



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

“Efecto de la tipificación del bagazo de caña sobre el perfil de
producción de enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus*
ostreatus“

Tesis que para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Isabel de la Luz Membrillo Venegas

Director de Tesis:
Dr. Octavio Loera Corral

Asesores:
Dra. Carmen Sánchez Hernández
Dr. Ernesto Favela Torres

México, D.F., Julio 2008

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y además cuenta con el apoyo del mismo con el número de registro 0472-O.

Agradecimientos

A mis padres, por los dobles nacimientos

Dr. Octavio Loera Corral, gracias por su acertada dirección, apoyo y calidez.

Dra. Carmen Sánchez Hernández, agradezco su valiosa orientación en el manejo de *Pleurotus*, sin la cual este estudio no habría llegado a efectuarse.

Dr. Ernesto Favela Torres, gracias por sus juiciosos comentarios para aterrizar de manera consistente el mar de resultados.

Dr. Marcos Meneses Mayo, le agradezco la gentileza de facilitar el material de estudio y los recursos para realizar los análisis químico-nutritivos del bagazo de caña.

Dr. Gerardo Díaz Godínez, agradezco su buena disposición para evaluar este documento.

A las maestras Carmen de la Paz y Jacqueline Ceja por su valiosa ayuda en el aprendizaje de técnicas histoquímicas

Al Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, gracias por el soporte brindado para la realización de este estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento al proyecto 42792-Z

México, DF a 30 de julio de 2008

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

“Efecto de la tipificación del bagazo de caña sobre el perfil de producción de enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*”

Que presentó: M. en C. Isabel de la Luz Membrillo Venegas

COMITÉ TUTORIAL

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesora: Dra. Carmen Sánchez Hernández

JURADO:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretaria: Dra. Carmen Sánchez Hernández

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Vocal: Dr. Marcos Meneses Mayo

Colegio de Posgraduados

RESUMEN

El bagazo de caña de azúcar es un residuo susceptible de emplearse en la producción de enzimas lignocelulósicas y, en consecuencia, puede ser una materia prima útil para su uso como complemento de la alimentación de rumiantes. En este trabajo se presenta el estudio de la producción de este tipo de enzimas por *Pleurotus ostreatus* en fermentación en medio sólido, como respuesta al efecto de fuentes de nitrógeno y la tipificación (en función a la distribución de los tamaños de partícula y aspecto de las fibras) del sustrato.

En la primera parte del estudio se crecieron dos cepas de *Pleurotus ostreatus* (IE-8 y CP-50) sobre un medio definido adicionado con extracto de paja de trigo. El micelio de estos cultivos se utilizó como inóculo para fermentación en medio sólido empleando bagazo de caña de azúcar (C: N = 142). Se emplearon por separado una mezcla de tamaños de partícula heterogéneos (diámetro promedio de 2.9 mm) o lotes con dos diferentes tamaños de partícula (0.92 y 1.68 mm). Se compararon el enriquecimiento proteico y la producción de enzimas lignocelulolíticas para cada tamaño de partícula. También se analizó el efecto de la adición de sulfato de amonio (SA) para modificar la relación C: N en el bagazo (C: N = 20), este compuesto favoreció para alcanzar niveles superiores de proteína. La cepa CP-50 mostró el mayor incremento en el contenido proteico (48% en partículas de 1.68 mm) cuando se comparó con el medio sin nitrógeno adicional. No obstante, la cepa IE-8 produjo los niveles más altos de todas las enzimas: xilanasas (5.79 UI/gss sobre partículas heterogéneas) y celulasas (0.18 UI/gss en las partículas más pequeñas), ambos sin la adición de sulfato de amonio. La actividad lacasa más alta (0.04 UI/gss) se obtuvo en las partículas de 1.68 mm en presencia de SA. Como el efecto del tamaño de partícula y la adición de SA fue diferente para cada cepa, se decidió emplear la cepa IE-8 para los estudios cinéticos relativos a la producción de enzimas.

En el estudio cinético de la degradación del bagazo de caña sin adición de SA por la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* se realizaron balances de materia por componente después de 15 días de cultivo, se midió el crecimiento del hongo y la producción de enzimas. La degradación del material vegetal en los tres tamaños de partícula fue prácticamente la misma, alcanzó alrededor de 81%. No obstante, las cantidades consumidas de lignina, hemicelulosa y lignina variaron con el tipo de partícula empleada. En las partículas de 1.68 mm (L/D= 9) prácticamente se consumió la mitad de la hemicelulosa; en las partículas de 0.92 mm (L/D = 12), la lignina se degradó en 67.4 % y la celulosa en 85.9 %. En los tres tamaños de partícula se alcanzó una cantidad de biomasa de alrededor de 8 mg/ gss, con velocidades específicas de crecimiento de 0.05, 0.049 y 0.043 h⁻¹ para partículas de 0.92, 1.85 y 2.9 mm, respectivamente. Respecto a la actividad enzimática, el bagazo heterogéneo es un mejor inductor para la producción de xilanasas, con títulos alrededor de 11 UI/gss a partir del tercer día de fermentación. De igual manera, el bagazo heterogéneo constituye un mejor sustrato para la producción de lacasas, se alcanza un máximo de actividad de 24.5 mU/gss a los dos días. La producción de endocelulasas es más constante en el bagazo heterogéneo y se mantiene en un nivel inferior a 85 mU/gss todo el tiempo. Respecto a las exocelulasas, la mayor producción de estas enzimas se presenta en partículas pequeñas (0.92 mm) durante los tres primeros días 130 mU/gss. Prácticamente todos los hongos filamentosos producen de manera simultánea xilanasas y celulasas, la cepa IE-8 presenta una elevada selectividad para producir actividad xilanólítica en partículas medianas (X/C alrededor de 4560).

Con el fin de estudiar la disponibilidad de los diferentes materiales que constituyen el bagazo de caña, se realizaron tinciones diferenciales con azul de toluidina al sustrato para analizarlas por microscopía óptica, también se emplearon determinaciones por microscopía de fuerza atómica. Se establecieron correlaciones entre la tasa de

degradación y la superficie disponible inicial (y_0) para cada material. Se realizaron estudios de estabilidad para los extractos enzimáticos, los tiempos de vida media calculados para lacasas están alrededor de dos horas a pH de 6 para las partículas alargadas (0.92 y 2.9 mm). Por otro lado, un estudio zimográfico de actividad lacasa permitió encontrar dos bandas de actividad, una de alrededor de 60 kDa y otra de aproximadamente 38 kDa. Respecto a las celulasas, a pH 6 los tiempos de vida media calculados para los extractos producidos sobre bagazo de caña de 1.68 y 2.9 mm son cercanos a 5 horas; y de 1.92 horas el extracto correspondiente a partículas de 0.92 mm. Las xilanasas que produce la cepa IE-8 presentan un tiempo de vida media entre 1.14 h (0.92 mm) y 5 horas (1.68 mm) a pH de 6; a pH de 7, la actividad xilanólítica de la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* es menos estable (casi 8 horas en el extracto enzimático obtenido de partículas pequeñas y 3.85 horas en el extracto de partículas heterogéneas)

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN. | i |
| INTRODUCCIÓN. | 1 |
| 2. ANTECEDENTES. | 5 |
| 2.1. Bagazo de caña | 7 |
| 2.1.1 Producción nacional | 8 |
| 2.1.2 Estrategias para su uso. | 8 |
| 2.1.3 Composición química. | 9 |
| 2.2. Características de los sustratos para FMS. | 11 |
| 2.3. Hongos de pudrición blanca. | 13 |
| 2.4. Enzimas responsables de la degradación del material vegetal. | 17 |
| 2.4.1 Lacasas. | 18 |
| 2.4.2 Celulasas. | 21 |
| 2.4.2.1 Endocelulasas. | 21 |
| 2.4.2.2 Las exoglucanasas. | 22 |
| 2.4.2.3 β -Glucosidasas. | 22 |
| 2.4.3 Xilanasas. | 24 |
| 3. JUSTIFICACIÓN. | 29 |
| 4. HIPÓTESIS. | 33 |
| 5. OBJETIVOS. | 37 |
| 6. METODOLOGÍA. | 41 |
| 6.1 Preservación y activación de la cepa. | 43 |
| 6.2 Producción de inóculo. | 43 |
| 6.3 Análisis químico-nutricionales del bagazo de caña. | 44 |
| 6.4 Tipificación del sustrato. | 45 |
| 6.5 Fermentación en medio sólido. | 46 |
| 6.6 Contenido proteico. | 47 |
| 6.7 Crecimiento. | 48 |
| 6.8 Actividad enzimática. | 49 |
| 6.9 Técnicas histoquímicas y análisis de imágenes. | 51 |
| 6.10 Estabilidad de los ECE. | 52 |
| 6.11 Zimografía. | 53 |

| | |
|--|------------|
| 7. RESULTADOS: Tipificación de sustrato y elección de cepa. | 55 |
| 7.1 Características del sustrato. | 57 |
| 7.2 Crecimiento micelial y preparación de inóculo para FMS. | 59 |
| 7.3 Análisis de proteína y enzimas lignocelulósicas para diferentes tamaños de partícula. | 60 |
| 7.3.1 Producción de proteína. | 61 |
| 7.3.2. Producción de enzimas. | 61 |
| 8. RESULTADOS: Cinética de degradación de bagazo de caña. | 71 |
| 8.1 Descomposición del material vegetal. | 73 |
| 8.2 Producción de biomasa. | 76 |
| 8.3 Producción de enzimas. | 79 |
| 9. RESULTADOS: Disponibilidad y expresión. | 91 |
| 9.1 Composición de las fibras de sustrato, crecimiento y producción de enzimas. | 93 |
| 9.2 Estudio de la disponibilidad del material vegetal. | 96 |
| 9.3 Estabilidad de los extractos enzimáticos a diferentes pH. | 106 |
| 10. CONCLUSIONES. | 113 |
| 11. REFERENCIAS. | 117 |
| 12. APÉNDICES. | 127 |
| A. ANÁLISIS QUÍMICO NUTRITIVOS. | 129 |
| B. CÁLCULO DE LA RELACIÓN C/N PARA EL BAGAZO DE CAÑA. | 130 |
| C. CURVAS PARA MEDIR BIOMASA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. | 131 |
| D. ANALIZADOR DE IMÁGENES. | 132 |
| E. ZIMOGRFÍA. | 133 |
| F. TIPIFICACIÓN DEL SUSTRATO. | 135 |
| G. CINÉTICA DE INACTIVACIÓN. | 137 |
| H. PUBLICACIONES. | 138 |

Índice de tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 2.1. Producción nacional de caña de azúcar. | 8 |
| Tabla 7.1. Relación geométrica de las partículas de bagazo de caña de azúcar. | 58 |
| Tabla 7.2 Velocidad de crecimiento radial para dos cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> medidas con diferente fuente de nitrógeno. | 60 |
| Tabla 7.3. Enriquecimiento proteico después de 8 d de FMS sobre bagazo de caña por dos cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> | 61 |
| Tabla 7.4. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la producción de enzimas por dos cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecidas en tres diferentes tamaños de partícula. | 68 |
| Tabla 8.1. Cambios en la fracción fibrosa del bagazo de caña después de quince días de crecimiento de la cepa IE-8 de <i>Pleurotus ostreatus</i> | 75 |
| Tabla 8.2. Parámetros cinéticos ajustados para <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) crecido sobre bagazo de caña de azúcar de diferente tipificación. | 77 |
| Tabla 8.3. Actividades enzimáticas y crecimiento para cultivo de hongos por FMS. | 84 |
| Tabla 9.1. Caracterización del sustrato y su efecto en el crecimiento, enriquecimiento proteico y degradación del bagazo de caña para la cepa IE-8 de <i>Pleurotus ostreatus</i> después de 12 días de cultivo. | 94 |
| Tabla 9.2. Fracciones superficiales del material vegetal obtenidas por análisis de las imágenes microscópicas de la estructura del sustrato | 102 |
| Tabla 9.3. Cambio en la fracción superficial de los componentes estructurales del sustrato obtenidos del análisis de las imágenes microscópicas. | 103 |
| Tabla 9.4. Constantes cinéticas de inactivación para las enzimas lignocelulolíticas producidas por <i>Pleurotus ostreatus</i> en bagazo de caña de distinta tipificación. | 108 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura. 2.1 Esquema de la composición de la pared del material vegetal. | 10 |
| Figura 2.2 Ciclo catalítico de la lacasa. | 20 |
| Figura 2.3 Degradación de celulosa y hemicelulosa. | 23 |
| Figura 7.1. Producción de xilanasas por dos cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecido sobre bagazo de caña durante 8 día. | 62 |
| Figura 7.2. Producción de lacasas por dos cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecido sobre bagazo de caña de azúcar después de 8 días | 64 |
| Figura 7.3 Producción de CMCasa por dos cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecido sobre bagazo de caña durante 8 día. | 66 |
| Figura 7.4. Producción de PFasa por dos cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> crecido sobre bagazo de caña durante 8 días | 67 |
| Figura 8.1. Patrón de descomposición del material vegetal (medido como FDN) por <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tres tamaños de partícula. | 74 |
| Figura 8.2. Composición del material celular para la degradación de bagazo de caña por la cepa IE-8 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en partículas de características diferentes. | 74 |
| Figura 8.3. Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula | 77 |

| | |
|--|-----|
| Figura 8.4. Producción de proteína por <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tres tamaños de partícula. | 78 |
| Figura 8.5. Actividad xilanas por <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula. | 79 |
| Figura 8.6. Actividad lacasa por <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula. | 81 |
| Figura 8.7. Actividad endocelulasa (CMCasa) por <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula. | 82 |
| Figura 8.9. Actividad exocelulasa (PFasa) por <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula. | 83 |
| Figura 8.9. Patrones de actividad xilanas/ actividad CMCasa por <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula. | 85 |
| Figura 8.10. Patrones relativos de actividad enzimática, proteína y biomasa para <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar de 0.92 mm diámetro (<i>L/D</i> , 12). | 86 |
| Figura 8.11. Patrones relativos de actividad enzimática, proteína y biomasa para <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar de 1.68 mm diámetro (<i>L/D</i> , 9). | 87 |
| Figura 8.12. Patrones relativos de actividad enzimática, proteína y biomasa para <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar de 2.9 mm diámetro (<i>L/D</i> , 18). | 88 |
| Figura 9.1. Composición del material celular para la degradación de bagazo de caña por la cepa IE-8 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en partículas de características diferentes después de 12 días de cultivo. | 94 |
| Figura 9.2. Perfiles enzimáticos obtenidos para la cepa IE-8 en partículas de diferente tipificación. | 96 |
| Figura 9.3. Tinción con azul de toluidina para estimar la disponibilidad del material vegetal. | 98 |
| Figura 9.4. Microscopía de fuerza atómica modo de contacto intermitente del material vegetal. | 99 |
| Figura 9.5. Microscopía de fuerza atómica de contacto del material vegetal | 100 |
| Figura 9.6 Cinética de inactivación de xilanasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tipificación distinta. | 106 |
| Figura 9.7 Cinética de inactivación de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tipificación distinta | 107 |
| Figura 9.8 Cinética de inactivación de CMCasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tipificación distinta | 107 |
| Figura 9.9. Geles de poliacrilamida con actividad lacasa. | 110 |

1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, en México, el cultivo de caña de azúcar ha alcanzado una producción anual promedio de 46.5 millones de toneladas (SAGARPA, 2006); el bagazo de caña (material fibroso que queda después de la extracción del jugo de caña de azúcar) constituye una fuente importante de polisacáridos y puede ser empleado en diferentes maneras. En este sentido, existen numerosas estrategias para su uso: por ejemplo, en las fábricas de azúcar el bagazo de caña se emplea como combustible para las calderas generadoras de vapor (Agüero y col., 2006), en algunas poblaciones rurales es utilizado como un componente de los materiales de construcción (Medjo Eko y Riskowski, 2001). Por otro lado, el bagazo de caña puede emplearse en diferentes procesos productivos: fabricación de alcohol para la manufactura de químicos (Thygesen y col., 2003); producción de proteína para alimentación de ganado si se reduce su grado de lignificación (Campos y col., 2004); generación de gas hidrógeno (Kapdan y Kargi, 2006); producción de metabolitos, hongos comestibles y enzimas (Viniestra-González y col., 2003). En todos estos procesos se trata de minimizar los residuos y contribuir al desarrollo de “tecnologías verdes”.

Así pues, el bagazo de caña de azúcar es un residuo susceptible de emplearse como sustrato para la fermentación en medio sólido (FMS) por hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, capaz de producir enzimas responsables de la degradación de lignocelulosa (xilanasas, celulasas y lacasas), entre otras enzimas. Además, existe la necesidad de hacer aplicables los procesos de transformación de materiales vegetales residuales y resulta de gran interés realizar investigación básica respecto al tipo de enzimas que produce *Pleurotus* por FMS. Este basidiomiceto puede degradar distintos sustratos fibrosos, sin embargo, no están bien identificadas las enzimas responsables de

INTRODUCCIÓN

esta degradación. El interés de este trabajo se centró en estudiar a detalle la degradación parcial del bagazo de caña por este basidiomiceto.

