

Obtención de extractos enzimáticos con actividad ligninolítica en un fermentador de bandejas con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*

Almeida E.*; Espín N.*

*Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito, Ecuador
e-mail: edu_almeida_ben@hotmail.com; neyda.espin@epn.edu.ec

Resumen: Se estudió la actividad enzimática de lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) en extractos obtenidos de la fermentación de aserrín de eucalipto con *Phanerochaete chrysosporium* a escala de laboratorio en frascos de 250 g y en un fermentador de bandejas, con 3 960 g de aserrín, 72 % de humedad, inóculo del 10 %, 30 °C, y flujo de aire de 0.19 L/s, durante 4 días. Las actividades de LiP y MnP se incrementan inmediatamente después de la inoculación, son máximas en el primer o segundo día y luego descienden. La actividad enzimática de la LiP es mayor. A escala de laboratorio los valores obtenidos son 4 a 5 veces mayores.

Palabras clave: *Phanerochaete chrysosporium*, lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), fermentación en medio sólido, enzimas

Abstract: Enzyme activity of Lignin peroxidase (LiP) and Manganese Peroxidase (MnP) obtained from sawdust fermentation with *Phanerochaete chrysosporium* was studied using lab flasks of 250 g and a tray fermentor with 3 960 g sawdust, 72 % humidity, 10 % inoculum, 30 °C and air flow of 0.19 L/s, for 4 days. LiP and MnP activities increase immediately after inoculation; are greatest at the first or second day, and then decrease. LiP activity is higher. Lab scale produces higher activities than tray fermentation.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), solid fermentation, enzymes.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de enzimas lignocelulósicas es una alternativa muy rentable para aprovechar los desechos lignocelulósicos debido a la gran cantidad de aplicaciones industriales de las enzimas. Las ligninasas se emplean en la obtención de bioetanol, porque optimiza el proceso y abarata costos [19].

En la industria papelera, el uso de enzimas es conveniente porque las condiciones de operación son menos severas, no generan productos indeseados y son amigables con el ambiente [10]. En el campo de la biorremediación, se emplean enzimas ligninolíticas debido a que son catalíticamente activas sobre una gran variedad de compuestos orgánicos, como fenoles clorinados, plaguicidas, dioxinas, explosivos aromáticos y colorantes [5].

El tratamiento enzimático de efluentes presenta ventajas sobre los métodos tradicionales como: degradación de materiales recalcitrantes, operación dentro de un amplio rango de concentraciones de los contaminantes, pH, temperaturas, salinidad y fácil control del proceso [9].

La fermentación en sustrato sólido, FSS, de los desechos lignocelulósicos con hongos filamentosos, para países en vías de desarrollo podría resultar una alternativa viable para la producción de enzimas se refiere, ya que se emplean desechos como medio de cultivo, el equipo no requiere una inversión alta, lo que permitiría minimizar costos de producción. Por esta razón, el presente trabajo está orientado, al estudio de la producción de extractos con posible actividad enzimática ligninolítica, a partir de la fermentación en medio sólido con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* con aserrín de eucalipto como sustrato.

Se realizó el estudio a escala de laboratorio en frascos de 250 g y en un fermentador de bandejas con el objetivo de determinar los días de máxima generación de actividad lignino peroxidásica (LiP) y manganeso peroxidásica (MnP) presentes en los extractos, durante el proceso fermentativo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Se utilizó una cepa de *Phanerochaete chrysosporium*

proporcionada por el Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional.

El aserrín de eucalipto utilizado como sustrato fue obtenido de un aserradero de la ciudad de Ibarra el aserrín de maderas tropicales fue obtenido de la empresa Endesa Botrosa.

Los reactivos grado analítico empleados fueron: Alcohol veratrílico de Aldrich, Tartrato de sodio y Ácido acético de Sigma, Ácido tartárico y Fenol de DBH Laboratories, Tween 80 de Life, Acetato de sodio, Agua Oxigenada e Hidróxido de sodio de Merck, Albúmina de JT Baker, Sulfato manganoso monohidratado de Mallinckrodt, Malta Agar de Difco.

2.2 Preparación del inóculo primario del hongo *Phanerochaete chrysosporium*

La cepa del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, se duplicó en erlenmeyers con malta agar. Se incubaron a 30 °C en una estufa marca Boekel Industries INC Model 132000, hasta que el micelio cubrió en su totalidad la superficie de la caja. Con el hongo se inoculó un medio de cultivo de malta agar enriquecido con un 0.7 % de aserrín en peso, contenido en cajas Petri. Estas se almacenaron dentro de la estufa a 30 °C, durante 21 días, hasta que el micelio del hongo cubriera toda la superficie del agar en la caja. El hongo de estas cajas Petri fue utilizado como inóculo durante toda la experimentación.

2.3 Preparación del sustrato e inoculación del aserrín a escala de laboratorio

En frascos de vidrio de 500 mL, se colocaron 70 g de aserrín seco y 140 mL de agua (relación 2:1 agua: aserrín seco). Se esterilizaron los frascos en un autoclave marca New Brunswick, modelo AE15-10, a 121 °C durante 15 min. Una vez fríos, de 30 a 40 °C, se realizó la inoculación del sustrato en una cámara de flujo laminar, marca Laminar Cabin flow 85 H. La inoculación se realizó de la siguiente manera: se cortó asépticamente el micelio y el agar desarrollado en las cajas petri en ocho partes iguales. Se tomaron cuatro partes opuestas entre sí y se colocaron en la superficie de cada frasco; el inóculo se colocó con el hongo hacia el aserrín, en la parte superior del frasco, y se cubrió con una capa del aserrín. Se cerraron los frascos no herméticamente para poder permitir la entrada y salida de gases al frasco. Los frascos se incubaron durante cinco semanas a 30 °C.

