

# Obtención de Extractos Enzimáticos con Actividad Ligninolítica y Celulolítica a partir del Crecimiento del Hongo *Lentinusedodes* en Aserrín Tropical

Molina C.\*; Espín N.\*\*

\*Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito, Ecuador  
e-mail: [krly\\_molina@hotmail.com](mailto:krly_molina@hotmail.com); [neyda.espin@epn.edu.ec](mailto:neyda.espin@epn.edu.ec)

**Resumen:** Se determinaron las actividades enzimáticas de la celulasa, ligninoperoxidasa y manganeso peroxidasa en los extractos obtenidos del aserrín tropical en el que creció el hongo *Lentinusedodes* con el objetivo de determinar los períodos de mayor generación de las mismas. Los extractos presentaron mayor actividad enzimática celulolítica. La mayor producción de actividad enzimática celulolítica se presentó en el día de la primera cosecha, la actividad manganeso peroxidásica mayor se dio en los períodos de inducción. No se encontraron valores de actividad ligninoperoxidásica representativos. Se almacenaron los extractos a temperaturas: ambiente (15 °C), 3 °C y -14 °C, para determinar estabilidad. La mayor estabilidad se obtuvo en congelación.

**Palabras clave:** *Lentinusedodes*; Actividad Enzimática; LigninoPeroxidasa; Manganeso Peroxidasa; Celulasa, Estabilidad Enzimática.

**Abstract:** Cellulase, lignin peroxidase and manganese peroxidase enzyme activities were determined in extracts produced by *Lentinusedodes* which was grown in sawdust to determine the periods of the highest generation of enzyme activities. The extracts showed higher cellulolytic enzyme activity being the first day of harvest the one in which the maximum value was obtained. Manganese peroxidase activity showed the best production during the induction periods. Lignin peroxidase showed no activities during the whole process. The extracts were stored at: room temperature (15 °C), 3 °C and -14 °C to assess their stability, being -14 °C the best condition to maintain it.

**Keywords:** *Lentinusedodes*; Enzymatic Activity; Lignin Peroxidase; Manganese Peroxidase; Cellulase; Enzymatic Stability.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos de podredumbre blanca, son aquellos que crecen en sustratos lignocelulósicos como la madera y la paja; secretan una mezcla de enzimas que despolimerizan los componentes de sustratos celulósicos [18]. Uno de los papeles más importantes de los hongos en los ecosistemas es la degradación de la lignina y la celulosa, los dos componentes principales de la pared celular de las células de plantas [12]. Debido a la capacidad del *Lentinusedodes* de degradar la lignina, que es difícil de romper en la naturaleza, se emplea en procesos de biorremediación de contaminantes recalcitrantes. Así mismo, se han desarrollado estudios para la obtención de enzimas celulolíticas [6], las mismas que tienen usos en varias industrias, como la de alimentos y la textil. [1][22].

La obtención de metabolitos a partir de procesos fermentativos, se ha visto potenciada por las tendencias actuales de buscar tecnologías amigables con el ambiente. Por esta razón, el estudio del aprovechamiento de toda la potencialidad del cultivo de hongos cobra importancia. La

obtención de hongos comestibles no solamente es una alternativa de uso de desechos agroindustriales que da como resultado un producto alimenticio, el hongo, y un sustrato degradado que puede emplearse como abono; adicionalmente, el recuperar las enzimas generadas por los hongos durante el proceso fermentativo resultaría en un beneficio adicional del cultivo de hongos, al tener un producto de alto valor agregado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

Se utilizó una cepa de *Lentinusedodes* proporcionada por el Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional. Se utilizó aserrín de maderas tropicales obtenido de la empresa Endesa-Botrosa. El trigo se adquirió en el mercado local.

Los reactivos empleados fueron: Acetato de Sodio (analítico 99% pureza), Agua Oxigenada (analítico 30%), Hidróxido de Sodio (analítico 99% pureza) de Merk; Ácido Acético (analítico 99% pureza), DNS (analítico 99% pureza), Tartrato

de Sodio (analítico 99% pureza) de Sigma; Tartrato de Sodio y Potasio (analítico 99% pureza), Bisulfito de Sodio (analítico 99% pureza), de Fischer Scientific, Ácido Cítrico (técnico 99% pureza), Albúmina de huevo (técnico) de JT Baker, Ácido Tartárico (analítico 99% pureza), Fenol (analítico 99% pureza) de BDH Laboratories; Alcohol Veratrílico de Aldrich (analítico 99% pureza), Carboximetilcelulosa (técnica 67% pureza) de HiMediaLaboratories, Malta Agar (analítico 99% pureza) y PlateCount Agar (analítico 99% pureza) de Difco TM.