Los resultados se presentan en tres partes: la primera sección corresponde a la elección de una cepa para la producción de enzimas y proteína como una respuesta al efecto de fuentes de nitrógeno y la tipificación del sustrato (en función a la distribución de los tamaños de partícula y aspecto de las fibras). En la segunda, se presenta la descripción de la evolución del cultivo de la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* tomando en cuenta la degradación del bagazo de caña y los balances de materia por componente del sustrato; así mismo, la producción de biomasa, proteína y enzimas por esta cepa durante 15 días de cultivo sobre los tres tamaños de partícula empleados (diámetro de las fibras de 0.92mm, 1.68 mm y 2.9 mm). También se presenta el cálculo de parámetros cinéticos de utilidad en el diseño de procesos de FMS.

Finalmente, en la tercera sección de resultados, se presentan los análisis químicos y microscópicos de las fibras de bagazo de caña; el estudio de estabilidad de los extractos crudos enzimáticos para actividad xilanolítica, lacasa y celulolítica; así como un estudio zimográfico de los extractos crudos de lacasa para el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña con diferente tipificación con el fin de explicar la posible presencia de isoformas enzimáticas producidas por este organismo.

2

ANTECEDENTES

Durante el proceso de producción de caña de azúcar se generan subproductos que pueden ser utilizados para la alimentación de rumiantes, producción de materiales químicos y enzimas. De manera particular, durante la fermentación en estado sólido del bagazo de caña por *Pleurotus ostreatus* se producen de manera simultánea xilanasas, celulasas y lacasas. Sin embargo, la producción de cada tipo enzimático se verá favorecida de acuerdo a las características del sustrato que se quiera atacar. En este apartado se presentan las consideraciones que deben tenerse en cuenta para propósitos específicos en la producción de extractos fibrolíticos con enzimas capaces de atacar a la lignina.

2.1 Bagazo de caña.

2.1.1 Producción nacional.

Desde el año 2000, en México se cultivan anualmente más de seiscientas mil hectáreas de caña de azúcar empleada con diferentes fines agropecuarios (Tabla 2.1); después de la extracción de jugo de la caña de azúcar, queda un material fibroso conocido como bagazo (Da Silva y col., 2005), este residuo constituye una fuente importante de polisacáridos y es susceptible de ser utilizado en diferentes formas.

Tabla 2. 1 Producción Nacional de Caña de azúcar (Industrial, Piloncillo, Semilla y Fruta)
Cultivos Cíclicos y Perennes / Riego + Temporal

| Año | Superficie Sembrada (Ha) | Producción (Ton) | Rendimiento (Ton/Ha) |
|----------|-----------------------------|------------------|-------------------------|
| 2004 | 717,752.17 | 49,249,941.98 | 68.62 |
| 2003 | 700,578.89 | 48,158,510.69 | 68.74 |
| 2002 | 639,897.04 | 46,309,335.86 | 72.37 |
| 2001 | 644,111.38 | 46,329,203.28 | 71.93 |
| 2000 | 635,626.25 | 42,866,622.90 | 67.44 |
| Promedio | 667,592.95 | 46,582,722.94 | 69.82 |

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).
Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (SAGARPA, 2006)

2.1.2 Estrategias para su uso

Existen numerosas estrategias para el empleo del bagazo de caña y se han realizado infinidad de investigaciones al respecto. Por ejemplo, en las fábricas de azúcar y alcohol, el bagazo se emplea como combustible en las calderas que generan el vapor necesario para los generadores eléctricos, molinos y trapiches, bombas centrífugas, ventiladores, etc. y el vapor de escape se recircula en el proceso de producción de azúcar. La presión y temperatura del vapor generado en estas calderas son relativamente bajas pero suficientes para lograr un equilibrio energético entre fuerza motriz y vapor para procesos (Pandey y col., 2000 (b); De Buen, 2002; Agüero y col., 2006). En algunas poblaciones rurales, el bagazo de caña se mezcla con tierra y cemento para fabricar ladrillos (Medjo Eko y Riskowski, 2001).

Por otro lado, el bagazo de caña puede emplearse en procesos de bioconversión. Entre los distintos procesos se incluye la producción de químicos, metabolitos, hongos comestibles, proteína para alimentación de ganado y enzimas. En la producción biológica

de gas hidrógeno es posible utilizar materiales de desecho para minimizar los residuos, lo que se conoce como “tecnologías verdes”. La producción de hidrógeno se realiza por microorganismos anaerobios y fotosintéticos que utilizan los carbohidratos de las materias primas. Durante el proceso, el hidrógeno se produce como un subproducto en la generación de metano. Utilizando bagazo de caña como sustrato de *Rhodospseudomonas* sp se han obtenido rendimientos de hasta 45 ml/(mg de material seca-hora) (Kapdan y Kargi, 2006). El bagazo de caña puede ser sometido a un proceso de composteo para producir fertilizantes (Meunchang y col., 2005); asimismo, este material ofrece una materia prima útil para su empleo como complemento de la alimentación de animales rumiantes; sin embargo, su uso es limitado por ser un forraje de baja calidad debido a su alto grado de lignificación (Hassoun y col., 2002; Tengerdy y Szakacs, 2003; Campos y col., 2004). Los polisacáridos del bagazo pueden recibir un tratamiento químico para deslignificarlos y después, otro enzimático para liberar azúcares fermentables, útiles para la producción de alcohol u otros productos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000; Ferraz y col., 2003; Thygesen y col., 2003). Una de las aplicaciones más significativas del bagazo de caña es la producción de enzimas empleando fermentación en medio sólido (FMS). Esta es una alternativa para la producción de enzimas por hongos filamentosos dadas sus características fisiológicas y morfológicas (Viniegra-González y col., 2003).

2.1.3 Composición química

Las plantas, tanto las tropicales como las de clima templado, difieren entre sí en la estructura y composición de su pared celular, dependiendo de su especie, parte anatómica y fase de desarrollo. En el mismo sentido, la estructura de la pared celular vegetal es muy compleja y variable, tanto química como histológicamente (Fig. 2.1). La pared celular de las plantas es considerada la fuente renovable de polisacáridos más

abundante en la naturaleza. Esta se compone de tres constituyentes principales: a) celulosa, polímero insoluble formado por residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$; b) lignina, un compuesto polifenólico asociado a hemicelulosas y que forma matrices que rodean a las microfibras de celulosa, constituyendo las paredes vegetales secundarias; c) hemicelulosa, que agrupa diferentes heteropolisacáridos, que incluyen los polímeros de xilosa (llamados genéricamente xilanos), manosa, arabinosa, entre otros (Joseleau y col., 1992; Harris y Smith, 2006).

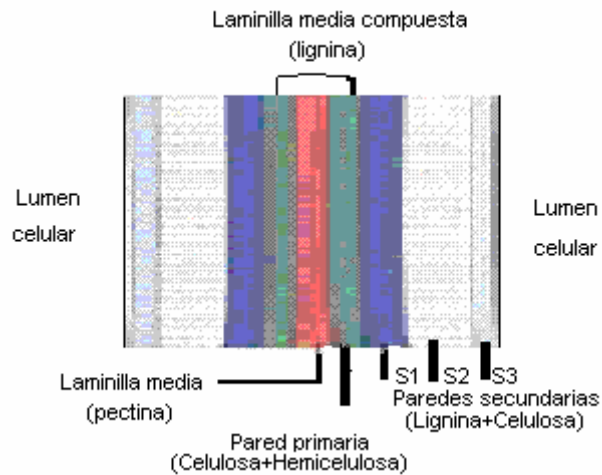


Figura 2.1. Esquema de la composición de la pared del material vegetal (González, 2004).

El bagazo de caña consiste de aproximadamente 48% celulosa, 38% de hemicelulosa, 10% de lignina y 4% de cenizas (Okano y col., 2006); dado su bajo contenido de cenizas, éste ofrece numerosas ventajas para el crecimiento microbiano en comparación con otros residuos agrícolas tales como paja de arroz o de trigo, las cuales poseen 17.5% y 11% de cenizas, respectivamente (Pandey, 2000 (b)).

2.2. Características de los sustratos para FMS

Desde la década pasada, muchos de los estudios relacionados con la aplicación de fermentación en medio sólido se han concentrado en aumentar el valor agregado de los residuos industriales (Pandey y col., 2000 (a)). Se han desarrollado distintos procesos para mejorar el contenido proteico en residuos frutales amiláceos (Smail y col., 1995), producción de enzimas (Mazutti y col., 2006) y síntesis de metabolitos (Pallares y col., 1996). En general, en todos esos procesos la fuente de nutrientes actúa como soporte físico para el crecimiento microbiano. Así, la degradación de sustrato se atribuye a enzimas extracelulares que se liberan de manera secuencial durante la fermentación (Nandakumar y col., 1994). La acción de las enzimas sobre los sustratos depende de las propiedades físicas de los materiales, incluyendo la naturaleza amorfa o cristalina, superficie accesible, área superficial, porosidad y principalmente el tamaño de partícula (Viniestra-González y col., 2003; Rodríguez y Sanromán, 2005). Por otro lado, en los procesos de FMS se presentan tres fases: gas, líquido y sólido; de las cuales, la fase acuosa está íntimamente asociada con las superficies sólidas y está en contacto con una fase gaseosa continua de gas ambiental, esta interfase gas líquido resulta una frontera para el intercambio gaseoso oxígeno-dióxido de carbono y la transferencia de calor. El tamaño de esta frontera es función del tamaño de las partículas sólidas, puesto que partículas pequeñas proveen una mayor área superficial para la transferencia de calor y el intercambio gaseoso, pero debido a su mayor densidad de empaque se reduce el espacio entre partículas, lo cual tiende a disminuir el área superficial disponible de esta frontera (Knapp y Howell, 1980); esto debe tomarse en cuenta puesto que los hongos filamentosos son microorganismos aerobios estrictos; así, la fermentación sólida puede implicar una pobre transferencia de calor (Marsh y col., 2000) con una reducción de la actividad microbiana, siendo interesante evaluar el efecto del tamaño de partícula en la producción

de metabolitos (García y col., 2003) y crecimiento microbiano (Roukas, 1994; Reddy, 2003).

De acuerdo a lo anterior, la estructura y tamaño de los soportes-sustratos permite dejar expuestos diferentes materiales susceptibles de degradación microbiana (Pandey, 2003; García y Torres, 2003). De aquí que la separación mecánica de cualquier sustrato puede ser útil para propósitos específicos, como el cultivo de hongos comestibles, producción de piensos (Zadrazil y Puniya, 1995) o producción de extractos enzimáticos enriquecidos en actividades particulares. Aunque es difícil determinar la naturaleza de las fibras con base en las estructuras de los polisacáridos que las constituyen, a últimas fechas se han estudiado las características de diversos materiales fibrosos de origen vegetal con el fin de evaluar sus propiedades físicas y químicas para ser empleados como materiales biodegradables en la manufactura de materiales para varias industrias. Esta tendencia se asocia con ventajas particulares que combinan baja densidad, bajo costo, buenas propiedades mecánicas y biodegradabilidad. Muchos residuos vegetales, ofrecen múltiples posibilidades en dimensiones, composición y morfología de estructuras fibrosas, que pueden ser útiles en la industria papelera, de materiales cerámicos aislantes empleados en la construcción con estructuras porosas específicas. Gañán y col. (2008) realizaron un estudio dirigido a investigar la estructura fibrosa de residuos agroindustriales de diferentes especies de *Musaceae* (bananero) mediante técnicas microscópicas: óptica, confocal, electrónica de barrido y fuerza atómica con el fin de abrir el panorama del uso de este residuo en la elaboración de productos. Por otro lado, Pinto y col. (2008), mediante microscopia de fluorescencia marcan celulosa en los materiales que la contienen para mejorar las propiedades de la pulpa o como un aditivo en el reciclaje de papel. Esta técnica les permite medir el área superficial de las fibras de celulosa evaluando de manera indirecta la concentración de dominios de unión de celulosa. Por otro lado, Chiparus y Chen (2003) encontraron una buena manera de evaluar la

resistencia de fibras textiles obtenidas de bagazo de caña libre de lignina mediante microscopía electrónica de barrido. Empleando esta misma técnica, Bilba y col. (2007) analizan las fibras de palmas de coco y plátano para evaluar su textura después de tratamientos térmicos con buenos resultados para ser empleadas en la elaboración de cementos cerámicos aislantes analizando su porosidad. Sin embargo, no se han encontrado reportes para evaluar la disponibilidad de los componentes del material vegetal en sustratos agrícolas mediante el uso de análisis de imágenes.

2.3. Hongos de pudrición blanca

Los hongos constituyen un grupo muy extenso de organismos, se encuentran en todos los nichos ecológicos. Son eucariontes inferiores que difieren en morfología, fisiología y ecología. Muchos de los hongos poseen un impacto negativo en el bienestar humano como agentes de enfermedad en plantas (royas, y pudrición) o como patógenos de animales (Bennett, 1998).

Existen antecedentes sobre el uso de diversas especies de hongos capaces de degradar residuos agroindustriales como son pajas de: trigo, cebada o maíz; los cuales son ricos en compuestos ligninocelulósicos, lo que representa un grave problema de contaminación. Los basidiomicetos del género *Pleurotus* son clasificados como hongos de pudrición blanca por su capacidad de degradación de lignina, celulosa y hemicelulosa. Bajo condiciones naturales, los hongos de pudrición blanca colonizan sustratos lignocelulósicos y sus hifas pueden penetrar al suelo. *Pleurotus ostreatus* es un hongo saprófito que degrada madera; popularmente es conocido como “hongo ostra” y es de las especies mayormente cultivadas. El uso potencial biotecnológico de estos hongos ha tomado atención considerable en las últimas dos décadas. La mayor parte de las

biodegradaciones *in situ* han utilizado *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, o *Pleurotus ostreatus* (Baldrian, 2004).

El cultivo de hongos comestibles es un primer ejemplo de la conversión de residuos de bajo valor, primordialmente de las prácticas agrícolas, en materia primas de mayor valor las cuales pueden servir como material alimenticio para humanos y como una fuente de metabolitos importantes comercialmente. Entre las setas de mayor cultivo se encuentran los hongos ostra, que incluyen *Pleurotus ostreatus* y *P. sajor-caju*. Estas especies son muy adaptables y capaces de crecer y fructificar sobre una amplia variedad de residuos lignocelulósicos, por ejemplo, pajas, aserrín, bagazo y hojas de bananero. Tanto la producción de enzimas lignocelulolíticas como el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en diferentes materiales dependen de la cepa, la composición del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento (Cohen, 2001; Sainos y col., 2006; Stajić y col., 2006). El crecimiento fúngico sobre los residuos y el rendimiento en la fructificación son dependientes de la habilidad del hongo para sintetizar enzimas hidrolíticas y oxidativas las cuales convierten los componentes individuales del sustrato (celulosa, hemicelulosa, lignina) en compuestos de bajo peso molecular asimilables para la nutrición. Puesto que la degradación de lignina parece ser la etapa limitante en la velocidad de colonización de sustrato, el desarrollo de estrategias para mejorar las eficiencias requiere un entendimiento completo de los sistemas ligninolíticos que mantiene el hongo y los factores fisiológicos que afectan su actividad (Fu y col. 1997).

La capacidad de los hongos para adaptar rápidamente su metabolismo a diversas fuentes de carbono y nitrógeno se debe a la producción de un gran número de enzimas intra y extracelulares capaces de degradar biopolímeros (Palmieri y col., 2000). Los hongos del género *Pleurotus* producen gran cantidad de enzimas hidrolíticas y fenol-oxidasas, las cuales son responsables de la degradación de lignina (Díaz, 2003; Iriarte, 2003). Los sistemas enzimáticos que utilizan no son específicos, y presentan una gran complejidad,

primero se da la despolimerización de la lignina y posteriormente la degradación de fragmentos alifáticos y aromáticos. Estos sistemas enzimáticos están implicados en la degradación de una gran variedad de xenobióticos, incluyendo hidrocarburos poliaromáticos, bifenoles y varios grupos de pesticidas (Bending y col., 2002).

En México, el uso de *Pleurotus ostreatus* se presenta como una alternativa para la solución, al menos parcialmente, de problemas como la contaminación por subproductos agroindustriales y la insuficiencia alimentaria. Los residuos más recomendados son pulpa de café, bagazo de caña de azúcar, de maguey pulquero o tequilero, de henequén y de uva (Guzmán y col., 1993; Guillén-Navarro y col., 1998; Hernández y col., 2003). El cultivo en medio sólido de *Pleurotus* consiste en propagar el micelio en granos de cereales como trigo, sorgo o avena (Guillén-Navarro y col., 1998, Tinoco y col., 2001), dicho inóculo llamado primario es el que se mantiene en las mejores condiciones para su conservación, esto constituye la base del cultivo comercial de hongos comestibles, el inóculo primario se consigue cuando el sustrato es colonizado por el micelio del hongo (Villa-Cruz y col., 1999). Con fines de obtener cuerpos fructíferos, se resiembró de nuevo y se obtiene un inóculo secundario sobre granos de cereal en mayor cantidad, para después inocularlo en el sustrato de producción (subproducto agrícola).

