

Obtención de Extractos Enzimáticos con Actividad Celulolítica y Ligninolítica a Partir del Hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 en Rastrojo de Maíz

Vaca M.*; Izurieta B.*; Espín N.*

*Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria

Quito, Ecuador (Tel: 593-2-2507-144; e-mail: mónica_vp@hotmail.com; bolívar.izurieta@gmail.com; neyda.espin@epn.edu.ec)

Resumen: Se determinaron los días de máxima generación de tres las actividades enzimáticas celulolítica, manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica en los extractos obtenidos durante la fermentación en rastrojo de maíz de las cepas 404 y 2171 del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente. La mayor actividad enzimática obtenida fue la celulolítica, seguida de la manganeso peroxidásica; no se obtuvo actividad lignino peroxidásica. La actividad celulolítica tuvo sus máximos valores en los días de la cosecha del hongo comestible, la actividad manganeso peroxidásica presentó sus máximos valores en el período de desarrollo del micelio. La cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 presentó mayor actividad enzimática.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*; Actividad Enzimática; Lignino Peroxidasa; Manganeso Peroxidasa; Celulasa.

Abstract: The aim of this project was to determine the time of maximum enzymatic activity generation of cellulase, manganese peroxidase and lignin peroxidase in extracts obtained from corn straw fermentation with two strains of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* 404 and 2171. Enzyme activities were determined spectrophotometrically. The highest enzyme activity, obtained for the two strains of fungi, was cellulolytic activity, followed by manganese peroxidase activity. Lignin peroxidase activity was not detected. Cellulolytic activity had its maximum values in the days of the edible mushroom harvest. Manganese peroxidase activity showed the highest values during mycelial period. *Pleurotus ostreatus* strain 2171 showed higher enzymes activities.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; Enzymatic Activity; Lignin Peroxidase; Manganese Peroxidase; Cellulase; Corn Straw.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura y las industrias de alimentos y de papel generan una gran cantidad de desechos lignocelulósicos que constituyen un problema ambiental. Sin embargo, esta gran cantidad de biomasa considerada como desecho, puede convertirse en materia prima para la generación de varios productos de interés comercial mediante la degradación de la lignina y la celulosa.

Los hongos comestibles como el *Pleurotus ostreatus* son degradadores eficientes de lignina y celulosa ya que producen durante su crecimiento enzimas lignocelulolíticas. Por lo tanto, el empleo de desechos agroindustriales como sustrato sólido para el crecimiento del hongo permitiría no solamente obtener un alimento como es el hongo comestible sino también extractos enzimáticos celulolíticos y ligninolíticos del material fermentado residual, lo que daría un gran valor agregado a los desechos agroindustriales.

Las celulasas y enzimas relacionadas se usan en industrias de alimentos, de textiles, de pulpa y papel así como también son empleadas para fines de investigación. Los trabajos sobre este campo se ven incentivados por la demanda cada vez más creciente de enzimas con actividad lignocelulósica [1].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Se utilizaron dos cepas de *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 proporcionadas por el Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional. El rastrojo de maíz utilizado fue obtenido de la ciudad de Atuntaqui, ubicada en la provincia de Imbabura.

Los reactivos empleados fueron: Alcohol veratrílico de Aldrich; Bisulfito de sodio; PDA; MA; Ácido acético y Tartrato sodio y potasio de Fisher; DNS y Tartrato sódico de Sigma; Acetato de sodio; Agua oxigenada e Hidróxido de sodio de Merck; Carboximetilcelulosa de HiMedia Lab.;

Albúmina y Ácido cítrico de J.T.Baker; Fenol y Ácido tartárico de BDH Lab.

2.2 Preparación del inóculo del hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Se duplicaron las cepas 404 y 2171 del hongo *Pleurotus ostreatus* en tubos de ensayo con papa dextrosa agar como medio de cultivo y después en cajas Petri con malta agar. Se incubaron a 25 °C en una estufa marca Boekel Industries INC Modelo 132000, hasta que el micelio cubrió en su totalidad la superficie de la caja. Se prepararon frascos de vidrio de una capacidad de 500 mL, con 120 g de trigo seco y 240 mL de agua, por cada frasco (relación constante 1:2). Los frascos se esterilizaron a 121 °C por 15 min y se inocularon con el hongo. Los frascos se almacenaron en la estufa a 25 °C hasta que el micelio cubrió en su totalidad los granos de trigo. El trigo de los frascos constituyó el inóculo para la siembra en las fundas.