## 2.2 Caracterización del rastrojo del aserrín

Se determinó el contenido de celulosa, lignina, resinas, ceras y grasas del aserrín utilizado en la fermentación. Se analizaron muestras de aserrín correspondientes a la muestra original, el aserrín fermentado de la primera cosecha y el aserrín fermentado después de la segunda cosecha del hongo. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional. Se siguió la metodología descrita en el Manual sobre la Fabricación de Pulpa y Papel de Grant[8] y las normas TAPPI-T-13-os-54 para determinación de lignina, TAPPI-T-17-m-55 para celulosa, y TAPPI-T-6-os-59 para resinas y ceras.

## 2.3 Preparación del inóculo del hongo *Lentinusedodes*

Se realizó una duplicación en cajas Petri con Malta Agar y se incubó por 30 días a 28 °C, hasta que el micelio cubrió todo el medio de la caja [5]. Para el cultivo del hongo *Lentinusedodes* en frascos, se colocó 110 g de trigo seco y 132 mL en frascos de 250 mL. Se taparon y esterilizaron en un autoclave marca New Brunswick, modelo AE15-10 a 121 °C por 20 minutos. En una cámara de flujo laminar, se inoculó cada frasco con el 10% de hongo obtenido de las cajas petri; los frascos se cerraron sin ajustar completamente la tapa, y se llevaron a una estufa marca Boekel Industries INC Model 132000 a 28 °C por 30 días, hasta que el micelio cubrió todo el trigo. Estos fueron los inóculos con los que se realizó la siembra en las fundas.

## 2.4 Preparación del sustrato de aserrín y crecimiento del hongo

El aserrín, colocado en sacos fue esterilizado en agua a 90 °C, por un período de 4h.

El aserrín se colocó sobre una mesa de acero inoxidable previamente desinfectada, y fue introducido en fundas plásticas de 17,78 × 25,40 cm (7 × 10 pulgadas) junto con el inóculo del hongo en una relación de 15% en peso. El peso total de las fundas fue de 300 g. Las fundas se cerraron con cinta adhesiva. Se prepararon 140 fundas por cada corrida.

Las fundas inoculadas se llevaron a la cámara oscura donde estuvieron cerradas hasta el tercer día después de la siembra, en este día con la ayuda de un bisturí estéril se realizaron dos perforaciones de 2×2 cm en la parte superior de cada funda, una a cada lado. La aireación y humidificación de la

cámara se realizó desde el primer día con el objetivo de mantener la humedad sobre el 80%; la temperatura ambiental osciló entre los 16 y 20 °C [2].

Una vez que el micelio cubrió por completo el sustrato se retiró la funda plástica y el sustrato cubierto de micelio se colocó en bandejas con agua a temperatura ambiente durante dos días, con el fin de inducir el apareamiento de los primordios[2]. Este proceso se repitió después de la primera cosecha, para inducir el apareamiento de los segundos primordios. Las fundas con los primordios se llevaron a la cámara clara-oscura y se continuó con el riego y la aireación diaria, para mantener condiciones de humedad y temperatura. La cosecha se realizó en los días en los cuales se observó un desarrollo completo del cuerpo fructífero. Se realizaron dos cosechas.

Los rendimientos biológicos del hongo se determinaron al dividir el peso del hongo cosechado de cada funda, para el peso del sustrato seco en esa funda. Este resultado se expresó en porcentaje.

## 2.5 Muestreo y obtención de los extractos enzimáticos

El proceso fermentativo se realizó en tres corridas, en cada corrida se trabajó con dos grupos. Para cada grupo en cada corrida, desde el día de la siembra del hongo en fundas, hasta las cosechas de los hongos, se muestrearon 2 fundas diarias, 2 veces por semana. Se escogieron las fundas al azar, y se homogenizó su contenido. Para la determinación de cada actividad enzimática se pesaron 45 g de sustrato fermentado homogenizado y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 75 mL de la solución buffer correspondiente a cada ensayo. Se colocaron los erlenmeyers en unshaker marca NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC N.B.S por 30 minutos, el contenido de cada erlenmeyer se filtró al vacío y se centrifugó a una velocidad de 1350×g en una centrífuga marca THERMO modelo IEC HN SII. En el extracto obtenido se determinaron las actividades enzimáticas y se expresaron en Unidades Internacionales(UI). La UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones de la reacción [4].