2.4 Muestreo y obtención de extractos enzimático a escala de laboratorio

Se muestrearon cuatro frascos, diariamente desde el día de la siembra durante 5 días. A cada frasco se añadieron 70 mL de la solución buffer correspondiente a cada ensayo de determinación de las actividades enzimáticas, es decir, solución buffer de tartrato de sodio para la ligninoperoxidasa y buffer de acetato de sodio para la manganoperoxidasa. Se utilizaron dos frascos para cada ensayo.

Los frascos fueron colocados en un agitador New Brunswick, durante 30 min; luego se filtró el contenido de cada frasco con una bomba de vacío. Se obtuvo de 60 a 70 mL de cada extracto enzimático, que se clarificaron por centrifugación a 1509 gravedades, durante 15 min, en una centrifuga marca Thermo IEC HN SII. Se midieron las actividades enzimáticas correspondientes para cada uno de los cuatro extractos elaborados.

2.5 Descripción del fermentador de bandejas

En la Fig. 1, se presenta el esquema del fermentador de bandejas empleado en la experimentación. Es un armario de madera de 61 X 60.5 X 101 cm (frente, fondo, ancho), recubierto internamente con pintura para facilitar la limpieza. En su interior hay una estructura desmontable de madera en la que se colocan las seis bandejas que pueden deslizarse hacia afuera o adentro del armario; además de un sistema de deflectores para una distribución homogénea del aire. Las bandejas de 32 X 53 cm tienen un marco de madera y una malla metálica fina en el piso que sirve como soporte para el medio de fermentación.

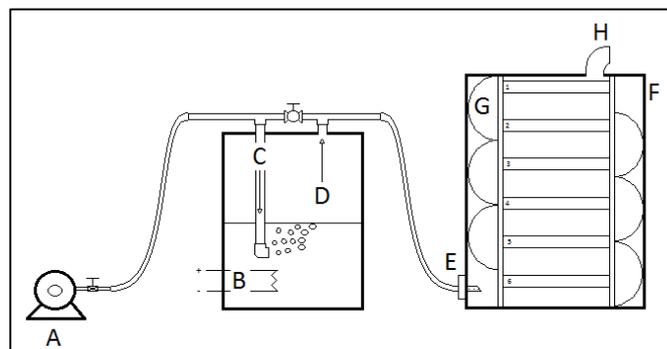


Figura 1. Esquema del equipo utilizado. A: compresor de aire, B: resistencia eléctrica, C: entrada de aire seco, D: salida de aire húmedo y caliente, E: entrada de aire húmedo y caliente, F: fermentador de bandejas, G: deflectores, H: salida de gases

Las condiciones del proceso fermentativo fueron: 3 960 g de aserrín de eucalipto, 72 % de humedad del aserrín, 30 °C de temperatura, y flujo de aire de 0.19 L/s.

2.6 Preparación del inóculo para el fermentador de bandejas

Los inóculos empleados en el proceso de fermentación a escala piloto, se prepararon de igual manera que los frascos empleados a escala de laboratorio, según el procedimiento descrito en el acápite 2. 3.

Todos los inóculos se prepararon el mismo día, por lo tanto, los inóculos tuvieron distintas edades dentro de la cual se encuentran un periodo de incubación y además un periodo de refrigeración. La duración de estos se puede apreciar en la Fig. 2. A los inóculos que no tuvieron periodo de refrigeración se les denominó inóculos frescos y a los que sí tuvieron un periodo de refrigeración, inóculos refrigerados. Los inóculos frescos se utilizaron para las corridas 1 y 2, y los inóculos refrigerados se utilizaron para las corridas 3 y 4.

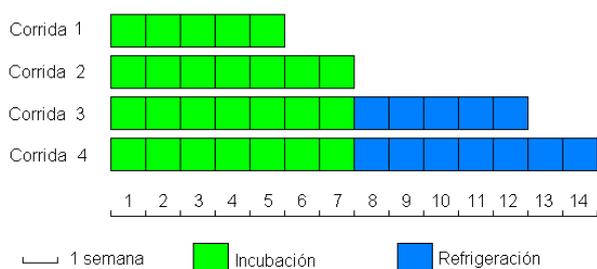


Figura 2. Periodos de incubación y de refrigeración de los inóculos

2.7 Preparación del sustrato e inoculación en el fermentador de bandejas

Se esterilizó aserrín de eucalipto en costales cerrados con vapor de agua a 121 °C durante 30 min. Una vez fríos, se extendió su contenido sobre bandejas metálicas desinfectadas y se colocaron 600 g del aserrín estéril sobre cada una de las seis bandejas del fermentador, procurando un espesor homogéneo de la cama, y se las introdujo en el fermentador para aclimatación.

