**Figura 38:** Actividad de celulasas del medio de fermentación con carboximetilcelulosa y xilano, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.3.7 Actividad de xilanasas

En la figura 39 se muestran los valores obtenidos de la actividad de xilanasas, donde se observa un valor máximo alcanzado de 20,813 U/L a las 456 horas de fermentación.

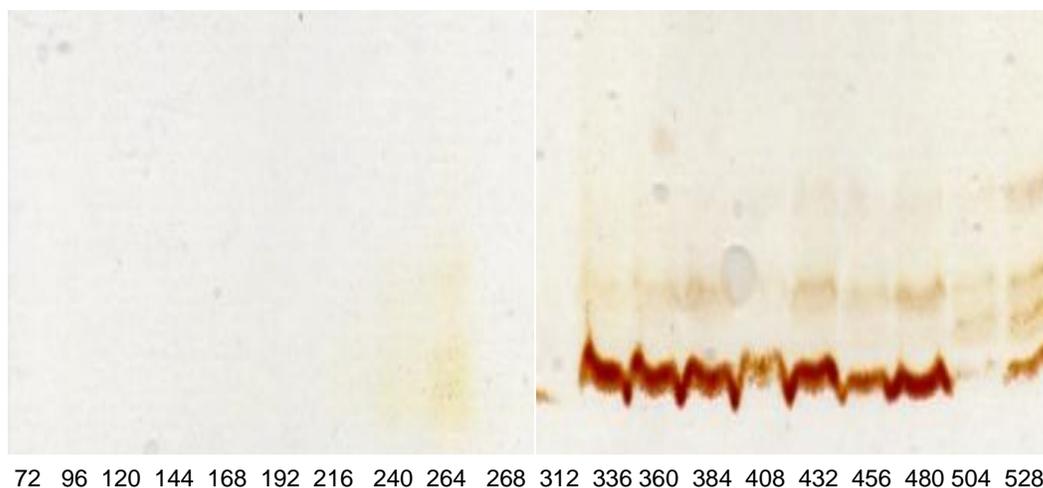


**Figura 39:** Actividad de xilanasas del medio de fermentación con carboximetilcelulosa y xilano, durante el desarrollo de *P. ostreatus* en FML.

### 7.3.8 Zimografía

#### 7.3.8.1 Geles de electroforesis de lacasas pH 6.5

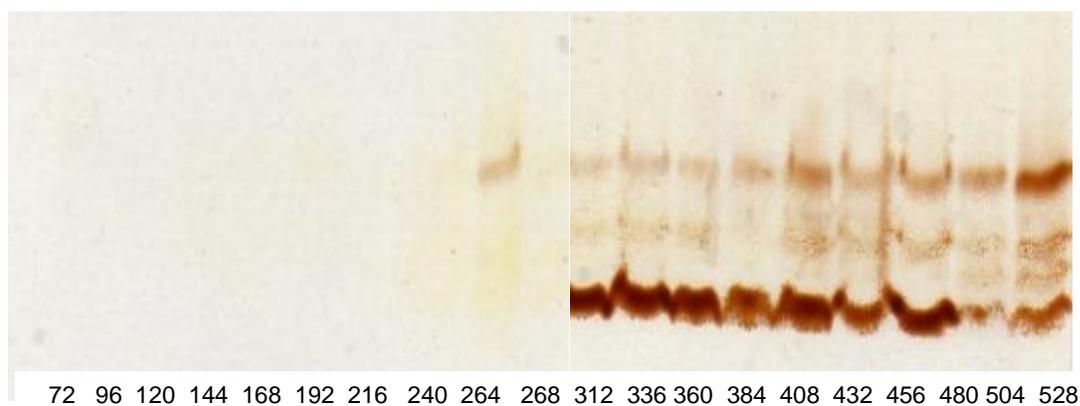
La figura 40 muestra las isoformas de lacasas encontradas en cada día de la fermentación. Se observó que las primeras horas de fermentación no hay presencia de lacasas, no así a partir de las 264 horas donde se observan de una a cuatro isoformas.