2.3 Caracterización del rastrojo de maíz

Se determinó el contenido de lignina; celulosa; y, resinas, ceras y grasas del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional. Se utilizaron los métodos descritos en el Manual sobre la Fabricación de Pulpa y Papel [7] y las normas TAPPI-T-13-os-54 para determinación de lignina, TAPPI-T-17-m-55 para celulosa, y TAPII-T-6-os-59 para resinas y ceras.

2.4 Desarrollo del micelio, fructificación y cosecha

Se picó el rastrojo de maíz para obtener fracciones entre 3 y 5 cm. Se esterilizó el sustrato en agua a 90 °C, por un período de 1 h, en un autoclave marca New Brunswick, modelo AE15-10.

Se utilizaron fundas plásticas de 17,78 x 25,40 cm (7 x 10 pulgadas), las mismas que se llenaron con capas alternadas de rastrojo de maíz y de inóculo en una relación del 10% del peso total del sustrato contenido en la funda. El peso total en cada funda fue de aproximadamente 0,25 kg.

Se llevaron las fundas a una cámara oscura. Dos veces al día, se controló la aireación y humidificación de la cámara para mantener una humedad relativa superior al 80% y una temperatura entre 16 y 20 °C. Las fundas permanecieron en la cámara oscura hasta el desarrollo completo del micelio.

Las fundas pobladas completamente por el hongo fueron llevadas a una cámara claro-oscuro, para promover el apareamiento de los cuerpos fructíferos, mediante la presencia de luz tenue. Se mantuvieron las condiciones de temperatura 16 y 20 °C y de humedad relativa superior al 80%.

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 de rastrojo de maíz seco en esa funda. Este resultado se expresó en porcentaje. Se reportó, para cada hongo, un promedio de los rendimientos biológicos de todas las fundas cosechadas para cada corrida.

2.5 Obtención de extractos y determinación de las actividades enzimáticas

Para la determinación de la actividad enzimática, se tomaron muestras dos veces por semanas, en cada muestreo se seleccionaron al azar dos fundas para obtener los extractos enzimáticos. El contenido de cada funda se homogeneizó. Para cada análisis enzimático se pesaron 45 g de sustrato fermentado y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL, con 75 mL de la solución tampón, correspondiente a cada ensayo. Se colocaron los frascos erlenmeyer en un agitador marca New Brunswick, por 30 min. Luego se filtró el sustrato y se obtuvo el extracto en el que se determinaron las actividades enzimáticas.

La actividad celulolítica se determinó según el método de Miller [13] [4]. Se utilizó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa al 2% en solución tampón 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, a 50 °C en un baño maría marca Cole Parmer Polystad Modelo 1200-00 Circulator. Se agregaron 3,0 mL de reactivo DNS y se colocó en agua en ebullición por 5 min. Después de hervir, los tubos se trasladaron a un baño de agua fría para detener la reacción. Se agregaron 20 mL de agua destilada a cada tubo y se homogeneizaron las mezclas. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro marca Labomed. Inc. Spectro UV-VIS Double Beam UVD 3500. La concentración de azúcares reductores se calculó mediante la ecuación de regresión, obtenida de una curva patrón con D-glucosa anhidra.