Se vació el contenido de dos frascos con aserrín de maderas tropicales inoculado con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* sobre una bandeja metálica desinfectada. Se homogenizó y dividió el contenido de cada frasco en tres partes iguales de aproximadamente 65 g, con cada una de las cuales se inoculó el aserrín de eucalipto de cada bandeja ya aclimatada. El peso total de aserrín húmedo e inoculado en las bandejas fue de 660 g.

2.8 Muestreo y obtención de extractos enzimático a escala piloto

Se tomó una muestra de 10 g de sustrato, de cada una de las seis bandejas hasta tener un total de 60 g de sustrato fermentado. El muestreo se realizó diariamente desde el día de la siembra durante 5 días. Para asegurar que la muestra es representativa para todo el contenido del fermentador, en un mismo día se muestreó de los dos mismos puntos elegidos al azar, en todas las bandejas, y de diferentes puntos cada día.

La muestra compuesta se homogenizó, se partió en fracciones de 30 g cada una y se colocó dentro de Erlenmeyers de 250 mL de capacidad. Con cada fracción se obtuvo el extracto enzimático de la misma forma que a escala de laboratorio, para determinar la actividad enzimática.

2.9 Determinación de las actividades enzimáticas

La actividad lignino peroxidásica fue medida espectrofotométricamente [20, 21, 22]. 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 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 MnSO_4 2 mM, 0.20 mL de una solución de albúmina al 0.5 % y 0.05 mL de una solución de H_2O_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 ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La actividad enzimática se reportó 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” [15].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de las actividades enzimáticas de Lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa a escala de laboratorio

En la Fig. 3 se presentan los resultados de la actividad lignino peroxidásica en función del tiempo de fermentación, de los extractos que corresponden a las muestras tomadas desde el momento de la inoculación del sustrato hasta el cuarto día de fermentación. Las unidades de actividad enzimática (U) se presentan por 1000 g de sustrato seco (gss).

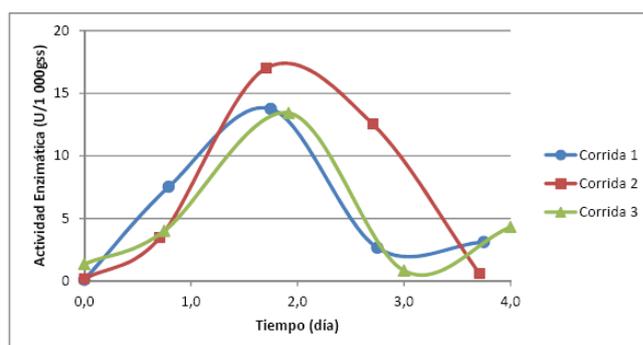


Figura 3. Actividades enzimáticas lignino peroxidásica de los extractos para las tres corridas en frascos

La producción de ligninoperoxidasa presenta un máximo al segundo día de fermentación, con valores de actividad que van desde 13 a 17 U/1000 gss. La actividad enzimática desciende a partir de que alcanza el pico de producción, hasta alcanzar valores cercanos a cero hacia el tercero o cuarto día, para luego incrementar nuevamente a un valor tres o cuatro veces menor al alcanzado en el pico de producción.

Al comparar el presente estudio con el realizado por Villa [22], la tendencia de producción de lignino peroxidasa es diferente. En el estudio de Villa la producción enzimática baja a partir del octavo día de fermentación, con un valor máximo de 0.17 U/1000 g de sustrato sólido, diez veces menor a la obtenida en el presente estudio. Esta diferencia puede deberse a los sustratos utilizados, en el trabajo de Villa se empleó aserrín de maderas tropicales como sustrato, mientras que en este trabajo se utilizó aserrín de eucalipto.

En la Fig. 4 se presentan los resultados de la actividad Manganese peroxidase en función del tiempo de fermentación, de los extractos que corresponden a las muestras tomadas desde el momento de la inoculación del sustrato hasta el cuarto día de fermentación.

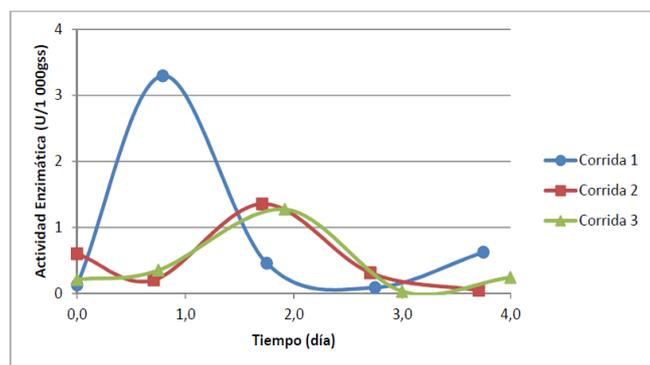


Figura 4. Actividades enzimáticas Manganese peroxidase de los extractos para las tres corridas en frascos

La producción de actividad manganese peroxidase en frascos presenta tendencias diferentes entre sí. En la corrida 1, la producción llega a un pico alto, 3.29 U/1 000 gss, al primer día, a diferencia de las otras dos corridas en las que un máximo de producción se produce al segundo día con valores alrededor de 1.3 U/1 000 gss. Esta diferencia en los resultados obtenidos puede ser consecuencia de la heterogeneidad del sustrato. Del Pilar Castillo *et al.* [6], comprobaron que la presencia de un 1 % de glucosa en el sustrato aumenta un 30 % la actividad de MnP. La cantidad de carbohidratos simples libres en la madera de eucalipto es muy variable dentro de maderas de una misma especie [7], por lo que, el sustrato utilizado para la corrida pudo haber contenido una mayor concentración de azúcares simples, que motivaron la producción de MnP por parte del hongo.

