

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA

(CBS)

TÍTULO:

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS POR *Trametes* sp. EUM1 EN CULTIVO
SÓLIDO**

TESIS:

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B.I. ARMANDO ORDAZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

MEXICO, D.F

ENERO 2008

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Postgrado del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con No. de Registro 0471-O.

Iztapalapa, D.F. a 18 Enero de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS POR *Trametes* sp. EUM1 EN CULTIVO SÓLIDO**

que presentó

IBI. Armando Ordaz Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral. Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres. Universidad Autónoma Metropolitana

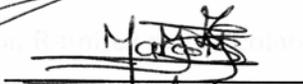
Asesor: Dr. Marcos Meneses Mayo. Colegio de Postgraduados

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres



Secretario: Dr. Marcos Meneses Mayo



Vocal: Dr. Germán Mendoza Martínez



Vocal: Dr. Ascención Ramírez Coronel



AGRADECIMIENTOS

Antes de iniciar, quiero dar gracias a dios por permitirme vivir un día más en este mundo lleno de cosas maravillosas

Agradezco el apoyo de las siguientes instituciones:

- a) Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. 202362)
- b) Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa

Le agradezco a mis padres, Carmen y Francisco, por el apoyo, cariño, y aliento recibido durante mi educación

A mis hermanos, quienes me otorgaron amistad y apoyo para seguir estudiando

A Tere, mi esposa, quien siempre estuvo a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida de manera incondicional. Le agradezco el gran cariño, amor, alegría y comprensión proporcionados

A mis amigos Eric, Roberto, Ricardo y Misael por brindarme apoyo, amistad y momentos de alegría

Al director de tesis, Dr. Octavio Loera, por la paciencia y consejos brindados durante la realización de este trabajo

A los asesores, Dr. Marcos Meneses y Dr. Ernesto Favela, por sus consejos y asesorías

Al Dr. Germán Mendoza y Dra. Ascención Ramírez por su colaboración y atención

La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar (Thomas Chalmers)

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de la temperatura en la producción y productividad de celulasas, xilanasas y lacasas por cultivo sólido, utilizando el hongo *Trametes sp.* EUM1 y el rastrojo de maíz como sustrato. El objetivo, encontrar la temperatura más favorable para la producción de enzimas. Se inició propagando el hongo *Trametes sp.* EUM1 en un medio de cultivo de agar extracto de malta. Después, se evaluó su conservación en agua destilada y a temperatura ambiente durante 5 meses. No se observaron cambios en las características de crecimiento, como alteraciones en la coloración y forma de crecimiento del micelio.

El estudio de producción de enzimas, consistió en evaluar diferentes mezclas de residuos (paja de avena ó de rastrojo de maíz) como fuente de nutrientes, con cachaza como fuente de sales minerales, para el crecimiento del hongo *Trametes sp.* EUM1. Las mezclas fueron, paja de avena ó rastrojo de maíz-cachaza de: 100:0, 90:10 y 80:20 (p/p). La velocidad de crecimiento radial fue mayor sobre las mezclas de rastrojo de maíz-cachaza que con las mezclas de paja de avena-cachaza. La adición de cachaza no tuvo efecto en el crecimiento del hongo para ninguna mezcla evaluada. Se seleccionó el rastrojo de maíz como la mejor fuente de nutrientes para el crecimiento del hongo.

Después, se analizó la extracción de enzimas a partir del rastrojo de maíz durante 15 y 30 min, evaluando dos agentes: agua destilada y amortiguador de citratos (50 mM, pH 5). La extracción con agua y 30 min de tratamiento permitió recuperar la mayor cantidad de celulasas, xilanasas y lacasas. Adicionalmente, con esta metodología fue posible medir los cambios de pH durante el transcurso del cultivo.

También, se evaluó la producción y productividad de celulasas, xilanasas y lacasas, al modificar la temperatura de cultivo de *Trametes sp.* EUM1 de 30 a 45 °C, con incrementos de 5 °C. Con el incremento de temperatura de 30 a 40 °C la producción de celulasas y de xilanasas se elevó 1.6 y 2.8 veces, respectivamente; mientras que la producción de lacasas se incrementó 2.7 veces al modificarse la temperatura de 30 a 35 °C. En estos mismos intervalos de temperatura, la productividad de celulasas y de xilanasas mejoró 2.1 y 3.8 veces, respectivamente; mientras que la productividad de lacasas mejoró 2.3 veces. Entre las aplicaciones que podrían tener estos extractos enzimáticos destaca su uso como aditivos en nutrición de diversas especies pecuarias para mejorar la digestibilidad de los forrajes.

CONTENIDO GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Composición de las fibras de la materia vegetal	1
1.2. Biodegradación de la lignocelulosa.....	2
1.2.1. Hidrólisis de la celulosa.....	2
1.2.2. Hidrólisis de la hemicelulosa.....	3
1.2.3. Oxidación de la lignina.....	4
1.3. Microorganismos que producen enzimas lignocelulolíticas.....	6
1.4. Aplicaciones de las enzimas lignocelulolíticas	6
1.5. Cultivo sólido	7
1.6. Producción de enzimas lignocelulolíticas por cultivo sólido	8
1.7. Factores que afectan la producción de enzimas lignocelulolíticas	10
1.7.1. Sustrato	10
1.7.2. Tamaño de partícula	10
1.7.3. Humedad y actividad de agua.....	11
1.7.4. El pH.....	11
1.7.5. Temperatura.....	11
1.7.6. Temperatura de crecimiento de microorganismos usados en cultivo sólido	13
2. ANTECEDENTES	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO GENERAL	17
5.1. Objetivos específicos.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. Microorganismo	18
6.2. Medio de cultivo	18
6.3. Propagación	18
6.4. Conservación	18
6.5. Viabilidad y velocidad de crecimiento radial	19
6.6. Proporción de residuos agroindustriales.....	20

6.7. Extracción de enzimas	20
7. Cultivo sólido para la producción de enzimas lignocelulolíticas	21
7.1. Medio de cultivo	21
7.2. Inóculo	21
7.3. Condiciones de cultivo	22
7.4. Actividad enzimática	22
7.4.1 Celulasas	22
7.4.2. Xilanasas	23
7.4.3. Lacasas	23
7.5. Determinación de pH y humedad del cultivo	24
7.6. Determinación de proteína extracelular	24
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	25
8.1. Método de conservación	25
8.2. Selección de residuos agrícolas en función a la velocidad de crecimiento radial	27
8.3. Selección del tamaño de partícula	29
8.4. Métodos de recuperación de enzimas	32
8.5. Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas	35
8.6. Producción de proteína extracelular durante el cultivo sólido a diferentes temperaturas	43
8.7. Cambios de pH durante el cultivo sólido a diferentes temperaturas	44
8.8. Cambios de humedad durante el cultivo sólido a diferentes temperaturas	46
9. CONCLUSIONES	48
10. PERSPECTIVAS	49
11. REFERENCIAS	50
12. ANEXOS	59
ANEXO I 599	
I.I. Balance de agua del sustrato	59
I.II. Curva patrón de glucosa y xilosa	59
I.III. Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB)	61
ANEXO II	63

II.I. Análisis estadístico: Método de conservación.....	63
II.II. Análisis estadístico: Extracción de enzimas.....	65
II.III. Análisis estadístico: Producción y productividad de enzimas	67
II.IV. Análisis estadístico: Producción de proteína extracelular	69
II.V. Análisis estadístico: Cambios de pH durante el cultivo sólido.....	69
II.VI. Análisis estadístico: Cambios de humedad durante el cultivo sólido.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de hidrólisis de las fibras de celulosa por celulasas	3
Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de xilano por xilanas y enzimas relacionadas	4
Figura 3. Mecanismo de oxidación de la lignina por lacasas, peroxidasas y deshidrogenasas	5
Figura 4. Efecto de la temperatura en los procesos que ocurren en las células de los microorganismos	12
Figura 5. Viabilidad de <i>Trametes</i> sp. EUM1 determinada como velocidad de crecimiento radial (V_r) después de conservarse por 5 meses en agua destilada estéril	26
Figura 6. Determinación de biomasa de <i>Trametes</i> sp. EUM1 después de conservarse por 5 meses en agua destilada estéril	26
Figura 7. Efecto de la proporción fuente de nutrientes: fuente de sales minerales sobre el crecimiento de <i>Trametes</i> sp. EUM1	28
Figura 8. Distribución del tamaño de partícula del rastrojo de maíz.....	30
Figura 9. Cantidad de enzimas lignocelulolíticas recuperadas del rastrojo de maíz después de la extracción con agua destilada	33
Figura 10. Cantidad de enzimas lignocelulolíticas recuperadas del rastrojo de maíz después de la extracción con amortiguador de citratos (50 mM, pH 5)	33
Figura 11. Efecto de la temperatura de cultivo de <i>Trametes</i> sp. EUM1 en la producción de celulasas sobre rastrojo de maíz	35
Figura 12. Efecto de la temperatura de cultivo de <i>Trametes</i> sp. EUM1 en la producción de xilanasas sobre rastrojo de maíz	37
Figura 13. Efecto de la temperatura de cultivo de <i>Trametes</i> sp. EUM1 en la producción de lacasas sobre rastrojo de maíz	38
Figura 14. Efecto de la temperatura de cultivo de <i>Trametes</i> sp. EUM1 en la productividad de enzimas lignocelulolíticas sobre rastrojo de maíz	39
Figura 15. Pórfiles de producción de proteína extracelular determinados durante el cultivo de <i>Trametes</i> sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz a varias temperaturas	44

Figura 16. Cambios de pH durante el cultivo de <i>Trametes</i> sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz a varias temperaturas	45
Figura 17. Cambios de humedad durante el cultivo de <i>Trametes</i> sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz a varias temperaturas	47

1. INTRODUCCIÓN

La materia vegetal es una fuente renovable de materia orgánica que puede ser transformada por métodos químicos (hidrólisis con ácidos y bases) y biológicos (hidrólisis enzimática, cultivo de microorganismos) en productos de interés industrial como biocombustibles, enzimas, químicos orgánicos, azúcares simples, metabolitos secundarios y proteína celular. Dichos productos son generados a partir de la conversión de los polímeros estructurales de la materia vegetal (Howard *et al.*, 2003; Tengerdy y Szakacs, 2003).

1.1. Composición de las fibras de la materia vegetal

Las fibras de la materia vegetal (lignocelulosa) están constituidas principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, forman parte de la pared celular de las plantas, y químicamente están enlazados por fuerzas covalentes y no covalentes. En las fibras también se encuentran otros componentes como las pectinas, los taninos y minerales. Los polímeros que la constituyen tienen las siguientes funciones: a) celulosa es el mayor componente del complejo lignocelulosa, es un polímero constituido de 3,500 unidades de glucosa ó mas, unidas por enlaces glicosídicos β -1,4. La unión de cientos de unidades de este polímero forma las cadenas llamadas microfibrillas, las cuales se agrupan para formar las fibras elementales que forman la celulosa. Dependiendo del arreglo de las mismas, las fibras de celulosa presentan regiones denominadas cristalinas (arreglo ordenado de las fibras) y regiones denominadas amorfas (arreglo desordenado de las fibras), estas últimas son las regiones más susceptibles a la hidrólisis enzimática (Cullen y Kersten, 1992; Pérez *et al.*, 2002). b) Hemicelulosa es un polímero complejo que cubre las fibras de la celulosa, su estructura se compone de unidades de xilosa, manosa, galactosa, glucosa, arabinosa y ácidos glucorónicos, las cuales están unidas por enlaces glicosídicos β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3. El principal componente en maderas duras es el glucoronoxilano y el glucomanano en maderas blandas, y a diferencia de la celulosa, es un polímero fácil de hidrolizar (Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005). c) Lignina recubre el polímero de la hemicelulosa; su estructura está compuesta de unidades de fenilpropano (alcohol coniferílico, sinaprílico y cumarílico) que están unidas entre sí por enlaces carbono-carbono y aril-éter. Su función es conferir soporte

estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque por microorganismos (Howard *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2005).

1.2. Biodegradación de la lignocelulosa

Los microorganismos son capaces de hidrolizar y oxidar los polímeros estructurales de la materia vegetal por medio de la secreción de enzimas lignocelulolíticas, constituidas por celulasas, xilanasas y oxidasas.

1.2.1. Hidrólisis de la celulosa

Las celulasas hidrolizan los enlaces glicosídicos internos β -1,4 de la celulosa a través de la acción conjunta de tres tipos de enzimas (**Figura 1**): a) Las endoglucanasas (EGs), endo-1,4- β -glucanasas ó carboximetilcelulasas hidrolizan al azar los enlaces internos de las regiones amorfas que se encuentran en las fibras de la celulosa generando sitios nuevos para la acción de otras enzimas, y generando dímeros de celobiosa como productos de su hidrólisis. b) Las celobiohidrolasas (CBHs), exo-1,4- β -glucanasas ó simplemente exoglucanasas actúan en los extremos de las fibras de la celulosa y en los sitios creados por la acción de las EGs generando moléculas de celobiosa y pequeñas cantidades de glucosa. c) Las β -glucosidasas, por otro lado, hidrolizan las moléculas de celobiosa que fueron generadas por la hidrólisis de las EGs y CBHs a monómeros de glucosa. De esta manera, los microorganismos pueden utilizar los productos generados por la hidrólisis de la celulosa como fuente de carbono para el crecimiento (Cullen y Kersten, 1992; Pérez *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002).

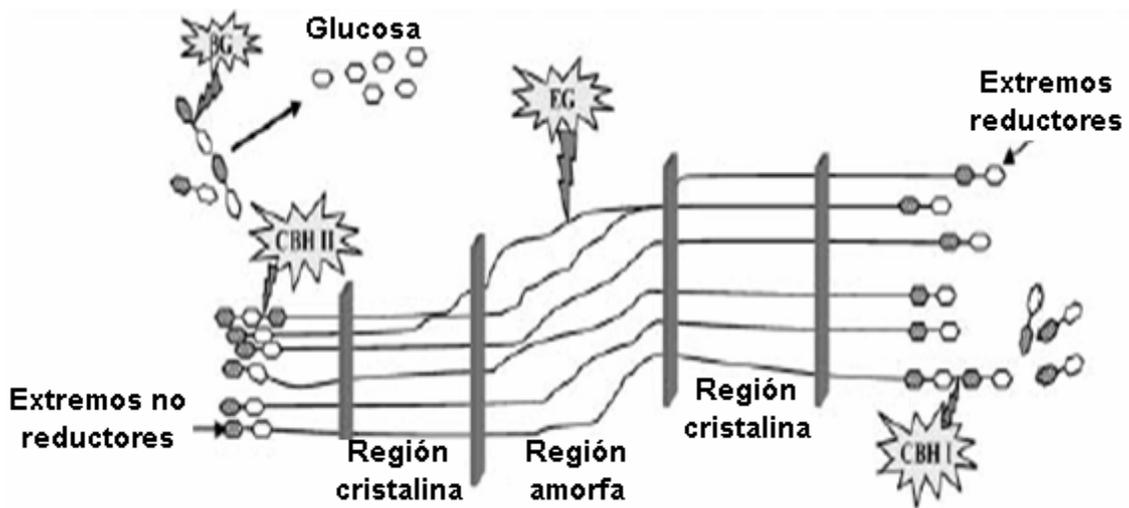


Figura 1. Mecanismo de hidrólisis de las fibras de celulosa por celulasas (Pérez *et al.*, 2002)

1.2.2. Hidrólisis de la hemicelulosa

El xilano es el polisacárido principal que constituye la estructura de la hemicelulosa, químicamente es un polímero constituido principalmente de unidades de xilosa (150-200) arregladas en forma lineal, con presencia de ramificaciones que consisten de unidades de otros azúcares como la manosa, arabinosa, galactosa, glucosa, arabinosa y ácidos glucorónicos (Figura 2). La hidrólisis del xilano, se lleva a cabo por la acción cooperativa de las endoxilanasas, EXs (endo-1,4- β -xilanasas) las cuales hidrolizan los enlaces β -1,4 internos del xilano para generar oligómeros, dímeros y monómeros de xilosa. Las endoxilanasas no hidrolizan el xilano al azar como sucede en la hidrólisis de la celulosa por las endoglucanasas, sino en sitios donde existan ramificaciones ó ciertos azúcares específicos. Los oligómeros ramificados y dímeros generados por la acción de las EXs son rápidamente hidrolizados en forma simultánea por otras enzimas como las xilosidasas, acetil esterases, glucoronidasas, arabinofuranosidasas, galactosidasas para liberar azúcares como la xilosa, ácido glucorónico, arabinosa y galactosa, respectivamente (Beg *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005).

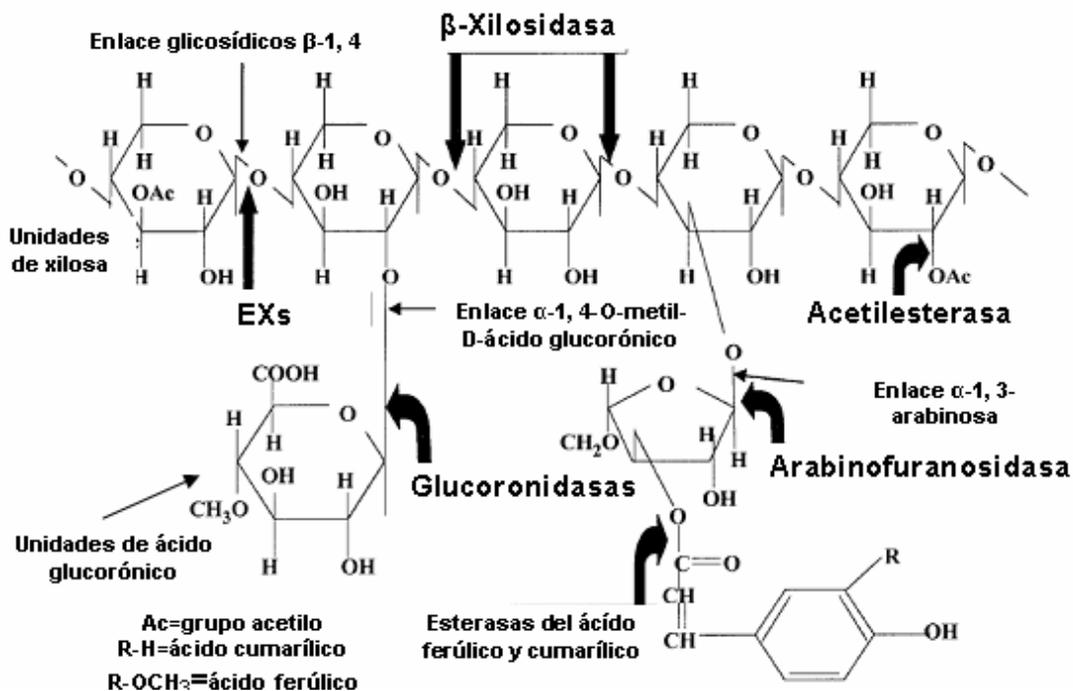


Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de xilano por xilanas y enzimas relacionadas (adaptado de Beg *et al.*, 2001)

1.2.3. Hidrólisis de la lignina

La lignina es un polímero de difícil degradación por la complejidad de su estructura y por la insolubilidad en agua. Las enzimas que están involucradas en la oxidación de la lignina son las peroxidasas (lignino peroxidasas (LiPs) y manganeso peroxidasas (MnPs)) y las lacasas, no obstante, también están involucradas otras enzimas como las aril-alcohol-oxidasas (AAO), aril-alcohol-deshidrogenasas (AAD) y quinonas reductasas (QR). Como se muestra en la **Figura 3**, las lacasas y las peroxidasas oxidan el polímero de lignina generando radicales aromáticos (**a**), por ser compuestos tan inestables, estos presentan rupturas de enlaces éter (**b**), rupturas de anillos aromáticos (**c**), enlaces C-C (**d**) y desmetilación (**e**).