**Figura 40:** Perfil de zimogramas de lacasas de fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

#### 7.3.8.2 Geles de electroforesis de lacasas pH 4.5

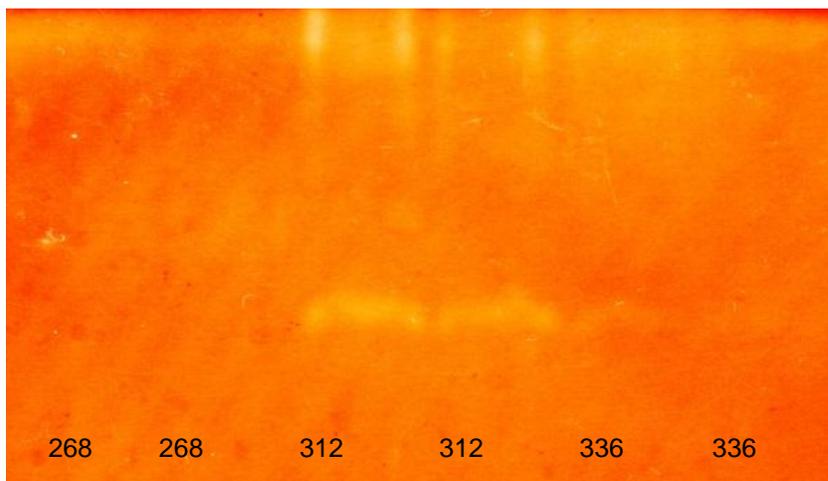
La figura 41 muestra las isoformas de lacasas encontradas en cada día de la fermentación. Se observó que las primeras horas de fermentación no hay presencia de lacasas, no así a partir de las 264 horas donde se observan de una a cinco isoformas.



**Figura 41:** Perfil zimográfico de lacasas de fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

### 7.3.8.3 Geles de electroforesis celulasas

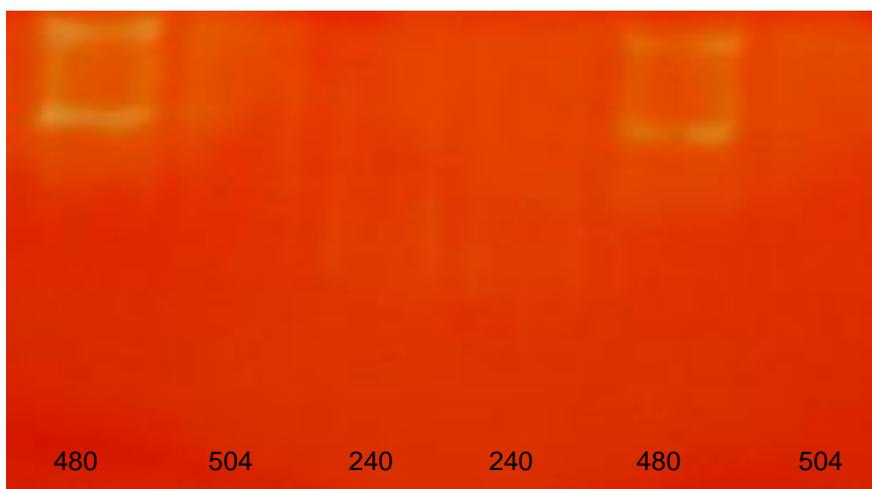
La figura 42 muestra las isoformas de celulasas y su replica encontradas en las horas que presentaron la actividad más alta de celulasas durante la fermentación. Se observó que solamente se presentan dos isoforma de dicha enzima.



**Figura 42:** Perfil zimográfico de celulasas de fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

### 7.3.8.4 Geles de electroforesis xilanasas

La figura 43 muestra las isoformas de xilanasas y su replica encontradas en las horas que presentaron la actividad más alta de celulasas durante la fermentación. Se observó que solamente se presentan dos isoforma de dicha enzima.