Al analizar el comportamiento de la generación de actividad enzimática manganese peroxidase y lignino peroxidase se puede observar que la actividad enzimática en ambos casos cae a partir de que alcanza su valor máximo. Este comportamiento podría explicarse debido a que existe una producción continua de proteasas por parte del mismo hongo, lo que causaría una inactivación de las enzimas ligninolíticas. Según Cabaleiro *et al.* [2], las proteasas son producidas por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* como parte de su metabolismo primario, y hay otros autores como Dass *et al.* [3] y Dosoretz *et al.* [8], que han demostrado que la producción de proteasas no solo se limita al metabolismo

primario, sino que también transcurre durante el desarrollo del hongo hasta, incluso, durante el metabolismo secundario.

Según Datta [4], la generación de proteasas por parte del hongo, cuando hay carencia de nitrógeno, puede deberse al intento de liberar enzimas de las paredes celulares de la madera, las mismas que estarían en la capacidad de degradar los polímeros de las paredes para, a su vez, liberar nutrientes, como el nitrógeno y azúcares simples.

Es importante mencionar, que sustratos pobres en nitrógeno, como es el caso del aserrín de eucalipto, podría generar otro tipo de enzimas como celulasas, hemicelulasas y proteasas; enzimas ligninolíticas como lacasas, peroxidases y oxidasas [18].

3.2 Determinación de las actividades enzimáticas de Lignino peroxidase en el fermentador de bandejas

En la Fig. 5 se presentan los resultados de la actividad enzimática lignino peroxidase en función del tiempo de fermentación, obtenida para las cuatro corridas realizadas en el fermentador de bandejas.

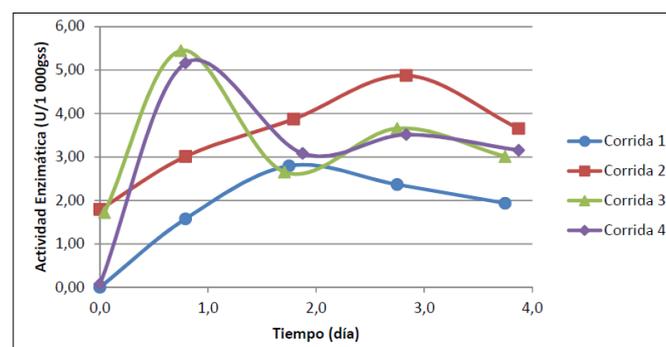


Figura 5. Actividades enzimáticas Lignino peroxidase de los extractos para las cuatro corridas en el fermentador de bandejas

Se puede observar dos tendencias diferentes entre los resultados obtenidos para las cuatro corridas, la tendencia de producción enzimática es similar entre las corridas 1 y 2, y la tendencia también es similar entre las corridas 3 y 4. Sin embargo, hay diferencia entre estos dos tipos de tendencias: en las corridas 3 y 4 la producción alcanza su máximo valor al día uno y luego desciende, más o menos a la misma velocidad con la que subió, hasta casi la mitad de la actividad alcanzada en el máximo, luego la actividad parece que tiende a estabilizarse en el valor alcanzado durante los tres días siguientes. Por otro lado, en las corridas 1 y 2, la producción enzimática se incrementa más lentamente, para alcanzar un máximo al segundo y tercer día, respectivamente para las corridas 1 y 2.

Hacia el final de la fermentación, al día cuarto, según la tendencia con la que la producción de lignino peroxidase llega hasta este punto, la producción enzimática parecería que se estabilizará, en días posteriores. Los valores finales son similares para las corridas 2, 3 y 4, los cuales van de 2.26 a 2.36 U/1 000 gss, estos valores son alrededor de 1 U/1 000 gss mayor que el valor alcanzado al final de la

corrida 1, y a su vez 0.5 U/1 000 gss que el pico de producción alcanzado en la misma corrida 1. Esto lleva a pensar que los tiempos de incubación y almacenamiento en refrigeración de los inóculos influenciarían en el proceso fermentativo y en la generación de actividad enzimática.

En la Fig. 6, se presentan las curvas de actividad enzimática ligninoperoxidásica, para las corridas 1 y 2, realizadas con inóculos de 5 y 7 semanas de incubación, respectivamente.

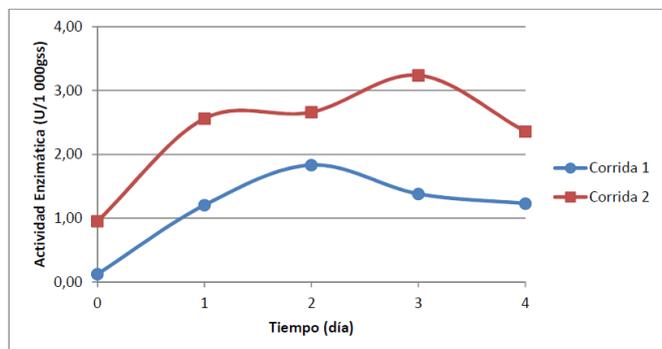


Figura 6. Actividades enzimáticas lignino peroxidásicas de los extractos para las corridas 1 y 2 en el fermentador de bandejas