Durante la producción de hongos comestibles, ocurren diferentes etapas en el ciclo biológico del hongo. Después que el sustrato es sembrado, se da un desarrollo masivo del micelio sobre éste, posteriormente se produce un cuerpo fructífero (basidiocarpo). La inducción para la fructificación se consigue sometiendo al micelio a cambios en estímulos externos como temperatura, humedad y luz. Se cree que los alcoholes aromáticos como el veratrílico presentes en la lignina inducen la producción de lacasas para la formación de cuerpos fructíferos (Sugimoto y col., 2001). La formación del micelio sirve para conseguir el ablandamiento de las fibras del sustrato y la reducción considerable de compuestos

potencialmente tóxicos presentes en los sustratos como son taninos, fenoles y ácidos que afectan el desarrollo del micelio.

Ventajas del empleo de *Pleurotus*

El Centro para la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Aplicada (CFSAN) de la Administración para los Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) trabaja con organizaciones internacionales (OMS, FAO, Codex) para armonizar los estándares internacionales sobre alimentos. Entre las áreas de preocupación por la seguridad del centro destacan: a) patógenos biológicos (p. ej. bacterias, virus, parásitos); b) toxinas que existen de forma natural (micotoxinas, por ejemplo) y; residuos pesticidas. Este centro cuenta con instrumentos para garantizar la seguridad alimentaria, entre los que se incluyen la supervisión de plantas de procesamiento de alimentos y de procesos biotecnológicos (FDA-CFSAN, 2001).

Aunque en apariencia, es posible utilizar cualquier hongo para modificar y enriquecer subproductos agrícolas con el fin de emplearlos como complementos alimentarios para el ganado, se requiere tener en cuenta que la creciente globalización económica y los tratados de comercio internacionales hacen que los procesos tecnológicos innovadores se ajusten a la normatividad internacional; así pues, contar con tecnologías seguras en la producción de alimentos y suplementos dietéticos de animales para el consumo humano se vuelve una actividad indispensable. Ante esta panorámica, resulta valioso evaluar el uso potencial de microorganismos para modificar y enriquecer sustratos agroindustriales. Así pues, muchos de los hongos que crecen sobre sustratos agrícolas producen aflatoxinas (cancerígenas) y la elección de un hongo que permita elaborar un complemento alimenticio se debe hacer de manera cuidadosa. A este respecto, uno de los microorganismos que ofrece la posibilidad de fabricar un producto generalmente reconocido como seguro (GRAS, de acuerdo a la normatividad de la FDA) en la

elaboración de complementos alimenticios es el hongo blanco *Pleurotus* por su capacidad de degradar muchos sustratos y su elevado valor nutricional. Por otro lado, los basidiomicetos del género *Pleurotus* son organismos cuya fase vegetativa puede ser obtenida relativamente fácil a nivel laboratorio. Aunque sus cuerpos fructíferos se cultivan a nivel industrial para consumo humano, por su excelente sabor rico en proteínas y vitaminas es posible realizar la fermentación de residuos agrícolas sin llegar a la fructificación con el fin de degradarlos parcialmente y aumentar su digestibilidad para su uso posterior en la elaboración de piensos para ganado (Okano y col, 2006). No obstante las características convenientes de *Pleurotus*, se conoce de un caso de asma ocasionada por esporas de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* (Senti, y col., 2000), por tal razón, es conveniente emplear mascarillas al trabajar este organismo para evitar la sensibilización del sistema pulmonar.

2.4. Enzimas responsables de la degradación del material vegetal

La degradación de los componentes de las paredes vegetales es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares. En los hongos filamentosos, estas proteínas son indispensables para la obtención de energía y nutrientes por estos microorganismos. Muchas de estas enzimas han recibido una atención especial debido a su uso potencial en diferentes procesos industriales. A continuación se presenta información relativa a las principales enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos.

2.4.1 Lacasas

Este tipo de enzimas se ha estudiado de manera especial desde finales de la década de los 90's y son producidas por una gran diversidad de organismos en la naturaleza. Estas proteínas se han detectado en plantas como el árbol de la laca – de ahí su nombre- árbol del mango, frijol y pino; (Flickinger y Drew, 1999; Antorini y col., 2002); en bacterias, como *Azospirillum lipoferum* y algunos géneros de insectos (*Drosophila*, *Manduca* y *Tenebrio*, por ejemplo). En la actualidad, las lacasas más estudiadas son las concernientes a los hongos basidiomicetes que pertenecen al grupo de los hongos de podredumbre blanca (*Agaricus*, *Trametes* y *Pleurotus*) (Kiiskinen y col., 2004). Son llamados así debido a que degradan la lignina y producen un residuo de color blanco que corresponde a los desechos de celulosa y hemicelulosa que contienen las cortezas (González, 2004), indicando que las lacasas están relacionadas con diversas actividades celulares y microbianas. En las plantas se relacionan con la síntesis de lignina; mientras que en los hongos juegan un papel en la degradación de la lignina, la esporulación, la producción de cuerpos fructíferos, producción de pigmentos y la patogénesis en plantas (Márquez-Rocha y col., 2000; Galhaup y col., 2002). Las lacasas (bencendiol: oxígeno reductasas, EC 1.10.3.2) pertenecen al grupo de las polifenol oxidasas que contienen cobre en el centro catalítico y se encuentran unidas en tres sitios distintos con cobre; de manera común se llaman oxidasas multicobre (Baldrian, 2006); son capaces de oxidar polifenoles sustituidos y diaminas transformándolos en compuestos más oxidados no tóxicos (quinonas) o mineralizándolos, para el caso de antraceno y fenantreno (Márquez-Rocha y col., 2000; Suzuki y col., 2003), también pueden degradar lignina en ausencia de lignina peroxidasa y de manganeso peroxidasa (Mayer y Staples, 2002).

Entre las principales aplicaciones de las lacasas se encuentran la deslignificación y decoloración de lignocelulosa en las industrias papelera y textil, sirviendo como agentes de bioblanqueo; se utilizan en el tratamiento de aguas residuales que contengan

compuestos aromáticos contaminantes y en la desulfuración de los combustibles fósiles (D'souza y col., 1996; Singh y Kaur, 2001; Tinoco y col., 2001; Kiiskinen y col., 2004). Entre otras aplicaciones, se manejan como agentes aglutinantes en ensayos enzimáticos e inmunológicos (Milstein y col., 1993); en menor medida, las lacasas se emplean en productos de cuidado médico y personal para contrarrestar toxinas que producen melanomas y dermatitis (Youngchim y col., 2004) o como sustitutos del peróxido en los tintes para el cabello (Rodríguez y Toca, 2006). De manera más reciente, la lacasa se trata de utilizar en la manufactura de biosensores para detectar fenol, anilina y oxígeno por su capacidad para reoxidarse (Klis y col., 2006, Nogala y col., 2006). Por último, en la industria alimentaria, las lacasas se han aplicado para eliminar compuestos fenólicos formados durante el procesamiento de bebidas, es decir, se utilizan para oxidar agentes tóxicos; también pueden proveer de aroma, color, sabor y estabilidad a los jugos u otras bebidas; en los alimentos el uso de lacasas permite eliminar el oxígeno y asegurar condiciones de anoxia (Loera y col., 2006).

Estas enzimas no son específicas para un solo sustrato, la gama de estos puede variar de una lacasa a otra; sin embargo, se sabe que su sitio activo está constituido por un tripéptido histidina-cisteína-histidina (Baldrian, 2006). Las lacasas realizan la oxidación a una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo monofenoles, difenoles y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, aminas aromáticas y ascorbato (Galhaup y col., 2002; Kiiskinen y col., 2004). La reducción del oxígeno a agua por esta enzima, está acompañada por la oxidación típica de un sustrato fenólico, generando un radical libre, que generalmente es inestable (v. fig. 2.2). También, puede experimentar una segunda oxidación por catálisis enzimática para formar quinonas, o puede ocurrir una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación, y/o podría participar en una reacción de polimerización, dando un compuesto amorfo insoluble como la melanina

(Thurston, 1994). Las reacciones oxidativas que pueden llevar a cabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: rompimiento entre enlaces C α -C β , hidroxilación, rompimiento de estructuras aromáticas y desmetilación (Sariaslani, 1989; Farnet y col., 1999).

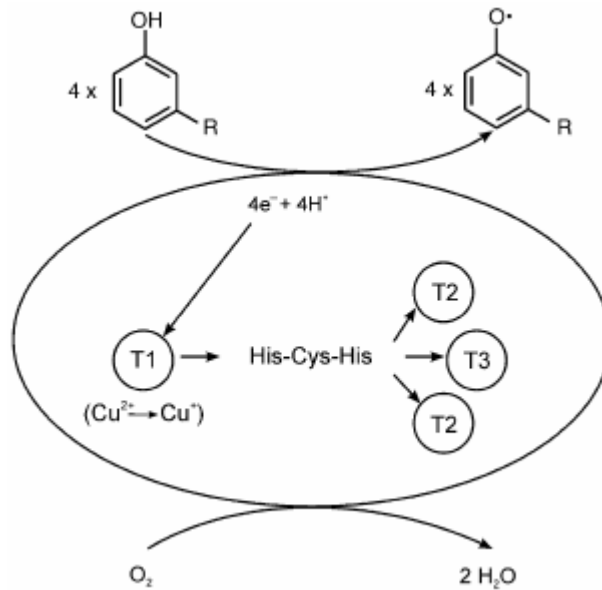


Figura 2.2. Ciclo catalítico de la lacasa (Baldrian, 2006)

Es sabido que especies individuales de hongos pueden expresar diferentes isoformas de lacasas con diversas condiciones para la detección de su actividad: pH, especificidad de sustrato y algunas condiciones de cultivo como son: las fuentes de nitrógeno, carbono, fósforo, etc. (Fernandez-Larrea y Stahl, 1996; Wahleithner y col., 1996). Estas formas se diferencian por su peso molecular y localización celular. En la actualidad se estudian lacasas intracelulares y extracelulares. Las propiedades moleculares que poseen estas enzimas varían, sus puntos isoeléctricos (pI) van de 3.0 a 7.0 -las lacasas de plantas el pI es por lo regular de 9.0. Mediante las técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida, se ha encontrado que los hongos tienen diferentes unidades de lacasas

con pesos moleculares de: a) entre los 60 a 70 kDa (Hublik y Schinner, 2000; Tinoco y col., 2001; Palmieri y col., 2002; Tellez-Tellez y col., 2005); b) entre los 38 a 43 KDa (Tinoco y col., 2001; Jordaan y Leukes, 2003) y c) 16 a 18 KDa (Palmieri y col., 2002); del 10 - 50% de su peso molecular se atribuye al grado de glicosilación. La glicosilación determina diversos factores en la lacasa como son la secreción, la susceptibilidad proteolítica, la actividad, la retención del cobre y termoestabilidad.

2.4.2 Celulasas

La hidrólisis completa de la celulosa nativa requiere la acción conjunta de múltiples enzimas con distintas especificidades de sustrato. Las tres enzimas más importantes son: endocelulasas, exocelulasas y β -Glucosidasas. En el caso de hongos, éstos producen los tres tipos de enzimas (Harris y Smith, 2006).

2.4.2.1 Las endocelulasas (E.C 3.2.1.4) son las celulasas más ampliamente encontradas, hidrolizan la celulosa amorfa (celulosa pretratada con ácido fosfórico concentrado) o derivados solubles tales como la carboximetilcelulosa (CMC) (Coughlan y Ljungdahl, 1998). Las endocelulasas también reciben el nombre de endo- β 1,4-glucanasas, 1,4 β -D glucan 4-glucanohidrolasas y CM-celulasas. Se inhiben fuertemente por la presencia de celobiosa (Massadeh y col., 2001). Las endoglucanasas también juegan un papel importante en el incremento de rendimiento de jugo de frutas, filtración de cerveza, extracciones con aceite, en la mejora de la calidad nutricional de productos de panadería y alimento para ganado (Kaur y col., 2007).

2.4.2.2 Las exoglucanasas (E.C 3.2.1.91) son componentes cruciales de la degradación de celulosa cristalina. Estas enzimas son inactivas en CMC, pero hidrolizan la celulosa amorfa al atacar los residuos de celobiosa, con inversión de la configuración anomérica de las terminaciones no reductoras de la cadena de celulosa (Kaur y col., 2007). La acción de estas enzimas en celulosa cristalina es significativamente amplificada (sinergismo) por la presencia de endoglucanasas. Las exoglucanasas son también conocidas como exocelulasas, 1,4- β -glucan celobiohidrolasas y exocelobiohidrolasas. La actividad exoglucanasa no es fácilmente cuantificada, pero su presencia en una mezcla de enzimas celulolíticas es a menudo correlacionada con el poder de sacarificación de celulosa más o menos cristalina como el avicel (actividad de avicelasa) o de papel filtro (actividad con papel filtro) (Massadeh y col., 2001).

2.4.2.3 Las β -Glucosidasas (1,4- β -D-glucosido glucohidrolasa) (E.C 3.2.1.21) son consideradas elementos que componen los sistemas celulolíticos, hidrolizan la celobiosa a glucosa (Massadeh y col., 2001), también se cree poseen actividad transglucosilante para convertir la celobiosa en soforosa (Aro y col., 2005). Estas enzimas son detectadas empleando como sustrato al *p*-nitrofenol-glucósido y esta actividad es denominada aril- β -Glucosidasa. Las β -Glucosidasas son poco específicas y algunas pueden ser activas contra varios β -Glucósidos (Woodward y Wiseman, 1982).

Algunos hongos como *Trichoderma reesei* producen una celulasa novedosa descrita como SWOI, que sirve para separar cadenas de glucosa y es equivalente a la expansina de las plantas que destruye las fibras de celulosa sin poseer actividad hidrolítica y su acción podría hacer más accesibles las fibras a las celulasas (Aro, 2005). En la figura 2.3 (a) se muestra un esquema de la acción sinérgica de las enzimas celulolíticas.

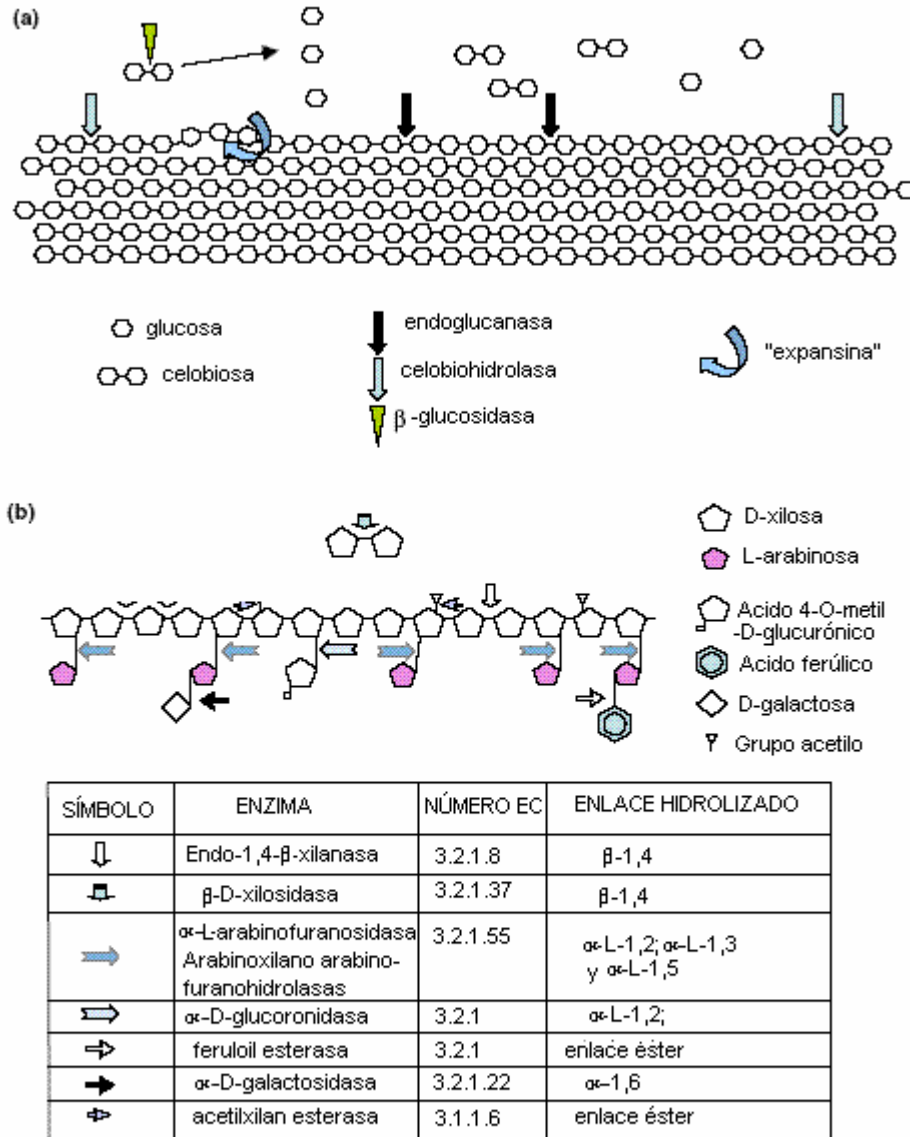


Figura 2. 3. Degradación de celulosa y hemicelulosa (a) Vista esquemática de los sistemas celulolíticos. (b) Vista esquemática de un sistema hemicelulolítico, como ejemplo degradación de arabinoxilano. En la tabla se listan las enzimas responsables (Fuente: Aro y col., 2005).