**Figura 43:** Perfil zimográfico de xilanasas de fermentación líquida de la cepa *P. ostreatus* en FML.

## 8. PARÁMETROS CINÉTICOS

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

<b>Parámetros cinéticos</b>		<b>Fermentación "G"</b>	<b>Fermentación "G, CMC y X"</b>	<b>Fermentación "CMC y X"</b>
$X_{max}$ (g/L)		5.92	3.12	3.03
$\mu$ ( $h^{-1}$ )		0.016	0.018	0.018
$E_{max}$ (U/L)	<b>lacasas</b>	34,240 (UA) 980 (UI)	31,840 (UA) 910 (UI)	30,680 (UA) 900 (UI)
	<b>xilanasas</b>	16,765	27,153	20,813
	<b>celulasas</b>	8,158	7,659	12,858
$Y_{X/S}$ (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )		0.49	0.183	0.178
$Y_{E/S}$ (U/g <sub>s</sub> )	<b>lacasas</b>	2,853.33 (UA) 81.66 (UI)	1,872.94 (UA) 53.53 (UI)	1,804.70 (UA) 52.94 (UI)
	<b>xilanasas</b>	679.83	1,597.23	1,224.94
	<b>celulasas</b>	1,379.08	450.52	756.35
$Y_{E/X}$ (U/g <sub>x</sub> )	<b>lacasas</b>	5,783.78 (UA) 165.34 (UI)	10,205.12 (UA) 291.66 (UI)	10,125.41 (UA) 297.02 (UI)
	<b>xilanasas</b>	2,831.92	8,702.88	6,868.97
	<b>celulasas</b>	1,378.04	2,453.84	4,243.56
Pro (U/Lh)	<b>lacasas</b>	62.02 (UA) 1.77 (UI)	65.98 (UA) 1.72 (UI)	60.87 (UA) 1.78 (UI)
	<b>xilanasas</b>	30.37	51.42	41.29
	<b>celulasas</b>	14.77	14.5	25.51
$q_s$ (g <sub>s</sub> /g <sub>x</sub> h)		0.03	0.09	0.01
$q_p$ (U/hg <sub>x</sub> )	<b>lacasas</b>	92.54 (UA) 2.64 (UI)	183.69 (UA) 5.24 (UI)	182.25 (UA) 5.34 (UI)
	<b>xilanasas</b>	45.31	156.65	123.64
	<b>celulasas</b>	22.04	44.16	76.38

## 9. DISCUSIONES

El crecimiento de *P. ostreatus* en fermentación sumergida ha sido estudiado para la producción de lacasas Palmieri y col. (1997), se han utilizado diferentes inductores en el medio de cultivo como: lignosulfonato y alcohol veratrílico, ácido ferulico, 2,6- xilidina, p-anisidina y cobre Eggert y col. (1996), Galhaup y col. (2002), Juárez-Hernández (2006), y se conoce que este organismo puede producir varias isoenzimas de lacasas, algunas constitutivas y otras inducibles (Bollag-Leonowicz 1984); debido a que el hábitat natural de los hongos del género *Pleurotus* es sobre sustratos lignocelulósicos, hemicelulosa, celulosa y lignina, que actúan como inductores directos de las enzimas ligninolíticas, sin embargo existen pocos reportes sobre la producción de xilanasas y celulasas para este hongo.

En este trabajo se evaluaron los parámetros cinéticos de crecimiento de la cepa ATCC-32783 del hongo *P. ostreatus*, en tres medios de cultivo con diferentes concentraciones de fuentes de carbono. El crecimiento de *P. ostreatus* fue descrito por el modelo matemático de la ecuación logística para todos los casos de medios de cultivo.

El crecimiento de *P. ostreatus* ATCC-32783 (*Po* 83) se evaluó durante los 21 días de cada fermentación obteniendo la biomasa máxima en la fermentación con glucosa como única fuente de carbono con un valor de  $X_{max}=5.92$  g/L y una  $\mu= 0.016/h$  a las 460 h de fermentación, seguido de la fermentación 2 con glucosa, carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono con una  $X_{max}$  de 3.12 g/L y una  $\mu = 0.018/h$  a las 480 h de fermentación y finalmente la fermentación 3 con carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono con una  $B_{max}$  de 3.03 g/L y una  $\mu= 0.018/h$  a las 380 h de fermentación, trabajos con la misma cepa muestran una biomasa máxima de 6 g/L Tellez-Tellez y col. (2008) y de 7.7 g/L Beristaín (2005), por su parte (Alonso-Bosada 2007) observó bajo el sistema de fermentación sumergida una biomasa máxima de 2.22 g/L para la cepa *Po* 3, y una biomasa máxima de 7.24 g/L para la cepa *Po* 7. Beristaín y col. (2008) en fermentación sumergida muestran que *P. ostreatus Po. 83* alcanza una biomasa máxima de 7.8 g/L a las 480 horas de fermentación. Con base a lo anterior se puede observar que la cepa *Po* 83 mantiene más o menos los mismos

parámetros de crecimiento, aun modificado el medio de fermentación, mientras que otras cepas de la misma especie mostraron valores bajos.