La producción de enzimas difiere ligeramente, alcanza un máximo en el segundo o tercer día de fermentación y luego disminuye. El máximo valor obtenido es de 3.24 U/1 000 gss, durante la corrida 2. El máximo alcanzado en la corrida 1 es de 1.83 U/1 000 gss, el cual representa, casi la mitad del valor pico de la corrida 2. Los inóculos utilizados para estas dos corridas tuvieron una diferencia de dos semanas en la incubación; para la corrida 1 se utilizó un inóculo con cinco semanas de incubación y para la corrida 2 se ocupó un inóculo con siete semanas de incubación. Esto podría influir sobre la producción enzimática, en la magnitud y en el día de apareamiento del pico de producción, porque mientras más tiempo ha estado el hongo en incubación mayor es su biomasa y una gran cantidad de inóculo asegurará una buena producción de metabolitos secundarios en periodos cortos de tiempo [12].

En la Fig. 7, se grafican las curvas de producción enzimática para las corridas 3 y 4, realizadas con inóculos refrigerados por 5 y 7 semanas, respectivamente, luego de una incubación previa de 7 semanas.

Se puede notar que las dos curvas son muy similares. Los valores máximos de producción enzimática de 3.79 U/1 000 gss y 3.46 U/1 000 gss, son alcanzados al primer día. Luego, al segundo día la producción cae con una velocidad parecida con la cual subió para luego estabilizarse dentro de los tres días posteriores, en valores de 2.23 U/1 000 gss y 2.36 U/1 000 gss respectivamente.

Al analizar los resultados obtenidos en las cuatro corridas, se puede suponer que la producción enzimática podría estar influenciada por el tratamiento sufrido por los inóculos, el mismo que se muestra en la Tabla 1.

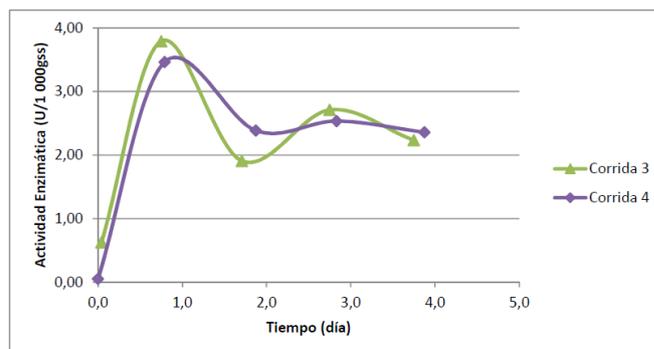


Figura 7. Actividades enzimáticas lignino peroxidásicas de los extractos para las corridas 3 y 4 en el fermentador de bandejas

Tabla 1. Producción pico de LiP según el tratamiento dado a los inóculos utilizados en el fermentador de bandejas

Tratamiento	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4
Incubación (semanas)	5	7	7	7
Refrigeración (semanas)	0	0	5	7
Aclimatación (h)	1	1	1	1
Producción pico de LiP (U/1 000 gss)	1.83	3.24	3.79	3.46
Día de aparición del pico	2	3	1	1

Parecería que cuando el inóculo se ha refrigerado, el hongo ha tenido más tiempo para adaptarse al aserrín y penetrar en su estructura a una mayor profundidad debido a que el modo hifático de crecimiento del hongo filamentosamente incrementa la capacidad de penetración dentro del sustrato sólido [16].

Según el mismo autor, la penetración incrementa la accesibilidad a todos los nutrientes disponibles dentro de las partículas de sustrato y la estructura de la pared celular sujeta a la punta de la ramificación del micelio asegura una estructura firme; entonces, mientras más tiempo haya tenido el hongo para asegurar esta unión, se esperaría una mejor producción enzimática futura ya que se encuentra más arraigado al sustrato.

Al observar la producción y el día de aparición del pico máximo de generación enzimática en función del tiempo de incubación y de refrigeración, parecería que la refrigeración afecta directamente en el día de apareamiento del pico; mientras que la incubación parecería afectar en la concentración de la enzima.

3.3 Determinación de las actividades enzimáticas de Manganese peroxidasa en el fermentador de bandejas

En la Fig. 8 se presentan los resultados de la actividad enzimática Manganese peroxidásica en función del tiempo de fermentación, obtenida para las cuatro corridas realizadas en el fermentador de bandejas.

Se puede apreciar, al igual que en el caso de la producción de actividad lignino peroxidásica, que existen dos tendencias diferentes de producción enzimática. Las corridas 1 y 2 son similares y las corridas 3 y 4 también son similares entre sí.

La tendencia de producción es similar a la ligninoperoxidasa. En las corridas 1 y 2, la producción enzimática sube con una pendiente más reducida, alcanza un máximo al segundo día, y luego baja a una velocidad similar a la observada en la subida; a partir del tercer día hasta el cuarto se observan tendencias diferentes.