En general, las celulasas son proteínas bimodulares con un dominio grande catalítico y uno pequeño de unión al sustrato ligado por una secuencia proteica altamente glicosilada rica en prolina y serina. Las celulasas se utilizan ampliamente en la industria textil para tallar y terminar las fibras celulósicas (“stone washing”) empleadas en la fabricación de ropa “denim”, donde el empleo de celulasas disminuye el teñido y destañado de colorante índigo, impartiendo apariencia de gastado y mejorar la suavidad de la tela. (Kaur y col., 2007).

2.4.3 Xilanasas

La hemicelulosa se encuentra asociada a la celulosa y lignina y llega a representar hasta el 35% del peso seco de las plantas superiores. La diversidad de azúcares en las hemicelulosas depende de la planta de procedencia. Por lo regular, las hemicelulosas se clasifican de acuerdo al azúcar residual principal en el esqueleto del polímero. El xilano es la hemicelulosa más abundante, está presente en los cereales y maderas blandas y duras (Aro y col., 2005). Estos polímeros son cadenas de xilosas unidas por enlaces xilosídicos β (1 \rightarrow 4); aproximadamente una de cada diez moléculas de xilosa en la cadena tiene una sustitución en su carbono 2 (C₂), al que se une un residuo de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico por medio de un enlace α -(1 \rightarrow 2). Cerca del 70% de las xilosas están acetiladas en C₂, C₃ ó ambos. La presencia de los grupos acetil es responsable de la solubilidad parcial del xilano en agua. Además, una considerable proporción de las unidades de arabinosa de las cadenas laterales de xilanos está esterificada con ácidos *p*-cumárico y ferrúlico (en paja de cebada, 2,9 y 6,7 %, respectivamente), que establecen

enlaces con las cadenas de lignina (Joseleau y col., 1992; Vliegenthat y col., 1992; Khandeparkar y Bhosle, 2006).

No obstante su complejidad, la degradación enzimática del xilano está bien descrita y su biodegradación es efectuada por un conjunto complejo de enzimas llamadas genéricamente xilanasas, las cuales son producidas por hongos y bacterias. La distribución de las cadenas laterales en los xilanos, así como su conformación física es de gran importancia para las enzimas que degradan estos sustratos. La hidrólisis del esqueleto de xilano se realiza por la acción de endo- $\beta(1\rightarrow4)$ -xilanasas (EC 3.2.1.8) que liberan xilooligosacáridos de diferente longitud y disminuyen el grado de polimerización del sustrato, $\beta(1\rightarrow4)$ xilosidasas (EC 3.2.1.37) (Sapag y col., 2002; Anthony y col., 2003; Monti y col., 2003) y exoenzimas como la α -glucuronidasa (EC 3.2.1.131) y acetil xilan esterasa (3.1.1.72) que liberan azúcares monoméricos por su acción en los extremos de las cadenas (Aro y col., 2005). Se presenta un esquema de la degradación de arabinoxilano en la figura 2.3 (b) para facilitar el entendimiento de este apartado.

Las xilanasas tienen un número creciente de usos, de manera individual o combinada con otras enzimas. Existen numerosas investigaciones con endoxilanasas (EC 3.2.1.8) para la producción de xilanos y su empleo en procesos biotecnológicos. La aplicación de xilanasas en la industria papelera durante el blanqueo de papel, se presenta como una alternativa para reducir el uso de compuestos clorados (Anthony y col., 2003). Por otro lado, junto con otras enzimas hemicelulasas, las xilanasas permiten la obtención de oligosacáridos de xilano provenientes de desechos agrícolas (sacarificación de biomasa lignocelulósica) para su uso como aditivos alimenticios y edulcorantes. Además, empleadas junto con celulasas, son útiles para la modificación de masas en panadería y para el mejoramiento de las dietas de aves y rumiantes, puesto que la hidrólisis

enzimática de los arabinosilanos (en forrajes y cereales) aumenta la digestibilidad de las materias primas de la dieta (Topakas y col., 2003). Adicionalmente, se ha probado la aplicación de xilanasas en extracción de jugos, sabores, esencias y pigmentos; clarificación de jugos y vinos; y mejoramiento de fibras textiles (Subramannian y Prema, 2002; Monti y col., 2003).

Los hongos filamentosos son productores interesantes de estas enzimas desde un punto de vista industrial, debido al hecho de que pueden excretar xilanasas al medio. A escala industrial, las xilanasas se producen por *Aspergillus* y *Trichoderma* spp. en fermentación sólida (Solórzano y Pereira, 2002). Existen preparaciones comerciales de xilanasas obtenidas por vía microbiana: Novo Ban de *Bacillus subtilis*, micelio de *Aspergillus foetidus*, secreción de *Pomacea insularis* (Brenda, 2004).

Se ha descrito, purificado, secuenciado y caracterizado un gran número de endoxilanasas provenientes de diversos microorganismos, y con base en las similitudes de sus secuencias y agrupaciones hidrofóbicas, se han agrupado en las familias 10 (F) y 11(G). Las xilanasas de la familia 11 tienen un dominio catalítico con un peso molecular de 32–39 KDa, mientras que las de la familia 10 poseen de 272 a 350 residuos de aminoácidos en cada proteína. La estructura catalítica del dominio se ha determinado por cristalografía de rayos X y consiste de un haz octaplegado β/α . Las enzimas del grupo 10 muestran una mayor versatilidad catalítica que la familia 11. En las xilanasas llamadas alcalinas se presenta la asparagina, en las más ácidas se localiza el ácido aspártico. (Sapag y col., 2002; Gallardo y col., 2004). En las xilanasas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei*, y *Bacillus circulans*, los residuos catalíticos son dos residuos conservados de ácido glutámico, los cuales se localizan opuestos uno al otro en el sitio activo abierto. El

papel de un glutamato es actuar como un catalizador ácido/base mientras el otro actúa como nucleófilo y estabiliza al intermediario de la reacción (Brenda, 2004).

Las distintas aplicaciones que se han indicado requieren generalmente de la presencia simultánea de xilanasas, celulasas y lacasas. Sin embargo, de manera particular cada aplicación se verá favorecida si los perfiles y proporciones de cada actividad varían de acuerdo al sustrato que se quiera atacar. Así por ejemplo los sustratos ricos en hemicelulosas (granos) requieren que el extracto enzimático contenga xilanasas en mayor cantidad, mientras que sustratos ricos en lignina (forrajes) serán modificados preferencialmente con extractos en los que dominen las lacasas. Sin duda, los basidiomicetos, en especial los hongos de pudrición blanca, son organismos capaces de producir los tres tipos de enzimas y es conveniente presentar información concerniente a ellos.

3

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

Como se ha expuesto, el bagazo de caña de azúcar es un residuo susceptible de emplearse en la producción de enzimas lignocelulósicas y, puede ser utilizado como complemento de la alimentación de rumiantes. Una manera conveniente de reducir el contenido de lignocelulosa en este residuo agroindustrial, mediante el ataque de los componentes de las paredes vegetales, es utilizarlo como sustrato para la FMS por hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, este organismo produce endo- β -xilanasas, celulasas y lacasas, entre otras enzimas, que son responsables de la degradación de lignocelulosa. De manera ventajosa este basidiomiceto no requiere de la adición de fungicidas y permite obtener un producto generalmente reconocido como seguro (GRAS).

Es interesante estudiar a detalle la degradación parcial del bagazo de caña, que incluye la determinación del tiempo en que se observa la mayor actividad catalítica y grado de descomposición del material vegetal, como una respuesta al efecto de fuentes de nitrógeno y la tipificación -en función a la distribución de los tamaños de partícula y aspecto de las fibras- de los materiales agroindustriales sobre los que crezca *Pleurotus*. Estos resultados se pueden aplicar en el cálculo de la velocidad de degradación, el cálculo de los rendimientos enzimáticos y la determinación de la selectividad de la reacción de degradación de los materiales vegetales lignocelulósicos (evaluación comparativa de la capacidad del hongo para producir lacasas, xilanasas y celulasas). Todas estas actividades permiten establecer los parámetros de diseño más convenientes en el manejo y construcción de reactores para fermentación en estado sólido.

Además de la necesidad de hacer aplicables los procesos de transformación de materiales vegetales residuales, resulta de gran interés realizar investigación básica respecto al tipo de enzimas que produce *Pleurotus* por FMS. Este basidiomiceto puede degradar distintos sustratos fibrosos, sin embargo, no están bien identificadas las enzimas responsables de esta degradación; este estudio muestra datos que hacen inferir si la producción de isoformas específicas varía dependiendo de las características del cultivo. Por otro lado, es deseable conocer la termoestabilidad de las enzimas producidas para decidir las aplicaciones que puedan dárseles eventualmente o bien, estimar qué tipos de enzimas son más estables bajo las condiciones evaluadas.

4

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Los perfiles de producción para las enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*, crecido sobre bagazo de caña de azúcar de diferentes tamaños de partícula, varían como resultado tanto de la disponibilidad de los principales componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina) de las paredes celulares del sustrato como de la fuente de nitrógeno que se adicione a este material

5

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la relación entre la producción de enzimas lignocelulolíticas y la degradación de bagazo de caña durante el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en FMS.

Objetivos particulares

- Caracterizar las partículas de bagazo de caña para ser empleado como un sustrato en FMS.
- Determinar el grado de degradación, velocidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*, actividad enzimática (celulasas, lacasas y xilanasas) y contenido proteico sobre partículas de sustrato de diferente tamaño.
- Evaluar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la producción de enzimas lignocelulolíticas.
- Determinar la estabilidad de los extractos crudos enzimáticos producidos por FMS.
- Efectuar un análisis de imágenes para evaluar la disposición de los diferentes materiales vegetales en el sustrato y relacionarlo con los cambios de la composición del material fermentado.

6

METODOLOGÍA

6.1 Preservación y activación de la cepa.

En el desarrollo de este estudio se utilizaron dos cepas de *Pleurotus ostreatus*: IE-8 y CP-50 de la colección de hongos del Colegio de Posgraduados. Para su conservación, cada microorganismo fue sembrado en placas de agar-extracto de malta (EMA, DIBICO®) que contenían tiras de papel filtro estéril de 1 cm X 6.5 cm, las tiras fueron retiradas una vez que fueron invadidas por el micelio. Posteriormente, el papel con micelio se pasó a viales que contenían 5 ml de agua destilada estéril, cada vial se selló con papel parafilm. Los viales con el micelio pueden dejarse en un lugar fresco y seco hasta por un año para asegurar la viabilidad del hongo.

Antes de realizar las fermentaciones en medio sólido, fue necesario activar al hongo sembrándolo en agar-extracto de malta y posteriormente, en placas con agar-extracto de malta-extracto de paja para producir un inóculo.

6.2 Producción de inóculo

Un disco de 6 mm de *Pleurotus ostreatus* crecido sobre papa-dextrosa-agar fue sembrado en cajas Petri con el siguiente medio: 33.2 g de extracto de malta, 15 g de agar y 1 litro de extracto de paja de maíz. El extracto de paja de maíz se obtuvo a partir de 100 g de este material suspendidos en un litro de agua y mantenidos a 85°C durante una hora, después se filtró y el volumen de líquido se ajustó a un litro. La mezcla de los materiales se llevó a esterilización en autoclave (121°C) durante 15 minutos. Después de incubar a $29.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 8 días se cortaron discos de 6 mm de diámetro, a partir de la periferia de la colonia, para emplearse como inóculo en las fermentaciones del bagazo de caña. La estimación de la biomasa por peso seco indicó que el nivel de inóculo fue de 3.4 mg de biomasa por cada gramo de sustrato seco.

6.3 Análisis químico-nutricionales del bagazo de caña

Se utilizó bagazo de caña de azúcar obtenido del ingenio azucarero Emiliano Zapata, localizado en el municipio de Ecatepec en el Estado de Morelos, de la zafra 2004. La recolección fue realizada tras el proceso de obtención de azúcar en la propia planta de procesamiento, que constituye un residuo, mismo que es empleado como combustible.

El contenido de los diferentes componentes del material vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina) se determinó empleando el método selectivo propuesto por Van Soest y Wine en 1967. Este análisis se realizó al bagazo de caña antes y después de ser incubado con el hongo. El material seco se pasó por un molino de cribas (marca Willey, Mod 4) hasta obtener partículas de 1 mm de diámetro. Diferentes porciones de cada muestra (1 ± 0.1 g) fueron sometidas a los tratamientos con solución FDN (fibra detergente neutro) y solución FDA (fibra detergente ácido). La formulación de las soluciones FDA y FDN aparece en la sección de apéndices (A). El tratamiento con los detergentes consiste en ebullición durante una hora, después, el material se filtra y lava con agua caliente y etanol empleando un crisol Gooch, posteriormente se seca por un día a 90°C , pasado este tiempo se pesa. Inmediatamente, a las muestras que se trataron con los detergentes se les cubre con ácido sulfúrico al 72% y se deja así por tres horas, el ácido se lava con agua caliente y se seca a 90°C por un día. Se pesan los residuos de cada tratamiento para estimar la composición del material vegetal.

El reactivo FDN permite eliminar todo el material soluble (proteínas, cenizas, grasas, carbohidratos solubles), después de este tratamiento, sólo queda el material celular compuesto exclusivamente por celulosa, hemicelulosa y lignina, a este residuo se le llama %FDN. El reactivo FDA solubiliza la hemicelulosa, su residuo será %FDA; y el tratamiento con ácido sulfúrico sólo deja intacta a la lignina. Con esta información se deduce que:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{FDN} - \% \text{FDA} \quad \text{Ec. (6.1)}$$

$$(2) \% \text{ Celulosa} = \% \text{FDA} - \% \text{Lignina} \quad \text{Ec. (6.2)}$$

(Bassi, 2004).

6.4 Tipificación del sustrato

La tipificación del sustrato se realizó empleando técnicas comunes utilizadas en la caracterización de partículas sólidas que sirven para soportar catalizadores o como empaque para diferentes operaciones unitarias. Se presentan las tres medidas más útiles.

Tamaño de partícula. Para determinar el diámetro promedio de las partículas de bagazo de caña, se realizó una clasificación de tamaños de acuerdo a la técnica de tamizado (McCabe y col., 2002); con este fin se utilizó un tren de tamices de números de malla: 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 35, 48, 50 y 60. El bagazo sin tamizar contiene partículas cuyos diámetros van de 0.25 mm hasta 5.5 mm. Para realizar las fermentaciones se emplearon tres distintos tamaños: 0.25-5.5 mm (bagazo heterogéneo, sin separarse por tamaños), partículas de bagazo de 1.68 (pasan malla 8 y no pasan malla 12) y partículas de 0.92 mm de diámetro (entre malla 16 y malla 20).

Determinación del aspecto de las fibras de sustrato. Se tomó una muestra de 100 fibras retenidas en cada una de las mallas y con un vernier se midió su longitud, el resultado se expresa como la relación de la longitud de las fibras respecto al diámetro de las mismas (L/D).

Cálculo de la superficie específica de las partículas. A las fibras de los tres tamaños a estudiar se le ajustó el contenido de humedad a 80% y se les sometió a esterilización. Al material estéril se le midió la densidad, densidad de empaque, fracción de espacios

vacíos (ε), esfericidad (ϕ_s) y superficie específica (a). Cada una de estas variables se expresa con las siguientes ecuaciones:

$$\varepsilon = \frac{\text{Volumen.de.hue.cos.en.el.lecho}}{\text{Volumen.total.del.lecho(hue.cos.más.sólidos)}} \quad \text{Ec. (6.3)}$$

$$\phi_s = \left(\frac{\text{Superficie.de.la.esfera}}{\text{Superficie.de.la.partícula}} \right)_{\text{al.mismo.volumen}} \quad \text{Ec. (6.4)}$$

$$a = \frac{6(1-\varepsilon)}{\phi_s d_{\text{esfera}}} \quad \text{Ec. (6.5)}$$

(Geankoplis, 1998)

6.5 Fermentación en medio sólido

El bagazo de los tres diferentes tamaños (bagazo heterogéneo, partículas de 1.68 mm y partículas de 0.92 mm de diámetro) se remojó en agua a 80°C y se mantuvo así por 30 minutos, después se escurrió. Cinco gramos del material escurrido se colocaron en matraces erlenmeyer de 125 ml, los matraces con el sustrato se cubrieron con tapones de algodón y papel aluminio, después se esterizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. La humedad del material estéril fue de 80%.