La actividad enzimática de lacasas ha sido evaluada anteriormente en la cepa *Po 83* uno de los valores máximos de lacasas en esta cepa es el reportado por Tlecuilt-Beristaín y col. (2005) el cual purifico una enzima de lacasa logrando una actividad máxima de 12,196 U/L, mientras que Tellez-Tellez y col. (2008) evaluó el crecimiento y producción de lacasas en fermentación sólida y líquida, logrando una actividad máxima de lacasas en fermentación líquida de 13,000 U/L y en fomentación solida 2,340 U/L, en *Pleurotus sagur-caju* Snajdr y Baldrian (2007) reportaron una actividad máxima de lacasas de 3.8 U/L, en otras especies de hongos también se ha evaluado la actividad enzimática de lacasas, como es el caso de *Botryosphaeria* el cual presento una valor máximo de lacasas de 8 U/mL, en *Volvariella* la actividad máxima de lacasas fue de 30 U/L, la actividad enzimática de lacasas obtenida en este estudio tuvo valores muy cercanos a los reportados anteriormente, se logro la máxima actividad de lacasas en la fermentación con glucosa como una fuente de carbono logrando un valor máximo de 34,240 UI/L, a las 356 h de fermentación, mientras que la fermentación 2 con glucosa, carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono presento una actividad máxima de lacasas de 31,840 UI/L a las 560 h, y la fermentación 3 con carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono mostro una actividad máxima de 30,680 UI/L, mostrando con esto que en las 3 fomentaciones la actividad máxima de lacasas se presenta en la fase estacionaria del hongo, lo cual coincide con el tiempo en el cual el hongo consume a la glucosa, carboximetil-celulosa y al xilano en su totalidad, esto nos sugiere que dichos azucres pueden causar represión catabólica en las enzimas lacasas.

En la cepa *Po 83* no se había evaluado la actividad enzimática de xilanasas, sin embargo en la cepa CP-50 de *P. ostreatus* se encontraron valores máximos de xilanasas de 7.59 U/L, también existen reportes de la presencia de dichas enzimas en otros hongos como en *Aspergillus niger* obteniendo valores máximos de 14,790 U/hL, la actividad enzimática máxima de xilanasas obtenida en este estudio se obtuvo en la fermentación 2 con glucosa, carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono encontrando valores máximos de

27,153 U/L 340 h de fermentación, mientras que en la fermentación 3 con carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono se logro un valor máximo de 20,813 U/L a las 456 h de fermentación y finalmente la fermentación 1 con glucosa como única fuente de carbono obtuvo un valor máximo de 16,765 U/L a las 356 h.

Al igual que las xilanasas las celulasas no habían sido evaluadas en la cepa *Po 83*, pero Mekala y col. (2008) evaluaron la producción de enzimas celulasas en *Tricoderma resei* encontrando un valor máximo de 25 U/gss, en otras especies de *Pleurotus* el valor máximo de celulasas encontrado fue de 62 ml/U Raghukumar y col. (2004), mientras que en este estudio el valor máximo de actividad de celulasas se encontró en la fermentación 3 con carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono con un valor máximo de 12,858 U/L a las 288 h de fermentación, seguido de la fermentación 1 con glucosa como única fuente de carbono con un valor máximo de 8,158 U/L a las 288 h de fermentación, y finalmente la fermentación 3 con glucosa, carboximetil-celulosa y xilano como fuentes de carbono con un valor máximo de 7,656 U/L a las 240 h de fermentación.

Los zimogramas son un herramienta de gran utilidad para caracterizar las enzimas tanto extracelulares como intracelulares al detectar bandas de actividad específica, debido a que solo 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 extractos de las diferentes fermentaciones. En los patrones zimográficos de lacasas se encontraron de 2 a 5 bandas en las tres fermentaciones, sin embargo los zimogramas a pH de 6.5 revelaron solo de 1 a 4 isoformas en las tres fermentaciones, mientras que los zimogramas a pH de 4.5 revelaron de 2 a 5 isoformas de lacasas, lo cual nos indica que la enzima lacasas prefiere un pH ácido para la expresión de las isoformas.