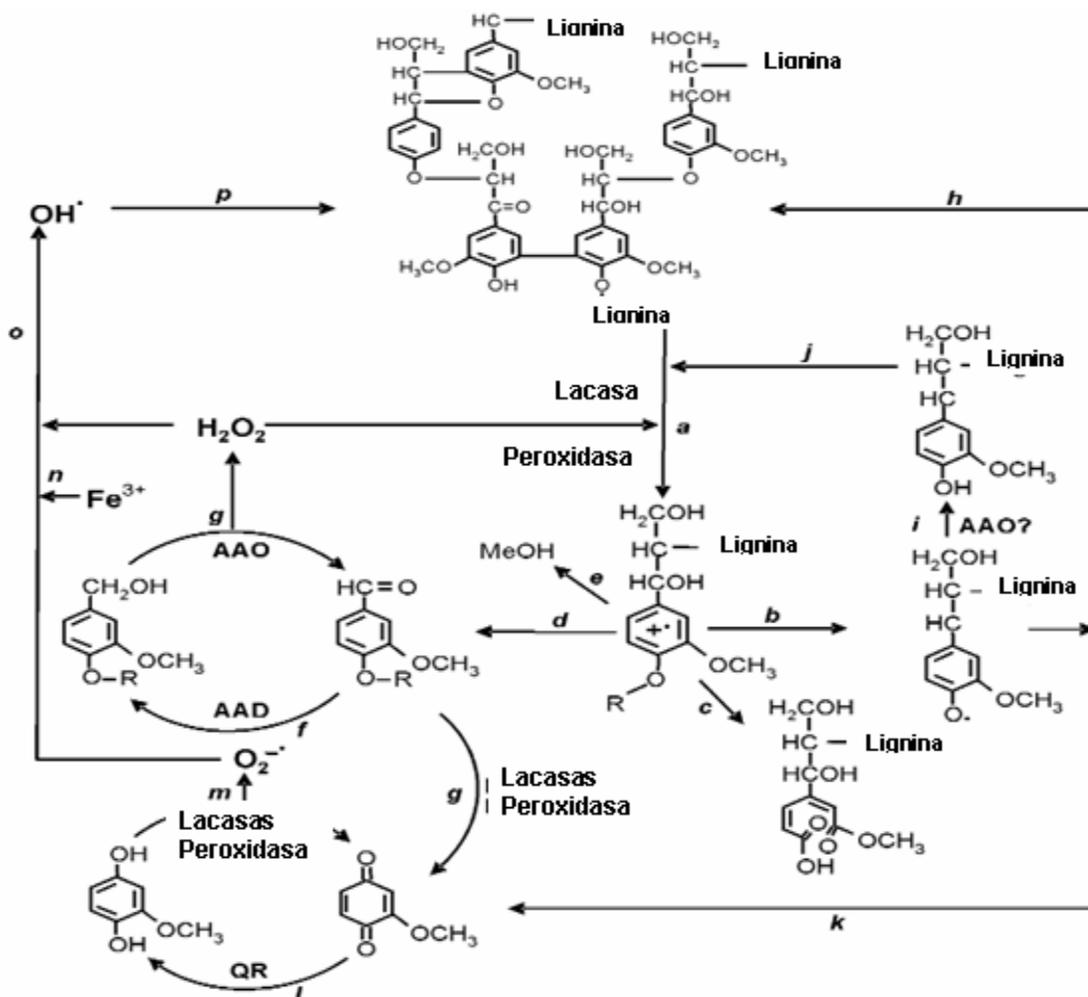


Figura 3. Mecanismo de oxidación de la lignina por lacasas, peroxidasas y deshidrogenasas (adaptado de Martínez *et al.*, 2005)

Los compuestos aromáticos generados por la ruptura de los enlaces C-C son utilizados como sustratos por las enzimas AAO y AAD para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en un proceso de reacciones de oxidación cíclico (**f, g**). Los radicales fenoxi generados por la ruptura de los enlaces éter pueden volverse a polimerizar sobre la lignina (**h**), si no son reducidos por oxidasas a compuestos fenólicos (**i**), pueden volverse a oxidar por las lacasas ó peroxidasas (**j**) o pueden ser retomados para una nueva ruptura de enlaces C-C para producir quinonas (**g, k**), las cuales son oxidadas en forma cíclica por la acción de las quinonoreductasas (QR), lacasas y peroxidasas (**l, m**) para generar iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno. Posteriormente, estos iones son reducidos y oxidados respectivamente para generar iones oxidrilos (**n, o**), estos compuestos son muy reactivos y provocan rupturas en la estructura de la

lignina (p). Los productos generados durante la oxidación de la lignina son incorporados dentro de las células de los microorganismos para su metabolismo (Marzullo *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2005)

1.3. Microorganismos que producen enzimas lignocelulolíticas

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

1.4. Aplicaciones de las enzimas lignocelulolíticas

Los productos comerciales preparados a base de celulasas y xilanasas que están disponibles en el mercado han sido obtenidos de hongos y bacterias de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola* y *Bacillus* (Bhat, 2001; Ovando y Waliszewski, 2005; Polizeli *et al.*, 2005). Por lo general, la mayoría de los productos comerciales a base de celulasas y xilanasas se acompañan de otras enzimas como las pectinasas y las amilasas, por lo que ha permitido utilizarlos en varios campos de la biotecnología ambiental y alimentaría. En biotecnología alimentaría, los productos hechos a base de celulasas y xilanasas se han utilizado en la industria de bebidas para extraer y clarificar los jugos de las frutas y los vegetales, en la industria de la extracción son usados para extraer colorantes, aceites y antioxidantes, en

repostería son agregadas sobre la masa de panificación para mejorar la consistencia del pan, en la preparación de la cerveza mejoran el proceso del malteado y, en la elaboración de vinos mejoran el proceso de maceración de las uvas permitiendo obtener extractos con mejor color y sabor (Beg *et al.*, 2001; Bhat, 2001; Ovando y Waliszewski, 2005; Polizeli *et al.*, 2005). En alimentación animal son usadas ampliamente para mejorar la digestibilidad de la fibra en los forrajes ó granos (Bhat, 2001; Beauchemin *et al.*, 2004). En biotecnología ambiental son utilizadas en la industria del papel como alternativa a los compuestos químicos que contienen cloro para remover la lignina y los xilanos, también son agregadas sobre las fibras de celulosa para modificar la resistencia de las hojas de papel. En la industria textil las celulasas y xilanasas son usadas en vez de los compuestos químicos para pulir y mejorar la brillantes de las fibras textiles ó para remover los colorantes que están impregnados en exceso sobre las fibras textiles (Bhat, 2001; Tengerdy y Szakacs, 2003; Polizeli *et al.*, 2005).

Las lacasas y peroxidasas son un grupo de enzimas que tienen gran potencial biotecnológico debido a la amplia variedad de compuestos que pueden oxidar. Las enzimas que componen los productos comerciales y que están disponibles en el mercado provienen de hongos de pudrición blanca de los géneros *Trametes*, *Pleurotus*, *Pyricularia*, *Coriolus*, *Phanerochaete* y del hongo *Aspergillus oryzae* que codifica el gen de la lacasa del hongo termófilo *Myceliophthora termophila* (Durán y Esposito, 2000; Berka, *et al.*, 1997). Estas preparaciones son aplicadas en la industria del papel para oxidar la lignina, en biorremediación para oxidar los compuestos fenólicos y los colorantes textiles que están presentes en las aguas residuales, también son empleadas en la remoción de hidrocarburos aromáticos que contaminan los suelos, para clarificar el vino, para producir etanol y en el área de diagnóstico son útiles para construir biosensores (Durán y Esposito, 2000; Meyer y Staples, 2002).

1.5. Cultivo sólido

El cultivo sólido se define como el proceso donde los microorganismos crecen sobre la superficie de materiales sólidos con niveles de actividad de agua de 0.4 a 0.9, el material sólido puede ser natural ó inerte, siendo el primero, el más usado como sustrato para el crecimiento de los microorganismos (Nigam y Robinson, 2004; Krishna, 2005). Los sustratos más utilizados incluyen los subproductos generados por las prácticas agrícolas y forestales,

como granos de semillas, fibras de rastrojos y residuos de madera (Pandey *et al.*, 1999; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005). A partir del cultivo sólido se han obtenido productos de interés industrial por el cultivo de microorganismos sobre residuos agrícolas, tales como: enzimas, biocombustibles, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios, azúcares, proteína (Nigam y Robinson, 2004). Esta tecnología ofrece algunas ventajas frente al cultivo líquido para la formación del producto destacándose el uso de sustratos baratos como fuentes de carbono, rendimiento del producto más alto, represión por carbono baja, volúmenes de operación pequeños, baja demanda de agua y energía, productividad volumétrica alta, fácil aireación, simulación del medio de crecimiento natural de los microorganismos (Viniégra-González *et al.*, 2003; Hölker *et al.*, 2004). A pesar de ello, existen algunas desventajas del cultivo sólido, por ejemplo, puede ser necesario el pretratamiento mecánico y químico del sustrato (molido, hidrólisis con solventes), la determinación de biomasa y la reproducibilidad de los experimentos es difícil por la heterogeneidad de los sustratos empleados, los gradientes de temperatura, oxígeno y pH no pueden ser controlados a gran escala (Hölker *et al.*, 2004; Krishna, 2005).

1.6. Producción de enzimas lignocelulolíticas por cultivo sólido

La mayoría de las enzimas que están disponibles en el mercado son producidas por cultivo líquido, pese a esto, el cultivo sólido ha generado gran interés para la producción de enzimas lignocelulolíticas por las ventajas que ofrece en comparación con el cultivo líquido (Chahal, 1985; Polizeli *et al.*, 2005; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005). Entre ellas podemos destacar la utilización de residuos agroindustriales baratos como sustratos, obtención de extractos enzimáticos más concentrados, productividad volumétrica más alta, obtención de enzimas más estables al pH y temperatura (Chahal, 1985; Grajek, 1987; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Isil y Nilufer, 2005).

Los residuos agrícolas son los sustratos más utilizados para la producción de enzimas lignocelulolíticas, ya que contienen nutrientes e inductores necesarios para el crecimiento y expresión de enzimas de los microorganismos (Rodríguez-Couto y Saromán, 2005). Los residuos agrícolas utilizados para la producción de enzimas lignocelulolíticas incluyen al bagazo de caña, granos de trigo, arroz, maíz, paja de trigo, residuos del plátano, cáscaras de

frutas, fibra de coco, semillas de uva, etc. (Cen y Xia, 1999; Pandey *et al.*, 1999; Polizeli *et al.*, 2005; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005). Algunos de estos sustratos son empleados durante el cultivo sólido para la producción de celulasas a gran escala por medio del cultivo de hongos mesófilos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, porque estos hongos secretan gran cantidad de celulasas al medio de cultivo (Chahal *et al.*, 1985; Cen y Xia, 1999; Jecu *et al.*, 2000; Panagiotou *et al.*, 2003; Beauchemin *et al.*, 2004; Ovando y Waliszewski, 2005). Otros hongos que se han cultivado en medio sólido a partir de residuos agroindustriales son los hongos termófilos, los cuales se han estudiado para producir celulasas termoestables, con este propósito, se han utilizado los géneros *Sporotrichum*, *Thermoascus*, *Talaromyces*, y *Humicola* (Maheshwari *et al.*, 2000; Ovando y Waliszewski, 2005). La aplicación del cultivo sólido también ha generado un gran interés para la producción de xilanasas a nivel industrial (Polizeli *et al.*, 2005). Los microorganismos más utilizados para producirlas a nivel industrial son: los hongos mesófilos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Beng *et al.*, 2001; Polizeli *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006); las bacterias mesófilas del género *Bacillus* (Polizeli *et al.*, 2005; Battan *et al.*, 2006); y los hongos termófilos de los géneros *Melanocarpus*, *Paecilomyces*, *Sporotrichum*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, y *Humicola* (Maheshwari *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006). Los hongos de pudrición blanca que pertenecen a los géneros *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinus* y *Cerrena* también se han estudiado para la producción de celulasas y xilanasas por cultivo sólido, pero los niveles de producción obtenidos durante su crecimiento han sido bajos en comparación a los obtenidos por los hongos empleados para producir celulasas y xilanasas a gran escala (De Souza *et al.*, 2002; Kachlishvili *et al.*, 2005). Es por ello, que la mayoría de los estudios con hongos de pudrición blanca se enfocan en la producción de lacasas y peroxidases, las cuales se han producido por cultivo sólido a escala piloto utilizando hongos de los géneros *Pleurotus*, *Trametes*, *Lentinus* y *Phanerochaete* (Rodríguez-Couto *et al.*, 2003; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Jing *et al.*, 2007).

1.7. Factores que afectan la producción de enzimas lignocelulolíticas

1.7.1. Sustrato

El cultivo sólido se caracteriza por el uso de soportes orgánicos que sirven como fuente de nutrientes e inductores para el crecimiento de los microorganismos y para la producción de enzimas. Es por ello, que la selección del sustrato debe realizarse de acuerdo al tipo de microorganismo y tipo de enzima que se requiera, por ejemplo, para producir celulasas y xilanasas se pueden seleccionar sustratos que contengan porcentajes elevados de celulosa y hemicelulosa; mientras que para producir oxidasas pueden seleccionarse sustratos con alto contenido de lignina (Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Rosales *et al.*, 2002). Este aspecto se debe evaluar para obtener los mayores rendimientos de enzimas por unidad de sustrato, por que se ha determinado que en cultivo sólido el tipo de sustrato es uno de los factores más importantes que influyen en la producción de enzimas lignocelulolíticas (Rosales *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2005; Shah y Madamwar, 2005; Battan *et al.*, 2006).

1.7.2. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula es una de las variables que está relacionada con la transferencia de masa entre los microorganismos y sus sustratos. Con tamaños de partículas pequeños el área de contacto entre el micelio de los microorganismos y los sustratos se incrementa, pero a su vez, se limita el intercambio de gases al reducirse el espacio entre las partículas. Por el contrario, con tamaños de partícula grandes el área de contacto entre el micelio de los microorganismos y los sustratos se reduce, pero el intercambio gaseoso mejora al incrementarse el espacio entre las partículas de los sustratos (Barrios-González *et al.*, 1993; Muniswaran y Charyulu, 1994; Muzutti *et al.*, 2007). Estos dos efectos opuestos pueden influir en los niveles de producción de enzimas, por lo que es necesario seleccionar un tamaño de partícula adecuado para la producción de enzimas lignocelulolíticas (Muniswaran y Charyulu, 1994; Krishna, 1999; Hu y Duvnjak, 2004; Botella *et al.*, 2007).

1.7.3. Humedad y actividad de agua

En el cultivo sólido la humedad del sustrato favorece ó limita la producción de enzimas lignocelulolíticas. Los niveles de humedad mayores al 90% y menores al 50 % pueden reducir considerablemente la producción de las enzimas (Azin *et al.*, 2007). Se ha observado que los requerimientos de humedad dependen del tipo de sustrato, microorganismo y, tipo de enzima que se este produciendo (De Souza *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2002; Panagiotou *et al.*, 2003; Asgher *et al.*, 2006; Azin *et al.*, 2007). A pesar de que la humedad del sustrato es una de las variables que comúnmente se optimiza en los sistemas de cultivo sólido para la producción de enzimas lignoceluloíticas (Jecu, 2000; Shah y Madamwar, 2005; Azin *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2007); se reconoce que la eficiencia del proceso depende del tipo de interacciones que existen entre el agua y los sustratos, es decir la actividad del agua (A_w). Por este motivo, durante el cultivo sólido es frecuente relacionar la actividad del agua (A_w) y humedad del sustrato con el crecimiento de los microorganismos y con la producción de enzimas (Oriol *et al.*, 1988; Wenquing *et al.*, 2003)

1.7.4. El pH

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

1.7.5. Temperatura

La temperatura es un factor que influye en el crecimiento de los microorganismos y en la formación del producto durante el cultivo sólido. Conforme la temperatura aumenta, las velocidades de las reacciones químicas y enzimáticas, que ocurren en el interior de las células de los microorganismos, se vuelven cada vez más rápidas, al igual que la velocidad de crecimiento. Sin embargo, hay un límite de temperatura dentro del cual las funciones

metabólicas pueden ocurrir y, cuando este se sobrepasa, las funciones celulares empiezan a decaer drásticamente (**Figura 4**).

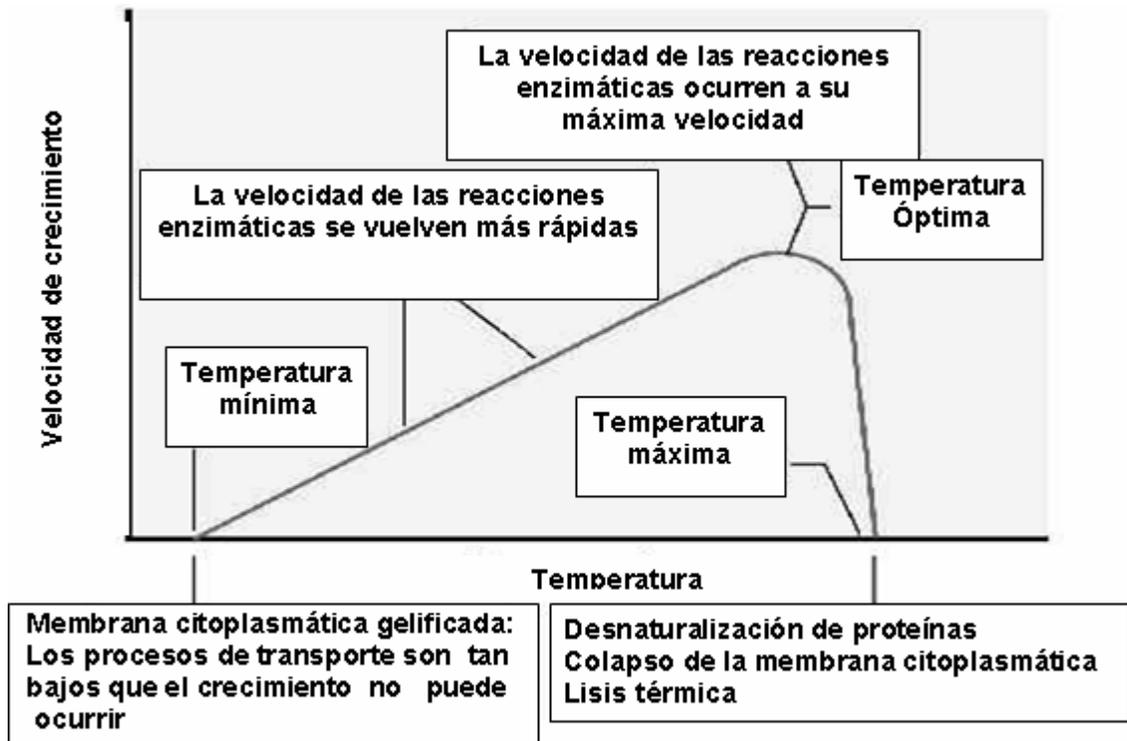


Figura 4. Efecto de la temperatura en los procesos que ocurren en las células de los microorganismos (tomado de Brock, 1993)

En cultivo sólido, la variación de temperatura puede acelerar ó desacelerar la velocidad de producción de enzimas lignocelulolíticas (Tao *et al.*, 1997), incrementar ó mermar su producción (Jecu, 2000; Azin *et al.*, 2007), y detener la producción por completo (Shah y Madamwar, 2005). En otros casos, la temperatura de cultivo puede ocasionar pérdidas excesivas de agua de los soportes usados para la producción de enzimas, afectando seriamente la producción de estas (Mazutti *et al.*, 2007). Por ello, la temperatura debe ser explorada con el objetivo de elevar la producción de enzimas lignocelulolíticas durante el cultivo sólido.

1.7.6. Temperatura de crecimiento de microorganismos usados en cultivo sólido

En la naturaleza existe una gran variedad de microorganismos que pueden crecer a distintas temperaturas, por lo que se les ha clasificado con base en esta, en tres grupos principales: psicrófilos, mesófilos y termófilos. Los microorganismos psicrófilos son capaces de crecer entre -5 y 20 °C, pero la temperatura donde proliferan mejor se encuentra entre 15 y 18 °C. Por su parte, los microorganismos mesófilos pueden crecer entre 12 y 47 °C, pero el crecimiento es favorable entre 30 y 37 °C. A parte de estos, existen los microorganismos termófilos, que crecen desde 42 °C y hasta más de 110 °C, pero la temperatura ideal para su crecimiento, generalmente, oscila entre 50 y 75°C (Brock, 1993). La clasificación anterior no debe tomarse en forma absoluta por que se ha determinado que el intervalo de crecimiento de los microorganismos respecto a la temperatura varía de acuerdo a las condiciones de cultivo (Maheshwari *et al.*, 2000). Normalmente, la producción de enzimas lignocelulolíticas se lleva a cabo con microorganismos mesófilos y termófilos, obteniéndose los niveles de producción de enzimas más altos entre 25 y 32 °C para mesófilos, y para termófilos entre 45 y 55 °C (Chahal, 1984; Tao *et al.*, 1997; Ovando y Waliszewski, 2005; Polizeli *et al.*, 2005; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Yang *et al.*, 2005).

2. ANTECEDENTES

La clasificación taxonómica de los hongos incluye aspectos morfológicos del micelio, tipo de reproducción y la naturaleza de las esporas, con base en estos aspectos, los hongos se han dividido en Mixomycota y Eucomycota. Esta última se ha subdividido en: *Chytridiomycetes*, *Oomycetes*, *Plasmodiophoromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* y *Deuteomycetes* (Frioni, 1999). El género *Trametes* se clasifica como un basidiomiceto, que pertenece a la familia Polyporacea. Este tipo de hongos son mejor conocidos como hongos de pudrición blanca, porque al oxidar la lignina dejan una coloración blanca. En la naturaleza se distinguen fácilmente por la forma sinuosa, porosa y coloreada de su basidiocarpo, además del crecimiento característico en forma de repisas sobre la madera. También son distinguibles por las características morfológicas de sus hifas, las cuales tienen formas diferentes de acuerdo a la función que desempeñan y, por la estructura lisa- elipsoidal de sus esporas (Ko y Jung, 1999).