La actividad manganeso peroxidásica fue medida, espectrofotométricamente, de acuerdo con Lopes *et al.* [11]. En un tubo de ensayo de 10 mL se colocaron 0,1 mL de tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 4,5); 0,05 mL de una solución de MnSO₄ 2 mM; 0,20 mL de una solución de albúmina al 0,5% y 0,05 mL de una solución de H₂O₂ 2 mM en tampón 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 ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La actividad lignino peroxidásica fue medida espectrofotométricamente [17] [18]. En un tubo de ensayo de 10 mL se colocaron 0,5 mL de extracto enzimático y se agregaron 0,015 mL de una solución de alcohol veratrílico al 20% en volumen; 9,4 mL de una solución de tartrato de sodio 0,15 M (pH = 3,0); 0,1 mL de una solución de Tween 80 al 10% en volumen y se inició la reacción al añadir 0,02 mL de

una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en volumen. La mezcla se dejó reaccionar en un baño maría marca Julabo SW22, a 30 °C, por 60 min. Se leyó la absorbancia a 310 nm ($\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (UI). Según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM), una UI se define como “aquella cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mmol de sustrato o la formación de 1 mmol de producto por minuto, bajo condiciones definidas” [16]

2.6 Determinación de los períodos de mayor generación de las actividades enzimáticas

Se realizó una primera corrida experimental de fermentación como prueba preliminar para determinar condiciones de muestreo, tiempos de obtención de los extractos y curvas de calibración para la determinación de las actividades enzimáticas. Con base en esta prueba preliminar, se realizaron una segunda y tercera corridas de fermentación para la obtención de los datos definitivos de las tres actividades enzimáticas.

Para cada cepa de hongo, se calcularon las actividades enzimáticas cada muestreo. Para cada cepa de hongo se graficaron las tres actividades enzimáticas calculadas en función del tiempo, para determinar la actividad enzimática que presenta un mayor valor comparada con las otras, y sus tendencias respecto al tiempo de fermentación.

Para la determinación de los períodos de mayor generación de las actividades enzimáticas, para cada cepa de hongo se comparó el gráfico de cada actividad enzimática en función del tiempo con los períodos de crecimiento del micelio y fructificación, así como con los días de cosecha de cada cepa de hongos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización química del rastrojo de maíz

Los resultados de la caracterización química del rastrojo de maíz, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización del rastrojo de maíz

Analito	Resultados (%)
Humedad	9,86
Resinas, ceras y grasas	9,52
Celulosa	41,60
Lignina	18,44
Otros*	20,58

*Obtenido por diferencia

El rastrojo de maíz tiene un contenido alto de lignina y celulosa, por lo que es considerado un residuo agroindustrial lignocelulósico, ideal para la fermentación en medio sólido del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, que es un hongo de pudrición blanca que degrada la lignina y la celulosa. Los hongos de pudrición blanca como el *Pleurotus ostreatus* degradan en primer lugar la lignina presente en la pared

celular y dejan un tejido de color blanco compuesto principalmente de celulosa [3].

El contenido de celulosa del rastrojo de maíz, utilizado en la fermentación, es superior al contenido de lignina del mismo, por lo cual se espera una mayor generación enzimática para la actividad celulolítica, en comparación con la actividad manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica que son específicas en la degradación de la lignina [9].

El hongo *Pleurotus ostreatus* requiere un contenido de humedad en el sustrato entre el 50 y 80 % [3]; debido a que el rastrojo de maíz seco analizado presenta un contenido de humedad de 9,86%, que es muy bajo para el crecimiento del hongo, es necesario hidratarlo, lo que se consigue durante la esterilización del sustrato, cuando se realiza la cocción a 90 °C por 4 horas.

El término otros podría asociarse a otros compuestos como hemicelulosa, pectinas, pentosanas que suelen estar presentes como parte de la composición de las maderas [10]

3.2 Períodos de desarrollo del micelio, fructificación y cosecha

Los períodos de crecimiento del micelio y de fructificación de las dos cepas de hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, así como los días de cosecha con su respectivo rendimiento biológico se muestran en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Períodos de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 404

PARÁMETRO	Tiempo (días)	
	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Período de crecimiento del micelio	0 – 19	0 - 20
Período de fructificación	19 - 39	20 - 35
Primera cosecha	22	20
Rendimiento biológico (g hongo/100 g rastrojo seco)	58,76	59,23
Segunda cosecha	29	31
Rendimiento biológico (g hongo/100 g rastrojo seco)	52,92	52,02