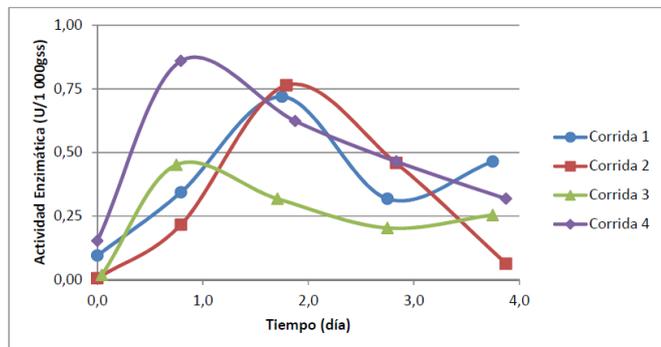


Figura 8. Actividades enzimáticas Manganeso peroxidásica de los extractos para las cuatro corridas en el fermentador de bandejas

Mientras que en las corridas 3 y 4, la producción enzimática se da más rápidamente y alcanza su máximo en el primer día, para luego descender notablemente. Se estima, a partir de los resultados obtenidos por Quintero *et al.* [14], autores que utilizan aserrín como sustrato, que a partir del cuarto día de fermentación, la actividad manganeso peroxidásica subiría hasta alcanzar otro pico de producción enzimática de la mitad del valor alcanzado durante los primeros días, para después, descender y no volver a subir.

En la Fig. 9 se presentan curvas de producción enzimática para las corridas 1 y 2 realizadas con inóculos de 5 y 7 semanas de incubación, respectivamente.

Los máximos alcanzados son de 0.72 y 0.76 U/1 000 gss. La actividad enzimática alcanza un máximo al segundo día, igual que para la lignino peroxidasa ya que las dos enzimas, la manganeso peroxidasa y la lignino peroxidasa, son producidas simultáneamente por el hongo [17]. Al final del proceso de fermentación, la actividad en las dos corridas toma direcciones diferentes. En la corrida 1 la tendencia de la producción va en subida, en la corrida 2, en cambio, se ve que la pendiente es negativa y pronunciada, esta diferencia en las tendencias se podría atribuir a que el sustrato utilizado no es completamente homogéneo y la producción de ligninasas se da según los requerimientos de nutrientes que tenga el hongo. Además que la inoculación del sustrato sólido no siempre será homogénea [12], por lo que se podrían esperar desviaciones entre las corridas.

En la corrida 1, el hongo pudo haber encontrado dificultad para degradar la lignina durante los primeros días, por lo cual, para el cuarto día renueva su producción enzimática. Esto coincide con las observaciones, de Quintero *et al.*[14], autores que encuentran un segundo pico de producción de manganeso peroxidasa 5 días después de haber alcanzado el primero.

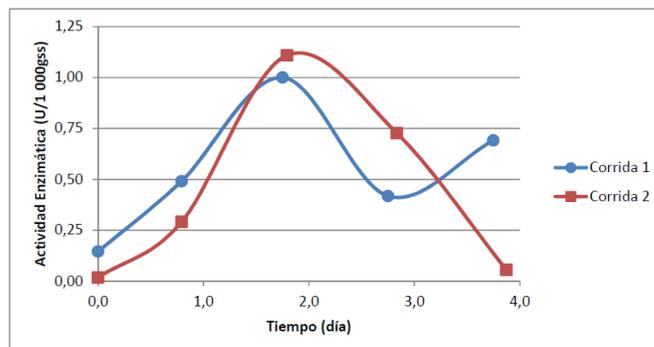


Figura 9. Actividades enzimáticas Manganeso peroxidásica de los extractos para las corridas 1 y 2 en el fermentador de bandejas

En la Fig. 10 se grafican las curvas de producción enzimática para las corridas 3 y 4 realizadas con inóculos de 5 y 7 semanas de refrigeración, respectivamente, luego de una incubación previa de 7 semanas.

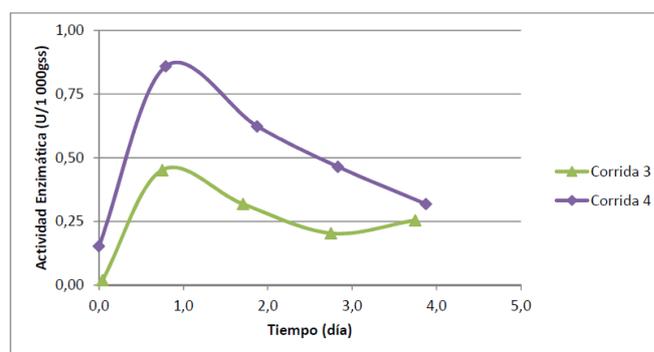


Figura 10. Actividades enzimáticas Manganeso peroxidásica de los extractos para las corridas 3 y 4 en el fermentador de bandejas

La producción de la manganeso peroxidasa obedece a la misma tendencia con la que se produce la LiP en las mismas corridas, pero la magnitud de las actividades enzimáticas difiere mucho; las producciones máximas para las corridas 3 y 4, fueron de 0.45 U/1 000 gss y de 0.86 U/1 000 gss, respectivamente.

La actividad enzimática, cuando desciende desde el máximo lo hace con tendencias similares en los dos casos, posiblemente debido, también, a la posible producción de proteasas, hasta el día 2, donde, la velocidad del descenso en la corrida 3, empieza a disminuir para luego terminar con una tendencia que predice un leve aumento a partir del día 4. El valor de la actividad enzimática final de las dos corridas son similares, 0.36 y 0.45 U/1 000 gss, respectivamente.