El género *Trametes* se caracteriza por secretar cantidades considerables de lacasas, pero, se ha determinado que también secreta celulasas y xilanasas (Sun *et al.*, 2004; Jing *et al.*, 2007). La mayoría de los estudios de producción de sus enzimas se han enfocado en la obtención de lacasas por cultivo líquido porque estas enzimas son muy utilizadas para el tratamiento de aguas residuales, oxidación de hidrocarburos aromáticos y colorantes textiles (Bourbonnais *et al.*, 1997; Abadulla *et al.*, 2000; Nyanhongo *et al.*, 2002b). A pesar de ello, existen varios trabajos donde se ha utilizado el género *Trametes* para la producción de lacasas, celulasas y xilanasas por cultivo sólido. En este sentido, los sustratos utilizados para su producción han sido las semillas de uva, la paja de cebada, la paja de trigo y las cáscaras de frutas (Rodríguez-Couto *et al.*, 2002; Moldes *et al.*, 2003; Rosales *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Jing *et al.*, 2007). En cultivo líquido y sólido, para la producción de enzimas lignocelulolíticas por el género *Trametes*, se ha estudiado principalmente el efecto de la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono, pero hay poca información sobre el efecto de la temperatura en la producción de sus enzimas dado que este género sólo las produce a temperaturas entre 28 y 30 °C. Levin y Forchiassin (1998) indicaron que la temperatura entre 30 y 37 °C tiene poco efecto en la producción de xilanasas en medio líquido por *Trametes gallica*, incluso por arriba de este intervalo, encontraron que el hongo fue incapaz de crecer y de producir enzimas.

Considerando el potencial de aplicación de las lacasas en biotecnología ambiental se aisló el hongo *Trametes* sp. EUM1 a partir de residuos de la madera (Medina, 2003). De esta cepa se obtuvieron lacasas por cultivo líquido a 40°C a partir de un medio de cereal de maíz. Después de purificarlas se determinó que el hongo producía dos isoenzimas de la enzima lacasa, las cuales eran estables a pH entre 4 y 10, a la temperatura entre 50 y 60 °C y a los disolventes no acuosos. Estudios posteriores determinaron que la producción de lacasas en medio líquido mejoraba sustancialmente al combinarse el efecto de la adición de varios inductores de lacasas con el incremento de la temperatura de cultivo de 28 a 39 °C (Márquez, 2004).

Posteriormente, en medio líquido se evaluó el efecto de la fuente de nitrógeno (peptona y tartrato de amonio) en la producción de las isoenzimas de la enzima lacasa por *Trametes* sp. EUM1 a 39 °C, de estos resultados se determinó que en el medio de cultivo suplementado con peptona se producían isoenzimas más termoestables, incluso la termoestabilidad de una de las isoenzimas fue mayor cuando se le comparó con una enzima comercial (Márquez, 2006).

Por otro lado, los primeros estudios de producción de enzimas lignocelulolíticas por cultivo sólido del hongo *Trametes* sp. EUM1 fueron llevados a cabo por Márquez- Araque *et al.* (2007), quien comparó los niveles de producción de celulasas, xilanasas y lacasas obtenidas durante el cultivo de *Trametes* sp. EUM1 sobre bagazo de caña a 34 °C, con los obtenidos durante el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* sobre el mismo sustrato a 30 °C. Los resultados obtenidos destacaron la capacidad del hongo *Trametes* sp. EUM1 para producir celulasas y xilanasas en mayor cantidad respecto a los demás hongos estudiados, a pesar de esto, la producción de lacasas que se obtuvo fue menor a la obtenida durante el cultivo de *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*.

3. JUSTIFICACIÓN

Una gran cantidad de microorganismos tienen la capacidad de excretar enzimas lignocelulolíticas, no obstante, las bacterias y hongos son los microorganismos que las producen en mayor cantidad en condiciones de cultivo líquido y sólido (Pandey *et al.*, 1999; Polizeli *et al.*, 2005). Al respecto, el género *Trametes* es capaz de excretar dichas enzimas en ambos sistemas de producción, pero la mayoría de los estudios se enfocan a la obtención de lacasas por cultivo líquido, porque son utilizadas en varias aplicaciones en biotecnología ambiental. El género *Trametes* se caracteriza por producir enzimas lignocelulolíticas, tanto en cultivo sólido como en cultivo líquido, en el intervalo de temperatura de 28 a 30 °C. A diferencia de las especies estudiadas, el hongo *Trametes* sp. EUM1 fue capaz de producirlas en medio líquido a la temperatura de 40 °C y en medio sólido a 34 °C, respectivamente. A pesar de ello, aún no se ha establecido la temperatura de cultivo idónea para la producción de todas sus enzimas en ambos sistemas de producción, por ejemplo, en medio líquido el hongo sólo se ha cultivado a 28 y 40 °C para la producción de lacasas y, en medio sólido a 34 °C, para la producción de celulasas, xilanasas y lacasas. Hasta ahora sólo se sabe que *Trametes* sp. EUM1 es capaz de producir enzimas lignocelulolíticas bajo estas condiciones, sin embargo, aún se desconoce que efecto tiene la temperatura en la producción de todas sus enzimas. Por las características antes mencionadas, es interesante la exploración de esta cepa como fuente nueva para la obtención de enzimas que puedan ser usadas en algún campo de trabajo específico, desde biotecnología ambiental hasta en nutrición animal, a través del uso de los extractos enzimáticos obtenidos durante su cultivo.

Teniendo en cuenta estos aspectos, en este trabajo se evaluaron los residuos agrícolas de rastrojo de maíz y de paja de avena como sustratos para el crecimiento de *Trametes* sp. EUM1. Además, se evaluó el efecto de la temperatura en los niveles de producción de celulasas, xilanasas y lacasas sobre el mejor sustrato, relacionando los niveles de producción de enzimas con los niveles de producción de proteína extracelular y de pH, manteniendo la humedad del sustrato constante durante todo el cultivo.

4. HIPÓTESIS

La producción y productividad de enzimas lignocelulolíticas que se obtengan durante el crecimiento de *Trametes* sp. EUM1 en cultivo sólido serán mayores al incrementarse la temperatura. El intervalo de temperatura seleccionado será superior al utilizado por hongos mesófilos para producir enzimas lignocelulolíticas.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la temperatura de cultivo en la producción de enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas) sobre residuos agrícolas en cultivo sólido.

5.1. Objetivos específicos

- Evaluar el método de conservación de la cepa *Trametes* sp. EUM1 en agua destilada
- Determinar el efecto de residuos agrícolas y de cachaza en la velocidad de crecimiento superficial de *Trametes* sp. EUM1
- Seleccionar método de extracción de enzimas
- Evaluar el efecto de la temperatura de cultivo de *Trametes* sp. EUM1 en la producción de enzimas

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismo

El hongo de pudrición blanca *Trametes* sp. EUM1 se utilizó para evaluar el efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas. Este hongo se aisló de residuos de madera en el Estado de Yucatán y se seleccionó de un grupo de 6 basidiomicetos por la capacidad de oxidar rápidamente el ABTS [(2,2, - azinobis (3 - etilbenzotiazolina - ácido sulfónico)] (Medina, 2003).

6.2. Medio de cultivo

Para el crecimiento del microorganismo se usó extracto de malta como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno extracto de levadura. El medio de cultivo se preparó disolviendo los siguientes componentes en agua destilada: extracto de malta (40 g/L), extracto de levadura (3 g/L) y agar bacteriológico (18 g/L) (Schlosser *et al.*, 1997).

Para eliminar la presencia de organismos contaminantes, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C. El medio estéril se vertió en cajas Petri en condiciones de esterilidad dejándose enfriar a temperatura ambiente para permitir solidificar el medio. Finalmente, las cajas con medio de cultivo se utilizaron para propagar el microorganismo.

6.3. Propagación

En el centro de una caja Petri conteniendo medio de cultivo fresco, se colocó un disco de agar (0.6 cm) con micelio que se propagó en caja Petri con el mismo medio (7 días, 30 °C). Para el crecimiento del microorganismo las cajas inoculadas se incubaron durante 7 días a 30 °C. Después, el microorganismo se propagó nuevamente, trasladando un fragmento de micelio del cultivo nuevo en medio de cultivo fresco.

6.4. Conservación

La conservación de la cepa se realizó con tiras de papel filtro estéril con micelio, sumergidas en agua destilada, por 5 meses. En el centro de una caja Petri con medio fresco, se colocó un disco de agar con micelio (0.6 cm) con 4 tiras de papel Whatman N# 4 (0.6 cm x 2 cm) distribuidas uniformemente alrededor de la caja. Después de mantener el cultivo en incubación

a 30 °C durante 7 días las tiras se retiraron y depositaron en viales conteniendo 4 mL de agua destilada estéril. Para corroborar la esterilidad en el método de conservación propuesto se utilizaron dos viales como controles de esterilidad conteniendo tiras de papel sin micelio. En ambos casos (conservación y controles), los viales fueron sellados con parafilm y conservados a temperatura ambiente. Para determinar la viabilidad del microorganismo se tomaron dos viales cada mes y las tiras contenidas en éstos se utilizaron como inóculo para probar su viabilidad. La viabilidad se determinó por duplicado.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SAS (2002). Con los datos de velocidad de crecimiento radial, obtenidos en el método de conservación, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de medias por mes de conservación empleando el método de Tukey ($\alpha = 0.05$) (**ver Anexo II**).

6.5. Viabilidad y velocidad de crecimiento radial

La viabilidad del microorganismo en el método de conservación propuesto se determinó como crecimiento radial (mm/día) del hongo y biomasa formada seca (mg). En el centro de una caja conteniendo medio fresco, se colocó un fragmento de las tiras utilizadas en el método de conservación (0.6 cm x 0.6 cm). Posteriormente, el crecimiento radial se midió con un Vernier registrando el diámetro de la colonia sobre la superficie de la caja Petri a partir del segundo día de cultivo (30 °C) en al menos dos direcciones. Después de 7 días de cultivo el micelio formado se retiró y colocó en un recipiente con agua destilada en ebullición (50 mL) para fundir el agar y aislar el micelio filtrando la solución con papel Whatman N# 4. Finalmente, la biomasa obtenida se secó por 12 h a 70 °C para registrar la biomasa seca por diferencia de peso. Los valores de velocidad de crecimiento radial y de biomasa se compararon cada mes con los obtenidos del crecimiento de la cepa sin conservar. La velocidad de crecimiento radial sobre las mezclas de residuos agrícolas también se evaluó registrando el crecimiento de la colonia sobre la superficie de las cajas Petri a partir del segundo día de cultivo y hasta el séptimo día.

6.6. Proporción de residuos agroindustriales

Para el crecimiento de *Trametes* sp. EUM1 se utilizaron mezclas de rastrojo de maíz ó paja de avena con cachaza en las siguientes proporciones (residuo:cachaza): 100:0, 90:10 y 80:20 (p/p). Las mezclas se prepararon a una concentración de 20g/L resuspendiendo los sólidos en agua destilada y licuándolos a 4,000 rpm durante 5 min (Licuador *Osterizer*). A continuación las mezclas se combinaron con agar (15 g/L), se esterilizaron (120 °C, 25 min) y vertieron en cajas Petri para ser inoculadas con un disco de agar (0.6 cm) procedente de un cultivo de 7 días. Después, la velocidad de crecimiento radial se determinó en cada una de las mezclas conservadas en incubación durante 7 días a 30 °C. La velocidad radial se determinó por triplicado en cada una de las mezclas utilizadas.

El análisis estadístico de los datos de velocidad de crecimiento radial que se obtuvieron en cada una de las mezclas consistió de un análisis de varianza (ANOVA). Para evaluar la respuesta de la proporción de residuos agrícolas y cachaza en la velocidad de crecimiento de *Trametes* sp. EUM1, se realizó una prueba de contrastes lineal y cuadrático. Para seleccionar la mejor mezcla de residuos agrícolas para el crecimiento del hongo, se hizo una comparación múltiple de medias empleando el método de Tukey ($\alpha = 0.05$) (ver Anexo II).

6.7. Extracción de enzimas

La extracción de enzimas lignocelulolíticas se realizó con agua destilada ó amortiguador de citratos (50 mM, pH 5). Para hacerlo, primero se tomaron matraces con 6 días de cultivo a 30 °C, a los cuales se les agregó 50 mL de agua destilada ó amortiguador de citratos (50 mM, pH 5). Para separar las enzimas adsorbidas sobre el rastrojo de maíz (sustrato seleccionado del experimento anterior), el contenido de los matraces se agitó a 250 rpm manteniendo cada matraz en un baño con hielo durante 15 ó 30 min para cada método de extracción. Después, para eliminar el sustrato, el contenido se filtró con papel Whatman N# 4 y los extractos obtenidos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C para sedimentar los sólidos residuales. El sobrenadante obtenido en cada caso se utilizó para determinar la actividad enzimática. La actividad enzimática se determinó por triplicado en muestras independientes.

El análisis estadístico de los datos consistió de un análisis de varianza (ANOVA) para la cantidad de celulasas, xilanasas y lacasas que se recuperaron después de su extracción. Para

seleccionar del mejor agente de extracción de enzimas lignocelulolíticas se hizo una comparación múltiple de medias empleando el método de Tukey ($\alpha = 0.05$) (ver Anexo II).

7. Cultivo sólido para la producción de enzimas lignocelulolíticas

7.1. Medio de cultivo

El rastrojo de maíz (sustrato donde se obtuvo el mejor crecimiento) se trituró con ayuda de un molino convencional para reducir el tamaño de partícula. La mezcla de tamaños de partícula del rastrojo de maíz se separó por tamaño con tamices de malla: $\frac{3}{4}$, 4, 6, 10 y 20. La mezcla de los tamaños obtenidos de las mallas 6 (4.06 mm), 10 (2.52 mm) y 20 (0.61 mm) fue utilizada como sustrato para la producción de enzimas. Para ello, se utilizaron matraces de 250 mL como unidades experimentales (UE), conteniendo una masa de 2.3 g de rastrojo de maíz que consistió de una mezcla de los tamaños de partícula que se indican en paréntesis: 0.60 g (4.06 mm), 1 g (2.52 mm) y 0.7 g (0.61 mm). Al contenido de cada matraz se le adicionó un volumen de 4 mL de agua destilada, la cual se esparció en todo el sustrato homogeneizando el contenido. El sustrato húmedo se esterilizó por 25 min a 120 °C para ser inoculado con una suspensión de micelio de *Trametes* sp. EUM1.

7.2. Inóculo

En viales de 10 mL que contenían un volumen de 4 mL de agua destilada estéril y 6 perlas de ebullición estériles se depositaron 4 discos de agar (0.6 cm) con micelio, los cuales fueron tomados de un cultivo de 7 días a 30 °C. Para obtener una suspensión homogénea de micelio, el contenido de cada vial se agitó en un Vórtex a máxima velocidad durante 1 min a temperatura ambiente y en condiciones de esterilidad. La cantidad de biomasa seca que se adicionó como inóculo en cada uno de los matraces fue calculada por triplicado cada vez que se realizó una cinética de producción. Para esto, la suspensión de micelio contenida en tres viales se filtró con papel Whatman N# 4. La biomasa retenida en los filtros se secó por 12 h a 70 °C para registrar la biomasa seca por diferencia de peso.

7.3. Condiciones de cultivo

Bajo las condiciones antes mencionadas el contenido de humedad del sustrato fue de 80 %, mientras que el tamaño del inóculo fue en promedio de 0.092 mg de biomasa seca por gramo de sustrato seco. Los matraces inoculados se mantuvieron por 12 días a 30, 35, 40 ó 45 °C. Las respectivas incubadoras tenían en su interior un recipiente con agua destilada para reducir las pérdidas excesivas de agua por evaporación. Los puntos experimentales de las cinéticas de producción se calcularon por duplicado, para esto, se tomaron 2 matraces diariamente para extraer las enzimas producidas sobre el rastrojo de maíz con agua destilada (seleccionado como el mejor agente de extracción de enzimas). Para establecer las diferencias de producción de enzimas lignocelulolíticas por día de cultivo y por temperatura, se hizo una comparación de medias múltiple por el método Tukey ($\alpha = 0.05$) (ver Anexo II).

7.4. Actividad enzimática

7.4.1 Celulasas

Para cuantificar la actividad enzimática de celulasas se utilizó el método descrito por Miller (1960), basado en la cuantificación de azúcares reductores por el reactivo DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico), el cual reacciona con los azúcares reductores produciendo una coloración cuya intensidad es proporcional al contenido de azúcares reductores presentes en solución.

Por cada extracto obtenido se tomaron dos tubos de ensaye, el primero utilizado para medir la actividad enzimática y el segundo para cuantificar los azúcares aportados desde la extracción de las enzimas. A cada tubo se agregó 0.9 mL de carboximetilcelulosa al 0.5 % (p/p), preparada en amortiguador de citratos (50 mM, pH 5), después en el tubo B se adicionó 1.5 mL del reactivo DNS. Antes de llevar a cabo la reacción, ambos tubos se mantuvieron en incubación durante 1 min a 50 °C. Posteriormente, la reacción se inició en ambos tubos adicionando 0.1 mL de extracto enzimático. Transcurridos 20 min, la reacción enzimática se detuvo agregando en el tubo A, 1.5 mL del reactivo DNS para desnaturalizar las enzimas presentes.

Para desarrollar el color la mezcla de reacción contenida en ambos tubos se mantuvo en ebullición durante 5 min en baño maría, seguido de su enfriamiento en un baño con hielo. Finalmente, se registró la absorbancia de la solución contenida en los tubos a una longitud de onda de 640 nm con un espectrofotómetro (DU 640 Beckman). Los azúcares reductores generados durante el ensayo se calcularon, primero, restando el valor de absorbancia del tubo B del valor de absorbancia del tubo A, y segundo, interpolando el valor obtenido a partir de una curva patrón de glucosa (**ver Anexo I**). La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI) por gramo de sustrato seco, donde una UI se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por min en las condiciones de reacción.

Para calibrar el espectro se utilizó un 1 mL de una mezcla que consistió de 0.9 mL de carboximetilcelulosa, 0.1 mL de amortiguador de citratos y 1.5 mL de DNS, tratada en las mismas condiciones antes mencionadas.

7.4.2. Xilanasas

Se utilizó el procedimiento anterior, pero el tiempo de reacción fue de 5 min y el sustrato utilizando fue xilano al 0.5 % (p/p) preparado también en amortiguador de citratos (50 mM, pH 5.3). Para determinar los azúcares reductores generados por la actividad de las enzimas se utilizó una curva patrón de xilosa (**ver Anexo I**). La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI) por gramo de sustrato seco, donde una UI se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de xilosa por min en las condiciones de reacción. Para calibrar el espectro se utilizó un 1 mL de una mezcla que consistió de 0.9 mL de xilano, 0.1 mL de amortiguador de citratos y 1.5 mL de DNS, tratada en las mismas condiciones antes mencionadas.

7.4.3. Lacasas

La actividad enzimática de lacasas se determinó con el método descrito por Bourbonnais *et al.* (1997) usando ABTS como sustrato ($\epsilon_{420 \text{ nm}} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). En una celda de 1 mL se colocó un volumen de 0.5 mL de una dilución adecuada de extracto enzimático con 0.5 mL de ABTS 0.5 mM preparado en amortiguador de citratos (50 mM, pH 5). La mezcla de reacción se incubó a 40 °C y la actividad enzimática se determinó midiendo el incremento de

absorbancia durante 1.5 min a una longitud de onda de 420 nm (DU 640 Beckman). Como blanco se utilizó una mezcla de 0.5 mL del amortiguador de citratos con 0.5 mL de ABTS. Asimismo, la actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI) por gramo de sustrato seco, donde una UI se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de ABTS por min en las condiciones de reacción.

7.5. Determinación de pH y humedad del cultivo

Los cambios de pH durante el cultivo sólido se determinaron directamente de los extractos enzimáticos usando un potenciómetro (Spectronic 120). Para medir el contenido de humedad inicial del sustrato y los cambios de humedad durante el transcurso del cultivo sólido, se utilizaron matraces con rastrojo de maíz inoculado. La humedad del sustrato se evaluó con un analizador de humedad (OHAUS MB45) tomando una muestra de material fermentado cada 3 días. Se realizó una prueba de comparación de medias múltiple por el método Tukey ($\alpha = 0.05$) para establecer las diferencias de pH y humedad por día de cultivo y por temperatura (**ver Anexo II**).