## 2.6 Determinación la actividad enzimática celulolítica

La actividad celulolítica se determinó según el método de Miller, descrito en el trabajo de Ghose[9]. Se utilizó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa al 2% en solución buffer de citrato de sodio 0,05 M pH 4.8. Se agregaron 0,5 ml de extracto enzimático a un tubo de ensayo, de al menos 25 ml de capacidad. Se agregaron 0,5 ml de la solución sustrato y se incubó 30 min en un baño maría marca Cole Parmer Polystad Modelo 1200-00 Circulator, a 50 °C. Se agregaron 3,0 ml de reactivo DNS y se colocó en agua en ebullición por 5 min. Para detener la reacción se enfriaron los tubos colocándolos bajo agua fría. Se agregaron 20 mL de agua destilada y se mezcló el reaccionante con el agua destilada. Para preparar el blanco de reactivos se sustituyeron 0,5 mL de extracto enzimático por 0,5 mL de solución buffer

de citrato de sodio 0,05 M (pH 4,8). Para corregir los azúcares presentes en el extracto enzimático y preparar las muestras de blanco de muestra, después de agregar DNS se agregó el extracto enzimático. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro marca Labomed. Inc. Spectro UV-VIS DoubleBeam UVD 3500. La concentración de azúcares reductores se calculó mediante la ecuación de regresión, cuyos datos se obtuvieron de una curva patrón con D-glucosa anhidra, cuyo rango de concentración fue de 0,17 a 1 g/L.

### 2.7 Determinación la actividad enzimática ligninoperoxidásica

La actividad ligninoperoxidásica fue medida espectrofotométricamente [23] [24]. En un tubo de ensayo con rosca de 10 mL de capacidad se colocaron: 1 mM de una solución de tartrato de sodio con pH de 3,0; 0,5 mL del extracto enzimático, 2 mM de alcohol veratrílico, 0,1% de Tween 80 y 4 mM de peróxido de hidrógeno. El volumen final fue de 10 mL y la mezcla contenida en los tubos se dejó reaccionar en un baño María marca Julabo SW22 a 30 °C por 60 minutos.

Se preparó un blanco de muestra sin adicionar peróxido de hidrógeno. Para el blanco de reactivos, el blanco de muestra y las respectivas muestras de extractos se leyó la absorbancia a 310 nm ( $\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 2.8 Determinación del perfil de la actividad enzimática manganeso peroxidásica

La actividad manganeso peroxidásica fue medida, espectrofotométricamente, de acuerdo con Lopes *et al.* [13]. En un tubo de ensayo de 10 mL se colocó: 0,1 mL de buffer acetato de sodio 0,1 M (pH 4,5), 0,05 mL de una solución de  $\text{MnSO}_4$  2 mM, 0,20 mL de una solución de albúmina al 0,5% y 0,05 mL de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM en buffer de fosfato de sodio 0,2 M (pH 8,0). La mezcla se dejó reaccionar en un baño maría a 30 °C por 10 min. Se detuvo la reacción con adición de 0,04 mL de una solución de NaOH 2 N. Para cada muestra se preparó un blanco sin la adición del peróxido de hidrógeno. De cada muestra y blanco, correspondiente, se leyó la absorbancia a 610 nm ( $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 2.9 Evaluación de la estabilidad de los extractos enzimáticos

Para evaluar la estabilidad de los extractos enzimáticos con actividad enzimática celulolítica y manganeso peroxidásica, se preparó una muestra compuesta formada por los extractos obtenidos en los días de mayor generación. El volumen total de extracto compuesto bien mezclado fue distribuido en tubos de 10 mL. Se elaboró un total de 45 tubos, que fueron distribuidos de la siguiente manera, 15 tubos a temperatura ambiente promedio de (15,5 °C), 15 tubos en refrigeración (3 °C) y los otros 15 en congelación (-14 °C).

La actividad enzimática de los extractos se determinó cada 2 días, durante un período de 30 días. Todos los extractos

fueron filtrados a través de papel filtro, previamente a la determinación de la actividad.

Para determinar la estabilidad de los extractos, se emplearon 2 modelos matemáticos: cinética de degradación de orden cero, y cinética de degradación de orden uno [11]. Adicionalmente, se determinó la influencia de la temperatura en la constante de degradación según la ecuación de Arrhenius, mediante regresión lineal.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización del aserrín usado como sustrato

Los resultados de la caracterización química del aserrín tropical se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización del aserrín

Analito [%]	Aserrín original	Aserrínfermentado 1 <sup>ra</sup> cosecha	Aserrínfermentado 2 <sup>da</sup> cosecha
Humedad	6,53±0,14	7,88±0,14	8,50±0,03
Resinas, ceras y grasas	2,82±0,17	4,64±0,22	4,34±0,07
Celulosa	54,07±0,54	52,10±0,61	49,49±0,72
Lignina	22,86±0,14	21,62±0,04	20,44±0,37
Otros	13,71±0,60	13,75±0,66	17,23±0,82

n = 4

Como se observa, el aserrín tropical utilizado como sustrato tuvo 54,07% de celulosa y un 22,86% de lignina, y las concentraciones finales fueron de 47,7% y 19,79% respectivamente. La disminución del contenido de celulosa y lignina probablemente se dio ya que estas son las principales fuentes de nutrientes para el desarrollo del hongo [15].