Los zimogramas de celulasas y xilanasas se llevaron a cabo únicamente con los extractos enzimáticos de los días que presentaron mayor actividad de dichas enzimas, mostrando resultados en los zimogramas de xilanasas de hasta dos isoformas en las tres fermentaciones,

mientras que las celulasas mostraron de una a dos isoformas en las tres fermentaciones, lo cual coincide con lo reportado por Raghukumar y cols. (2004) en donde los geles de electroforesis mostraron hasta 2 bandas de xilanasas con pesos moleculares de 13 a 18 KDa en el hongo *Aspergillus niger*.

Las isoenzimas obtenidas por electroforesis son una herramienta en la sistemática, genética y biología de poblaciones. Esta técnica se ha utilizado ampliamente en la biología de plantas para el estudio de flujo de genes y diversidad genética. Pero en los hongos un gran número de enzimas se han utilizado en estudios taxonómicos, estas enzimas son principalmente las que están involucradas en el metabolismo primario, pero en algunos estudios han utilizado modelos de bandas enzimáticas extracelulares para la identificación de hongos. Sin embargo, dado que las enzimas extracelulares se encuentran en el caldo de cultivo, limita su uso en algunos hongos debido a que los patrones zimográficos no son constantes (Rosendahl y Banke, 1998).

## 10. CONCLUSIONES

- La fermentación sumergida se llevo a cabo exitosamente ya que se logró el crecimiento del hongo *P. ostreatus* con producción de lacasas, celulasas y xilanasas con las tres combinaciones de fuentes de carbono.
- Se obtuvieron hasta 5 isoformas de lacasas en las tres fermentaciones, mientras que las celulasas y xilanasas se obtuvieron hasta 2 isoformas en las tres fermentaciones.
- La glucosa, carboximetil-celulosa y el xilano causaron represión catabólica en la producción enzimática de lacasas.
- La actividad enzimática de xilanasas y celulasas fue mayor cuando a los medios de cultivo se les agrego xilano y carboximetil-celulosa.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Anselmo T., Prema P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol* 22:33–64
- Asgher M., Asad M.J., Legge R.L., 2006. Enhanced lignin peroxidase synthesis by *Phanerochaete Chrysosporium* in solid state bioprocessing of a lignocellulosic substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22 (5): 449-453.
- Azin M., Moravej R., Zareh D., 2007. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 801–805.
- Battan B., Sharma J., Kuhad R.C., 2006. High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1281–1287.
- Barr, D. P; Aust, S. D., 2000. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci.Technol*;28(2):78A-87A.
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: review in *Appl. Microbiol Biotechnol* 56:326–338
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- 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 Journal of Biological Sciences*. 5(6):578-595.
- Dekker C., Diaz A., Ory I., Webb C., Blandino A., 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 42: 98–101.
- Deacon, J.W., 2000. *Introducción a la Micología Moderna*. Editorial Limusa. Mexico. pp 223-247.

- De Souza C y Peralta R., 2002. Purification and characterization of main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology* 43: 278-286.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. and Bally, R., 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in rhizospheric bacteria, *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 919-927.
- Diaz-Godinez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C. y Viniegra-Gonzalez, 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., 2007. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 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.
- Gricelda F., Muñoz C., Gómez-Torbio V., Martínez AT y Martínez MJ., 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 170-175.
- Gong Ch y Tsao GT., 2002. *Ann. Rep. Ferment. Process* 3: 111.
- Hoshida R., Pice M. G., Freiermuth B., Bodie E. and Borneman S., 2001. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environmental Microbiology* 63 (12): 4627-4632.
- Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., and Howard S., 2003. lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal Biotechnology* 2(12):602-619.
- Jecu L., 2000. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial crops and Products* 11: 1-5.

- Jing D., Li P., Stagnitti F., Xiong X., 2007. Optimization of laccase production from *Trametes versicolor* by solid fermentation. *Canadian Journal of Microbiology* 53 (2): 245-251.
- 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.
- Juarez-Hernandez J., 2006. Estudio de las condiciones de fermentación sumergida para la producción de lacasas de *Pleurotus ostratus*. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas*. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Mexico.
- 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.
- Krishna C., 2005. Solid state fermentation systems: an overview *Critical Reviews in Biotechnology* 25 (1/2):1–30.
- Kumaran S., Sastry C.A., Vikineswary S., 2002. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13 (1): 43-49.
- Kulkarni Lu., Defa L., Wu Y., 2005. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus* *Enzyme and Microbial Technology* 32: 305–311.
- 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.
- Landolo R., Bocchini DL., Martins EDS., Silva D., Gomez E., y Da Silva., 2010. Production of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes From *Aureobasidium pulluans* on Solid State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 136-140, pp. 281-288.