Tabla 3. Períodos crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 2171

PARÁMETRO	Tiempo (días)	
	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Período de crecimiento del micelio	0 – 19	0 - 20
Período de fructificación	19 - 39	20 - 35
Primera cosecha	29	28
Rendimiento biológico (g hongo/100 g rastrojo seco)	59,61	55,67
Segunda cosecha	39	35
Rendimiento biológico (g hongo/100 g rastrojo seco)	50,63	46,85

Para las dos cepas de hongos, el período de crecimiento del micelio dura aproximadamente 20 días, después de los cuales los hongos pasan a la cámara clara-oscura para dar inicio al

período de fructificación. Se observa que la cepa 404 presenta un periodo menor para la primera cosecha (20 – 22 días) y la para la segunda cosecha (29 – 31 días) que el que presenta la cepa 2171, cuyos días de cosecha alcanzan los 28-29 y los 35- 39 días para la primera y la segunda cosecha, respectivamente.

Trabajos previos, realizados por Flores [2] y Pazos [14] para el cultivo sobre rastrojo de maíz del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* 2191, muestran períodos de desarrollo del hongo comestible entre 28 y 46 días para primera y segunda cosecha y resultados de rendimientos biológicos de alrededor del 50%. Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo.

3.3 Determinación de las actividades enzimáticas

En las Figs. 1 y 2 se muestran los valores de las actividades enzimáticas calculadas para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 a diferentes tiempos, durante la fermentación en rastrojo de maíz en la segunda y la tercera corrida de fermentación, respectivamente.

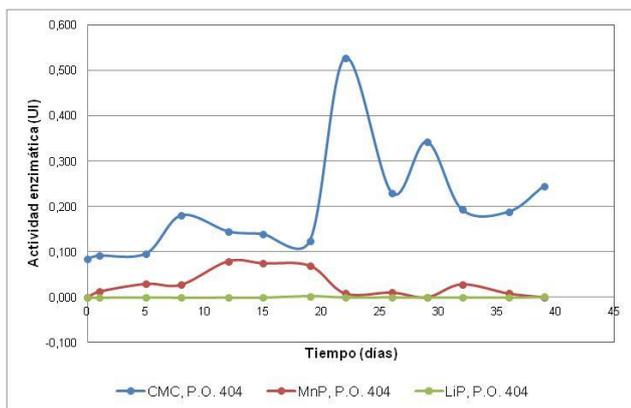


Figura 1. Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404

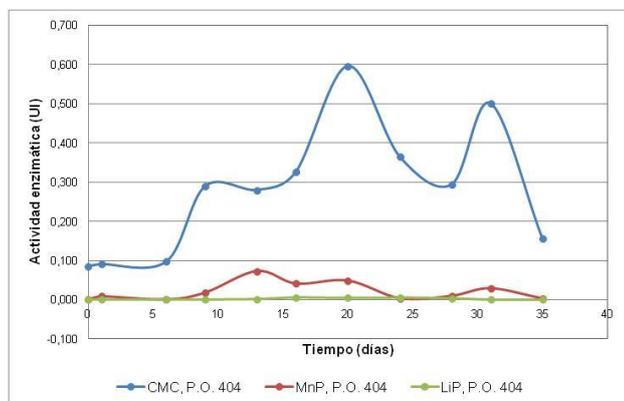


Figura 2. Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404

En las Figs. 3 y 4 se muestran los valores de las actividades enzimáticas calculadas para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 a diferentes tiempos, durante la fermentación en rastrojo de maíz en la segunda y la tercera corrida de fermentación, respectivamente