### 3.2 Períodos de desarrollo y eficiencia biológica del hongo *Lentinusedodes* en aserrín tropical

En la Tabla 2 y en la Tabla 3 se muestran los períodos de crecimiento y cosecha; y los valores del promedio de peso fresco del hongo y del promedio de la eficiencia biológica obtenidos durante las cosechas de las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinusedodes*.

Tabla 2. Períodos de crecimiento del hongo *Lentinusedodes*

PARÁMETRO	Tiempo (días)		
	PRIMERA CORRIDA	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Desarrollo del Micelio	1-25	1-20	1-17
Fructificación	25-69	20-52	17-49
Primera Cosecha	41	31	28
Segunda Cosecha	59	52	45

Tabla 3. Pesos fresco y Eficiencia Biológica promedio del hongo *Lentinusedodes*

PARÁMETRO	PRIMERA CORRIDA	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Peso promedio hongo fresco (g)	40,3 ± 10,8	38,2 ± 9,1	16,3 ± 4,2
Eficiencia Biológica Promedio (%)	14,1 ± 5,8	14,1 ± 3,2	41,0 ± 13,9

n = 6

Los días de primera y segunda cosecha, día 31 y 59, son comparables con los días de cosecha obtenidos por Curvettoet *al.* [7] quienes al cultivar los hongos *Lentinusedodes* en cáscaras de semilla de girasol obtuvieron las cosechas al día 35 y al día 55. Al realizar esta comparación se podría inferir que el tipo de sustrato no influiría en los días de cosecha.

Royse [22] al sembrar *Lentinusedodes* en bolsas de aserrín de 1-3 kg tuvo de 20 a 25 días para el desarrollo del micelio, 4 semanas para el apareamiento de los primordios y entre 9 y 11 días para la cosecha de los cuerpos fructíferos; en total tuvo alrededor de 64 días para el completo desarrollo del hongo *Lentinusedodes*. Al comparar los resultados de Royse con los obtenidos en este proyecto, se observó que los períodos de desarrollo del hongo *Lentinusedodes* en fundas con 300 g de aserrín se encontraron dentro de los rangos de tiempo esperados según lo señala este autor y por lo tanto, se puede decir que el tamaño de las fundas parecería no influir en estas variables.

La eficiencia biológica máxima obtenida fue de  $41,0 \pm 13,9\%$ , valores que están dentro de los rangos obtenidos por otros estudios; como los reportados por Carrión [5] de  $35,9 \pm 8,6\%$ , o por Israilides y Philippoussis [10] de  $50\%$ .

### 3.3 Determinación del perfil de actividad enzimática y periodos de mayor generación de las actividades enzimáticas

En las FIGS.1, 2 y 3 se muestran los valores de las actividades enzimáticas calculadas para la cepa de *Lentinusedodes* para las tres corridas respectivamente, a diferentes tiempos, durante la fermentación en aserrín de maderas tropicales.

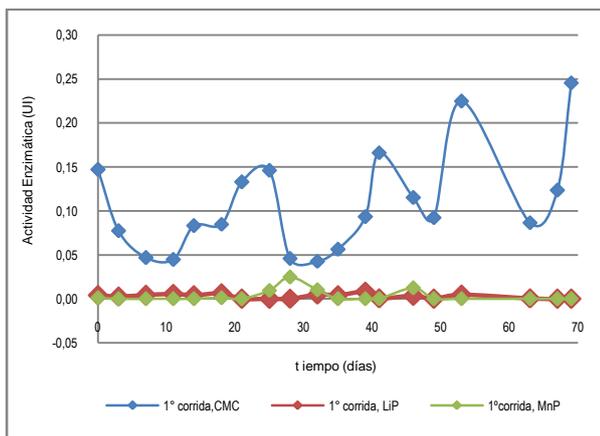


Figura 1. Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y ligninoperoxidásica (LiP) a diferentes tiempos para la primera corrida de fermentación del *Lentinusedodes*

Al analizar las tres figuras se observa que la actividad enzimática celulolítica es la más alta de todas, seguida de la actividad manganeso peroxidásica y por último la ligninoperoxidásica, la misma que no presenta actividad apreciable a lo largo del tiempo.