En la Tabla 2 se presenta la producción enzimática con respecto a los tiempos de incubación y refrigeración a las que se sometieron los inóculos.

Al observar la producción y el día de apareamiento del pico máximo de generación enzimática en función del tiempo de incubación y de refrigeración, parecería que, a diferencia de lo observado en la producción de lignino peroxidasa, la refrigeración afecta a la concentración de la enzima en el pico

de producción, mientras que la incubación parecería influir en el día del apareamiento del pico.

Tabla 2. Producción pico de MnP según el tratamiento dado a los inóculos utilizados en el fermentador de bandejas

Tratamiento	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4
Incubación (semanas)	5	7	7	7
Refrigeración (semanas)	0	0	5	7
Aclimatación (h)	1	1	1	1
Producción pico de LiP (U/1 000 gss)	0.72	0.76	0.45	0.86
Día de aparición del pico	2	2	1	1

Se deduciría que la refrigeración parece anticipar el apareamiento del pico de producción máxima, ya que cuando los inóculos no fueron refrigerados el pico aparece al día 2 de la fermentación, mientras que en las corridas 3 y 4, en las cuales se utilizaron inóculos refrigerados, el pico aparecen al día 1 de la fermentación. Como lo explica Rimbault [16], el tiempo que haya tenido el hongo para arraigarse dentro del sustrato utilizado para el inóculo facilitará la producción de enzimas durante la fermentación.

Al analizar las Tablas 1 y 2 conjuntamente se puede suponer que cuando el inóculo pasa por un periodo de refrigeración el pico de producción aparece al primer día de la fermentación.

Este hecho puede deberse a que la refrigeración genera estrés sobre el hongo, y este, al ser retirado de dicho estrés, produce las enzimas LiP y MnP, más rápidamente que cuando no se refrigera.

3.4 Comparación entre las escalas de producción

Algunos diseños de bio-reactores han sido probados para una producción eficiente de enzimas fúngicas, algunos reactores han manejado sustratos sumergidos [17] y otros con células inmovilizadas [1]. Poco se ha estudiado sobre la aplicación de bio-reactores en estado sólido para producir enzimas ligninolíticas, y los diseños actuales son escasos. Cuando se desea emplear condiciones sólidas en la producción de enzimas, un estudio sobre el diseño de ingeniería del reactor y el escalado, es absolutamente necesario [17]. En la Tabla 3 se presentan las producciones enzimáticas máximas de cada enzima para cada escala de fermentación.

Tabla 3. Producciones enzimáticas máximas a escala de laboratorio (frascos) y a escala piloto (fermentador de bandejas)

Escala de producción	MnP (U/1 000 gss)	LiP (U/1 000 gss)
Fermentación en frascos	3.296	17.01
Fermentación en bandejas	0.859	3.789

La producción de lignino peroxidasa es mayor que la de manganeso peroxidasa. Resultados diferentes a los presentados por Kerem *et al.* [11] y Quintero *et al.* [14], en donde la producción de Manganeso peroxidasa resulta ser mayor que la ligninoperoxidasa. Esto puede ser el resultado de utilizar una cepa diferente del mismo hongo, o a las variaciones que pudo haber sufrido la cepa en el laboratorio

de Bioprocesos por efectos de su almacenamiento y su tratamiento en la preparación del inóculo. Según Lonsane *et al.* [12], las cepas de los microorganismos son susceptibles a sufrir variaciones en su calidad dependiendo del número de generaciones que esta tenga. Mientras más generaciones se alcanzan, más número de variaciones podrá tener el microorganismo. Cualquier variante producida en una generación, multiplicará su efecto en las generaciones subsiguientes. Este fenómeno puede producir notables efectos sobre fermentaciones en las que el producto de interés no esté asociado con el crecimiento microbiano, es decir si ese trata de un metabolito secundario.

Las condiciones en las que se encontraban los inóculos utilizados para cada escala de fermentación no fueron exactamente iguales. Mientras que para inocular los frascos se utilizó un hongo desarrollado en malta agar, para inocular el aserrín de las bandejas se utilizó un hongo desarrollado en madera. En el agar el hongo tendrá siempre mayor cantidad de nutrientes y de humedad que en la madera.

Según Lonsane *et al.* [12], la esterilización del sustrato puede conducir a que este sufra cambios fisicoquímicos, degradación térmica de algunos nutrientes, formación de compuestos tóxicos y daño de los nutrientes. El aserrín utilizado para la fermentación en frascos fue esterilizado durante 15 min, mientras que el utilizado para el fermentador de bandejas se esterilizó a la misma temperatura durante 30 min. Esta diferencia de tiempo podría haber generado una mayor producción de compuestos tóxicos que inhibirían fuertemente la producción de enzimas por parte del hongo.

4. CONCLUSIONES

La actividad enzimática máxima de lignino peroxidasa fue de 17.01 U/1 000 gss, en frascos, (a escala de laboratorio), y a escala piloto en el fermentador de bandejas fue de 3.79 U/1 000 gss.

La producción enzimática máxima de manganeso peroxidasa en frascos, a escala de laboratorio, fue de 3.296 U/1 000 gss y a escala piloto en el fermentador de bandejas fue de 0.859 U/1 000 gss.

La producción de las enzimas ligninolíticas lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa, por parte del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, en frascos, a escala de laboratorio, es de 4 a 5 veces mayor, que en el fermentador de bandejas.