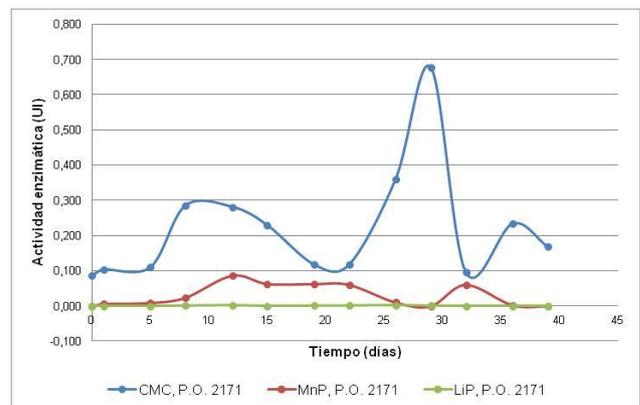


Figura 3. Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171

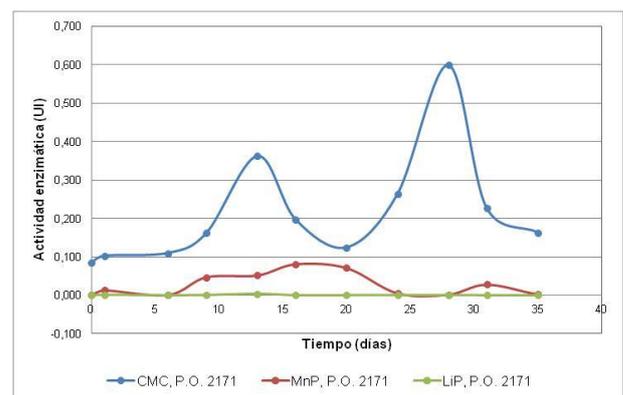


Figura 4. Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171

Al observar estas cuatro figuras, se nota que la actividad enzimática más alta es la actividad celulolítica, seguida de la actividad manganeso peroxidásica mientras que la actividad lignino peroxidásica es prácticamente nula.

Se puede ver que la tendencia de las curvas para todas las enzimas es la misma para las dos cepas de hongo. La diferencia se presenta en los días de máxima generación de las actividades enzimáticas, entre los días 20 y 22 para la cepa 404, y entre los días 28 – 30 para la cepa 2171.

Como ya se mencionó, la tendencia de las curvas para las dos cepas es similar, por lo que al comparar el comportamiento de las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* durante la segunda y tercera corridas de fermentación, se tiene que para las dos cepas en el período de crecimiento del micelio, la actividad manganeso peroxidásica aumenta y se mantiene en sus máximos valores, y cuando se acerca el período de

fructificación y cosecha, esta actividad disminuye y tiende a cero, mientras que la actividad celulolítica presenta sus máximos valores en los días de la cosecha.

De igual manera, al terminar los días de la primera cosecha, la actividad manganeso peroxidásica aumenta nuevamente y la celulolítica disminuye, hasta la segunda cosecha, donde se obtiene un segundo pico máximo en la actividad celulolítica, mientras que la manganeso peroxidásica disminuye hasta tender a cero.

En la segunda corrida de fermentación, para la cepa 404 el valor máximo de actividad celulolítica es de 0,527 UI, alcanzado en el día 22 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor máximo obtenido es de 0,677 UI, en el día 29 de fermentación. En la tercera corrida, para la cepa 404 el valor máximo de actividad celulolítica es de 0,596 UI, alcanzado en el día 20 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor máximo obtenido es de 0,599 UI, en el día 28 de fermentación.

Durante la segunda corrida de fermentación, para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404, el máximo valor de actividad manganeso peroxidásica es de $7,93 \times 10^{-2}$ UI obtenido en el día 12 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor máximo es de $8,63 \times 10^{-2}$ UI alcanzado en el día 12 de fermentación. En la tercera corrida, para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404, el valor de actividad enzimática manganeso peroxidásica máximo es de $7,28 \times 10^{-2}$ UI obtenido en el día 13 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor máximo obtenido es de $8,09 \times 10^{-2}$ UI alcanzado en el día 16 de fermentación.

Los resultados obtenidos son razonables si se asocian con la forma de actuar de los hongos de pudrición blanca. Se sabe que la lignina evita que los materiales lignocelulósicos se hinchen y es responsable por la rigidez e integridad de estos materiales. Además, la presencia de la lignina es responsable de restringir la accesibilidad de las enzimas al material lignocelulósico para su hidrólisis y degradación [8].

Para los hongos de pudrición blanca como el *Pleurotus ostreatus*, se han propuesto dos mecanismos de degradación de los materiales lignocelulósicos. En el primer mecanismo se degrada la lignina, celulosa y hemicelulosa simultáneamente. En el segundo mecanismo, se degrada en primer lugar la lignina y hemicelulosa presentes en el sustrato, para luego permitir la degradación de la celulosa. En el segundo mecanismo de degradación, la lignina es degradada en la primera etapa del crecimiento del hongo para permitir la accesibilidad enzimática al resto de materiales celulósicos [12].