En todos los casos, se observa que durante la fase de adaptación del hongo al sustrato, la misma que se da en los primeros días de cultivo (0-10 días aproximadamente), la actividad enzimática celulolítica disminuyó con respecto al valor inicial. El valor inicial alto de la actividad celulolítica pudo estar asociado a la generación de dicha enzima durante la obtención del inóculo, se debe recordar que el hongo se siembra en frascos con trigo y se incubaba hasta que el micelio cubra la totalidad del medio, esto significa que el hongo para crecer, debió haber generado enzimas celulolíticas para consumir la celulosa presente en el trigo.

La actividad se incrementó en la fase de desarrollo del micelio del hongo, esto es en los días 11 al 28.

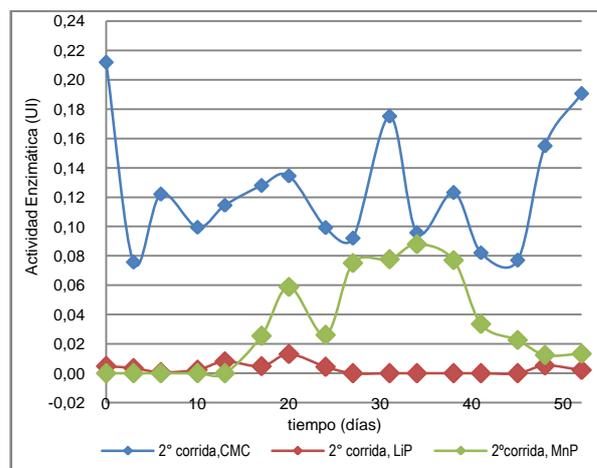


Figura 2. Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y ligninoperoxidásica (LiP) a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación del *Lentinusedodes*

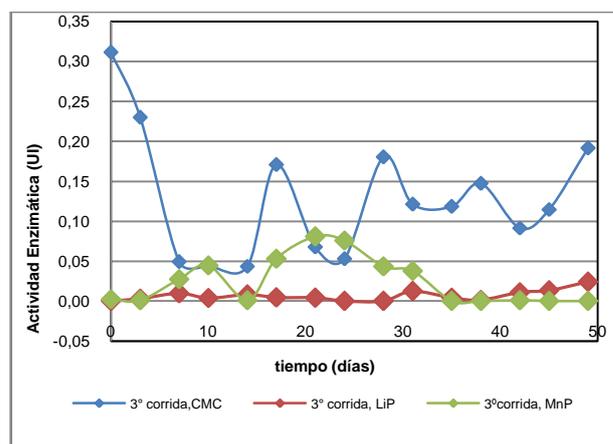


Figura 3. Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y ligninoperoxidásica (LiP) a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación del *Lentinusedodes*

En las siguientes etapas del proceso fermentativo, esto es durante la inducción y generación de primordios, nuevamente se tiene una disminución de la actividad enzimática, pero en la etapa de cosecha, alrededor del día 42 para la primera corrida, 31 para la segunda corrida y 28 para la tercera corrida, la actividad enzimática celulolítica volvió a

incrementar. En los días posteriores, se observa una disminución de la actividad celulolítica y un nuevo incremento en el día de la segunda cosecha.

En las tres corridas de fermentación se tuvo que la actividad enzimática celulolítica, se relacionó con el modo de acción de las enzimas celulolíticas; la enzima endoglucanasa produce una disminución sobre el grado de polimerización de la celulosa en las secciones amorfas, lo cual debió haberse dado en los primeros días de fermentación y es por esto que se tiene actividad enzimática celulolítica en los primeros días de fermentación de las corridas. La producción de la enzima endoglucanasa tiende a disminuir en los días cercanos al apareamiento de los primordios. En cambio; en las etapas de apareamiento de los primordios y fructificación, la enzima celulolítica que se produce es la exoglucanasa, ya que esta enzima actúa sobre el extremo no reductor liberado de la molécula de celulosa y produce rupturas en cadena [3].

Otra enzima celulolítica es la  $\beta$ -glucosidasa y la función de esta enzima es la de hidrolizar celobiosa y otros  $\beta$ -1,4-oligoglucósidos de cadena corta; entonces, siempre que exista producción de las endoglucanasas y las exoglucanasas la cantidad de celobiosa y otros  $\beta$ -1,4-oligoglucósidos estarán también presentes y con esto se incrementa la producción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa [17]. Por lo tanto, debido a la presencia de las exoglucanasas y de las  $\beta$ -glucosidasas en los días de apareamiento de los primordios y fructificación, se presentaron las más altas actividades enzimáticas celulolíticas.

Se observa que en las tres corridas, no se obtiene extractos con actividad ligninoperoxidásica. La actividad manganeso peroxidásica no presenta una relación directa con el crecimiento del hongo y tiene valores bajos, este comportamiento podría deberse a que las ligninasas son consideradas metabolitos secundarios, los mismos que se generan para degradar la lignina que recubre a la celulosa para permitir la accesibilidad enzimática al resto de materiales celulósicos y permitir que el hongo crezca [14]. La ausencia de las ligninasas estudiadas, sugiere que existen otras enzimas responsables de la degradación de lignina, como por ejemplo la laccasa [20].