- Leite RSR., Bocchini DL., Martins EDS., Silva 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.
- Laemmli UK., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-885.
- 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., 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.
- Loewus FA., 1952. Improvement in anithronie method for determination of carbohydrates. Analitical Chemistry. 24:219.
- Maheshwari R., Bharadwaj G., and Bhat K.M., 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64(3): 461-488.
- Martínez-Carrera D., Larqué-Saavedra A., Morales, Sobal M., Martínez W., y Aguilar A., 2005. Los hongos comestibles en México: biotecnología de su reproducción. Ciencia y Desarrollo. XVIII 108:41-49.
- Martínez T.A., Speranza M., Ruiz-Dueñas J.F., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez J.M., Gutiérrez M., Del Río C.J., 2002. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology 8(3): 195-204.
- Márquez Arenque., 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* en fermentación sólida. Interciencia 32 (11).
- Mayer M.A. and Staples R. C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. a review Phytochemistry 60: 551–565.

- Mazutti M., Ceni G., Di Luccio M., Treichel H., 2007. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess of Biosystems Engineering* 30: 297–304.
- Mekala NK., Singhanian R.K, 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., 2010. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*.
- Mester, T., Field, J. A., (2006). Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* strain BOS55. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:161-168.
- Mikiash A M. E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G. y Favela-Torres, E., 2006. Production and properties of the pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:808-814.
- Montenecourt, H.J., Marshall, R.T White C.H. y Lu M., 2003. “Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P23” *Applied Microbiology* 25:44-48.
- Morozova V., Shumakovich GP., Gorbacheva MA., Shleev SV., y Yaropolov AI., 2007. Blue laccases. *Biochemistry-Moscow* 72:1136-1150.
- Nigam P., and Robinson T., 2005. Solid state fermentation: an overview. En: *Handbook of Fungal Biotechnology. Mycology V. 20*, Second Edition. Editores: Arora.K.D., Bridge D.P., Bhatnagar D., Editorial MARCEL DEKKER, INC., New York pp: 267-274.

- 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., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A., y Sannia G., 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301-31307.
- Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 18 (1): 37-45.
- Pandey A., 2002. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 27: 1 09- 1 17.
- Paice T., Field, J. A., 2002. Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* strain BOS55. *FEMS Microbiol. Lett.* 155:161-168.
- 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.
- Paszczynsky E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Paulo A.C., and Gübitz G.M., 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8): 3357-3362.
- Peixoto T., Prema P., 2009. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol* 22:33–64
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., Rubia de la T. y Martínez J., 2006. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: overview *International Microbiology* 5: 53–63.
- Polizeli MLTM., Rizzatti ACS., Monti R., Terenzi HF., Jorge JA., Amorim DS., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(5): 577-591.
- Pountanen SB. 2004. 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.
- Ramirez, E., Pickard A., Vazquez-Duhalt R., 2003. Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38:27-32
- Rivers M. L., Emert A. C., 2006. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Moscow)*, 67 (8): 850-871.
- Rodríguez-Couto S., Moldes D., Liébanas A., Sanromán A., 2003. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid state conditions. *Biochemical Engineering Journal* 15: 21–26.
- Rodríguez- Couto S., Sanromán A., 2002. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22: 211–219.
- Rosales E., Rodríguez C. S., and Saromán A., 2002. New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsutia*. *Biotechnology Letters*, 24: 7001-7004.
- 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.
- Rughuvarao E., Raimbault M., Rousous S., 2003. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27: 498-503.
- San Roman A., Garg N., Sharma J., kuhar K., Kuhad RC., y Gupta VK., 2005. 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.
- Sethuraman A., Akin D., y Eroksson E., 2005. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Applied Microbiology Biotechnology* 52: 689-697.