7.6. Determinación de proteína extracelular

La proteína extracelular se determinó con el método de Bradford (1976). La reacción se llevó a cabo en tubos de ensaye agregando 800 μ L de una dilución adecuada de extracto enzimático (1:100) con 200 μ L del reactivo de Bradford (Sigma Aldrich). Como blanco se utilizó un volumen de 800 μ L de agua destilada con 200 μ L de reactivo de Bradford. Transcurridos 5 min de reacción a temperatura ambiente se registró la absorbancia a 595 nm. Para determinar la concentración de proteína en las muestras se usó una curva estándar con 2, 4, 6, 8 y 10 μ g/mL de ASB (**ver Anexo I**). Para establecer las diferencias de producción de proteína extracelular por día de cultivo y por temperatura, se realizó una prueba de comparación de medias múltiple por el método de Tukey (**ver Anexo II**).

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. Método de conservación

El hongo *Trametes* sp. EUM1 se preservó en agua destilada estéril y se determinó su viabilidad con el objeto de determinar el periodo de conservación que permitiera mantener viable al microorganismo. Para ello, la viabilidad se determinó cada mes como velocidad de crecimiento radial (V_r) y biomasa seca, tras 7 días de cultivo (**Figura 5 y 6**). Después de conservar el microorganismo por 5 meses, se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento superficial de la cepa conservada y sin conservar para cada mes de conservación ($p < 0.05$). La velocidad de crecimiento obtenida de la cepa que se conservó durante 1 mes fue de 0.679 mm/d, y para la cepa que se conservó por 5 meses fue de 0.602 mm/d ($p < 0.05$). Lo anterior significó un descenso de la velocidad de crecimiento radial de 12.6 %. Se observaron diferencias significativas en la cantidad de biomasa que se recuperó de la cepa conservada y sin conservar para cada mes ($p < 0.05$). La cantidad de biomasa seca que se obtuvo de la cepa que se conservó por 5 meses (24.59 mg) se redujo en un 11.7 % con respecto a la que se obtuvo de la que se conservó por 1 mes (27.79 mg).

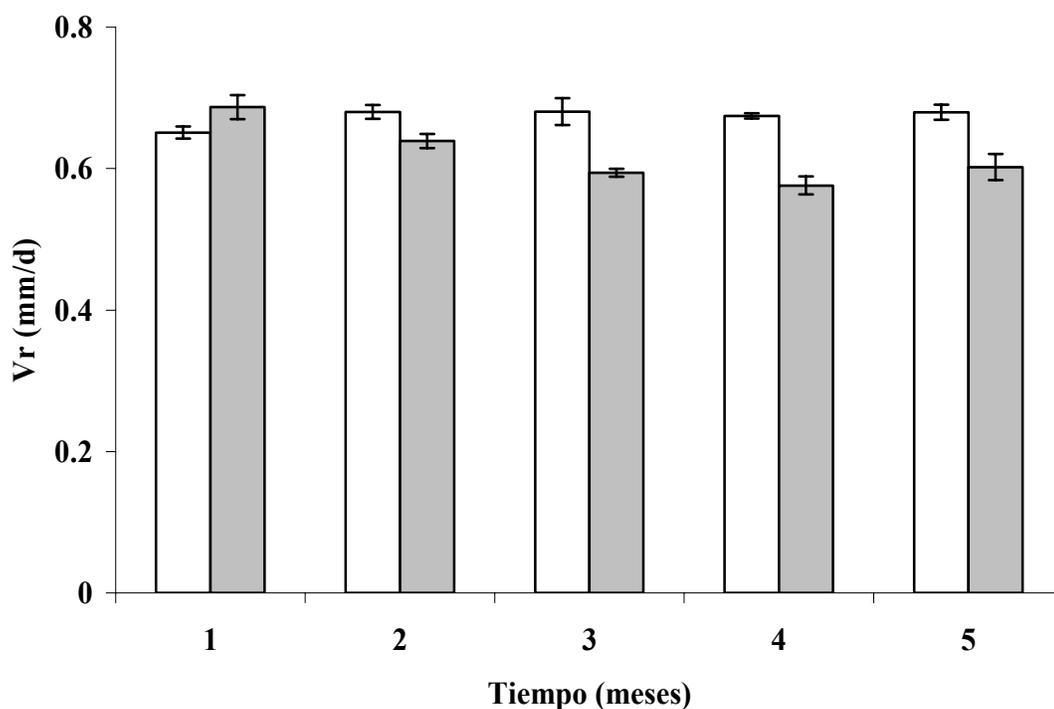


Figura 5. Viabilidad de *Trametes* sp. EUM1 determinada como velocidad de crecimiento radial (V_r) después de conservarse por 5 meses en agua destilada estéril. (□) Cepa sin conservar, (■) Cepa conservada

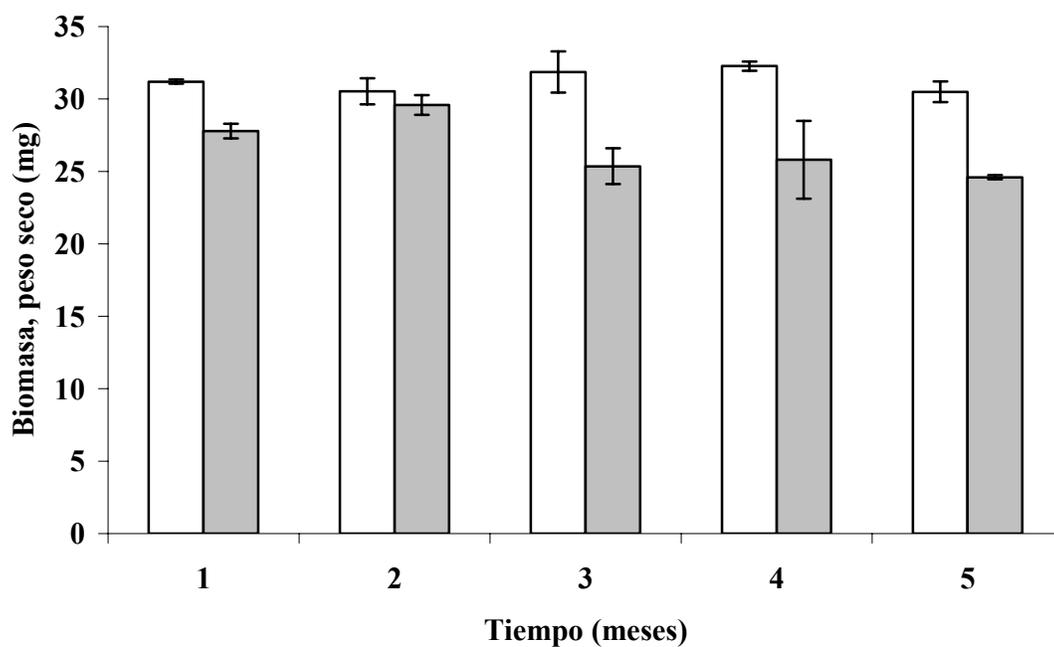


Figura 6. Determinación de biomasa de *Trametes* sp. EUM1 después de conservarse por 5 meses en agua destilada estéril. (□) Cepa sin conservar, (■) Cepa conservada

Los métodos de conservación son técnicas aplicables a los microorganismos para mantenerlos viables, estables ó disponibles por tiempos prolongados. Para conservarlos a largo plazo se utilizan métodos como la liofilización ó la congelación (Smith y Onions, 1983); sin embargo existen métodos alternativos de bajo costo y de fácil utilización como, la resiembra periódica y la conservación en agua destilada (Costa y Ferreira, 1991; Lastra *et al.*, 2002; Borman *et al.*, 2006). En este trabajo, se utilizó el método basado en agua destilada estéril para conservar el hongo *Trametes* sp. EUM1. Después de conservarse 5 meses, la velocidad de crecimiento radial y la biomasa sufrieron un descenso debido al tiempo de conservación, dado que la única fuente de nutrientes fue aportada por las tiras de papel, las cuales contienen celulosa. Al evaluarse la viabilidad no se observaron cambios en las características de crecimiento del hongo como alteraciones en la coloración del micelio ó forma de crecimiento del mismo, como se observó en hongos conservados en agua destilada por más de 1 año (Borman *et al.*, 2006). En este sentido, es importante cerciorarse que no sucedan dichas alteraciones cuando la conservación de *Trametes* sp. EUM1 se prolongue por más de 5 meses. Los hongos filamentosos conservados en agua destilada han permanecido viables de 0.2 a 20 años dependiendo del tipo de microorganismo (Borman *et al.*, 2006; Lastra *et al.*, 2002). Por su parte, los microorganismos conservados en aceite mineral, sílica gel ó nitrógeno líquido han permanecido viables de 0.6 a 40 años (Costa y Ferreira, 1991; Lastra *et al.*, 2002; Stoychev *et al.*, 1998). La conservación de *Trametes* sp. EUM1 en agua destilada basado en tiras de papel puede ser utilizado como método alternativo de bajo costo y de fácil utilización.

8.2. Selección de residuos agrícolas en función a la velocidad de crecimiento radial

Se evaluaron mezclas de rastrojo de maíz ó paja de avena (fuente de nutrientes) con cachaza (fuente de sales minerales) para seleccionar la mejor mezcla de sustratos para el crecimiento de *Trametes* sp. EUM1 en base a la velocidad de crecimiento radial del hongo (**Figura 7**).

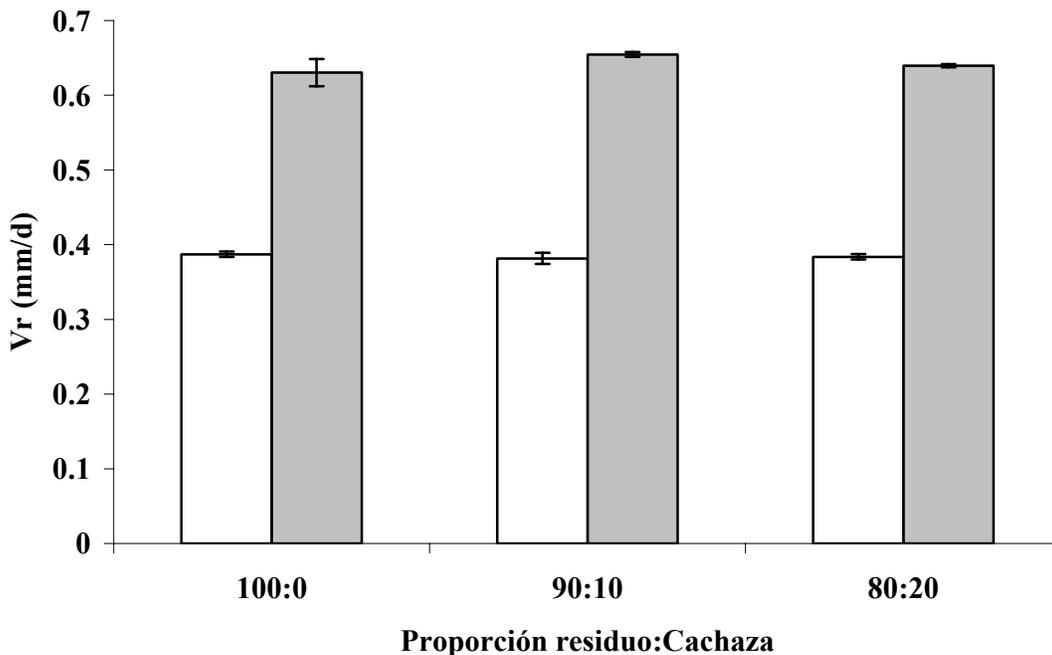


Figura 7. Efecto de la proporción fuente de nutrientes: fuente de sales minerales sobre el crecimiento de *Trametes* sp. EUM1. (□) Paja de avena-Cachaza, (■) Rastrojo de maíz-Cachaza

La cachaza adicionada como fuente de sales minerales sobre los residuos no afectó la velocidad de crecimiento del hongo en las proporciones evaluadas ($p > 0.05$), sin embargo, la fuente de nutrientes proporcionados por el rastrojo de maíz ó la paja de avena afectaron la velocidad de crecimiento radial ($p < 0.05$). Se probó el efecto lineal y cuadrático de la adición de cachaza y proporción de residuos agrícolas sobre la velocidad de crecimiento radial de *Trametes* sp. EUM1, en ambos casos no se observó dicho efecto ($p > 0.05$). De las mezclas de residuos evaluadas, la mayor velocidad de crecimiento radial del hongo se obtuvo sobre rastrojo de maíz ($p < 0.05$), siendo en promedio 67 % mayor a la obtenida sobre las mezclas de paja de avena. Por lo anterior, el rastrojo de maíz se eligió como la única fuente de nutrientes para el crecimiento y producción de enzimas lignocelulolíticas por *Trametes* sp. EUM1.

Al evaluarse el crecimiento de *Trametes* sp. EUM1 sobre mezclas de residuos agroindustriales se encontraron diferencias en la velocidad de crecimiento superficial entre los residuos agrícolas evaluados, independientemente de la adición de cachaza como fuente de sales minerales. Las diferencias pueden ser consecuencia de la composición química de cada uno de

los residuos utilizados, los cuales difieren en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (Yescas *et al.*, 2004), y a su vez, en la cantidad de azúcares simples en forma de glucosa y fructosa (Chen *et al.*, 2007); los cuales fueron utilizados por el hongo *Trametes* sp. EUM1 para su crecimiento.

La cachaza contiene sales minerales que aportan principalmente iones calcio (2.6 % p/p), iones fósforo (1.6 % p/p), iones potasio (0.29 % p/p) y iones azufre (0.19 % p/p) (Zérega y Adams, 1991). Al adicionarse sobre los residuos agrícolas no se observaron cambios en la velocidad de crecimiento, posiblemente por la cantidad de iones presentes en cada uno de los residuos (10-18 % p/v) (Chen *et al.*, 2007). Posiblemente, si se evaluara el efecto de la proporción de cachaza en la producción de enzimas, se encontraría un efecto favorable en los niveles de producción. Muniswaran y Charyulu (1994) evaluaron distintas soluciones de nutrientes para evaluar su efecto en la producción de celulasas durante el crecimiento de *Trichoderma viride* sobre tejido de coco, observando que los niveles de producción de enzima mejoraban como consecuencia del contenido de sales minerales de cada una de las soluciones utilizadas. Un efecto similar fue observado en la producción de xilanasas durante el cultivo de *Aspergillus foetidus* sobre mazorca de maíz (Shah y Madamwar, 2005). Algunos trabajos han presentado resultados similares al evaluar la proporción de residuos agroindustriales, pero su objetivo principal ha sido incrementar la producción de enzimas lignocelulolíticas (Jecu, 2000; Azin *et al.*, 2007); sin evaluar su efecto en el crecimiento del hongo.

El rastrojo de maíz es un residuo agrícola que se produce en grandes cantidades, no obstante, se ha utilizado poco como sustrato para la producción de enzimas lignocelulolíticas (Panagiotou *et al.*, 2003). Al seleccionarlo en términos de velocidad de crecimiento radial se pueden disminuir los riesgos de contaminación por otros hongos, además, se puede reducir el tiempo de cultivo para la producción de enzimas.

8.3. Selección del tamaño de partícula

El rastrojo de maíz se separó por tamaños en base a dos objetivos: seleccionar la fracción más representativa de los tamaños de partícula contenidos en la mezcla original y seleccionar la fracción de partículas más adecuadas para la producción de enzimas lignocelulolíticas en base

a tamaño. Las selección de las partículas se hizo eliminando las fracciones con tamaño de partícula mayor de 4.06 mm y menor de 1.26 mm de las demás fracciones (**Figura 8**).

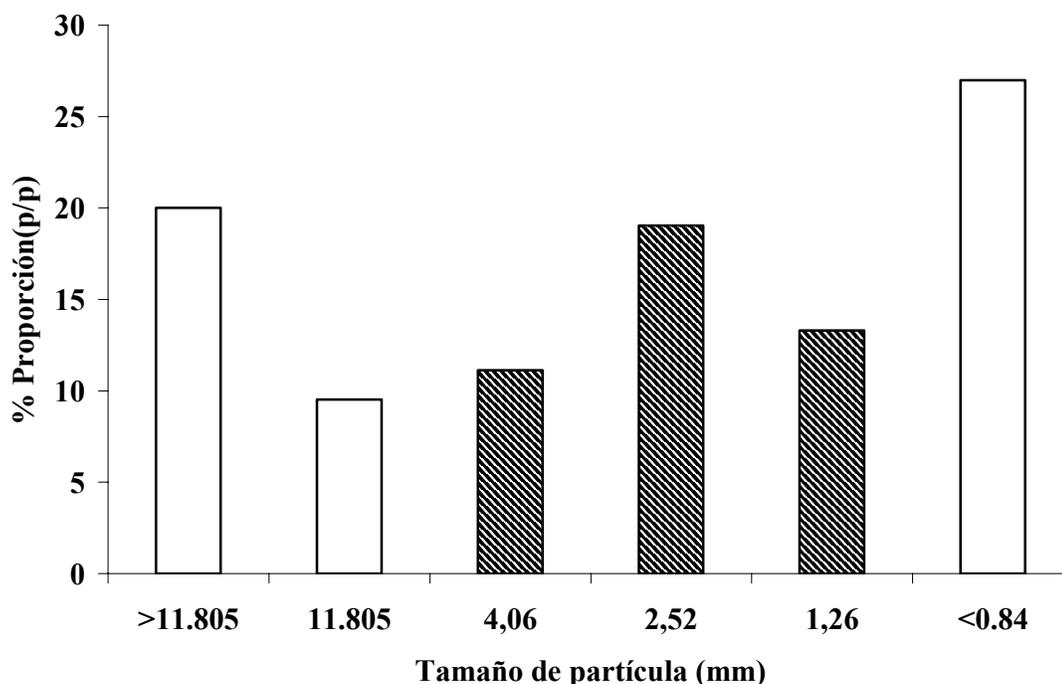


Figura 8. Distribución del tamaño de partícula del rastrojo de maíz

Las fracciones restantes, 46 % de la masa total, contenían los tamaños de partícula de 4.06 mm, 2.52 mm y 1.26 mm. Estos fueron seleccionados para usarse como sustrato para la producción de enzimas lignocelulolíticas. La selección del tamaño de partícula del sustrato es uno de los aspectos más relevantes que deben de tomarse en cuenta para la producción de enzimas en cultivo sólido, puesto que se ha determinado que este factor influye considerablemente en los niveles de producción de las mismas (Pandey, 1991; Jiang *et al.*, 2005; Shukla y Kar, 2006; Mazutii *et al.*, 2007). En este estudio se optó por la utilización de una mezcla de varios tamaños de partícula para la producción de enzimas lignocelulolíticas (4.06 mm, 2.52 mm y 1.26 mm) considerando que la diversidad de tamaños podía favorecer la producción de las tres enzimas. Es decir, los tamaños de partícula grandes (>2.52 mm) podrían favorecer la producción de lacasas al incrementarse el área superficial de la lignina, que es el sustrato de la enzima, y su vez, los tamaños de partícula pequeños (<2.52 mm) podrían

favorecer la producción de celulasas y xilanasas al incrementarse el área superficial de las partes que contienen celulosa y hemicelulosa. Hu y Duvnjak (2004) evaluaron el efecto del tamaño de partícula de la canola en la producción de lacasas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sólido, determinando que en los tamaños de partícula más grandes (0.7 a 1.4 mm) se obtenían los niveles de producción de lacasas más altos en comparación con los obtenidos en los tamaños de partícula más pequeños (<0.7 mm), aparentemente en respuesta al incremento del área superficial de la lignina que estuvo expuesta en la superficie de estas partículas. En concordancia a esto, los valores más altos de producción de xilanasas o de celulasas se han obtenido con la utilización de partículas más pequeñas. Por ejemplo, para producir xilanasas se han utilizado partículas de tamaño de 1.6 mm a 0.18 mm, sin embargo, los niveles más altos de producción se han obtenido en las partículas de tamaño menor a 0.7 mm (Jiang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Botella *et al.*, 2007). Por otro lado, Botella *et al.* (2007) no encontró diferencias en el nivel de producción de xilanasas obtenidas por *Aspergillus awamori* entre los tamaños de partícula grandes (1 a 1.6 mm) y pequeños (<1 mm), usando semillas de uva. Para producir celulasas se han utilizado tamaños de partícula también menores que 0.7 mm (Chahal, 1985; Muniswaran y Charyulu, 1994; Krishna, 1999). Algunos trabajos manifiestan que los mismos resultados pueden ser obtenidos al utilizar mezclas de partículas de tamaños heterogéneos. Pandey, (1991) comparó los niveles de glucoamilasa producida por *Aspergillus niger* sobre granos de arroz de distinto tamaño (1.4 a 0.18 mm) con los niveles de producción obtenidos sobre mezclas de los mismos y encontró que los niveles de producción obtenidos en las partículas más pequeñas (<0.5 mm) fueron similares a los obtenidos sobre las mezclas de partículas de tamaños heterogéneos. Un resultado análogo se obtuvo durante la producción de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* donde los niveles de producción de enzimas más altos se obtuvieron sobre mezclas de partículas de bagazo de caña heterogéneas (Membrillo *et al.*, 2005).

Una vez que se seleccionó la proporción de las fracciones de distintos tamaños de partícula, se evaluaron dos métodos de extracción para recuperar las enzimas producidas sobre el rastrojo de maíz durante el cultivo de *Trametes* sp. EUM1.