Cada matraz con el material estéril se inoculó con cuatro discos de micelio y se incubó entre 8 y 21 días, dependiendo del caso de estudio, a 29.5 ± 0.5°C. Después del período de incubación, el contenido de cada matraz fue suspendido en 50 ml de amortiguador de citratos (50 mM, pH 5.0) por 30 minutos dentro de un baño de hielo. Los sólidos fueron separados pasando el líquido por una gasa, después el líquido se centrifugó (4°C, 10 000 rpm, 30 min). El sobrenadante o extracto crudo enzimático (ECE) se utilizó para medir las

actividades enzimáticas y proteína soluble empleando el reactivo de Bradford (1976). Los sólidos se secaron a 70 °C durante 24 horas, después se molieron en una licuadora para medir la proteína insoluble adherida a las partículas de sustrato, así como la biomasa.

En una serie de experimentos se adicionó sulfato de amonio para dar una relación C/N de 20. La relación C/N en el bagazo natural es de 142, su cálculo se realizó tomando en cuenta los resultados de los análisis químicos nutritivos de este material (1.76% proteína bruta, 90% FDN, del cual: lignina 19%, hemicelulosa 20%, celulosa 57 %, el resto son cenizas). Para hacer el cálculo de la relación C/N en este material se consideró que el 16% de la proteína es nitrógeno (Nelson y Cox, 2000), lo cual permite calcular que el 0.28% del bagazo de caña corresponde a nitrógeno. El 40% de los carbohidratos corresponde a carbono y la fracción de carbono en lignina es 0.67, con estos valores, la relación de carbono en el residuo de estudio es de 142 g Carbono/g de Nitrógeno. Ver detalles en el apéndice B. La incubación y obtención de extractos enzimáticos y proteicos se realizó de la misma manera que con el sustrato sin adición de fuente de nitrógeno.

6.6 Contenido proteico

La cantidad de proteína se determinó utilizando seroalbúmina bovina como estándar en solución de 0.15 M NaCl (Bradford, 1976). A 800 µL de ECE apropiadamente diluido se añadieron 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-RAD) y se agitó vigorosamente y después de 5 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (DU 640 Beckman).

6.7 Crecimiento

El crecimiento de *Pleurotus ostreatus* se evaluó en dos formas, para el cultivo en cajas Petri se determinó la velocidad radial y para la FMS se estimó la biomasa por la medición de N-acetilglucosamina.

Velocidad radial. Las cepas IE-8 y CP-50 se crecieron en placas que contenían 20 ml de EMA enriquecido con urea o sulfato de amonio para conseguir una relación C:N de 20 (g:g). También se crecieron sobre placas con 20 ml del medio de activación (agar-EMA-extracto de paja), en este medio no se determinó la relación C:N. Se inocularon tres placas por cada cepa por cada medio con un disco de micelio obtenido del medio EMA simple, se mantuvieron a $29.5 \pm 0.5^\circ \text{C}$ por 5 días. La velocidad de crecimiento radial (mm/h) fue determinada por la medición del diámetro de la colonia diariamente (Trinci, 1974), las medias para cada medio se sometieron a un análisis estadístico empleando el paquete estadístico NCSS 2001®.

Medición de biomasa. La producción de biomasa se estimó por la determinación de N-acetil-glucosamina, uno de los constituyentes de la pared celular de los hongos de acuerdo a la metodología propuesta por Scotti y col. (2001). Para ello se requirió de una hidrólisis ácida de las muestras para liberar la glucosamina de la pared celular de los hongos. El procedimiento seguido consistió en pesar 0.4 g de muestra seca y ponerla en contacto con ácido sulfúrico al 72% por 30 minutos con agitación suave, después se diluyó la muestra con 10 ml de agua; la muestra diluida se mantuvo a 121°C por dos horas, enseguida se neutralizó con bicarbonato de sodio seguido de hidróxido de sodio 0.5 M, la muestra neutralizada se llevó a un volumen conocido y se le determinó el contenido de glucosamina. La glucosamina liberada se combina con acetilacetona para

formar un compuesto pirrólico. Este reacciona con el reactivo *p*-dimetilaminobenzaldehído (PDBA) para formar un compuesto estable de color fucsina con un máximo de absorbancia a 530 nm. Fue necesario realizar una curva de estandarización de biomasa (0-1g/L) y una de N-acetilglucosamina (0-1.8 g/L), ver apéndice C.

El desarrollo de color se consigue adicionando a 2 ml de muestra, 1 ml de solución A (1 ml de acetilacetona con 50 ml de carbonato de sodio 0.5 N) y 1 ml de agua destilada. La mezcla se mantiene en baño María por 15 minutos, se enfría y se agregan 4 ml de etanol. Después se mezcla con 1 ml del reactivo B (0.8 g de PDBA disuelto en 30 ml de ácido clorhídrico fumante y 30 ml de etanol), se agita y se deja reposar 30 minutos antes de leer la absorbancia.

6.8 Actividad enzimática

Se determinaron cuatro actividades enzimáticas diferentes, los resultados se expresan en unidades internacionales por cada gramo de sustrato seco (UI/gss) o en miliunidades (mU/gss). Todas las actividades enzimáticas fueron calculadas empleando triplicados y análisis estadístico NCSS 2001®. Las curvas estándar para cada actividad enzimática se presentan en el apéndice C.

Lacasas. La actividad fue ensayada con ABTS (Sigma) por lectura de absorbancia a 420 nm durante 2 minutos con intervalos de 20 segundos ($\epsilon_{420} = 36\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción (1 ml) contenía 0.5 ml de ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetato (pH 5, 0.1 M) y 0.5 ml de ECE (Bourbonais y col., 1997). Una unidad internacional de enzima se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.

Xilanasas. La actividad xilanólítica se determinó por detección de azúcares reductores usando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Loera y Córdova, 2003). El sustrato fue xilano de abedul al 0.5 % en amortiguador de citrato (50 mM, pH 5.3). Se utilizó una serie de diluciones de una solución patrón de xilosa (1.5 g/L en amortiguador pH 5.3). El volumen total de la mezcla de reacción fue 2 ml, consistente de 1.8 ml de sustrato y 0.2 ml de ECE. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 50°C. Después, se agregaron 3 ml de reactivo DNS para detener la reacción. El blanco de cada muestra se consiguió poniendo únicamente el sustrato en las condiciones de reacción y después de agregar el reactivo DNS se adicionó el ECE. El color se desarrolló hirviendo las muestras durante 5 minutos y poniéndolas inmediatamente en hielo. Se midió la absorbancia de las muestras a 540 nm contra un blanco preparado de la misma manera pero con 0.2 ml de amortiguador pH 5.3 en lugar de ECE. El cálculo de la actividad de cada ECE se obtuvo restando a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco de muestra. Una unidad de xilanasas es la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de azúcar reductor (expresado como equivalentes de xilosa) por minuto.

Endocelulasas (CMCasa). La actividad de endocelulasas se determinó por detección de azúcares reductores usando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller y col., 1960). El sustrato empleado fue carboximetilcelulosa al 1.0 % en amortiguador de citrato (50 mM, pH 4.8). Se utilizó una serie de diluciones de una solución patrón de glucosa (1.0 g/L en amortiguador pH 4.8). El volumen total de la mezcla de reacción fue 2.5 ml, consistente de 2 ml de sustrato y 0.5 ml de ECE. La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 50°C; después se agregaron 3 ml de reactivo DNS para detener la reacción; como para las xilanasas, se preparó un blanco de muestra. El color se desarrolló como con las xilanasas. Se midió la absorbancia de las muestras a 575 nm contra un blanco

preparado de la misma manera pero con 0.5 ml de amortiguador pH 4.8 en lugar de ECE. El cálculo de la actividad de cada ECE se obtuvo restando a la absorbancia de la muestra, la absorbancia del blanco de muestra. Una unidad de CMCasa es la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de azúcar reductor (expresado como equivalentes de glucosa) por minuto.

Exocelulasas (PFasa). La actividad de exocelulasas se determinó por detección de azúcares reductores usando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Decker y col., 2003). La mezcla de reacción consistió de una tira de papel filtro de 1 cm X 6 cm (sustrato), 2 ml de solución amortiguadora de citrato (50 mM, pH 4.8) y 0.5 ml de ECE. La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 50°C. Después, se agregaron 3 ml de reactivo DNS para detener la reacción; como para las xilanasas, se preparó un blanco de muestra. El color se desarrolló como se explicó anteriormente y se leyeron las muestras contra un blanco preparado como en los otros casos, la longitud de onda empleada fue 575 nm. Una unidad de PFsa es la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de azúcar reductor (expresado como equivalentes de glucosa) por minuto.

6.9 Técnicas histoquímicas y análisis de imágenes

Para los tres tamaños de partícula estudiados (antes y después de ser fermentados) se realizó una tinción diferencial de azul de toluidina (Quintanar y col., 2004). Para ello, se hicieron cortes transversales de 1-2 mm de espesor con la ayuda de un bisturí. Después se les aplicó azul de toluidina el 1% (p/v), el material se dejó en contacto con el colorante por 1 minuto, se enjuagó con agua destilada. Las coloraciones desarrolladas permitieron identificar los diferentes componentes del material vegetal. La coloración azul turquesa-

azul marino corresponde a lignina, para la celulosa el material se tiñe de azul claro y la hemicelulosa de color rosa-violeta. Los cortes teñidos se llevaron al microscopio (ZEISS MC80 a 10X y 40X) para ser fotografiados, después se hizo una medición de las superficies teñidas con el analizador de imágenes (Image Pro Plus® para Windows). Los cálculos detallados para estimar la fracción de cada componente en el material vegetal aparecen en el apéndice D. En el capítulo 8 de este trabajo se presentan imágenes de microscopía de fuerza atómica, estos análisis fueron encargados al laboratorio de Microscopía Electrónica de Ultra Alta Resolución del Instituto Mexicano del Petróleo.

6.10 Estabilidad de los ECE

Para determinar la estabilidad de las enzimas, se utilizaron ECE de 50 ml obtenidos después de doce días de cultivo de la cepa IE-8 en los tres tamaños estudiados. El ECE se mezcló (1:1) con solución amortiguadora a pH 6 ó 7 (pH 6, citrato 0.05 M; pH 7, fosfatos 0.05 M), para tener un volumen de 100 mL, esta nueva suspensión enzimática se colocó en microtubos de 1.5 ml, los cuales se incubaron a 39 °C. Se midió la estabilidad enzimática de lacasas, xilanasas y CMCasa utilizando las mezclas de reacción indicadas para cada tipo de enzima; la actividad se midió a 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 y 28 h. A las mediciones de la actividad enzimática residual se les realizó un tratamiento matemático para encontrar el modelo cinético que represente mejor la inactivación, el ajuste matemático se probó con las ecuaciones integradas. Se probaron tres modelos de inactivación, el de primer orden respecto a la actividad (ecuación 6.6) que da la ecuación integrada (6.7)

$$\frac{-dA}{dt} = kA$$

$$\text{Ec. (6.6)} \quad \ln \frac{A_0}{A} = kt + C$$

$$\text{Ec. (6.7)}$$

Un segundo modelo probado fue el de inactivación de segundo orden respecto a la actividad residual (ecuación 6.8), cuya integración se presenta en la ecuación (6.9)

$$\frac{-dA}{dt} = kA^2 \quad \text{Ec. (6.8)} \quad \frac{1}{A} - \frac{1}{A_0} = kt + C \quad \text{Ec. (6.9)}$$

Finalmente, se propuso un modelo de segundo orden que depende de la actividad residual y del tiempo (ecuación 6.10), al integrarse permite obtener la ecuación (6.11).

$$\frac{-dA}{dt} = kAt \quad \text{Ec. (6.10)} \quad \ln \frac{A_0}{A} = Kt^2 + C \quad \text{Ec. (6.11)}$$

6.11 Zimografía

Para identificar el número de isoformas enzimáticas, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con revelado específico para cada tipo de enzima. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se llevó de acuerdo a la metodología de Laemmli (1970), seguida de una renaturalización una vez que las proteínas fueron separadas. Se emplearon concentraciones de acrilamida de 10 a 12%, en todos los casos el gel se corrió a 4°C. Se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos (BIO-RAD) de amplio espectro. Ver apéndice E para los detalles de la preparación de la técnica.

Después de separar las proteínas, éstas se renaturalizaron como sigue: el gel se sumergió dos veces durante 5 minutos en Tris-HCl 20 mM pH 8 con Triton (7 ml/L), después dos veces por cinco minutos en Tris-HCl 20 mM pH 8. Entonces, en función del tipo de enzima, el gel se trató de distinta manera.

Zimografía de lacasas. Se probaron dos sustratos para revelar la actividad lacasa, ABTS 0.5 mM en amortiguador de acetato (pH 5, 0.1 M) y dimetoxifenol 2mM en amortiguador de fosfato (pH 6, 0.1 M) (Téllez-Téllez y col, 2005). Inmediatamente después de renaturalizado, el gel se sumergió en la solución con sustrato y se mantuvo a 40°C hasta que aparecieron las bandas de actividad (azul-verde con ABTS y café con dimetoxifenol).

Zimografía de xilanasas y CMCasa. Se emplearon dos técnicas, la primera consistió en sumergir el gel después de la renaturalización en una solución de sustrato preparada como se describió para medir la actividad enzimática, pero al 1%. El gel se preincubó con el sustrato a 4° C durante 30 minutos y después se mantuvo a 40°C por 21 minutos bajo agitación suave. Entonces, el gel se enjuagó con agua destilada y se tiñó con una solución de rojo congo 0.5% (5g/L) por 15 minutos. Pasado ese tiempo, el gel se destiñó en una solución de NaCl 1 M durante una hora, para encontrar las bandas de actividad el gel se sumergió en una solución de ácido acético al 7%.

En la segunda técnica, el gel renaturalizado se puso en contacto con una placa con el sustrato y agar al 1.5%, después de 27 minutos a temperatura ambiente, el gel de agar se tiñó, destiñó y reveló como el de poliacrilamida de la otra técnica.

7

RESULTADOS:
Tipificación de sustrato y elección
de cepa

Los resultados de este trabajo se presentan en tres capítulos; en éste, la primera sección corresponde a la tipificación del sustrato y la segunda a la elección de una cepa útil para establecer los parámetros cinéticos en la degradación del bagazo de caña. En los siguientes dos aparecen la descripción y análisis de la evolución de la degradación del bagazo de caña con la cepa elegida; finalmente en el capítulo ocho, se hace un análisis de imágenes y cinético para explicar la posible presencia de isoformas enzimáticas producidas por *Pleurotus ostreatus*.

7. 1 Características del sustrato

La tipificación del sustrato se realizó empleando las técnicas descritas en el capítulo anterior, los resultados se presentan en la tabla 7.1. El resultado de los análisis químico-nutritivos para las fibras de cada fracción estudiada indicó que la composición del material sin fermentar en todos los casos fue: lignina $19\% \pm 1.9$, hemicelulosa $20\% \pm 1.8$, celulosa $57\% \pm 3.3$ y cenizas $3.2\% \pm 0.7$; los estudios de Pandey y col. (2000 (b)) reportan una composición promedio de este residuo con menor contenido de celulosa (50% celulosa, 25 % hemicelulosa, 25% lignina, 2.4% cenizas); sin embargo, la proporción Hemicelulosa/Lignina es la misma. Por otro lado, la densidad promedio del bagazo de las partículas individuales (tres tamaños estudiados) de bagazo de caña hidratado y listo para ser fermentado fue de $1131 \pm 107 \text{ kg/m}^3$; este valor indica que el sustrato utilizado posee una buena retención de agua independientemente del tamaño de las fibras, lo cual tiene que ver con su composición. No obstante la densidad de las partículas de bagazo es la misma, la densidad de empaque en la FMS varía con el tamaño, sería de esperarse que

partículas más pequeñas tuvieran una mayor densidad de lecho (columna 3 de la tabla 7.1); sin embargo, las partículas intermedias presentan una mayor densidad. Esto puede explicarse por la relación geométrica L/D y el factor de esfericidad, las partículas más pequeñas son menos esféricas y eso les impide compactarse mejor en el lecho sólido. No obstante, no se puede establecer una tendencia entre la fracción de espacios vacíos (última columna) y la esfericidad para el bagazo de caña.