#### 3.4. Análisis y determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas de las tres corridas de fermentación del hongo *Lentinusedodes*

Para determinar los períodos de mayor generación de las actividades enzimáticas estudiadas, se comparó la cinética de generación de cada una de las tres actividades enzimáticas y los picos máximos de actividad enzimática, con los períodos de crecimiento del hongo.

En la Tabla 4 se presenta el valor promedio de las actividades enzimáticas y los días en los cuales se obtuvieron estos valores.

**Tabla 4.** Tiempos y valores de máxima generación enzimática durante la fermentación del hongo *Lentinusedodes*

Día	Actividad enzimática promedio (UI)		
	Celulolítica	Ligninoperoxidásica	Manganesoperoxidásica
Inicial	0,2237	$2,97 \times 10^{-3}$	$1,11 \times 10^{-3}$
Crecimiento del micelio	0,1505	$5,90 \times 10^{-3}$	$5,31 \times 10^{-2}$
Primera cosecha	0,3042	$4,06 \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-2}$
Post-inducción	0,1652	$2,07 \times 10^{-3}$	$2,57 \times 10^{-2}$
Final	0,2424	$9,43 \times 10^{-3}$	$2,23 \times 10^{-3}$

De los resultados tabulados se tiene que el máximo valor de actividad enzimática celulolítica se presentó el día de la primera cosecha y el menor valor de actividad enzimática celulolítica se obtuvo el día en el cual el micelio cubrió completamente el sustrato. Como se analizó anteriormente la actividad enzimática celulolítica estuvo presente durante todo el proceso de desarrollo del hongo *Lentinusedodes* y este comportamiento corresponde a los resultados esperados, pues esta enzima se deriva de la actividad metabólica primaria de los microorganismos. Según lo expresado por Montoya [16], los hongos de pudrición blanca dentro de sus requerimientos nutricionales prefieren la celulosa y hemicelulosa como fuente de energía, y en presencia de estos compuestos secretan celulasas.

La actividad enzimática ligninoperoxidásica promedio es mayor en el último día del proceso fermentativo. Se puede observar que la actividad es muy baja durante todo el proceso y aumenta ligeramente al final del desarrollo del micelio. En trabajos realizados por Montoya [16] para la fermentación del hongo *Grifola frondosa* en residuos sólidos se encontró un comportamiento similar, la máxima actividad ligninoperoxidásica se presentó al final de la fermentación, comportamiento atribuible al de un metabolito secundario.

El máximo valor promedio de actividad enzimática manganeso peroxidásica se presentó el día de crecimiento del micelio y el menor valor promedio de producción de esta enzima se tuvo el día inicial, comportamiento esperado, pues la enzima manganeso peroxidasa es una enzima ligninolítica que para la mayoría de hongos de pudrición blanca se produce en los primeros días de fermentación, entre la fase de adaptación y la fase de desarrollo miceliar, ya que para el desarrollo del hongo *Lentinusedodes* debe descomponer primero la lignina en mayor proporción que la celulosa [19].

Los valores de actividad enzimática lignino y manganeso peroxidásica producidos por el hongo *Lentinusedodes* no fueron altos, y esto coincide con la descripción de Pérez y Jeffries [20], quienes señalaron que la laccasa es la enzima ligninolítica encontrada con mayor frecuencia en los hongos de pudrición blanca.

Debido a que la mayor generación enzimática se da para las enzimas celulolíticas cuya máxima generación ocurre en el período de cosecha del hongo, esta enzima es la que puede tener aplicabilidad comercial, ya que se extrae del sustrato fermentado después de la cosecha, sin interferir con el

desarrollo del hongo, para que de esta manera se puedan obtener tanto los cuerpos fructíferos como los extractos enzimáticos y conseguir así un aprovechamiento integral del proceso fermentativo.

### 3.5 Estudio de la estabilidad de los extractos con actividad celulolítica

El estudio de la estabilidad se realizó para dos modelos matemáticos: orden cero y orden uno. Para los dos modelos se determinaron las constantes de deterioro  $k$  para cada temperatura. El efecto de la temperatura mediante el cálculo de la energía de activación  $E_a$ .

En la tabla 5 se presentan los resultados de la actividad enzimática celulolítica en función del tiempo.

A temperatura ambiente se observa una mayor disminución de los valores de actividad enzimática de los extractos, que para las otras temperaturas de análisis. A temperatura de refrigeración se tuvo que la actividad enzimática celulolítica disminuyó pero en menor proporción que a temperatura ambiente y en mayor proporción que a temperatura de congelación, resultados esperados ya que conforme se disminuye la temperatura, se detienen las reacciones químicas asociadas al deterioro de las sustancias [11].