8.4. Métodos de recuperación de enzimas

En una segunda etapa, se comparó la capacidad de extracción de enzimas lignocelulolíticas con agua destilada y amortiguador de citratos (50 mM, pH 5), en dos tiempos de extracción (15 y 30 min), para recuperar las enzimas producidas sobre el rastrojo de maíz. El agua destilada permitió recuperar la mayor cantidad de enzimas lignocelulolíticas cuando el tiempo de extracción se amplió de 15 a 30 min ($p < 0.05$), esto significó un incremento en la recuperación de celulasas de 7 % y 12.6 % para xilanasas; mientras que para lacasas significó un incremento de 52 % (**Figura 9**). De forma similar, la cantidad de enzima recuperada con amortiguador de citratos fue mayor con 30 min de extracción ($p < 0.05$), sin embargo, la cantidad de celulasas recuperada se incrementó sólo 5.8 % y para xilanasas 17.7 %, asimismo, la cantidad de lacasas recuperada se incrementó sólo 38.3 % (**Figura 10**). De los agentes de extracción probados, el agua permitió recuperar la mayor cantidad de celulasas, xilanasas y lacasas con 30 min de tratamiento ($p < 0.05$), por lo cual, se utilizó el agua destilada para la extracción de las mismas. Su utilización permitió medir los cambios de pH durante el cultivo para asociarlos con las variaciones en la producción de enzimas lignocelulolíticas.

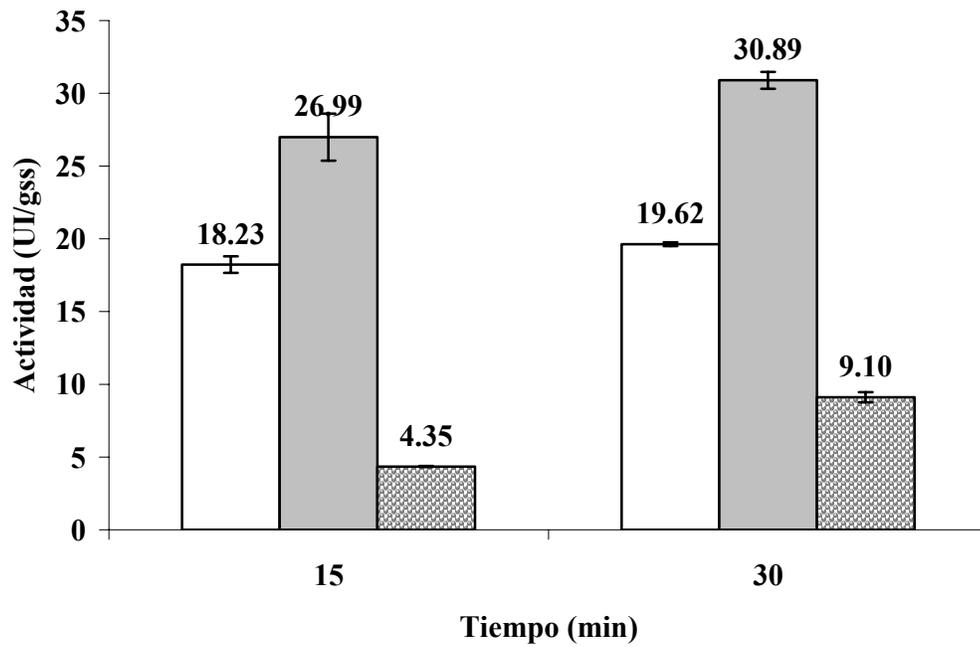


Figura 9. Cantidad de enzimas lignocelulolíticas recuperadas del rastrojo de maíz después de la extracción con agua destilada. (□) Celulasas, (■) Xilanasas, (▨) Lacasas

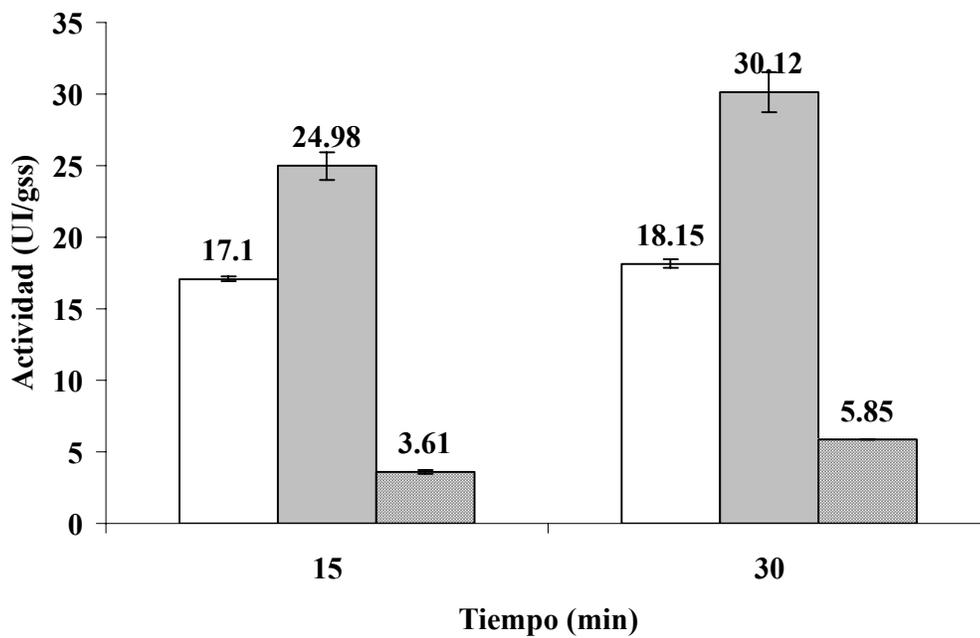


Figura 10. Cantidad de enzimas lignocelulolíticas recuperadas del rastrojo de maíz después de la extracción con amortiguador de citratos (50 mM, pH 5). (□) Celulasas, (■) Xilanasas, (▨) Lacasas

En cultivo sólido, después de producir las enzimas sobre los sustratos sólidos, la tarea más común es tratar de recuperarlas de los mismos. En la recuperación de enzimas por lo general se mide una sola, pero cuando se desea extraer más de una es necesario encontrar el método más adecuado para recuperarlas en mayor cantidad a partir de la fase sólida. Al respecto, los agentes utilizados para recuperar celulasas, xilanasas ó lacasas incluyen el agua destilada (Chahal *et al.*, 1983; Jecu, 2000; Yang *et al.*, 2006; Jing *et al.*, 2007), soluciones amortiguadoras (Shah *et al.*, 2005; Azin *et al.*, 2007) ó mezclas de agua con surfactantes como el Tween 80 (Urbánszki *et al.*, 2000; Rezendle *et al.*, 2002). El incremento en la recuperación de xilanasas que se obtuvo en este estudio fue similar al encontrado por Rezendle *et al.* (2002), cuando se comparó la capacidad de extracción del amortiguador de acetatos (50 mM, pH 5) y del agua- Tween (0.01%) para recuperar las xilanasas producidas por *Trichoderma* sobre el bagazo de caña entre 15 y 60 min, este resultado sugiere que el tiempo de extracción no tiene gran influencia en la recuperación de celulasas y xilanasas. Lo anterior podría justificar porque en la mayoría de los trabajos se prefieren tiempos de extracción grandes (0.5 a 3 h), en un intento por recuperar la mayor cantidad de enzima (Urbánszki *et al.*, 2000; Jecu, 2000). Por otro lado, los resultados obtenidos muestran que con 30 min de extracción se puede extraer una cantidad considerable de enzimas del rastrojo de maíz. Según las estimaciones de Chahal *et al.* (1983) la cantidad de celulasas que no se recuperan de la paja de trigo, un sustrato similar al rastrojo de maíz, después de extraerse con agua durante 30 min es del orden del 7 al 10 %, por lo que se puede suponer que la cantidad de enzimas del rastrojo de maíz se encuentra en el mismo orden.

La cantidad de lacasa que se recuperó después de 6 días de cultivo fue mejor con agua destilada que con amortiguador de citratos. Posiblemente, a causa de las diferencias de solubilidad de las enzimas en las soluciones utilizadas. Vikineswary *et al.* (2006), determinó los cambios en la cantidad de lacasas que se recuperaban del tejido de palma tras varios días de cultivo del hongo *Pycnoporus sanguineous*, encontrando que las diferencias de pH entre el agua, que se ajusto a pH 8, y el amortiguador de acetatos (pH 4.8) determinaban la cantidad de lacasas que se recuperan de la fase sólida. Adicionalmente, estos autores encontraron que la temperatura de extracción influía en la cantidad de enzima que se recuperaba. Además del tiempo de extracción y del tipo de soluciones usadas para recuperar las enzimas, el volumen

de extracción puede influir en la recuperación de las mismas. Para extraerlas se recomienda utilizar una relación soporte- volumen de 1:20, no obstante la relación puede variar de acuerdo a las características de los soportes utilizados durante el cultivo sólido (Urbánszki *et al.*, 2000; Rezendle *et al.*, 2002). En este sentido, la extracción de enzimas del rastrojo de maíz se llevó a cabo usando la relación antes mencionada.

8.5. Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lignocelulolíticas

La temperatura de cultivo de *Trametes* sp. EUM1 se modificó de 30 a 45 °C, con intervalos de 5 °C, para evaluar los cambios en los niveles de producción, y productividad de enzimas lignocelulolíticas sobre rastrojo de maíz. Los perfiles de producción de celulasas que se obtuvieron en las respectivas temperaturas después de 12 días de cultivo se muestran en la **Figura 11**. La producción de celulasas se inició a partir del primer día a 40 y 45 °C, siendo diferente de la producción obtenida a 30 y 35 °C ($p < 0.05$). En estas últimas temperaturas la producción de celulasas inicio a partir del día 5 y 4, respectivamente.

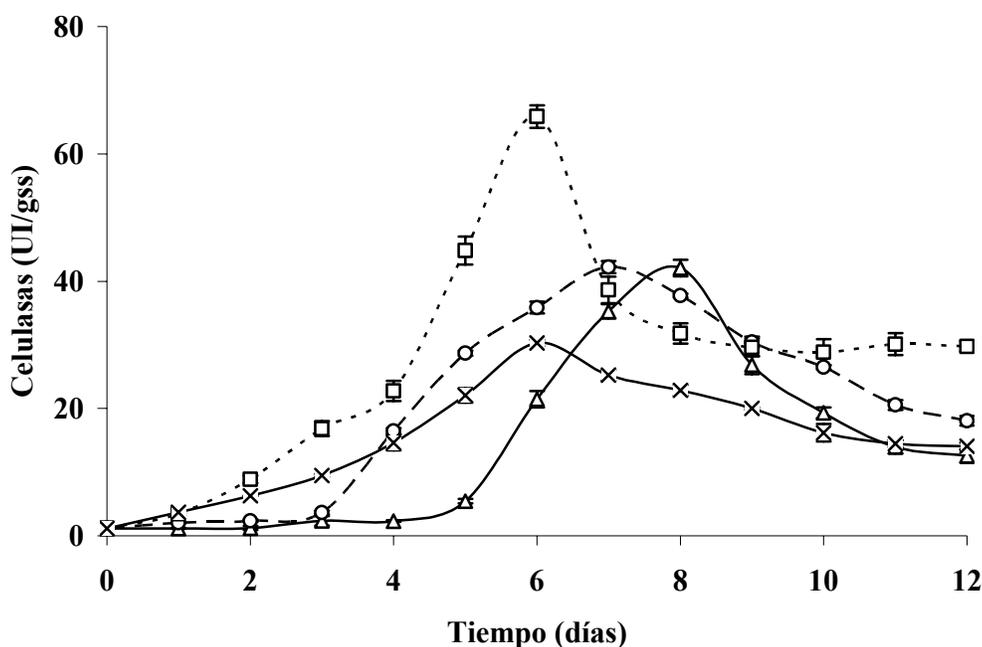


Figura 11. Efecto de la temperatura de cultivo de *Trametes* sp. EUM1 en la producción de celulasas sobre rastrojo de maíz. Temperatura: (Δ) 30 °C, (○) 35 °C, (□) 40 °C, (x) 45 °C

Por otro lado, la producción de celulasas a 40 °C fue diferente de la producción obtenida para las demás temperaturas durante los primeros 6 días ($p < 0.005$). El aumento de la misma de 30 a 40 °C permitió mejorar la producción 1.6 veces, este incremento estuvo acompañado por la reducción del tiempo necesario para alcanzar los niveles de producción máximos de enzima de 8 a 6 días, respectivamente. A 45 °C los niveles de producción fueron menores a los determinados para las demás temperaturas, alcanzando sólo 63.9 % de la producción máxima obtenida a 40 °C. Por otro lado, después de obtenerse los niveles de producción más altos la producción de celulasa decreció abruptamente para cada una de las temperaturas evaluadas, destacando las caídas obtenidas a 40 °C, las cuales fueron las más evidentes.

Los perfiles de producción de xilanasas se comportaron de forma similar a los de celulasas. La producción de xilanasas se inicio desde el primer día a 35, 40 y 45 °C, siendo diferente de la producción obtenida a 30 °C ($p < 0.05$), la cual inició a partir del día 4. La producción a 40 °C fue diferente de la producción obtenida para las demás temperaturas durante los 12 días de cultivo ($p < 0.005$). En contraste con la producción de celulasas, la producción de xilanasas mejoró 2.8 veces cuando la temperatura de cultivo se modificó de 30°C a 40°C. A 45 °C la producción de xilanasas fue menor a la observada a 35 ó 40 °C, obteniéndose sólo 38.6 % de la producción máxima observada a 40 °C. Después de obtenerse los niveles de producción más altos, la cantidad de enzima empezó a decaer de forma continua, pero no tan drásticamente como en el caso de las celulasas, no obstante, las caídas más drásticas nuevamente se presentaron en la temperatura de cultivo de 40 °C (**Figura 12**).

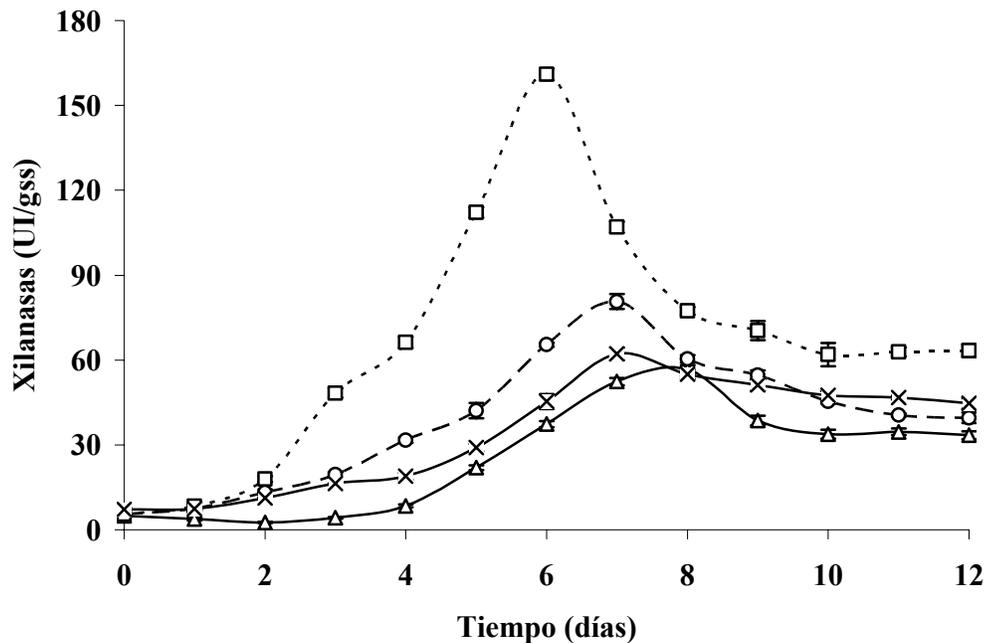


Figura 12. Efecto de la temperatura de cultivo de *Trametes* sp. EUM1 en la producción de xilanasas sobre rastrojo de maíz. Temperatura: (Δ) 30 °C, (○) 35 °C, (□) 40 °C, (x) 45 °C

Los perfiles de producción de lacasas también se determinaron durante 12 días de cultivo para cada una de las temperaturas (**Figura 13**). La cantidad de lacasas no mostró cambios evidentes en los primeros dos días, sin embargo, la producción se elevó drásticamente a partir del tercer día para la temperatura de 35 °C, y cuarto día, para las demás temperaturas. Durante los primeros 8 días de cultivo, la producción de lacasas a 35 °C fue mayor respecto a las demás temperaturas ($p < 0.05$). Es importante mencionar que el pico de producción de lacasas antecedió a los picos de producción de celulasas y xilanasas por 2 días cuando la temperatura de cultivo fue de 30 °C. Respecto a las temperaturas de 35 y 40 °C, los picos de producción aparecieron en el día 6, exactamente donde se observaron los niveles de producción más altos para celulasas y xilanasas (40 °C). Por otro lado, los resultados muestran que la temperatura de 35 °C es la más favorable para la producción de lacasas, puesto que al variarse de 30 a 35 °C, se obtuvo un incremento en la producción de 2.7 veces, después de 6 días de cultivo. Esta temperatura difiere con la temperatura ideal para la producción de las celulasas y xilanasas, las cuales alcanzaron sus niveles de producción más altos a 40 °C después de 6 días de cultivo. En

los cultivos que se mantuvieron a 40 °C se observó una reducción en los niveles de producción de lacasas alcanzándose sólo 67.5 % de la producción obtenida a 35 °C. El declive en la producción no fue continuo al incrementarse la temperatura a 45 °C, al contrario, el nivel de producción que se alcanzó después de 10 días fue semejante al obtenido a 35 °C (10.05 UI/gss). De forma similar a las demás enzimas, la producción decayó drásticamente después de alcanzarse la producción máxima, siendo la excepción la temperatura de 45 °C donde el nivel de lacasas permaneció constante después de 10 días.

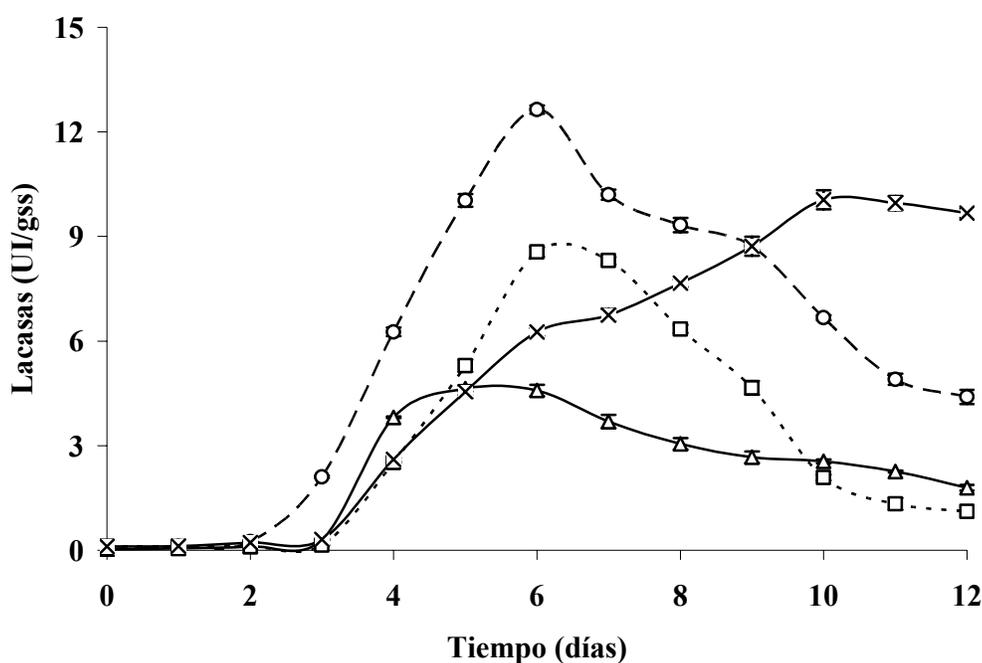


Figura 13. Efecto de la temperatura de cultivo de *Trametes* sp. EUM1 en la producción de lacasas sobre rastrojo de maíz. Temperatura: (Δ) 30 °C, (○) 35 °C, (□) 40 °C, (x) 45 °C

Además de evaluarse los cambios en los niveles de producción de celulasas, xilanasas y de lacasas, también se evaluaron los cambios en la velocidad de formación de enzimas para cada una de las temperaturas (**Figura 14**). Los cambios en la productividad de xilanasas y celulasas fueron más evidentes cuando la temperatura se incrementó de 30 a 40 °C ($p < 0.05$), asimismo, este cambio permitió elevar la velocidad de producción de xilanasas y de celulasas en 3.8 y 2.1 veces, respectivamente. Respecto a las lacasas, los cambios de productividad fueron mayores al variarse la temperatura de 30 a 35 °C ($p < 0.05$) permitiendo elevar la producción 2.3 veces.