Tabla 7.1. Relación geométrica de las partículas de bagazo de caña de azúcar.

| Tamaño promedio (mm) | Relación geométrica (L/D) * | Densidad del Lecho (kg/m^3) | Esfericidad (ϕ_s) | Superficie específica (mm^{-1}) | Fracción de espacios vacíos (ϵ) |
|----------------------|---------------------------------|--|--------------------------|--|--|
| 0.92 | 12.3 ± 0.44 | 244±26 | 0.55 | 2.56 | 0.78 |
| | 12 | | | | |
| 1.68 | 8.7 ± 1.1 | 349 ±37 | 0.60 | 1.85 | 0.69 |
| | 9 | | | | |
| 2.9** | 18 ± 0.55 | 392±50 | 0.54 | 2.55 | 0.65 |
| | 18 | | | | |

* Promedio de 100 fibras por fracción. ** Los resultados para este tamaño de fibra se obtuvieron ponderando cada propiedad con su fracción peso, debajo de la relación calculada, se incluye en negritas su valor redondeado, que será empleado el resto del trabajo.

Respecto a la superficie específica (penúltima columna), sabemos que la misma cantidad de un material con partículas pequeñas ofrece una mayor superficie que estando en forma de partículas grandes; los resultados tabulados para las partículas de tamaño homogéneo parecen indicar lo contrario: la mayor superficie específica (2.56 mm^{-1}) se determinó para partículas con un tamaño promedio de 0.92 mm y a las partículas más grandes (1.68 mm) se les midió una menor superficie específica (1.85 mm^{-1}), esta aparente contradicción puede explicarse tomando en cuenta que la geometría para ambas partículas es distinta y

también su fracción de espacios vacíos, pues las partículas pequeñas son más alargadas y con mayor porosidad. El bagazo heterogéneo posee una superficie específica de 2.55 mm^{-1} comparable a la de las partículas de 0.92 mm, esto no es de extrañar si tomamos en cuenta que el bagazo heterogéneo contiene una fracción considerable de partículas menores a 1.68 mm (45.55%) y 70% de partículas con $L/D > 10$. Los detalles para los cálculos se presentan en el apéndice F.

7.2 Crecimiento micelial y preparación de inóculo para FMS

Pleurotus ostreatus muestra diferentes patrones dependiendo del tipo de inóculo utilizado para la FMS (Sainos y col., 2006). Estos autores reportaron una correlación entre la productividad y algunos perfiles enzimáticos en una variedad de inóculos empleando *Pleurotus ostreatus*. Así pues, la preparación de inóculos se ha considerado como un aspecto importante para los cultivos sólidos.

Con el fin de obtener un micelio de crecimiento rápido para ser empleado como inóculo en los estudios de FMS, se analizaron tres fuentes diferentes de nitrógeno (Tabla 7.2). En el caso de la cepa IE-8, la velocidad radial de crecimiento fue 0.323 mm/h empleando extracto de paja (EP), el cual fue sólo ligeramente superior que el valor con sulfato de amonio (SA, 0.308 mm/h) y 30% superior que las velocidades determinadas en un medio con urea (0.234 mm/h). Para la cepa CP-50 se observó el mismo patrón; estos resultados concuerdan con Noble y col. (2002), quienes reportaron que el SA era mejor asimilado que la urea para *Agaricus bisporus*. Sin embargo, Novotný y col. (2001) observaron que el crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* alcanzaba velocidades hasta de 1.25 mm/h empleando columnas empacadas con 6 cm de suelo enriquecido con glucosa y extracto de malta y 2.5 mm/h en columnas empacadas de suelo adicionado de glucosa más

tartrato de amonio, indicando que algunas cepas prefieren fuentes de nitrógeno más complejas.

Tabla 7.2 Velocidad de crecimiento radial (mm/ h) para dos cepas de *Pleurotus ostreatus* medidas con diferente fuente de nitrógeno.

| Fuente de nitrógeno | Cepa | |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | IE-8 | CP-50 |
| Urea | 0.234± 0.011 ^a | 0.167± 0.008 ^a |
| Sulfato de amonio (SA) | 0.308±0.014 ^b | 0.275±0.017 ^b |
| Extracto de paja de trigo (EP) | 0.323±0.008 ^b | 0.294±0.016 ^b |

Comparando columnas, distinto superíndice indica que las medias son significativamente distintas después de una prueba comparativa de Duncan para cada fuente de nitrógeno ($p \leq 0.05$).

La velocidad de extensión radial para nuestras cepas fue sensiblemente mayor que aquellos valores reportados por Lara y col. (2002) a la misma temperatura para *P. ostreatus* crecido en EMA y granos residuales de la industria cervecera (0.16 mm/h). Nuestros resultados no mostraron diferencia significativa en la velocidad radial de las cepas IE-8 y CP-50 empleando tanto SA como EP (Tabla 7.2). El extracto de paja se utilizó como una fuente de nitrógeno para la preparación de inóculos en estudios de FMS ya que puede ser incorporado con facilidad a las cajas de Petri. Por otro lado, SA se adicionó de manera directa al bagazo de caña de azúcar para modificar la relación C:N como se presenta en la siguiente sección.

7.3 Análisis de proteína y enzimas lignocelulósicas para diferentes tamaños de partícula.

Para esta parte del estudio se empleó bagazo de caña de los tres tamaños elegidos (0.92 mm, 1.68 mm y 2.9 mm) que tienen una relación C:N de 142; también se utilizó el bagazo

de los tres tamaños suplementado con SA (C:N = 20). El bagazo con o sin SA sirvió de soporte para ambas cepas (CP-50 e IE-8). Después de 8 días de incubación, se determinaron la proteína total y la producción de enzimas.

7.3.1 Producción de proteína. La tabla 7.3 sintetiza el enriquecimiento proteico después del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula. Para ambas cepas, los niveles más altos de contenido de proteína se obtuvieron en aquellos medios con SA. La cepa CP-50 mostró el nivel más alto (252% de incremento de proteína) en partículas heterogéneas (2.9 mm)

Tabla 7.3. Enriquecimiento proteico después de 8 d de FMS sobre bagazo de caña por dos cepas de *Pleurotus ostreatus*. Los resultados se presentan en mg proteína total por gramo de sustrato seco fermentado. La proteína total al inicio fue de 0.3 ± 0.028 mg/gss

| Cepa | Relación C:N | Diámetro promedio de las partículas (mm) | | |
|-------|--------------|--|-------------------------|-------------------------|
| | | 0.92 | 1.68 | 2.9 |
| IE-8 | 20 | 0.630±0.09 ^a | ND | 0.430±0.04 ^a |
| | 142 | 0.526±0.02 ^a | 0.522±0.02 ^a | 0.342±0.01 ^b |
| CP-50 | 20 | 0.566±0.02 ^a | 0.742±0.03 ^b | 0.758±0.03 ^c |
| | 142 | 0.563±0.02 ^a | 0.500±0.02 ^a | 0.668±0.03 ^d |

ND= no determinado. En cada columna, las medias con distinto superíndice son significativamente distintas después de una prueba de comparación de medias de Duncan ($p \leq 0.05$).

7.3.2. Producción de enzimas. La producción de enzimas se determinó para diferentes actividades: xilanasas, lacasas y celulasas puesto que estas familias enzimáticas están involucradas en la ruptura de los componentes de la pared celular de vegetales. La actividad xilanasasa producida por *Pleurotus ostreatus* crecido sobre bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula se muestra en la figura 7.1.

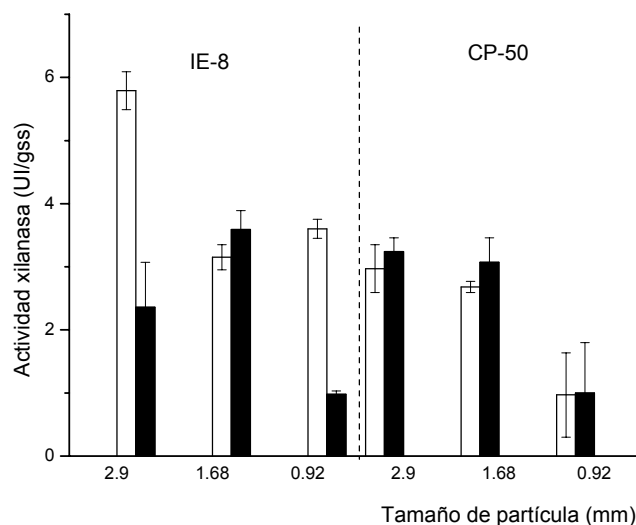


Figura 7.1. Producción de xilanasas por dos cepas de *Pleurotus ostreatus* crecido sobre bagazo de caña durante 8 días. Las barras negras corresponden a la adición de sulfato de amonio.

La cepa IE-8 fue más sensible a la presencia de SA. La actividad de xilanasas en partículas de 2.9 mm fue 145% superior en ausencia de SA (5.79 UI/gss) en comparación con aquella obtenida en presencia de SA (2.36 UI/gss). De manera similar, usando las partículas más pequeñas probadas en este estudio (0.92 mm de diámetro) sin SA, la actividad xilanasa (3.6 UI/ gss) fue casi cuatro veces superior que en el bagazo suplementado con esta fuente de nitrógeno inorgánico (0.98 UI/ gss). Sin embargo, al analizar la actividad enzimática de los extractos obtenidos con partículas intermedias (1.68 mm diámetro) no se observó efecto en la producción de xilanasa, esto es consistente para ambas cepas. Para la cepa CP-50 la presencia de SA no tuvo un efecto significativo para todos los tamaños de partícula; hubo un descenso fuerte en las xilanasas producidas en partículas más pequeñas (Fig. 7.1).

En un estudio de Reddy y col. (2003), quienes describen la producción de xilanasa por *Pleurotus*, se alcanzaron títulos entre 0.64 y 1.6 UI/ gss para *P. ostreatus* y entre 2.4 y 3.4 UI/ gss para *P. sajor-caju* después de 20 días de cultivo sobre residuos de bananero. En concordancia con un trabajo de Gutierrez-Correa y Tengerdy (1998), la producción de xilanasas dependió de la fuente de nitrógeno en la composición del sustrato para *Trichoderma reesei*, donde los títulos de xilanasa fueron de 412 y 2800 UI /gss en experimentos realizados en bagazo de caña con SA-urea y harina de soya, respectivamente. Más recientemente Seyis-Aksoz (2005) reportaron una producción de xilanasa arriba de 1060 UI/ gss después de una semana usando *Trichoderma harzianum* sobre residuos agro industriales en la presencia de diferentes fuentes de nitrógeno. A pesar que los perfiles enzimáticos pueden compararse entre todos los estudios mencionados, las diferencias cuantitativas pueden explicarse debido a la metodología utilizada para cada actividad enzimática en particular (Bailey y col., 1992).

La producción de lacasas para ambas cepas se muestra en la figura 7.2. Esta figura muestra que ni SA ni el tamaño de partícula tuvieron un efecto un la producción de lacasas para la cepa CP-50. Por otro lado, la presencia de SA con partículas de cada tamaño tuvo un fuerte efecto en los títulos de lacasas de la cepa IE-8. Por ejemplo, niveles de actividad fueron 40 mU /gss y 6 mU/gss, con y sin sulfato de amonio, respectivamente cuando la cepa IE-8 creció en partículas intermedias (1.68 mm). De modo similar, en partículas pequeñas (0.92 mm) se observó la misma tendencia. Sin embargo, en las partículas heterogéneas (2.9 mm diámetro promedio), la producción de actividad lacasa sin adición de SA fue casi el doble (21 mU/gss) comparada con los extractos enzimáticos obtenidos en la presencia de fuente de nitrógeno (12 mU/gss).

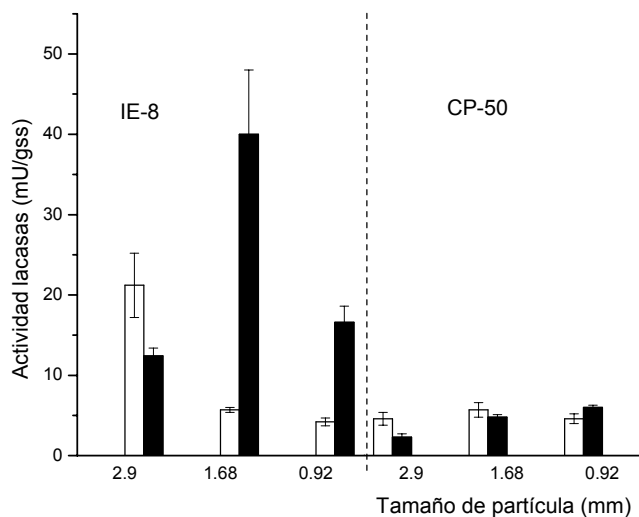


Figura 7.2. Producción de lacasas por dos cepas de *Pleurotus ostreatus* crecido sobre bagazo de caña de azúcar después de 8 días. Las barras negras corresponden a la adición de sulfato de amonio.

La máxima producción específica de lacasa (alrededor de 0.08 UI/mg proteína) determinada en este estudio, correspondiente a la cepa IE-8 para partículas intermedias, es sensiblemente menor que aquella reportada por Krishna-Prasad y col. (2005) en un estudio con *Pleurotus ostreatus* cultivado en fermentación sumergida, en el cual se alcanzó una actividad específica de 803 UI/mg proteína después de optimizar las condiciones de cultivo (glucosa, salvado de trigo, urea, extracto de levadura) y emplear inductores (xilideno y fuentes de nitrógeno). Salmenes y Mata (2002) crecieron *Pleurotus spp* sobre pulpa de café, obteniendo 27 UI/gss. Reddy y col. (2003), quienes trabajaron con *P. ostreatus* hallaron títulos de 15.8 y 27.4 UI/gss después de 10 y 20 días, respectivamente. Kumaran y col. (1997) obtuvieron 4.54 UI/gss de actividad lacasa en *P. ostreatus* sobre las médulas exprimidas del sagú suplementadas con urea. Aunque se ha sugerido que la limitación de nitrógeno es necesaria para la producción de lacasa, Stajić y

col. (2006) reportaron títulos de actividad lacasa de 32.1 UI/gss, después de 10 de cultivo, para *P. ostreatus* bajo condiciones de FMS de cáscaras de toronja con NH_4NO_3 (C:N=40). Nandakumar y col. (1994) mostraron que el tipo de sustrato disponible en el salvado de trigo (almidón o celulosa) ocasiona una producción secuencial de enzimas. Ellos propusieron un modelo matemático que predice la progresión de la degradación de sustrato (reducción de tamaño) durante la fermentación en términos de las dimensiones de la partícula; nuestros resultados concuerdan en este punto, sugiriendo que la exposición a diferentes materiales del bagazo de caña en las partículas con diferentes tamaños y geometría, afecta los niveles de lacasa para ambas cepas. De manera interesante, Tellez-Tellez y col. (2005) mostraron para cepas de *Pleurotus* pertenecientes a la misma especie crecidas bajo las mismas condiciones de cultivo, había diferencias en la actividad debido al nivel de expresión de la actividad de lacasa.

En el caso de celulasas, ambos máximos CMCasa (180 mU/gss) y actividad PFasa (13 mU/gss) se obtuvieron para la cepa IE-8 en partículas pequeñas (0.92 mm de diámetro) sin la adición de SA (Fig 7.3 y 7.4). Otros estudios (Salmones y Mata, 2002) reportaron que la actividad CMCasa para *P. ostreatus* crecido sobre residuos de pulpa de café alcanzó 1000 UI/gss; Reddy y col. (2003) han encontrado 810 mU/gss de actividad CMCasa y casi nada de actividad PFasa cuando el hongo creció en residuos de bananero después de 20 días. En otro estudio con *Lentinula edodes* crecido en residuos de eucalipto en FMS, la actividad CMCasa (1-1.5 UI/gss) se halló después de 30 días de fermentación (Silva y col., 2005). En este estudio, ambos factores (tamaño de partícula y adición de fuente de nitrógeno) tuvieron un efecto en la síntesis de CMCasa y PFasa. La cepa IE-8 produjo actividad CMCasa en partículas de 1.68 mm sólo con SA, mientras que

se observó un fuerte incremento en la actividad PFasa en partículas pequeñas sin adición de SA. Por otro lado, el efecto más fuerte de la adición de SA para la cepa CP-50 se detectó en extractos obtenidos de partículas grandes (Fig. 7. 4). Blandino y col. (2002) mostraron que tanto el tamaño de partícula como la composición química de mezclas que contenían granos de trigo y trigo molido afectan la velocidad de crecimiento microbiano y, consecuentemente, los patrones observados para la producción de polisacaridasas en *Aspergillus awamori* después de 7 días de cultivo a 30° C. En relación con esas observaciones, nuestros resultados mostraron que la inducción enzimática ocurrió a diferentes grados dependiendo del tamaño de partícula y presencia de SA, puesto que el bagazo de caña presentó la misma composición al principio de cada experimento.