De acuerdo con las determinaciones realizadas, la actividad manganeso peroxidásica se mantiene en valores altos hasta la etapa de fructificación. Una vez alcanzada la etapa de fructificación, esta actividad ligninolítica disminuye y produce un aumento de la actividad celulolítica. Estos resultados indicarían que la lignina sería degradada previamente, y después el hongo, para desarrollar el cuerpo fructífero, empezaría a degradar la celulosa para obtener los azúcares necesarios para su crecimiento.

La actividad lignino peroxidásica en ninguno de los casos presenta valores altos, en comparación con las otras actividades medidas, sino que se mantiene con valores que

tienden a cero. En trabajos realizados, mediante fermentación en medio sólido con *Pleurotus ostreatus*, por Gupte *et al.* [6], Guillén-Navarro *et al.* [5], Vyas y Molitoris [19] no se detectó actividad enzimática lignino peroxidásica para el hongo *Pleurotus ostreatus*. Gupte *et al.* [6] utilizaron como sustrato paja de trigo, paja de arroz, rastrojo de maíz y cáscaras de coco. Guillén-Navarro *et al.* [5], trabajaron con cultivo en medio sólido en un biorreactor con sustrato sólido compuesto por dextrosa, extracto de levadura y agar. Vyas y Molitoris [19] trabajaron con fermentación en medio sólido con paja como sustrato. En los tres trabajos realizados, la actividad lignino peroxidásica también se midió por el método de Tien y Kirk [17].

La falta de actividad lignino peroxidásica en el hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 sugiere que existen otras enzimas responsables de la producción de radicales libres en la degradación de la lignina por estas cepas de hongo. Así, la Pérez y Jeffries [15], mencionan que la laccasa es la enzima ligninolítica encontrada con mayor frecuencia en los hongos de pudrición blanca.

3.4. Determinación de los períodos de mayor generación de las actividades enzimáticas

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 las Tablas 6 y 7 se muestran los períodos de mayor generación enzimática.

La actividad lignino peroxidásica no presenta un período definido de generación al comparar ambas corridas, y sus valores tienden a ser cero para ambas cepas.

Tabla 6. Tiempos y valores de máxima generación enzimática para el *Pleurotus ostreatus* cepa 404

PARÁMETRO	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Máxima actividad celulolítica	0,527 UI	0,596 UI
	22 días	20 días
Máxima actividad manganeso peroxidásica	$7,93 \times 10^{-2}$ UI	$7,28 \times 10^{-2}$ UI
	12 días	13 días
Máxima actividad lignino peroxidásica	$2,33 \times 10^{-3}$ UI	$5,68 \times 10^{-3}$ UI
	19 días	16 días

Tabla 7. Tiempos y valores de máxima generación enzimática para el *Pleurotus ostreatus* cepa 2171

PARÁMETRO	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Máxima actividad celulolítica	0,677 UI	0,599 UI
	29 días	28 días
Máxima actividad manganeso peroxidásica	$8,63 \times 10^{-2}$ UI	$8,09 \times 10^{-2}$ UI
	12 días	16 días
Máxima actividad lignino peroxidásica	$1,86 \times 10^{-3}$ UI	$3,94 \times 10^{-3}$ UI
	26 días	13 días

Al comparar las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* utilizadas, se observa que la cepa 2171 presenta mayores actividades enzimáticas tanto celulolítica como manganeso peroxidásica.

Debido a que la mayor generación enzimática se da para las enzimas celulolíticas cuya máxima generación se da en el período de cosecha del hongo, esta enzima es la que podría 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.

4. CONCLUSIONES

La actividad enzimática de acción celulolítica es más representativa, comparada con la actividad de acción ligninolítica, para las cepas 404 y 2171 del hongo *Pleurotus ostreatus*. Los extractos enzimáticos obtenidos están más orientados a actuar sobre la celulosa.