De forma similar a los perfiles de producción, la productividad de todas las enzimas que fueron medidas durante el transcurso del cultivo sólido decreció cuando la temperatura fue de 45 °C.

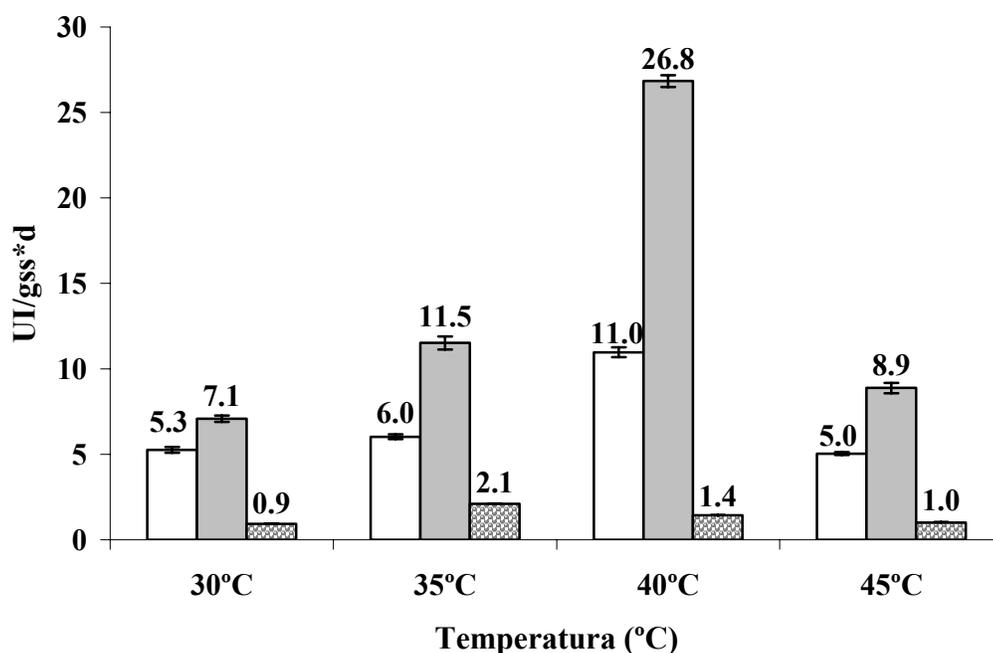


Figura 14. Efecto de la temperatura de cultivo de *Trametes* sp. EUM1 en la productividad de enzimas lignocelulolíticas sobre rastrojo de maíz. Temperatura: (□) Celulasas, (■) Xilanasas, (▨) Lacasas

Los resultados obtenidos indican que la temperatura de cultivo con el hongo *Trametes* sp. EUM1 es un factor muy importante que regula en distinto grado los niveles y la velocidad de producción de cada una de las enzimas lignocelulolíticas.

Reportes en la literatura señalan que las especies de *Trametes* que se han estudiado, sólo producen enzimas en medio líquido y en medio sólido a temperaturas de 28 ó 30 °C (Levin y Forchiassin, 1998; Nyanhongo *et al.*, 2002a; Jing *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2004). En este estudio, se determinó que el hongo *Trametes* sp. EUM1 es capaz de crecer y de producir enzimas lignocelulolíticas en medio sólido en un intervalo de temperatura de 30 a 45 °C, determinándose que la temperatura favorable para la producción de celulasas y xilanasas fue de 40 °C y para lacasas de 35 °C. Aparentemente, el hongo presenta las características de los microorganismos termotolerantes, los cuales suelen crecer entre 40 y 47 °C (Mouchacca,

2000). Posiblemente, *Trametes* sp. EUM1 adapte la composición de su membrana citoplasmática para regular el transporte de solutos y de iones para poder crecer a esas temperaturas, tal y como sucede en los hongos y en las bacterias termofílicas (Van de Vossenberg *et al.*, 1995; Konings *et al.*, 2006).

Al inicio del cultivo sólido se detectó la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas independientemente de la temperatura de cultivo, esto indica que el micelio excreta cantidades pequeñas de enzimas antes de ponerse en contacto con las fibras del rastrojo de maíz. Lo que se debe a la expresión basal de enzimas en los hongos de pudrición blanca para iniciar la hidrólisis de sus sustratos. Levin y Forchiassin (1997) determinaron que el hongo *Trametes trogii* producía pequeñas cantidades de endoxilanasas cuando crecía en medio líquido en presencia de sustratos que no eran hidrolizados por las endoxilanasas, sugiriendo que estas enzimas eran excretadas en niveles bajos durante el crecimiento del micelio. Por otro lado, durante el crecimiento de *Trametes* sp. EUM1 se determinó que la producción de enzimas lignocelulolíticas se llevó a cabo en forma simultánea y con niveles de producción similares para xilanasas y lacasas, aunque no para celulasas. A pesar de ello, la producción conjunta de las tres enzimas puede representar una ventaja cuando sean utilizadas en algún campo de aplicación donde sea necesaria la presencia de las tres actividades enzimáticas. Por ejemplo, en alimentación animal se puede aprovechar la acción conjunta de las tres enzimas para mejorar la digestibilidad de los forrajes, hidrolizando los polímeros estructurales, principalmente de la lignina, que limita el aprovechamiento de los alimentos. En este sentido, los productos comerciales son incapaces de actuar en la lignina porque contienen mayoritariamente celulasas y xilanasas (Beauchemin *et al.*, 2004).

Al evaluar el efecto de la temperatura de cultivo de *Trametes* sp. EUM1 en la producción de enzimas se observaron incrementos importantes en la producción y en la velocidad de producción de todas las enzimas. En el intervalo de temperatura de 30 a 45 °C los cambios de producción de xilanasas y de lacasas fueron más evidentes que los determinados para celulasas, este resultado indica que el hongo *Trametes* sp. EUM1 responde a los cambios de temperatura, en medio sólido, secretando mayor cantidad de xilanasas y de lacasas. Rizzatti *et al.* (2004) encontró un aumento en la secreción de xilanasas cuando la temperatura de crecimiento de *Aspergillus phoenicis* se incrementó de 25 a 40 °C, en este estudio también se

determinó que el incremento de la secreción de xilanasas fue acompañado por la reducción drástica de los niveles intracelulares de la enzima.

La secreción de celulasas fue más evidente al incrementarse la temperatura de cultivo de 30 a 40 °C, elevando la producción y la productividad 1.6 y 2.1 veces, respectivamente. Tao *et al.* (1997), elevaron la producción de 200 a 450 UI/gss cuando modificaron la temperatura de crecimiento de *Trichoderma viride* de 20 a 30 °C, el cambio en la producción de celulasas se acompañó por la reducción del tiempo para alcanzar los niveles de producción respectivos, de 5 a 4 días. Lo anterior permitió incrementar la productividad de 40 a 112 UI/gss*día. Dichos incrementos son mucho mayores a los obtenidos en este estudio dado que *Trichoderma* es un hongo mesófilo sobreproductor de celulasas. Sin embargo, si evaluamos únicamente la magnitud del incremento en los parámetros antes mencionados se deduce que la producción y la productividad sólo incrementó 2.25 y 2.8 veces, respectivamente, los cuales son valores semejantes a los encontrados en este estudio. De forma similar, Jecu (2000) mejoró la producción y la productividad de celulasas 1.6 veces con un tiempo de cultivo de 5 días, al modificar la temperatura de crecimiento del hongo *Aspergillus niger* de 25 a 30 °C, en este caso, sólo fue posible calcular la magnitud del cambio porque la actividad de celulasas se reportó en UI/mL. En hongos termófilos los cambios en la producción de celulasas son más drásticos, por ejemplo en el hongo *Thermoascus auranticus* la producción de celulasas se incrementó de 5 a 30 UI/gss (6 veces) en 4 días de cultivo, cuando la temperatura se varió de 30 a 50 °C (Da silva *et al.*, 2005). Pero los niveles de producción de celulasas, en general, que se han obtenido por otras especies de *Thermoascus* son aún más bajos (Jiang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006); si se les compara con los hongos del género *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, los cuales las producen en orden de 50 a 450 UI/gss (Chahal *et al.*, 1984; Tao *et al.*, 1997; Jecu, 2000; Panagiotou *et al.*, 2003).

En el caso de las xilanasas, los valores máximos de producción (161 UI/gss) y de productividad (26.8 UI/gss*d) que se obtuvieron son más pequeños que los determinados para otros microorganismos productores de xilanasas. Por ejemplo, durante el crecimiento de *Trichoderma longibrachatum* sobre paja de trigo, la producción de xilanasas se elevó de 500 a 2000 UI/gss durante 4 días de cultivo cuando la temperatura se modificó de 25 a 30 °C, este cambio en la producción permitió elevar la productividad de 125 a 500 UI/gss*día, lo que

significa un incremento de 4 veces (Azin *et al.*, 2007). Shah y Madamwar (2005) obtuvieron una producción similar al modificar la temperatura de cultivo de *Aspergillus foetidus* sobre mazorca de maíz de 25 a 30 °C. Da silva *et al.* (2005), por su parte mejoraron la producción de xilanasas durante el cultivo de *Teramoascus auranticus*, sobre el mismo sustrato, de 15 a 60 UI/gss cuando modificó la temperatura de 30 a 50 °C, en estas condiciones de temperatura, la productividad se incrementó de 3.7 a 15 UI/gss*día. En cambio, durante el crecimiento de *Bacillus pulmonaris* sobre granos de trigo se han obtenido con 3 días de cultivo de 2000 a 6000 UI/gss de xilanasas cuando la temperatura de crecimiento del hongo se mantuvo a 30 y 37 °C, respectivamente; el incremento observado en la producción permitió elevar la productividad de 666 a 2000 UI/gss*día, lo que equivale a un incremento de 3 veces (Battan *et al.*, 2006).

En medio líquido y en medio sólido no hay estudios del efecto de la temperatura en la producción de lacasas en microorganismos mesófilos ni en otras especies del género *Trametes*, porque estos sólo crecen y producen sus enzimas en el intervalo de temperatura de 28 a 30 °C (De Souza *et al.*, 2002; Panagiotou *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004; Kachlishvili *et al.*, 2005; Vikineswary *et al.*, 2006; Jing *et al.*, 2007).

En este trabajo se obtuvieron incrementos considerables de producción y de productividad de enzimas lignocelulolíticas. A pesar de ello, los niveles de producción y de productividad máximos de celulasas y xilanasas fueron menores a los obtenidos por los hongos sobreproductores, aunque son similares, cuando se les compara con los obtenidos por algunos hongos mesófilos de los géneros *Pleurotus*, *Lentinus*, *Trametes*, *Bacillus*, *Trichoderma* ó con hongos termófilos del género *Teramoascus*, los cuales producen celulasas en el intervalo de 3 a 150 UI/gss y de xilanasas de 6 a 250 UI/gss (Muniswaran y Charyulu, 1994; Kumaran *et al.*, 1997; Krishna *et al.*, 1999; De Souza *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Kachlishvili *et al.*, 2005). Por otro lado, los niveles de lacasas máximos obtenidos por *Trametes* sp. EUM1 (12.6 UI/gss) son mayores a los reportados por algunos hongos mesófilos de los géneros *Pleurotus*, *Lentinus*, y *Trametes* de los cuales se han obtenido de 1.3 a 3.9 UI/gss (Kachlishvili *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2004); pero menores a los obtenidos por las especies de hongos de *Pycnoporus sanguineus* (7.5 a 46 UI/gss), *Pleurotus pulmonarius* (8600 UI/gss) ó *Trametes gallica* (1.3-30 UI/gss), dado que las condiciones del cultivo sólido fueron optimizadas

(Vikineswary *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2007). Estos estudios de producción no consideraron el efecto de la temperatura de crecimiento porque las especies antes mencionadas sólo crecen entre 28 y 30 °C, mientras que el hongo *Trametes* sp. EUM1 fue capaz de producir todas sus enzimas a temperaturas superiores.

8.6. Producción de proteína extracelular durante el cultivo sólido a diferentes temperaturas

Los perfiles de producción de proteína extracelular se determinaron durante 12 días para relacionarlos con los de producción de enzimas (**Figura 15**). Los resultados muestran que, tanto, los incrementos como las caídas en la producción de proteína extracelular, estuvieron relacionados con los respectivos incrementos y las caídas de actividad enzimática. Durante los primeros días los niveles de producción de proteína extracelular se incrementaron hasta alcanzar su valor máximo, y después empezaron a decaer constantemente. Asimismo, el nivel de producción de proteína extracelular más alto (17.6 mg/gss) se obtuvo en el día 6 a 40 °C, justo donde se consiguieron los niveles de producción de enzimas más altos, pero también donde las caídas de proteína extracelular y de actividad enzimática fueron las más drásticas. De forma similar, el nivel de producción de proteína extracelular más bajo (11.9 mg/gss) se obtuvo a 30 °C, precisamente donde se obtuvieron los niveles de producción de enzimas mínimos. Los perfiles obtenidos a 35 y 40 °C se comportaron de forma similar, y los picos de producción respectivos se obtuvieron entre el día 5 y 8, coincidiendo con los picos de producción de enzimas a las mismas temperaturas.

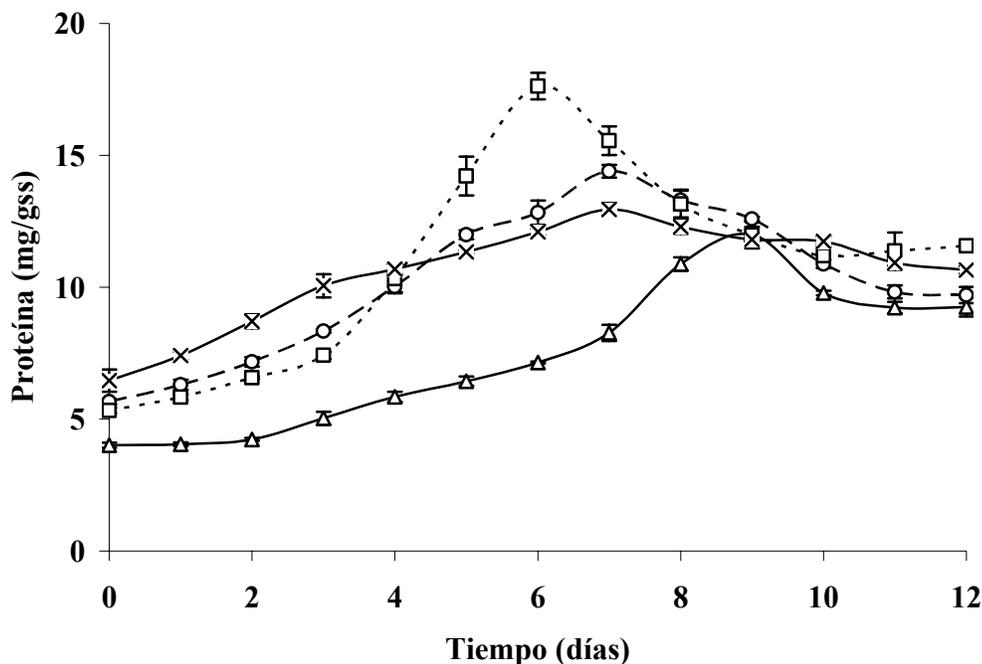


Figura 15. Perfiles de producción de proteína extracelular determinados durante el cultivo de *Trametes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz a varias temperaturas. Temperatura: (Δ) 30 °C, (○) 35 °C, (□) 40 °C, (x) 45 °C

8.7. Cambios de pH durante el cultivo sólido a diferentes temperaturas

Durante el cultivo sólido también se determinaron los cambios de pH para relacionarlos con los cambios en los niveles de producción de enzimas. Durante los primeros días el pH descendió paulatinamente hasta alcanzar un valor mínimo (~5.8), y después empezó a incrementarse hasta alcanzar un valor máximo entre 6.3 y 7, dependiendo de la temperatura de cultivo (**Figura 16**). El descenso de pH estuvo relacionado con el incremento de la producción de enzimas y de proteína extracelular; mientras que su incremento estuvo relacionado con las pérdidas de actividad enzimática y de proteína extracelular. Los cambios de pH más drásticos se obtuvieron a 40 °C, justo donde se alcanzaron los niveles de producción de enzimas más altos, pero también donde se presentaron las caídas de actividad enzimática más drásticas.

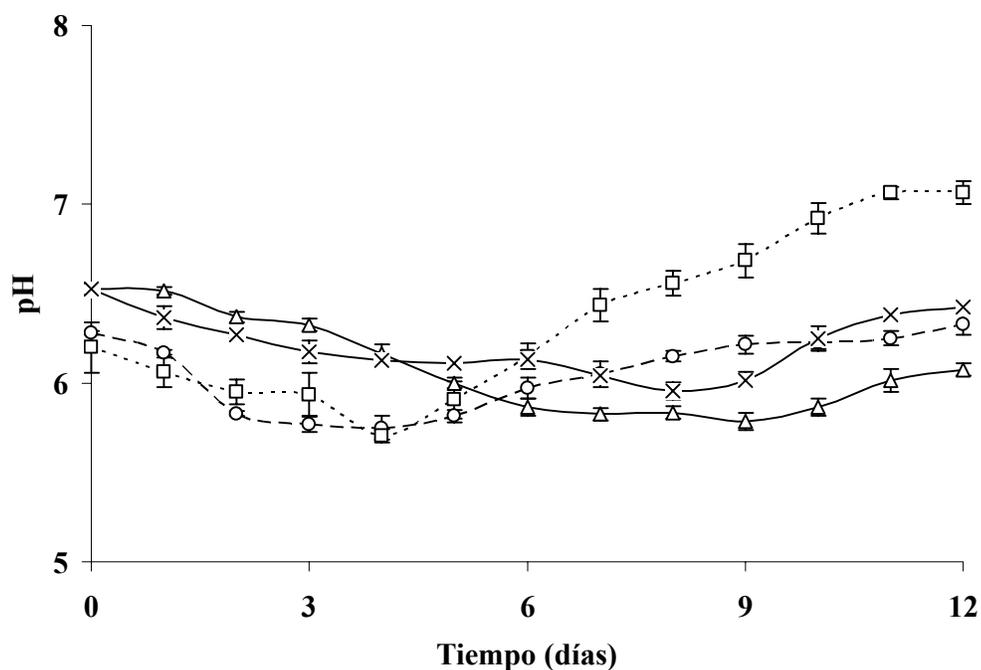


Figura 16. Cambios de pH durante el cultivo de *Trametes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz a varias temperaturas. Temperatura: (Δ) 30 °C, (○) 35 °C, (◻) 40 °C, (×) 45 °C

La producción de proteína extracelular y de enzimas se incrementó con el tiempo hasta alcanzar su valor máximo y después, en ambos casos, la producción empezó a decaer constantemente. Este comportamiento concuerda con lo encontrado por otros estudios donde se ha observado que la producción de enzimas lignocelulolíticas decae después de haberse obtenido los niveles de producción máximos (Levin y Forchiassin, 1998; Muniswaran y Charyulu, 1994; De Souza *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2002). Las caídas abruptas en la producción de enzimas probablemente fueron causadas por la producción de proteasas durante el cultivo sólido, dado que las caídas de actividad enzimática se relacionaron con las pérdidas de proteína extracelular y con los incrementos de pH, lo cual es una característica de la proteólisis de las proteínas. El descenso de pH durante los primeros días pudo ser causado por la producción de algunos ácidos como el acético y el glucorónico generados durante la hidrólisis de los componentes estructurales de la lignocelulosa presentes el rastrojo de maíz (Muniswaran y Charyulu, 1994; Polizeli *et al.*, 2005). A pesar de que el pH descendió hasta

~5.8, este se encuentra dentro del intervalo de pH para la producción de enzimas lignocelulolíticas, el cual se encuentra entre 5 y 7.

Algunos trabajos han confirmado la coproducción de proteasas durante el cultivo sólido durante la producción de enzimas lignocelulolíticas, determinado que la secreción de proteasas en el medio sólido impide mantener los niveles de producción de enzimas (Ferreira *et al.*, 1999; Cabaleiro *et al.*, 2002). En este estudio, la producción de proteasas podría estar afectando los niveles de actividad de cada enzima en grado distinto, y de acuerdo a la temperatura de cultivo las proteasas podrían producirse en niveles distintos. La primera suposición podría explicar si las celulasas y las xilanasas son menos susceptibles que las lacasas a la acción de las proteasas a 40 °C (**Figura 11 y 12**), donde los niveles de producción de lacasas decayeron; mientras que la segunda suposición, podría explicar el incremento observado en la producción de lacasas a la temperatura de 45 °C (**Figura 13**).