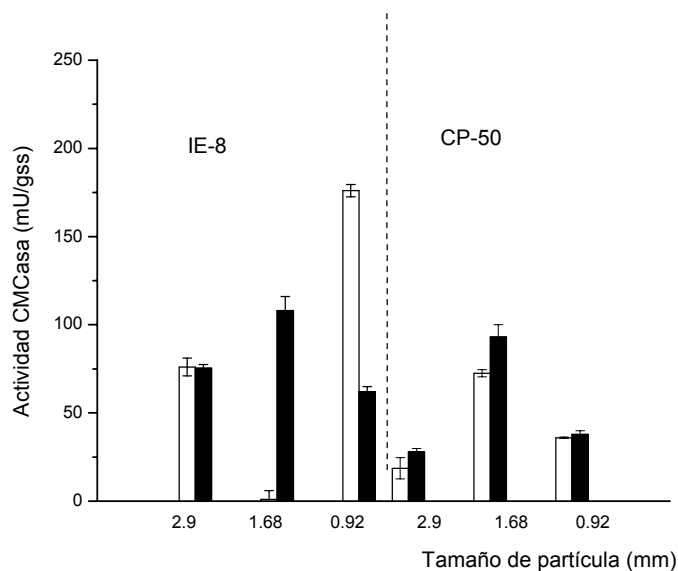


Figura 7.3 Producción de CMCase por dos cepas de *Pleurotus ostreatus* crecido sobre bagazo de caña durante 8 días. Las barras negras corresponden a la adición de sulfato de amonio.

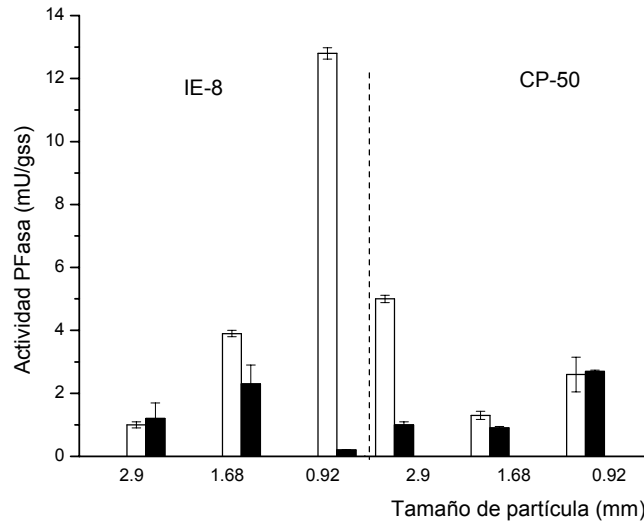


Figura 7.4. Producción de PFasa por dos cepas de *Pleurotus ostreatus* crecido sobre bagazo de caña durante 8 días. Las barras negras corresponden a la adición de sulfato de amonio.

En la tabla 7.4 se presenta un resumen de los efectos del tamaño de partícula en la producción de enzimas. La producción de xilanas fue más alta en partículas heterogéneas (con un tamaño promedio de 2.9 mm) sin la adición de nitrógeno para la cepa IE-8; sin embargo, las cepas IE-8 y CP-50 tuvieron una baja producción de este tipo de enzimas en partículas pequeñas (0.92 mm). La producción de actividad lacasa está muy influenciada por el tamaño de partícula sólo para la cepa IE-8, la cual produjo actividades aproximadamente 68% superiores en partículas grandes y heterogéneas que en partículas pequeñas.

Tabla 7.4. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la producción de enzimas (UI/gss para xilanasa, mU/gss para lacasa y celulasas) por dos cepas de *Pleurotus ostreatus* crecidas en tres diferentes tamaños de partícula. Los resultados representan los valores promedio de las relaciones C:N para cada cepa

| Cepa IE-8 | | | | |
|-------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| Tamaño (mm) | Xilanasa | Lacasa | CMCasa | PFasa |
| 0.92 | 2.29±1.50 ^a | 10±7.0 ^a | 119±66 ^a | 6.54±70 ^a |
| 1.68 | 3.37±0.26 ^{a,b} | 15±10.0 ^b | 55±60 ^b | 3.11±0.9 ^b |
| 2.9 | 4.08±2.20 ^b | 17±5.0 ^c | 76±0.4 ^c | 1.15±0.3 ^c |
| Cepa CP-50 | | | | |
| 0.92 | 0.99±0.60 ^a | 3.5±0.1 ^a | 37±6.8 ^a | 2.67±3.0 ^a |
| 1.68 | 2.87±0.75 ^b | 5.3±1.0 ^a | 83±6.8 ^b | 1.12±0.5 ^a |
| 2.9 | 3.11±0.68 ^b | 5.3±1.0 ^a | 23±9.0 ^a | 3.02±0.3 ^a |

Las medias por columna con superíndice distinto son significativamente distintas después de una prueba de comparación de Duncan para cada actividad enzimática ($p \leq 0.05$).

Nuestros resultados muestran que la relación geométrica y el tamaño de las fibras de bagazo de caña afecta fuertemente el perfil de las actividades enzimáticas. Los haces vasculares de la caña de azúcar exhiben una pared secundaria, donde se localiza una fracción mayor de materiales rígidos y los materiales celulósicos se ubican en la parte interna (González, 2004). Así, en partículas con una relación L/D grande, los microorganismos encuentran una fracción abundante de lignina en la superficie del sustrato al principio de la fermentación, lo que se refleja en una mayor producción de

lacasas y xilanasas. Por otro lado, cuando las partículas son más cortas (L/D menor a 12), hay más celulosa expuesta alrededor de la superficie de cada partícula. En términos de la respuesta a la síntesis enzimática después de la adición de SA, la cepa CP-50 fue menos sensible, lo que revela que el efecto regulatorio de nitrógeno depende del fenotipo de la cepa y no puede asumirse como una característica general de la especie. Esta sección del trabajo se efectuó a un único tiempo de fermentación (8 días), y los resultados sugieren que la exposición a los diferentes materiales del bagazo induce la producción de las diferentes enzimas que degradan la pared vegetal, en el siguiente capítulo se presenta un estudio cinético de la FMS del bagazo de caña con los tres tamaños de estudio empleando únicamente la cepa IE-8 sin la adición de SA, puesto que la producción de actividad lacasa y xilanasas está muy influenciada por el tamaño de partícula sólo para ésta.

8

RESULTADOS:
Cinética de degradación de
bagazo de caña

En el capítulo anterior se estableció que la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* exhibe una mayor producción de enzimas sin la presencia de sulfato de amonio, en esta sección presentamos la descripción de la evolución de la degradación del bagazo de caña sin SA y los balances de materia por componente derivados de estos resultados; así mismo, la producción de proteína y enzimas por esta cepa durante 15 días de cultivo sobre los tres tamaños de partícula empleados, los muestreos se realizaron cada tres días por triplicado; también se presenta el cálculo de parámetros cinéticos de utilidad en el diseño de procesos de FMS.

8.1 Descomposición del material vegetal

Como puede observarse en la figura 8.1, la evolución en la degradación del material vegetal en los tres tamaños de partícula es prácticamente la misma, alcanza alrededor de 81% después de 15 días de FMS, no obstante su composición después de este tiempo es distinta. Se realizaron balances de materia para cada uno de los componentes del bagazo de caña. Se consideró la cantidad de material fermentado en base seca, su contenido de FDN y la fracción de cada uno de los materiales presentados en la figura 8.2.

Es notable que en las partículas de 1.68 mm ($L/D= 9$) prácticamente se consumió la mitad de la hemicelulosa; sin embargo, los títulos de xilanas no superaron las 10 UI/gss a lo largo de la fermentación pero se mantuvieron entre 5 y 10 UI/gss durante todo el proceso, como se analizará en la sección 8.3; se destaca que para este tamaño de partícula también la lignina tuvo la tasa de degradación más alta (67.4%).

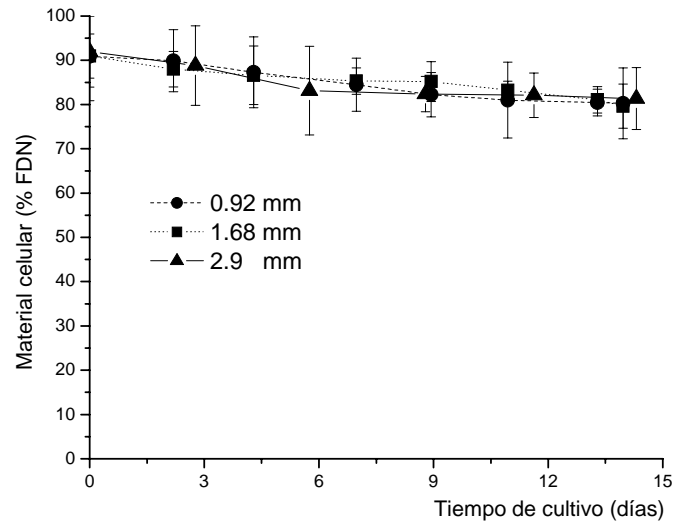


Figura 8.1. Patrón de descomposición del material vegetal (medido como FDN) por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tres tamaños de partícula.

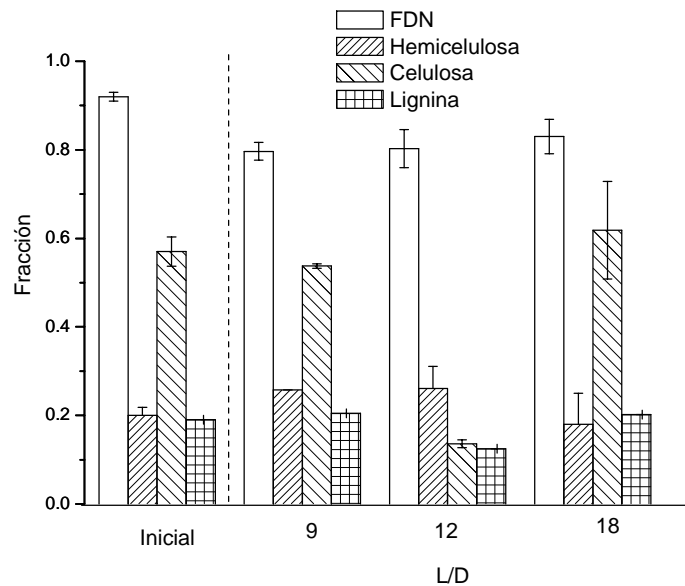


Figura 8.2. Composición del material celular para la degradación de bagazo de caña por la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* en partículas de características diferentes. A la izquierda de la línea punteada se encuentran el contenido de material vegetal (FDN) y su composición antes de ser fermentado. A la derecha, se presenta el contenido de FDN del material fermentado y las proporciones de hemicelulosa, celulosa y lignina en cada fracción de FDN. Partículas de 1.68mm, 0.92 mm y 2.9 mm para relaciones L/D de 9,12 y 18, respectivamente.

Esto puede sugerir que la producción de las enzimas responsables de la degradación de lignina y hemicelulosa puede alternarse por efecto de las características del sustrato, además, para este tipo de partículas, la actividad de endocelulasas se mantuvo casi constante. El bagazo heterogéneo (2.9 mm diámetro promedio, $L/D=18$) presentó un grado de hidrólisis de los tres materiales de estudio razonablemente similar: 35.9% para lignina, 43.5% hemicelulosa y 40.1% celulosa; a este respecto, la variación en el consumo de los componentes de las paredes vegetales respecto a la tipificación del sustrato se presenta en la tabla 8.1. Estos resultados parecen congruentes con estudios realizados por Reddy y col (2003) para el crecimiento de este microorganismo en residuos de bananero, quienes consiguieron una reducción en el contenido de lignina de un 52% para las hojas y 23% para los pseudotallos, lo que confirma que la producción de enzimas lignicelulósicas es función de la estructura del material vegetal. También se relacionan con los estudios de Okano y col. (2006), quienes durante la producción del hongo comestible *Pleurotus eryngii* con bagazo de caña adicionando salvado de arroz lograron reducir en un 6% el contenido de lignina, sin cambios en el contenido de celulosa y una reducción del 46% de hemicelulosa.

Tabla 8.1. Cambios en la fracción fibrosa del bagazo de caña de azúcar después de quince días de crecimiento de la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus*.

| Diámetro promedio (mm) | L/D | Material vegetal residual (% FDN) | % de degradación | | | *HF (%) |
|---------------------------|-------|---|------------------|--------------|----------|------------|
| | | | Lignina | Hemicelulosa | Celulosa | |
| 0.92 | 12 | 80.26 | 67.4 | 37.5 | 85.9 | 76.1 |
| 1.68 | 9 | 79.65 | 47.0 | 50.7 | 39.3 | 76.4 |
| 2.9 | 18 | 83.34 | 35.9 | 43.5 | 40.1 | 73.1 |
| Promedio | | 81.08 ± 1.98 | | | | |

*Humedad final

8.2 Producción de biomasa

En la Fig. 8.3 se presentan las curvas de crecimiento para la cepa IE-8 en los tres tamaños de partícula estudiados; es notable que al final del cultivo, se alcanza prácticamente la misma producción de micelio, alrededor de 8 mg/ gss, para los tres tamaños; en los casos de partículas homogéneas y pequeñas (0.92 y 1.68 mm de diámetro) las curvas son casi idénticas, sin embargo, en las partículas heterogéneas (promedio de 2.9 mm) se presenta un retardo en el crecimiento. Esto puede explicarse si consideramos que, no obstante la superficie específica de las partículas heterogéneas (2.55 mm^{-1}) es comparable a la de las partículas pequeñas (2.56 mm^{-1}), lo que supondría una mayor disponibilidad para el microorganismo del material vegetal, el hecho de que la densidad del lecho sea mayor (casi 400 kg/m^3) parece hacer menos accesible el material. Se realizó un ajuste del crecimiento utilizando el modelo logístico que representa correctamente el crecimiento de organismos filamentosos.

$$X = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \frac{X_0}{X_{\max}} (1 - e^{\mu t})}$$

(Shuler y Kargi, 1992)

El ajuste se efectuó con el paquete Origin 7.0 para Windows, los valores de la velocidad específica de crecimiento (μ), rendimiento de biomasa (Y_x/s) se muestran en la tabla 8.2.

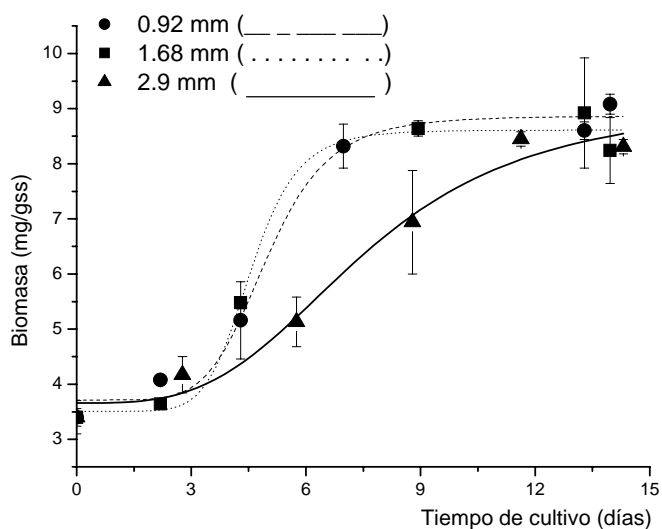


Figura 8.3. Producción de biomasa por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) crecido sobre bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula.

Tabla 8.2. Parámetros cinéticos ajustados para *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) crecido sobre bagazo de caña de azúcar de diferente tipificación. DB= Grado de degradación de bagazo.

| Diámetro de partícula (mm) | L/D | μ (h^{-1}) | R^2 | Biomasa (mg/gss) |
|----------------------------|-------|--------------------|--------|------------------|
| 0.92 | 12 | 0.050 | 0.9897 | 5.68 |
| 1.68 | 9 | 0.049 | 0.992 | 5.52 |
| 2.9 | 18 | 0.043 | 0.9830 | 5.05 |

Las velocidades de crecimiento calculadas ($0.043-0.50 h^{-1}$) son superiores en más del 100% a las que se miden para *P. ostreatus* creciendo en medio líquido (Márquez-Rocha y col., 1999) y si consideramos que en el bagazo existe poco nitrógeno para la producción

de enzimas y biomasa, el bagazo presenta un sustrato aceptable. Se confirma que en el bagazo heterogéneo el crecimiento es menor porque se ve favorecida la producción de proteínas solubles, entre las cuales hay enzimas, desde el principio del cultivo con el fin de hacer más disponible el material vegetal, esto se confirma con la producción de proteína soluble (Fig. 8.4), se alcanza un mayor contenido de proteína al final del cultivo cuando el bagazo es heterogéneo y se alcanza la menor velocidad de crecimiento (0.043 h^{-1}). Por el contrario, en las partículas de 0.92 mm de diámetro, se obtuvo una menor cantidad de proteína soluble y se alcanzó la mayor velocidad de crecimiento (0.5 h^{-1}). Estos resultados muestran que la producción de proteína por *Pleurotus ostreatus* tiene perfiles distintos según el tamaño de las partículas, o dicho de otra forma, por la disponibilidad del material vegetal. Además, la producción de proteína soluble, incluyendo las enzimas, limita la producción de biomasa.