La actividad celulolítica para las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* aumenta a medida que avanza el tiempo de fermentación, hasta llegar a un punto máximo en la primera cosecha del hongo comestible. Después de la cosecha, la actividad disminuye y vuelve a presentar una tendencia creciente, con un segundo pico en la segunda cosecha del hongo comestible. A pesar de que la cepa 2171 crece más lenta que la 404, presenta mayores actividades enzimáticas.

La cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 presenta un pico máximo de actividad celulolítica en la segunda corrida, correspondiente a 0,527 UI, alcanzada en el día 22 de fermentación. En la tercera corrida se tiene un pico actividad celulolítica de 0,596 UI, alcanzada en el día 20 de fermentación.

La actividad celulolítica para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 muestra un pico máximo de actividad celulolítica de 0,677 UI, alcanzada en el día 29 de fermentación. En la tercera corrida se tiene una actividad celulolítica de 0,599 UI, alcanzada en el día 28 de fermentación.

Se observa que la actividad manganeso peroxidásica aumenta en la etapa de fructificación y se mantiene en los máximos valores hasta los días de la cosecha, luego de los cuales disminuye y se vuelve casi nula. Después se obtiene un nuevo aumento de la actividad en la etapa previa a la segunda cosecha, después de la cual vuelve a disminuir hasta llegar a valores cercanos a cero, durante los días de la segunda cosecha.

La cepa 404 de *Pleurotus ostreatus* presenta un pico máximo de actividad manganeso peroxidásica alrededor de los días 12 y 13 de fermentación, en las dos corridas de fermentación.

La actividad manganeso peroxidásica para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 es máxima en los días de fermentación 12 y 16 para la segunda y tercera corrida, respectivamente.

Las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* estudiadas, no generan actividad lignino peroxidásica, ya que los valores de esta fueron casi nulos en todos los casos estudiados.

La actividad celulolítica presenta sus máximos valores en los días de la cosecha, con el pico máximo el día de la primera cosecha.

REFERENCIAS

- [1] M. Bhat, (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, pp.355-386
- [2] C. Flores, "Estudio de la cinética de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 2191 en rastrojo de maíz", Tesis Previa a la Obtención del título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, 2005.
- [3] J. Garzón y J. Cuervo, (2008), Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia, *NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 6 (10), pp. 126-140
- [4] T. Ghose, (1987), Measurement of cellulase activities, *Pure & Applied Chemistry*, 59 (2), pp. 257-268.
- [5] G. Guillén-Navarro, F. Márquez-Rocha, y J. Sanchez-Vázquez, (1998), "Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido", *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, pp. 302-306.
- [6] A. Gupte, S. Gupte y H. Patel, (2007), "Ligninolytic enzyme production under solid-state fermentation by white rot fungi", *Journal of Scientific & Industrial Research*, 66, pp. 611-614.
- [7] J. Grant, "Manual sobre la fabricación de pulpa y papel", primera edición, Compañía Editora Continental, Méjico, Méjico, 1966 p. 678.
- [8] I. Khalil, M. Hoque, M. Basunia, N. Alam y A. Khan, (2011), Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass, *Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBITAK)*, 35, pp. 333-341.
- [9] T. Kirk, y R. Farrel, (1987), Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin, *Annual reviews of Microbiology*, 41, pp. 465-505.
- [10] D. Klemm, H. Schmauder y T. Heinze, (2002), Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, *Biopolymers, Vol.* , Wiley / VCH, Alemania, pp. 275-319
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] G. Miller, (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-429.
- [14] D. Pazos, "Estudio de la influencia del tamaño del reactor en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 2191 sobre rastrojo de maíz", Tesis Previa a la Obtención del título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, 2004.
- [15] 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
- [16] E. Racker, (1958), International Unit of Enzyme Activity, *National Academy of Sciences-National Research Council, Science*, 128, pp. 19-20.
- [17] M. Tien y K. Kirk, (1984), Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, pp. 2280 - 2284.
- [18] 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.

- [19] B. Vyas y H. Molitoris, (1995), Involvement of an extracellular H_2O_2 -dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of remazol brilliant blue, *R. Appl. Environ. Microbiol.*, 61, pp. 3019-3027