8.8. Cambios de humedad durante el cultivo sólido a diferentes temperaturas

Los cambios de humedad del cultivo sólido se determinaron durante el crecimiento de *Trametes* sp. EUM1, esto con el fin de corroborar que las pérdidas de actividad enzimática no estuvieran asociadas con las pérdidas de humedad por efecto de la temperatura de cultivo. Para ello, se tomaron muestras de rastrojo de maíz fermentado cada 3 días para determinar el contenido de humedad. Después de 12 días de cultivo no se observaron pérdidas de humedad, de hecho, se observaron ligeros incrementos en el contenido de humedad del sustrato, a pesar de ello, la humedad se mantuvo alrededor de 80 % (**Figura 17**).

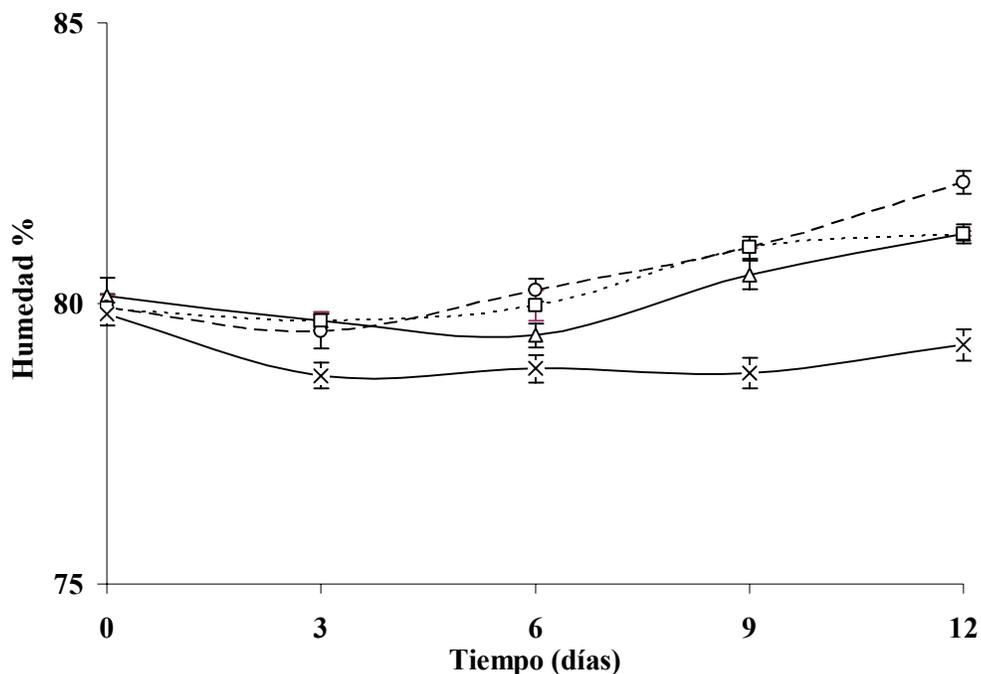


Figura 17. Cambios de humedad durante el cultivo de *Trametes* sp. EUM1 sobre rastrojo de maíz a varias temperaturas. Temperatura: (Δ) 30 °C, (○) 35 °C, (□) 40 °C, (x) 45 °C

Las pérdidas de actividad enzimática no fueron causadas por las variaciones de la humedad de los cultivos, como ha sucedido con la producción de otras enzimas, por ejemplo, durante el crecimiento de *Bacillus* sobre cáscara de plátano se ha observado que las caídas de actividad de amilasa fueron causadas por las pérdidas de humedad del sustrato cuando la temperatura de producción se mantuvo a 40 °C (Mazutti *et al.*, 2007). Aunque en este estudio, las variaciones de humedad no se relacionaron con las pérdidas de actividad enzimática, el nivel de humedad que se empleó para la producción de enzimas podría favorecer la aparición de actividad proteolítica. Ferreira *et al.* (1999) observó un incremento en la actividad proteolítica durante la producción de xilanasas por *Aspergillus awamori* cuando el contenido de humedad del sustrato superaba el 80 %. Sin embargo, es necesario corroborar el efecto, para determinar si el nivel de humedad está relacionado con la aparición de actividad proteolítica.

9. CONCLUSIONES

- El método de conservación en agua destilada, basado en tiras de papel permitió mantener viable el hongo por un periodo de 5 meses. De manera que se puede considerar como una alternativa sencilla y de bajo costo para la conservación de la cepa, evitando el consumo de energía eléctrica.
- La velocidad de crecimiento superficial de *Trametes* sp. EUM1 sobre paja de avena y sobre rastrojo de maíz, esta influenciada por el tipo de sustrato, pero no de la fuente de sales minerales adicionada como cachaza.
- El mejor método de extracción de enzimas lignocelulolíticas fue con agua destilada con 30 min, lo anterior permitió medir los cambios de pH a lo largo del cultivo sólido
- Los niveles y la productividad de enzimas lignocelulolíticas se incrementaron drásticamente al modificarse la temperatura de 30 a 40 °C. Este intervalo de temperatura fue mayor al utilizado por otros hongos mesófilos para producir enzimas lignocelulolíticas.
- La temperatura de 40 °C fue la idónea para la producción de celulasas y xilanasas; mientras que la temperatura de 35 °C fue la mejor para lacasas.
- Las caídas de actividad de celulasas y xilanasas más drásticas se presentaron a la temperatura de 40 °C. Todas, las caídas de actividad enzimática estuvieron relacionadas con las caídas de proteína extracelular y con los incrementos de pH, lo cual puede ser indicio de la presencia de actividad proteolítica, pero con efectos diferentes para cada enzima.

10. PERSPECTIVAS

Es necesario estudiar los factores que impiden mantener los niveles de producción constantes. El primer paso sería determinar los niveles de producción de proteasas a distintos valores de humedad con el objeto de verificar si el nivel de humedad utilizado en este estudio favoreció la aparición de actividad proteolítica, de ser así, se debe reducir el contenido de agua del cultivo para disminuir los niveles de producción de proteasas, lo cual permitiría elevar la producción de enzimas. Después, se deben obtener los perfiles y el tipo de proteasas para cada una de las temperaturas que se evaluaron, para determinar el efecto de las mismas sobre la producción de enzimas durante el transcurso del cultivo, lo anterior aportará información acerca del tipo de proteasas que limitan en mayor grado el mantener los niveles de producción de enzimas, además, de la forma en que estas regulan la producción de cada una de las enzimas producidas de acuerdo a la temperatura del cultivo. Con esta información, se podría explicar el incremento observado en la producción de lacasas a 45 °C y las caídas abruptas de actividad de celulasas y xilanasas a 40 °C, así como, para los otros perfiles obtenidos a las demás temperaturas.

11. REFERENCIAS

- Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Paulo A.C., and Gübitz G.M., 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8): 3357-3362.
- Asgher M., Asad M.J., Legge R.L., 2006. Enhanced lignin peroxidase synthesis by *Phanerochaete Chrysosporium* in solid state bioprocessing of a lignocellulosic substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22** (5): 449-453.
- Azin M., Moravej R., Zareh D., 2007. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 801–805.
- Barrios- González J., González H., Mejía A., 1993. Effect of size particle, parking density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. *Biotechnology Advances* **11**: 539-547.
- Battan B., Sharma J., Kuhad R.C., 2006. High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**:1281–1287.
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: review in *Appl. Microbiol Biotechnol* **56**:326–338
- Berka R.M., Schneider P., Golightly E. J., Brown S. H., Madden M., Brown K. M., Halkier T., Mondorf K., and Xu F., 1997. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3151-3157.
- Bhat M. K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* **18**: 355-383.
- Beauchemin K.A., Colombatto D. and Morgavi D.P., 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* **84**(1): 23-35.
- Borman A.M., Szekely A., Campbell C.K., 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* **161** (6): 361-368.

- Botella C., Diaz A., Ory I., Webb C., Blandino A., 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry* **42**: 98–101.
- Bourbonnais R., Pice M. G., Freiermuth B., Bodie E. and Borneman S., 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environmental Microbiology* **63** (12): 4627-4632.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brock D.T., Madigan T.M., 1993. *Microbiología*. Sexta Edición. Prentice Hall. México: 342-343.
- Cabaleiro D.R., Rodriguez-Couto S., Sanroman A., Longo M.A., 2002. Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media. *Process Biochemistry* **37** (9): 1017-1023.
- Cen P. and Xia L., 1999. Production of cellulase by solid-state fermentation. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 65: 70-91.
- Chahal D.S., 1985 Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. *Applied and Environmental Microbiology* **49**(1): 205-210.
- Chen F.S., Mowery A.R., Scarlata J.C and Chambliss K.C., 2007. Compositional analysis of water-soluble materials in corn stover. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **55**: 5912-5918
- Costa C.P and Ferreira M.C., 1991. Preservation of microorganisms: a review. *Revista de Microbiologia* **22**(3): 263-268.
- Cullen D. and Kersten P., 1992. Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In Kinghorn J.R, Turner G., eds. *Applied molecular genetics of filamentous fungi*. New York: Chapman and Hall. Chapter 4: 100-131.
- De Souza M., Giatti C., Zilly A., Rosane p.M., 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Journal Basic of Microbiology* **42** (2): 83-90.

- Da Silva R., Lago S. E., Merheb W.C., Macchione M.M., Park K.Y., Gomes E., 2005. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. Brazilian Journal of Microbiology **36**: 235-241.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. and Bally, R., 2000. Purification and characterisation of the first bacterial laccase in rhizospheric bacteria, *Azospirillum lipoferum*. Soil Biology and Biochemistry **32**: 919-927.
- Durán N., Esposito E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review Applied Catalysis B: Environmental **28** (2): 83–99.
- Ferreira G., Boer C.G., Peralta M.R., 1999. Producción of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarri* in solid state fermentation. FEMS Microbiology Letters **173**: 335-339.
- Frioni L., 1999. Procesos microbianos. Fundacion Universidad Nacional de Río de Cuarto., Argentina., Capitulo 8: Degradación de la materia Orgánica: 1-23.
- Grajek W., 1987. Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture. Biotechnology. Letters., **9**:353-356.
- Hölker U., Höfer M., Lenz J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi Applied Microbiology and Biotechnology **64**: 175–186.
- Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., and Howard S., 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal Biotechnology **2**(12):602-619.
- Hu J., Duvnjak Z., 2004. Production of a laccase and decrease of the phenolic content in canola meal during the growth of the fungus *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. Processes Engineering in Life Sciences **4** (1): 50-55.
- Isil S. and Nilufer A., 2005. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. Brazilian Archives of Biology and Technology **48** (2): 187-193).
- Jecu L., 2000. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. Industrial crops and Products **11**: 1-5.

- Jiang Z.Q., Yang S.Q., Yan L.T., Li and Tann S.S., 2005. Optimizing xylanase production by a newly isolated strain CAU44 of thermophile *Thermomyces lanuginosus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology **21**: 863-867.
- Jing D., Li P., Stagnitti F., Xiong X., 2007. Optimization of laccase production from *Trametes versicolor* by solid fermentation. Canadian Journal of Microbiology **53** (2): 245-251.
- Kachlishvili E., Penninckx J. M., Tsiklauri N., and Elissashvili V., 2005. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white rot basidiomycetes under solid state cultivation. World Journal of Microbiology and Biotechnology **22** (4): 391-397.
- Ko K.S and Jung H.S., 1999. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. Antonie van Leeuwenhoek **75**: 191-199.
- Konings N. W., 2006. Microbial transport: Adaptations to natural environments. Antonie Van Leeuwenhoek **90**: 325–342.
- Krishna C., 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. Bioresource technology **69** (3): 231-239.
- Krishna C., 2005. Solid state fermentation systems: an overview Critical Reviews in Biotechnology **25** (1/2):1–30.
- Kumaran S., Sastry C.A., Vikineswary S., 1997. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. World Journal of Microbiology and Biotechnology **13** (1): 43-49.
- Lastra L. C.C., Hajek A.E., and Humber Richard A., 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Canadian Journal of Botany **80**: 1126–1130.
- Levin L and Forchiassin F., 1998. Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Trametes trogii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology **14**(3): 443-446.
- Maheshwari R., Bharadwaj G. and Bhat K.M., 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews **64**(3): 461-488.
- Marqu ez O.A. E., 2004. Determinación de patrones de inducción de lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1. Tesis de Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.

- Marqu ez O.A. E., 2006. Estudios para la producción de una lacasa termoestable por el hongo *Trametes* sp. EUM1. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Márquez-Araque A.T., Mendoza-Martínez G.D., González-Muñoz S.S., Buntinx S.E. and Loera O. 2007. Fibrolytic activity of enzymes produced by *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 and *Aspergillus niger* AD96.4 in solid fermentation. *Interciencia* **32**(11): 1-6. (en proceso).
- Martínez T.A., Speranza M., Ruiz-Due as J.F., Ferreira P., Camarero S., Guill n F., Martínez J.M., Gutiérrez M., Del Río C.J., 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* **8**(3): 195-204.
- Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M.T., Sannia G., 1995. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 3823-3827.
- Mazutti M., Ceni G., Di Luccio M., Treichel H., 2007. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess of Biosystems Engineering* **30**: 297-304.
- Mayer M.A. and Staples R. C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. a review *Phytochemistry* **60**: 551-565.
- Medina R.E. 2003. Caracterización de lacasas producidas por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Membrillo I., Sánchez C., Favela E., Meneses M. y Loera O. 2005. Efecto del tamaño de partícula en las enzimas lignocelulolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña En: Avances de la Biotecnología Agropecuaria y Forestal en México. ISBN: 968-02-0202-X, Editores: González R.H y Jacinto H.C. Editorial: ANABAF, A.C. pp: 132-138.

- Mier T., Ayala Z.M.A., Toriello C., Navarro B.H., 2005. Conservación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. Libro de texto, UAM-X, México.
- Miller G. L., Blum R., Glannon W. E., Burton A.L., 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* **2**: 127-132.
- Moldes D., Gallego P.P., Rodríguez-Couto S., Sanromán A., 2003. Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsute*. *Biotechnology Letters* **25**:491-495.
- Mouchacca J., 2000. Thermotolerant fungi erroneously reported in applied research work as possessing thermophilic attributes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: 869-888.
- Muniswaran P.K.A, Charyulu N. C. L. N., 1994. Solid substrate fermentation of coconut coir pith for cellulase production enzyme and microbial technology **16** (5): 436-440.
- Nigam P. and Robinson T., 2005. Solid state fermentation: an overview. En: *Handbook of Fungal Biotechnology. Mycology V. 20*, Second Edition. Editores: Arora.K.D., Bridge D.P., Bhatnagar D., Editorial MARCEL DEKKER, INC., New York pp: 267-274.
- Nyanhongo G.S., Gomes J., Gubitz G.M., Zvauya R., Read J., Steiner W., 2002a. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research* **36** (6): 1449-1456.
- Nyanhongo G.S., Gomes J., Gubitz G., Zvauya R., Read J. S. and Steiner W., 2002b. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology* **84** (3): 259-263
- Oriol E., Raimbault M., Rousous S. and Viniegra-Gonzales G., 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **27**: 498-503.
- Ovando-Chacon S.L. y Waliszewski K.N., 2005. Preparaciones de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia* **21**(42):111-120.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P., 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sciences* **77**: 149-162.

- Pandey A., 1991. Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* **37** (2): 169-172.
- Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* **18** (1): 37-45.
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., Rubia de la T. y Martínez J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: overview *International Microbiology* **5**: 53–63.
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**(5): 577-591.
- Rabinovich M. L., Melnick M. S and Bolobova A.V., 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Moscow)*, **67** (8): 850-871.
- Rezende M.I, Barbosa A.M., Vasconcelos D.F, Endo A.S., 2002. Xylanase production by *Trichoderma harzianum rifai* by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Microbiology* **33** (1): 67-72.
- Rizzatti C.S.A., Sandrim C.V., Jorge A.J., Terenzi F.H and Polizeli T.M.L., 2004. Influence of temperature on the properties of the xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. *Journal Indian Microbiology and Biotechnology* **31**: 88-93.
- Rodríguez-Couto S., Moldes D., Liébanas A., Sanromán A., 2003. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid state conditions. *Biochemical Engineering Journal* **15**: 21–26.
- Rodríguez- Couto S., Sanromán A., 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* **22**: 211–219.
- Rosales E., Rodríguez C. S., and Saromán A., 2002. New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsutia*. *Biotechnology Letters*, **24**: 7001-7004.
- SAS Institute., 2002. *AS/STAT: User's Guide*, Version 9. SAS institute Inc: Cary, N.C.
- Schlosser D., Grey R., Fritsche W., 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation

- on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**: 412-418.
- Shah R.A and Madamwar D., 2005. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**(3): 233–243.
- Shukla J. and Kar R., 2006. Potato peel as a solid state substrate for thermostable *a*-amylase production by thermophilic *Bacillus* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22** (5): 417–422.
- Smith D., Onions A., 1983. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **81**: 535-540.
- Stoychev I., Homolka L., Nerud F., and Lisa L., 1998 Activities of ligninolytic enzymes in some white rot basidiomycete strain safter recovering from cryopreservation in liquid nitrogen. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73** (3): 211–214.
- Sun X., Zhang R., Zhang Y., 2004. Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. *Journal of Basic Microbiology* **44**(3):220-31.
- Tao S., Beihui L., Deming L., and Zuohu L., 1997. Effect of elevated temperature on *Trichoderma viride* SL-1 in solid state fermentations. *Biotechnology Letters* **19**: 171-174.
- Tengerdy R.P., Szakacs G., 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **13**: 169–179.
- Urbánszki K., Szakács G., Tengerdy R.P., 2000. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters* **22** (1): 65–69.
- Van de Vossen L.C.M.J., Ubbink-Kok T., Elferink G. L M., Driessen J. M.A and Konings N. W., 1995. Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. *Molecular Microbiology* **18** (5): 925-932.
- Vikineswary S, Abdullah N, Renuvathani M, Sekaran M, Pandey A, Jones EB., 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology* **97**(1):171-177.

- Viniegra-González G., Favela-Torres E, Noe A.C., Romero-Gomez S.J., Díaz-Godínez G., Augur C., 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state: over liquid fermentation systems *Biochemical Engineering Journal* **13** (2003) 157–167.
- Yang, S. Q., Yan, Q. J., Jiang, Z. Q., Li, L. T., Tian, H. M., Wang, Y. Z., 2006. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* **97** (15): 1794-1800.
- Yescas Y.R., Bárcena G.R., Mendoza M.D. G., González M.S.S., Cobos P.M and Ortega C.M.E., 2004. In situ digestibility of corn stover or oat straw diets with fibrolytic enzymes. *Agrociencia* **38**: 23-31.
- Wenqing Lu., Defa L., Wu Y., 2003. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus* *Enzyme and Microbial Technology* **32**: 305–311.
- Zérega L., Adams M., 1991. Efectos de la cachaza y el azufre sobre un suelo salino-sódico del Estado de Carabobo bajo condiciones de invernadero *Revista Caña de Azúcar*, **9** (02): 110-126.

12. ANEXOS

ANEXO I

I.I. Balance de agua del sustrato

Para llevar a cabo la fermentación sólida fue necesario ajustar el contenido de humedad del sustrato a 80%, para esto, primero se determinó el contenido de humedad inicial del rastrojo de maíz por triplicado con un analizador de humedad (OHAUS MB45) utilizando muestras de 1g del sólido. Después el contenido de agua se ajustó utilizando las siguientes ecuaciones y consideraciones:

Balance de agua total (1)

$$Y \text{ gH}_2\text{O} + X * A = 0.8 \text{ MH}$$

Balance de materia seca (2)

$$B * X = 0.2 * \text{MH}$$

Donde:

Yg H₂O = gramos de agua que se deben agregar

X = gramos de rastrojo de maíz total que se debe pesar

A = porcentaje de humedad inicial del rastrojo de maíz (11 %)

B = porcentaje de materia seca inicial del rastrojo de maíz (89 %)

MH = base de cálculo de materia húmeda en gramos (10 g de materia húmeda)

De la ecuación 2 se despejó a X que son los gramos de rastrojo de maíz necesarios para tener 2 g de sustrato seco, el valor obtenido se sustituyó en la ecuación 1. A partir de ésta se determinó que los gramos de agua totales (Yg H₂O) que deben agregarse por cada 2 g sustrato seco fueron 7.6 g, sin embargo, se agregaron 8 g de agua para compensar la pérdida después de la esterilización, lo cual fue corroborado posteriormente.

I.II. Curva patrón de glucosa y xilosa

Para construir la curva se realizaron diluciones sucesivas de una solución madre de 2 mg/mL de glucosa ó xilosa. En tubos etiquetados del 1 al 7 se les adicionó 1 mL de amortiguador de citratos (50 mM, pH 5) para la curva patrón de glucosa ó (50 mM, pH 5.3) para xilosa. En el tubo N#1 se le adicionó 1 mL de la solución con 2 mg /mL de glucosa ó xilosa, al tubo N#2 se

adicionó 1 mL de la solución anterior y así sucesivamente hasta llegar al tubo N#6, en este caso se desechó un mL. Después de adicionar 1.5 mL de DNS, todos los tubos se mantuvieron en ebullición durante 5 min, se enfriaron en agua con hielo, y se determinó la absorbancia a una longitud de 640 nm de cada uno de ellos tomando como blanco al tubo N# 7, el cual no contenía glucosa ó xilosa, sino amortiguador de citratos. La curva de glucosa ó xilosa se realizó por duplicado.