- Sonden B T.; Endo K.; Ito Tsujibo H.; Miyamoto K.; Inamori Y., 2001. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence and expression. *Bioscience and Biotechnology Biochemical*. 6(10): 2167-2175.
- Staments S., y Prema P., 2003 Biotechnology of microbial xylanases. *Enzymology, Molecular Biology and Application. Critical Reviews in Biotechnology* 22:33-64.
- Shah R.A., and Madamwar D., 2005. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(3): 233–243.
- Schinnegab A., Akin D., y Eroksson E., 2008. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Applied Microbiology Biotechnology* 52: 689-697.
- Schichen .F, Engels J., y Mattheck C., 2003 Fundamental aspects. En *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer. pp 5-31.
- Snajdr., Baldrian P., Temperature Affects the Production, Activity and Stability of Ligninolytic Enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *Folia Microbiol*, (5), 498-502 (2007).
- Tao S., Beihui L., Deming L., and Zuohu L., 1997. Effect of elevated temperature on *Trichoderma viride* SL-1 in solid state fermentations. *Biotechnology Letters* 19: 171-174.
- Téllez-Téllez M., Sánchez C., Montiel-Gonzalez A.M., 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* (In press).
- 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. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Tengerdy R.P., Szakacs G., 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 169–179.

- Tinoco, R., Pickard M.A., Vázquez-Duhalt R., 2010. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32: 331-335.
- Tlecuitl-Beristain S., Díaz-Godínez G., Soriano-Santos J., Romero-Gómez S., y Sánchez C., 2003. Effect of the initial concentration of glucose or sucrose on exopolysaccharide production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation.
- Van de Vossen L.C.M.J., Ubbink-Kok T., Elferink G L M., Driessen J. M.A and Konings N. W., 2000. Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. *Molecular Microbiology* 18 (5): 925-932.
- 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.
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar, N.C., 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.
- Wong G., Belinky AP., Hadart Y, Bilkis I., y Dosoretz GC., 2006. The influence of non-phenolic mediators and phenolic co-substrates on the oxidation of 4-bromophenol by lignin peroxidase. *Enzyme and Microbiology Technology* 30: 490-498
- Yang S. Q., Yan Q. J., Jiang Z. Q., Li L T., Tian H M., Wang, Y Z., 2005. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 97 (15): 1794-1800.

# ANEXOS



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

BTN110CCH20091211

EXTIENDE LA PRESENTE

# Constancia

A:

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

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA EXPOSICIÓN DEL TRABAJO LIBRE

Evaluación De La Actividad Lignocelulolítica De *Pleurotus ostreatus* Obtenida Por Fermentación Sumergida

**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 Raul Chávez Afvirco** **IBQ R. Alejandro Romo Mexia 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.

BTN111CHI20091211

EXTIENDE LA PRESENTE

# Constancia

A:

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

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA EXPOSICIÓN DEL TRABAJO LIBRE

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS DE *Pleurotus ostreatus* POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA EN UN MEDIO DE CULTIVO CON XILANO Y CELULOSA

**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 del 2010

*IBQ Raúl Chávez Afvircio* 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



# EL COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

## CONSTANCIA

07-VI055103-00-1877

A:

*Estela María Hernández Domínguez*

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 Comp. Fuentes De Carbono

*(Jorge Álvarez Cervantes; Carmen Sánchez Delgado; María Isabel Méndez; Gerardo Díaz Godínez)*

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

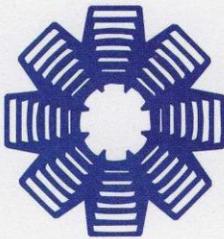
Del 24 al 26 de Marzo del 2010



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

*Dr. Mario Alberto Rodríguez Casas*  
Presidente Honorario

*Dr. Alejandro Antonio Méxica Gutiérrez*  
Presidente del Congreso



**SMBB**

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

Otorga el presente

# Reconocimiento



**SMBB**  
DELEGACIÓN  
YUCATÁN

Por la presentación del trabajo

**ZIMOGRAFÍA DE LACASAS DE *Pleurotus ostreatus* OBTENIDAS POR  
FERMENTACIÓN SÓLIDA Y LÍQUIDA.** \*Edna Ma. Hernández-Domínguez, Carmen  
Sánchez, Octavio Loera, Daniel Méndez, Jorge Álvarez- Cervantes 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