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

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

En la Tabla 6 se presentan los datos de las constantes de reacción, los coeficientes de regresión lineal y el valor de la energía de activación obtenidos al almacenar los extractos a tres temperaturas diferentes y al haber analizado estos datos como reacción de orden cero y primer orden.

**Tabla 6.** Variación de la actividad enzimática celulolítica en función del tiempo de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

Temperatura (°C)	ORDEN CERO			ORDEN UNO		
	k (UI/día)	R <sup>2</sup>	E <sub>a</sub> (kJ/mol)	k (UI/día)	R <sup>2</sup>	E <sub>a</sub> (kJ/mol)
15,5	0,0035	0,9104	6,681	0,0169	0,9459	11,164
3	0,0028			0,0121		
-14	0,0025			0,0097		

Se observa que el valor del coeficiente de regresión para el modelo de deterioro de orden uno es mayor que el coeficiente correspondiente al deterioro de orden cero, un resultado esperado, ya que la mayoría de procesos de degradación enzimática corresponden a modelos de primer orden [11].

### 3.6 Estudio de la estabilidad de los extractos con actividad ligninoperoxidásica

El estudio de la estabilidad de los extractos con actividad ligninoperoxidásica se realizó con los mismos criterios que los empleados para la actividad celulolítica, es decir, se almacenaron los extractos a tres temperatura, se determinó la variación de la actividad en función del tiempo y con esos datos se determinaron las constantes de deterioro  $k$ , y la energía de activación  $E_a$ , mediante regresiones lineales.

En la tabla 7 se presentan los resultados de la actividad enzimática manganeso peroxidásica en función del tiempo.

Al igual que para la actividad celulolítica se tiene que el almacenamiento en congelación produce una menor pérdida de actividad enzimática, lo que significa que a -14 °C los extractos son más estables.

**Tabla 7.** Variación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica en función del tiempo de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

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

En la Tabla 8 se presentan los datos de las constantes de reacción, los coeficientes de regresión lineal y el valor de la energía de activación, obtenidos al almacenar los extractos con actividad manganeso peroxidásica a tres temperaturas diferentes y al haber analizado estos datos como reacción de orden cero y primer orden.

**Tabla 6.** Variación de la actividad enzimática peroxidásica en función del tiempo de los extractos almacenados a 15,5 °C, 3 °C y -14 °C

Temperatura (°C)	ORDEN CERO			ORDEN UNO		
	k (UI/día)	R <sup>2</sup>	E <sub>a</sub> (kJ/mol)	k (UI/día)	R <sup>2</sup>	E <sub>a</sub> (kJ/mol)
15,5	0,0012	0,8441	1,888	0,0299	0,9982	9,399
3	0,0012			0,0245		
-14	0,0011			0,0189		

En este caso, al analizar el coeficiente de regresión, se observa que la pérdida de la actividad enzimática obedece a una reacción de orden uno, como era esperado.

## 4. CONCLUSIONES

Los valores máximos de actividad enzimática celulolítica en todas las corridas de fermentación del hongo *Lentinusedodes* se presentaron en los días de la primera cosecha con un valor promedio de 0,3042 UI; y en el día de la segunda cosecha (o

último día de fermentación) con un valor promedio de 0,246 UI.

La máxima actividad celulolítica se obtuvo en el periodo de cosecha. Se observó que la generación de actividad celulolítica está íntimamente relacionada con el crecimiento del hongo y sus requerimientos nutricionales.

En el proceso de fermentación del hongo *Lentinusedodes* se generó una mínima cantidad de ligninoperoxidasa, el máximo valor promedio obtenido fue de  $9,43 \times 10^{-3}$  UI correspondiente al último día de fermentación.

La máxima actividad enzimática ligninoperoxidásica parecería no haber estado relacionada con un periodo específico de crecimiento del hongo y finalmente.

La máxima producción de la enzima manganeso peroxidasa estuvo asociado a la fase de desarrollo del micelio ya que en dicho periodo se presentaron los valores máximos de producción de esta enzima, con un valor promedio de  $5,31 \times 10^{-2}$  UI.

Los extractos enzimáticos con actividad celulolítica y manganeso peroxidásica son más estables cuando se almacenan a temperaturas de congelación, seguido del almacenamiento en refrigeración y son menos estables cuando se almacenan a temperatura ambiente.

El estudio de estabilidad de los extractos con actividad celulolítica y manganeso peroxidásica parecen obedecer a un modelo de deterioro de primer orden.