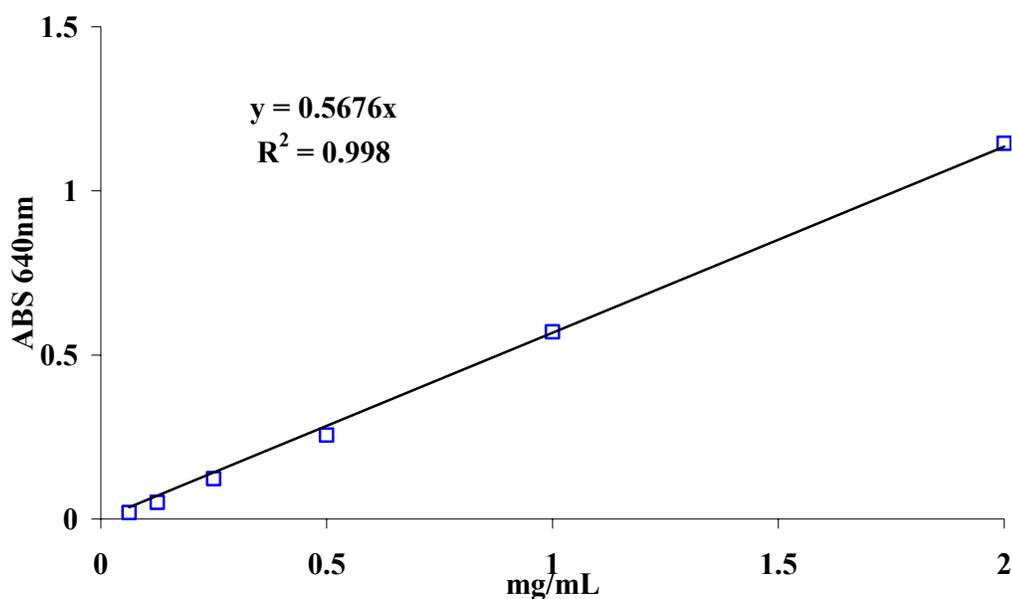
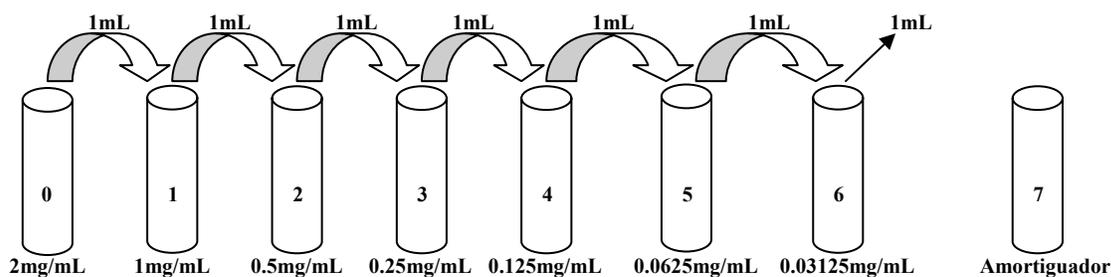


Figura 1. Curva patrón de glucosa. (□) Datos experimentales, (—) Modelo lineal

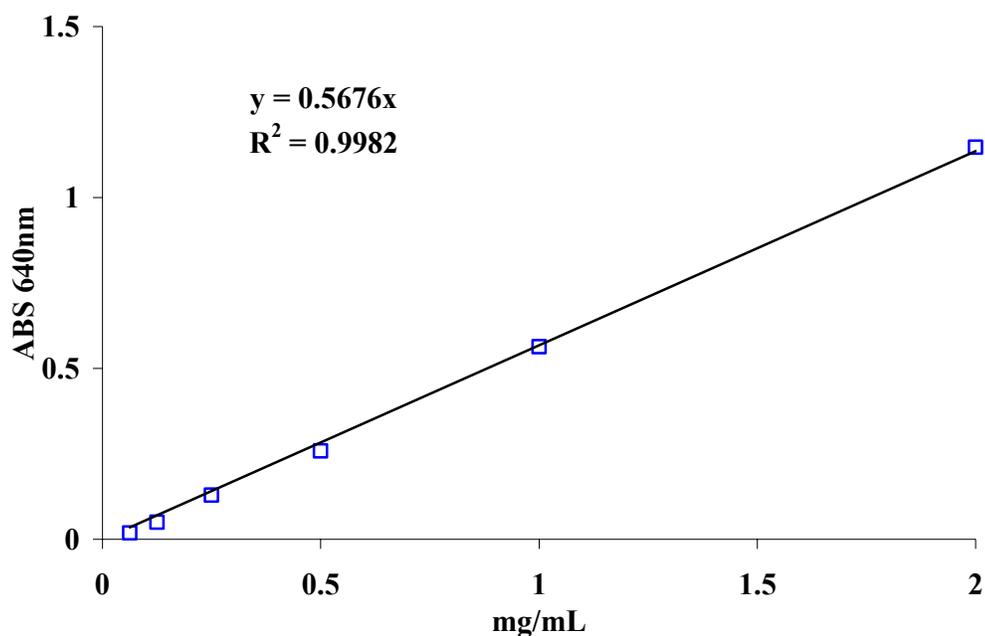


Figura 2. Curva patrón de xilosa. (□) Datos experimentales, (—) Modelo lineal

I.III. Curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB)

Se preparó una solución de ASB de 1 mg/mL, diluyendo 0.1 g de ASB en 100 mL de agua. Posteriormente se tomó un volumen de 2.5 mL de esta solución y se diluyó con agua destilada hasta 50 mL en un matraz aforado para obtener una concentración final de 50 µg/ml^(*). A partir de esta solución se realizó una serie de diluciones con agua destilada para obtener un intervalo de concentraciones de ASB de 1 a 10 µg/ml. Para iniciar la reacción se agregó el reactivo de Bradford en cada una de las concentraciones evaluadas. Después de 5 min de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 595 nm utilizando como blanco la solución sin ASB. La curva se realizó por duplicado.

Tabla 1. Volumen de reactivos empleados para la curva patrón de BSA

Tubo	BSA ^(*) (μl)	Agua (μl)	R. Bradford (μL)	[BSA] (μg/mL)
Blanco	0	800	200	0
1	20	780	200	1
2	40	760	200	2
3	60	740	200	3
4	80	720	200	4
5	100	700	200	5
6	120	680	200	6
7	140	660	200	7
8	160	640	200	8
9	180	620	200	9
10	200	600	200	10

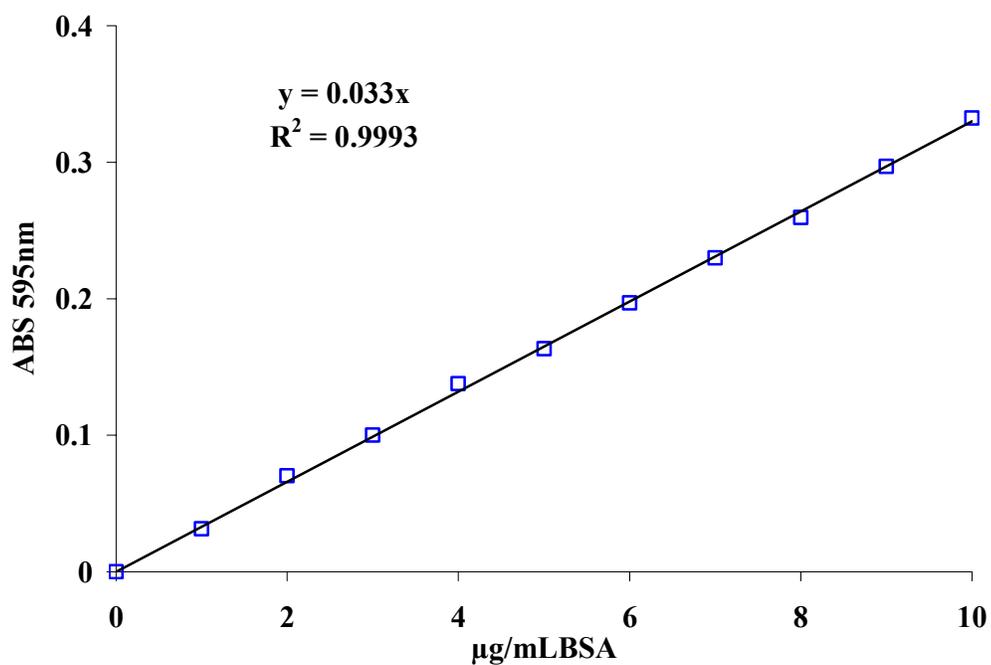


Figura. 3. Curva patrón de albúmina sérica bovina. (□) Datos experimentales, (—) Modelo lineal

ANEXO II

II.I. Análisis estadístico: Método de conservación

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA) mostrando la influencia de varios factores en la velocidad de crecimiento radial de *Trametes* sp. EUM1 después de conservarse por 5 meses en agua destilada ($\alpha=0.05$)

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor de F	Pr > F
Mes	4	0.0049	0.0012	7.89	0.0039
Conservación	1	0.0143	0.0143	90.72	0.0001
Mes*conservación	4	0.0118	0.0029	18.79	0.0001

Tabla 2. Comparación de medias de la velocidad de crecimiento radial de *Trametes* sp. EUM1 después de conservarse por 5 meses en agua destilada, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Media	Número de observaciones	Agrupamiento
1Conservación	0.6870	2	A
3 Control	0.6805	2	A
2 Control	0.6800	2	A
5 Control	0.6795	2	A
4 Control	0.6745	2	A
1 Control	0.6510	2	A B
2 Conservación	0.6390	2	A B C
5 Conservación	0.6020	2	A B D
3 Conservación	0.5940	2	C D
4 Conservación	0.5760	2	D

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) mostrando la influencia de varios factores en la biomasa de *Trametes* sp. EUM1 después de conservarse por 5 meses en agua destilada ($\alpha=0.05$)

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor de F	Pr > F
Mes	4	14.5298	3.6324	2.80	0.0853
Conservación	1	107.7872	107.7872	82.99	<0.0001
Mes*conservación	4	23.5069	5.8767	4.52	0.0241

Tabla 4. Comparación de medias de la biomasa de *Trametes* sp. EUM1 después de conservarse por 5 meses en agua destilada, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Media	Número de observaciones	Agrupamiento
4 Control	32.270	2	A
3 Control	31.865	2	A
1Control	31.195	2	A
2 Control	30.530	2	A
5 Control	30.485	2	A
2 Conservación	29.580	2	A B
1 Conservación	27.790	2	B C
4 Conservación	25.810	2	B C
3 Conservación	25.360	2	B C
5 Conservación	24.590	2	B C

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) mostrando la influencia de varios factores en la velocidad de crecimiento radial de *Trametes* sp. EUM1 sobre residuos agroindustriales ($\alpha=0.05$)

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor de F	Pr > F
Sustrato	1	0.2979	0.2979	4167.17	<0.0001
Cachaza	2	0.0003	0.00014	1.94	0.1857
Sustrato*Cachaza	2	0.0007	0.00034	4.72	0.0307

Tabla 6. Comparación de medias de la velocidad de crecimiento radial de *Trametes* sp. EUM1, obtenida sobre mezclas de residuos agroindustriales, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Media	Número de observaciones	Agrupamiento
Rastrojo de maíz: cachaza (80:20)	0.6546	3	A
Rastrojo de maíz: cachaza (90:10)	0.6396	3	A B
Rastrojo de maíz: cachaza (100:0)	0.6302	3	B
Paja de avena: cachaza (100:0)	0.3871	3	C
Paja de avena: cachaza (80:20)	0.3837	3	C
Paja de avena: cachaza (90:10)	0.3816	3	C

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

Tabla 7. Prueba de contrastes sobre la velocidad de crecimiento radial de *Trametes* sp. EUM1, obtenida sobre mezclas de residuos agroindustriales ($\alpha=0.05$)

Contraste	Grados de libertad	Contraste suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor de F	Pr > F
Cachaza lineal	1	0.0000267	0.0000267	0.37	0.5525
Cachaza cuadrático	1	0.00025100	0.0002510	3.51	0.0854
Avena lineal	1	0.00001734	0.00001734	0.24	0.6313
Avena cuadrático	1	0.00002939	0.00002939	0.41	0.5335
Rastrojo de maíz lineal	1	0.00013160	0.00013160	1.84	0.1999
Rastrojo de maíz cuadrático	1	0.00077487	0.00077487	10.84	0.0064

II.II. Análisis estadístico: Extracción de enzimas

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) mostrando la influencia de varios factores en la recuperación de celulasas del rastrojo de maíz ($\alpha=0.05$)

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor de F	Pr > F
Tiempo	1	4.4652	4.4615	38.77	0.0003
Agente	1	5.0843	5.0843	44.18	0.0002
Tiempo*Agente	1	0.0828	0.0828	0.72	0.4209

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) mostrando la influencia de varios factores en la recuperación de xilanasas del rastrojo de maíz ($\alpha=0.05$)

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor de F	Pr > F
Tiempo	1	61.4811	61.4811	42.35	0.0002
Agente	1	5.7851	5.7851	3.99	0.0810
Tiempo*Agente	1	1.1618	1.1618	0.80	0.3971

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) mostrando la influencia de varios factores en la recuperación de lacasas del rastrojo de maíz ($\alpha=0.05$)

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor de F	Pr > F
Tiempo	1	36.66604	36.66604	1072.86	<0.0001
Agente	1	12.0	12.0	351.12	<0.0001
Tiempo*Agente	1	4.732608	4.732608	138.48	<0.0001

Tabla 11. Comparación de medias para la cantidad de celulasas recuperadas del rastrojo de maíz por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Media	Número de observaciones	Agrupamiento
Extracción con agua destilada por 30 min	19.616	3	A
Extracción con agua destilada por 15 min	18.230	3	B
Extracción con A. citratos (50 mM, pH 5) por 30 min	18.150	3	B
Extracción con A. citratos (50 mM, pH 5) por 15 min	17.096	3	C

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

Tabla 12. Comparación de medias para la cantidad de xilanasas recuperadas del rastrojo de maíz por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Media	Número de observaciones	Agrupamiento
Extracción con agua destilada por 30 min	30.893	3	A
Extracción con A. citratos (50 mM, pH 5) por 30 min	30.120	3	A B
Extracción con agua destilada por 15 min	26.986	3	B C
Extracción con A. citratos (50 mM, pH 5) por 15 min	24.976	3	C

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

Tabla 13. Comparación de medias para la cantidad de lacasas recuperadas del rastrojo de maíz por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Tratamiento	Media	Número de observaciones	Agrupamiento
Extracción con agua destilada por 30 min	9.1040	3	A
Extracción con A. citratos (50 mM, pH 5) por 30 min	5.8480	3	B
Extracción con agua destilada por 15 min	4.3520	3	C
Extracción con A. citratos (50 mM, pH 5) por 15 min	3.6080	3	D

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

II.III. Análisis estadístico: Producción y productividad de enzimas

Tabla 14. Comparación de medias de la producción de celulasas, obtenida a varias temperaturas, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Temperatura (°C)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
30	1.141A	1.163C	1.208C	2.356C	2.314C	5.429D	21.452D	35.240B	42.088A	26.838A	19.323B	13.987C	12.553C
35	1.135A	2.040B	2.356C	3.657C	16.475B	28.695B	35.875B	42.220A	37.727A	30.440A	26.500A	20.545B	18.070B
40	1.195A	3.455A	8.880A	16.840A	22.750A	44.795A	65.850A	38.625AB	31.780B	29.590A	28.835A	30.100A	29.770A
45	1.142A	3.674A	6.301B	9.502B	14.633B	22.055C	30.273C	25.230C	22.861C	19.988B	16.187B	14.477C	14.462C

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

Tabla 15. Comparación de medias de la producción de xilanasas, obtenida a varias temperaturas, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Temperatura (°C)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
30	4.905B	3.805B	2.565C	4.223C	8.448D	21.970C	37.352D	52.421D	56.713B	38.660C	33.823C	34.641D	33.428C
35	5.476AB	7.501A	13.255B	19.590B	31.700B	42.095B	65.420B	80.660B	60.391B	54.835B	45.360B	40.535C	39.54BC
40	5.449AB	8.345A	18.018A	48.333A	66.216A	112.165A	161.00A	106.98A	77.378A	70.405A	61.958A	62.844A	63.321A
45	7.220A	7.460A	11.275B	16.350B	18.940C	29.055C	45.335C	62.165C	54.975B	51.160C	47.480B	46.665B	44.655B

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

Tabla 16. Comparación de medias de la producción de lacasas, obtenida a varias temperaturas, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Temperatura (°C)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
30	0.028B	0.052B	0.108B	0.304B	3.813B	4.640BC	4.582D	3.692D	3.054D	2.668C	2.552C	2.262C	1.798C
35	0.036B	0.106A	0.241A	2.106A	6.265A	10.03A	12.638A	10.198A	9.328A	8.723A	6.673B	4.905B	4.398B
40	0.110A	0.098A	0.104A	0.145C	2.514C	5.292B	8.555B	8.308B	6.345C	4.660B	2.088C	1.334D	1.113D
45	0.112A	0.119A	0.222B	0.309B	2.610C	4.543C	6.264C	6.742C	7.660B	8.724A	10.053A	9.956A	9.731A

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

Tabla 17. Comparación de medias de la productividad de enzimas lignocelulolíticas obtenida a varias temperaturas por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Temperatura (°C)	Celulasas	Xilanasas	Lacasas
30	5.265C	7.090D	0.930C
35	6.035B	11.520B	2.105A
40	10.975A	26.835A	1.425B
45	50.050C	8.880C	1.010C

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

II.IV. Análisis estadístico: Producción de proteína extracelular

Tabla 18. Comparación de medias de la producción de proteína extracelular en cultivo sólido, obtenida a varias temperaturas, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Temperatura (°C)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
30	4.014C	4.045C	4.234C	5.031C	5.848B	6.439C	7.145C	8.272C	10.880B	12.004A	9.785B	9.229B	9.254C
35	5.659AB	6.302B	7.165B	8.336B	10.026A	11.987B	12.827B	14.39AB	13.305A	12.294A	10.880A	9.820AB	9.703BC
40	5.330B	5.835B	6.564B	7.417B	10.325A	14.218A	17.628A	15.554A	13.155A	11.978A	11.187A	11.369A	11.569A
45	6.459A	7.404A	8.713A	10.058A	10.686A	11.336B	12.092B	12.949B	12.29AB	11.806A	11.732A	10.932A	10.65AB

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

II.V. Análisis estadístico: Cambios de pH durante el cultivo sólido

Tabla 20. Comparación de medias de los cambios de pH del cultivo sólido, obtenido a varias temperaturas, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Temperatura (°C)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
30	6.525A	6.515A	6.370A	6.325A	6.165A	6.000AB	5.865B	5.825B	5.835C	5.785C	5.865C	6.015C	6.075C
35	6.281AB	6.169BC	5.830B	5.769C	5.751B	5.815B	5.970AB	6.049B	6.150B	6.214B	6.230B	6.249B	6.330B
40	6.200B	6.060C	5.950B	5.935BC	5.705B	5.905AB	6.150A	6.435A	6.560A	6.685A	6.920A	7.065A	7.065A
45	6.525A	6.365AB	6.270A	6.175AB	6.125A	6.110A	6.130A	6.040B	5.955BC	6.015BC	6.250B	6.380B	6.425B

Nota: medias con la misma letra no difieren significativamente

II.VI. Análisis estadístico: Cambios de humedad durante el cultivo sólido

Tabla 21. Comparación de medias de los cambios de humedad del cultivo sólido, obtenida a varias temperaturas, por el método de Tukey ($\alpha=0.05$)

Temperatura (°C)	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 12
30	80.136A	79.690A	79.436B	80.510A	81.240B
35	79.930A	79.50A	80.236A	80.996A	82.166A
40	79.906A	79.690A	79.97AB	80.000A	81.250B
45	79.816A	78.713B	78.836C	78.756B	79.263C

Iztapalapa, D.F. a 18 Enero de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS POR *Trametes* sp. EUM1 EN CULTIVO SÓLIDO**

que presentó:

IBI. Armando Ordaz Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral. Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres. Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Marcos Meneses Mayo. Colegio de Postgraduados

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres

Secretario: Dr. Marcos Meneses Mayo

Vocal: Dr. Germán Mendoza Martínez

Vocal: Dr. Ascención Ramírez Coronel

The image shows four handwritten signatures in blue ink, each placed over a horizontal line. The signatures are: 1. A large, stylized signature for the President, Dr. Ernesto Favela Torres. 2. A signature for the Secretary, Dr. Marcos Meneses Mayo, with the name 'Marcos' clearly legible. 3. A signature for the Vocal, Dr. Germán Mendoza Martínez. 4. A signature for the Vocal, Dr. Ascención Ramírez Coronel.