La tendencia en las producciones enzimáticas de ligninoperoxidasa y manganesoperoxidasa, en las dos escalas de producción analizadas, se comportan de manera similar: inmediatamente después de la inoculación esta sube hasta alcanzar un valor máximo al primer o segundo día y luego descende a un valor de aproximadamente a mitad del valor máximo hacia el cuarto día.

Se puede considerar que en la producción de enzimas ligninolíticas con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*

sobre aserrín de eucalipto, alcanza un máximo de producción un día antes, cuando se utilizan inóculos sometidos a un periodo de refrigeración de 5 a 7 semanas.

5. RECOMENDACIONES

Analizar la cinética de producción enzimática de otras enzimas producidas por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* como la lacasa, CMCasa, CBH y BGL, bajo las mismas condiciones de producción con las que se trabajó en el presente estudio dentro del fermentador de bandejas.

Emplear mezclas de desechos lignocelulósicos en los que se induzca una mayor producción enzimática por parte del hongo *Phanerochaete chrysosporium* bajo fermentación en medio sólido en un fermentador de bandejas utilizando las mismas condiciones de cultivo descritas en el presente estudio.

Analizar la influencia de la temperatura en la cinética de producción de enzimas

Realizar un estudio acerca de la influencia de la edad del inóculo y pretratamientos del mismo sobre la producción enzimática del *Phanerochaete chrysosporium* bajo fermentación en sustrato sólido.

REFERENCIAS

- [1] M. Asgher, M. Asad, y R. Legge, (2006), "Enhanced Lignin Peroxidase Synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* in Solid State Bioprocessing of Lignocellulosic Substrate", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 22, p. 449.
- [2] D. Cabaleiro, S. Rodríguez, A. Sanromán, A., y M. Longo, (2001), "Characterization of Deactivating Agents and Their Influence on the Stability of Manganese-dependent Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 76, p. 867.
- [3] S. Dass, C. Dosoretz, C. Reddy, y H. Grethlein, (1995), "Extracellular Proteases Produced by the Wood-degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Under Ligninolytic and Non-ligninolytic Conditions", *Archives of Microbiology*, 163, p. 254
- [4] A. Datta, (1991), "Purification and Characterization of a Novel Protease from Solid Substrate Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, p. 728.
- [5] G. Dávila y R. Vázquez-Duhalt, (2006), "Enzimas Ligninolíticas Fúngicas para Fines Ambientales", *Mensaje Bioquímico*, Vol. 30, p. 29.
- [6] M. Del Pilar Castillo, P. Ander, y J. Stenström, (1997), "Lignin and Manganese Peroxidase Activity in Extracts from Straw Solid Substrate Fermentations", *Biotechnology Techniques*, Vol. 11, p. 701.
- [7] J. Del Río, A. Gutiérrez, M. Hernando, P. Landín, J. Romero, y A. Martínez, (2005), "Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS", *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 74, p. 110.
- [8] C. Dosoretz, H. Chen, y H. Grethlein, (1990), "Effect of Environmental Conditions on Extracellular Protease Activity in Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*", *Applied and Environmental Microbiology*, 56, p. 395.
- [9] N. Duran, y B. Esposito, (2000), "Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: A Review", *Appl. Catal. B. Ezym.*, 28, p.83.
- [10] R. Howard, E. Abotsi, E. Jansen van Rensburg, y S. Howsrd, (2003), "Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 2, p. 602.
- [11] Z. Kerem, D. Friesem, y Y. Hadar, (1992), "Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, p. 1121.
- [12] B. Lonsane, G. Saucedo-Castaneda, M. Rimbault, S. Roussos, G. Viniegra- Ganozalez, N. Ghildyal, M. Ramakrishna, y M. Krishnaiah, (1992), "Scale up Strategies for Solid State Fermentation", *Process Biochemistry*, 27, p. 259.
- [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] J. Quintero, G. Feijoo, y J. Lema, (2006), "Producción de Enzimas Ligninolíticas con Hongos Basidiomicetos Cultivos Sobre Materiales Lignocelulósicos", *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, Vol. 13, p. 61.
- [15] E. Racker, (1958), International Unit of Enzyme Activity, *National Academy of Sciences-National Research Council, Science*, 128, pp. 19-20.
- [16] M. Rimbault, (1998), "General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation", *Electronic Journal of Microbiology*, [Online] Vol. 1, Available in www.ejb.org.
- [17] I. Rivela, S. Rodríguez-Couto, y A. Sanromán, (2000), "Extracellular Ligninolytic Enzyme Production by *Phanerochaete chrysosporium* in a New Solid-state Bioreactor", *Biotechnology Letters*, Vol. 22, p. 1443.
- [18] F. Ruíz-Dueñas, y Á. Martínez, (2009), "Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this", *Microbial Biotechnology*, Vol. 2, p. 164.
- [19] D. Singh, y S. Chen, (2008), "White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions for the Production of Lignin-degrading Enzymes", *Applications of Microbiology in Biotechnology*, Vol. 81, p. 399.
- [20] M. Tien, y K. Kirk, (1983), "Lignin-degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-requiring Oxygenase", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 81, p. 2280.
- [21] M. Tien, y K. Kirk, (1988), "Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*", *Methods in Enzymology*, Vol. 161, p. 238.
- [22] 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.