El valor de la energía de activación para la estabilidad de la actividad enzimática celulolítica ajustada a un modelo de primer orden fue de 11,164 kJ/mol.

El valor de la energía de activación para la estabilidad de la actividad enzimática manganeso peroxidásica ajustada a un modelo de primer orden fue de 9,399 kJ/mol.

## REFERENCIAS

- [1] E. Abadulla, T.Tzanov, S. Costa, KH. Robra, A. Cavaco-Paulo y Gübitz, (2000), Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Application Environ Microbiol*, 66, pp. 3357-3362.
- [2] M.Barba, "Influencia de la antigüedad de la cepa en el rendimiento del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*". Ensayos de fructificación del hongo comestible *Lentinusedodes*", Proyecto de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico. EscuelaPolitécnicaNacional, Quito, Ecuador, 1998.
- [3] P. Béguin y M. Lemaire, (1996), The Cellulosome: An Exocellular, Multiprotein Complex Specialized in Cellulose Degradation. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*, 31 (3), pp. 201-236.
- [4] J. Braverman, Enzimas. Berk Z. (Ed.). *Bioquímica de los Alimentos*. México D.F., México: Editorial el Manual Moderno S.A, 1990 pp. 30-45.
- [5] J. Carrión, "Estudio del efecto de la adición de azúcar y rastrojo de maíz en el rendimiento del cultivo del hongo comestible *Lentinusedodes* en dos sustratos". Proyecto de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico. EscuelaPolitécnicaNacional, Quito, Ecuador, 2000.
- [6] S. Couto, y J. Herrera, (2006), Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *BiotechnolAdvantaces*, 24(1), pp. 500-513
- [7] N. Curvetto, D. Figlas, M. González y S. Delmastro, (2004), Cáscaras de semilla de girasol. *Mushroom Growers' Handbook*, (2)1, pp. 127-133. [online]. Disponible en: <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/>.
- [8] J. Grant, "Manual sobre la fabricación de pulpa y papel", primera edición, Compañía Editora Continental, Méjico, Méjico, 1966 p. 678.
- [9] T. Ghose, (1987), Measurement of Cellulase Activities, *Pure & Applied Chemistry*, 59 (2), pp. 257-268.
- [10] C. Israilides y A. Philippoussis, (2003), Bio-technologies of recycling agro-industrial wastes for the production of commercially important polysaccharides and mushrooms. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 20(4), pp. 247-259.
- [11] T. Labuza y D. Riboh, (1982), Theory and application of Arrhenius kinetics the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technology*, 46 (10), pp. 66-74.
- [12] L. Lynd, P. Weimer, W.Zyl y I. Pretorius, (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *MicrobiolMol Bio Rev*, 66(4), pp. 506-577.
- [13] P. Lopes, M. Teixeira, A. Nunes y L. Durrant (2009), Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, pp. 818-826.
- [14] A. Martínez, M. Speranza, F. Ruiz-Dueñas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillén, M. Martínez, A. Gutiérrez y J. del Río, (2005), Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin, *International Microbiology*, 8, pp. 195-204.
- [15] M. Miller y S.C. Jong, (1987). Commercial cultivation of shiitake in sawdust filled plastic bags. *Crop Science: Cultivating Edible Fungi*, 10(10), pp. 421-426.
- [16] S. Montoya, "Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola Frondosa*". Tesis de Grado - Maestría en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Manizales-Colombia, 2008.
- [17] D. Moore, *Fungal Morphogenesis*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press, 1998, p. 159.
- [18] M. Morais, A. Ramos, A. Matos y E. Santos, (2000). Production of shiitake mushroom (*Lentinusedodes*) on lignocellulosic residues. *Food science and Technology International*, 6(2), pp. 123-128. [online], Disponible en: <http://fst.sagepub.com/content/6/2/123.short>.
- [19] K. Niladevi. "Ligninolytic Enzymes". En "*Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*", P. Singh nee Nigam, A. Pandey Editor, Springer, Irlanda del Norte, Reino Unido, 2009, pp. 398-410.
- [20] J. Pérez y T. Jeffries, (1992). Roles of Manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *App Environ Microbiol*, 58, pp. 2402-2409.
- [21] D. Royse, (2001). Cultivation of Shiitake on Natural and Synthetic Logs. [online]. Disponible en: <http://www.cas.psu.edu>.
- [22] J. Rui, I. Schönsee y D. Barcelo, (1998). Determination of sulfonated dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Journal Mass Spectrom*, 33, pp. 653-663.
- [23] M. Tien y K. Kirk, (1984), Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, pp. 2280 - 2284.
- [24] Y. Villa, "Determinación de la cinética de crecimiento del Hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica en el sustrato a escala de laboratorio", Tesis Previa a la Obtención del título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, 2007.