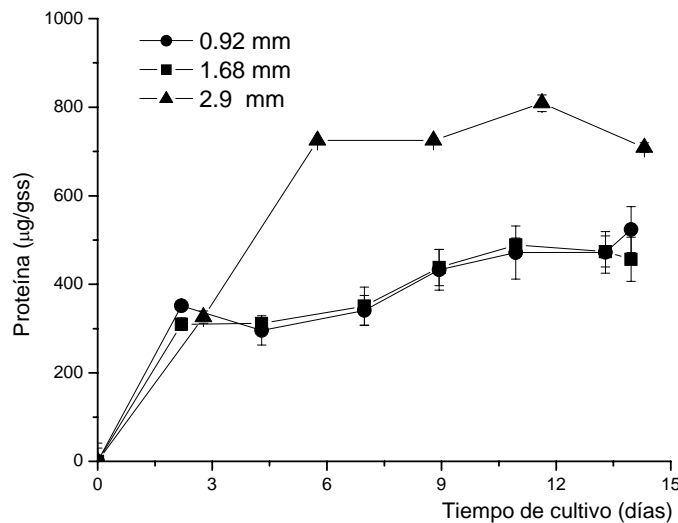


Figura 8.4. Producción de proteína por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tres tamaños de partícula.

8.3 Producción de enzimas

En esta sección, se describen y analizan los patrones enzimáticos obtenidos durante el cultivo de la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* sobre sustrato de diferente tipificación. Respecto a la actividad de xilanasa, en la Fig. 8.5 se presentan las actividades medidas en el bagazo de los tres tamaños; el bagazo heterogéneo es, sin duda, un mejor inductor para este tipo de enzimas, se llega a mantener una actividad alrededor de 11 UI/gss a partir del tercer día de fermentación, con otro pico de producción al final de cultivo. Se puede suponer que una fracción considerable de la proteína soluble presente en el material heterogéneo posee actividad xilanolítica, pues el pico de actividad al final coincide con un incremento en la cantidad de proteína soluble.

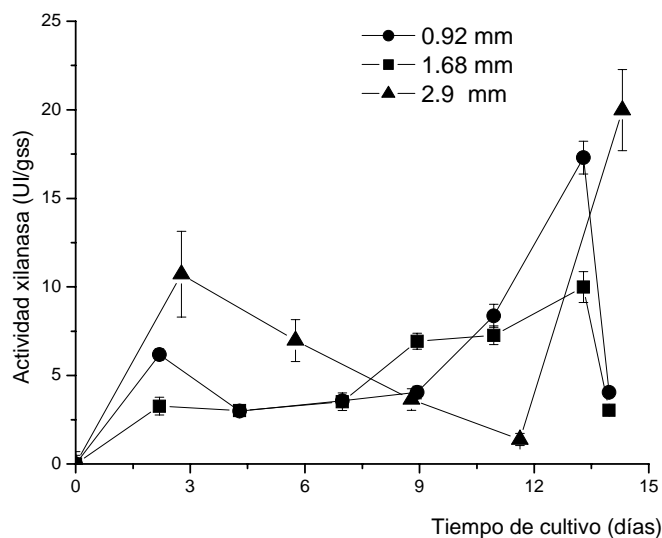


Figura 8.5. Actividad xilanasa por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula

En otros estudios con *Pleurotus ostreatus* se han reportado actividades de xilanasa de 0.94 UI/gss en hojas de bananero troceadas en partículas de 2cm (Reddy y col., 2003);

Salmones y Mata (2002) reportan títulos hasta de 250 UI/gss sobre residuos de café; y los trabajos de Kumaran y col. (1997) reportan alrededor de 2 UI/gss en residuos de sagú. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, a pesar de que los perfiles entre diferentes cultivos se pueden comparar, los valores cuantitativos varían considerablemente según la metodología usada en los cálculos de actividad enzimática (Bailey y col., 1992).

Por otro lado, se sabe que el bagazo de caña pretratado con hidróxido de sodio y sulfato de magnesio permite alcanzar hasta 700 UI/gss de xilanasas con *Aspergillus tamaris*, (Ferreira y col., 1999) y adicionado con peptona para *Aspergillus niger* (Gawande y Kamat, 1999), se lograron hasta 360 UI/gss. El bagazo con sales de amonio es un buen sustrato para *Thermoascus aurantiacus*, puesto que alcanza hasta 110 UI/gss (da Silva y col. 2005), mientras que adicionado de harina de soya es un excelente sustrato para la producción de xilanasas por un co-cultivo de *Trichoderma reesei*- *Aspergillus niger* (2800 UI/gss) según lo reportan Gutierrez-Correa y Tengerdy (1998).

El bagazo heterogéneo constituye un mejor sustrato para la producción de lacasas, se alcanza un máximo de actividad de 24.5 mU/gss a los dos días (Fig. 8.6), esta actividad de lacasa se mantiene hasta los ocho días para después disminuir. Por el contrario, en las partículas de 0.92 mm de diámetro y 1.68 mm, se obtuvo una menor actividad, con una tendencia estable por debajo de 3mU/ gss, que presenta un pico hacia los nueve días y que coincide con un incremento en la proteína soluble (Fig. 8.4). Se puede inferir que la proteína producida en partículas pequeñas es más rica en actividad lacasa al final, estos resultados muestran que la producción de proteína por *Pleurotus ostreatus* tiene perfiles distintos según el tamaño de las partículas.

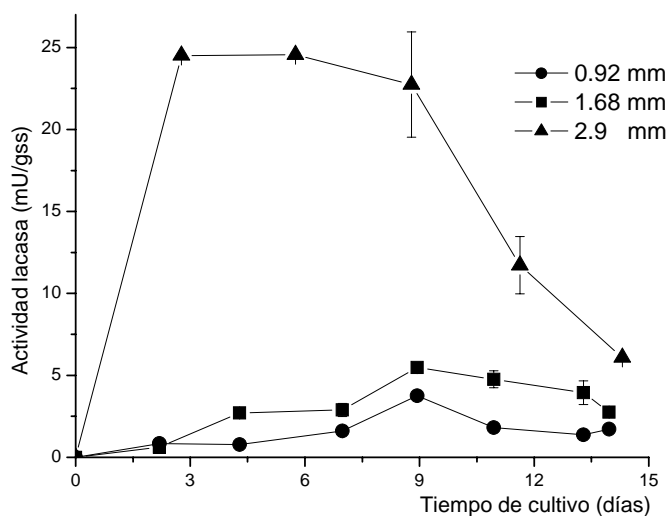


Figura 8.6. Actividad lacasa por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula

Los títulos de lacasa obtenidos en este estudio son hasta tres órdenes de magnitud menores a los obtenidos con otras cepas de *P. ostreatus* sobre diferentes sustratos, por ejemplo, Salmones y Mata (2002) determinaron 27 UI/gss sobre pulpa de café; Reddy y col. (2003) reportan 7.52 y 40.8 UI/gss para hojas de bananero y tallos, respectivamente. El bagazo de caña con alcohol, veratrílico y salvado permite alcanzar de 3.1 a 4.2 UI/gss de actividad lacasa antes de la formación de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* (Suguimoto y col., 2001). La comparación de diferentes estudios para la producción de enzimas lignocelulolíticas por hongos se presenta en la tabla 8.3, la primera sección son microorganismos distintos a *Pleurotus* y la segunda corresponde a estudios con *P. ostreatus*.

La producción de endocelulasas (Fig. 8.7) es más constante en el bagazo heterogéneo y se mantiene en un nivel inferior a 85 mU/gss todo el tiempo. Para los sustratos más homogéneos, la producción de endocelulasas es mayor al principio con variaciones importantes a lo largo del cultivo. En otros estudios con *Pleurotus ostreatus* se han reportado 1000 UI/gss sobre residuos de café Salmones y Mata (2002); otros autores reportan actividades de CMCasa más bajas, con valores de 0.16 y 0.56 UI/gss usando residuos de bananero y sagú, respectivamente (Reddy y col., 2003, Kumaran, 1997). Sin duda, otros hongos son mejores productores de este tipo de actividad sobre bagazo de caña: *Aspergillus niger* crecido sobre bagazo de caña adicionado con peptona y *Aspergillus terreus* sobre el mismo sustrato alcanzaron 10 y 2 UI/gss (Gawande y Kamat, 1999); así como *Thermoascus aurianticus* crecido sobre bagazo de caña y sales de amonio produjo 30 UI/gss (da Silva y col., 2005).

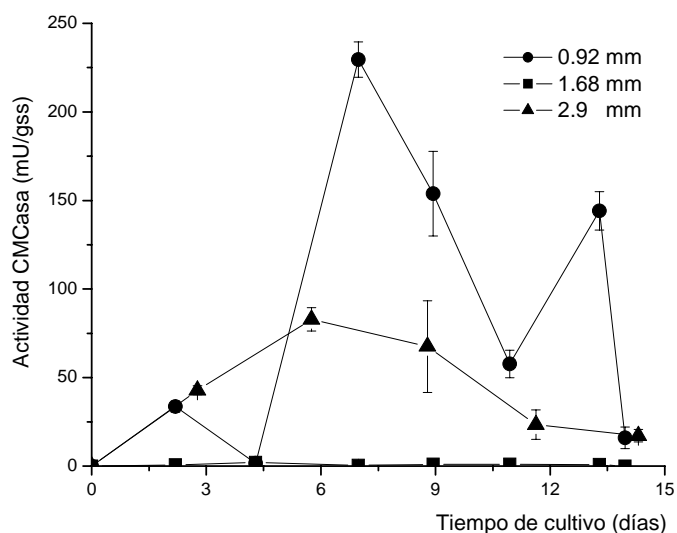


Figura 8.7. Actividad endocelulasa (CMCasa) por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula

Respecto a las exocelulasas, medidas como actividad en papel filtro (Fig. 8.8), la mayor producción de estas enzimas se presenta en partículas pequeñas durante los tres primeros días (130 y 25.7 mU/gss para partículas de 0.92 y 1.68 mm, respectivamente). Como se presenta en la tabla 8.3, estos resultados son hasta 40 veces menores a los títulos obtenidos con hojas de bananero y *Pleurotus ostreatus* (Reddy y col., 2003). En general, se puede afirmar que el bagazo de caña no es el mejor sustrato para producir PFasa, ni *P. ostreatus* el microorganismo más adecuado para su producción, aún con otros sustratos. El bagazo de caña funciona bien para la producción de PFasa cuando se mezcla con otros sustratos y se emplean co-cultivos de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* (Gutierrez-Correa y Tengerdy (1998); Massadeh y col. (2001)). Por otro lado, la actividad PFasa es mayor que CMCasa en partículas de 1.68 mm; no así para partículas pequeñas y heterogéneas, en las cuales se obtuvo mayor actividad de endocelulasas.

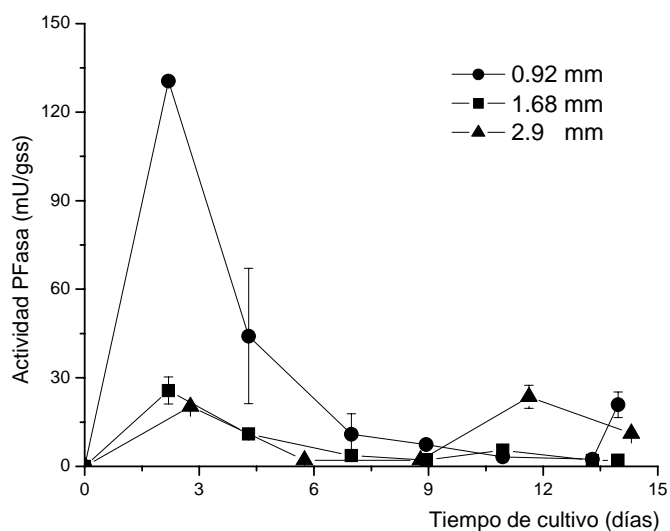


Figura 8.8. Producción de actividad exocelulasa (PFasa) por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula

Tabla 8.3. Actividades enzimáticas y crecimiento para cultivo de hongos por FMS

| Microorganismo | Sustrato | Actividad enzimática (U/gss) | | | | | *Yx/s | Referencia |
|---------------------------------|--|------------------------------|---------|--------|--------|-------|--------|------------------------------------|
| | | Xilanasa | Lacasa | CMCasa | FPasa | X/C** | | |
| <i>Aspergillus tamarii</i> | Bagazo de caña pretratado con hidróxido de sodio y sulfato de magnesio | 700 | | | | | | Ferreira y col., 1999 |
| <i>Aspergillus niger</i> | Bagazo de caña con peptona | 360 | | 10 | | 36 | | Gawande y Kamat, 1999 |
| <i>Aspergillus terreus</i> | | 70 | | 2.0 | | 35 | | |
| <i>Thermoascus aurianticus</i> | Bagazo de caña con nitrato y fosfato de amonio | 110 | | 30 | | 3.7 | | Da Silva y col. 2005 |
| <i>Trichoderma reesei</i> | Bagazo de caña y harina de soya | 2800 | | | 15.5 | 270 | | Gutierrez-Correa y Tengerdy (1998) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Bagazo de caña con sales y amonio | | | | 10 | | | Massadeh y col. (2001) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Vinazas | | | | | | 65-141 | Madrigal y col. (2002) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Masilla y bagazo tequilero | | | | | | 81 | Lara y col. (2002) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Residuos de hojas de bananero | 0.96 | 40.8 | < 0.16 | < 0.08 | 6 | - | Reddy y col. (2003) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Residuos de sagú | 2.02 | 3.54 | 0.56 | 0.06 | 3.6 | | Kumaran y col. (1997) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Bagazo de caña con alcohol, veratrílico y salvado | | 3.1-4.2 | | | | ~72 | Sugimoto y col. (2001) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> IE-8 | Bagazo de caña de azúcar | | | | | | | |
| | 0.92 mm | 17.3 | 0.0038 | 0.229 | 0.130 | 75.5 | 5.68 | Este estudio |
| | 1.68 mm | 10 | 0.0055 | 0.002 | 0.025 | 5000 | 5.52 | |
| | 0.25-5.5 mm | 20 | 0.0245 | 0.083 | 0.024 | 833 | 5.05 | |

* Rendimiento biomasa/sustrato (mg/ gss). ** Relación actividad xilanasa/actividad CMCasa

Prácticamente todos los hongos filamentosos producen de manera simultánea xilanasas y celulasas, por tal razón, es de utilidad evaluar la relación actividad xilanasa/actividad CMCasa (X/C) para diseñar procesos de FMS. En la figura 8.9 se presenta la evolución de esta relación para los tres tamaños de partícula presentados en este estudio.

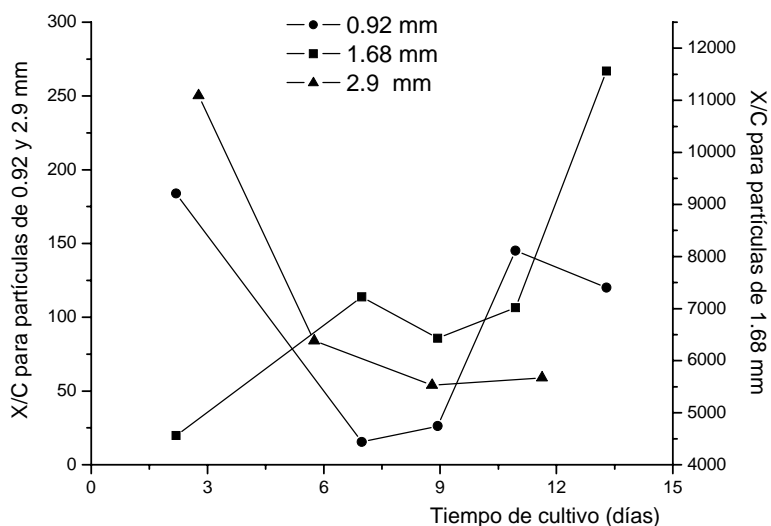


Figura 8.9. Patrones de actividad xilanasica/ actividad CMCasa por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar para tres tamaños de partícula

Se destaca la elevada selectividad en la actividad xilanasica para partículas medianas (L/D , 9) con valores que van desde alrededor de 4560 entre los días dos y tres, hasta aproximadamente 11560 al final del cultivo; en los distintos trabajos revisados para contrastar los resultados de esta investigación, ningún autor presenta valores tan altos, estos resultados pueden sugerir que el uso de sustratos con una relación L/D pequeña favorece la producción de actividad xilanolítica de manera sorprendente, o que quizá existe una relación geométrica umbral para la producción de xilanasicas. No obstante, la selectividad X/C para partículas pequeñas (0.92 mm, $L/D=12$) y grandes (2.9 mm diámetro promedio, $L/D=18$) se determinó con máximos cercanos a 184 y 250, respectivamente; en ambos casos la tendencia de esta relación es parecida: alta al inicio, baja y sube después del noveno día. En las partículas más grandes se presentó una selectividad 36% mayor que en las pequeñas. Los valores de X/C calculados para los dos tamaños estudiados son comparables con la selectividad reportada por Gutierrez-Correa y Tengerdy en 1998 (X/C , 270) en un co-cultivo de *Trichoderma reesei-Aspergillus niger*, y hasta uno y dos órdenes

de magnitud mayor que los valores calculados para los estudios de Gawande y Kamat (1999) con *Aspergillus niger* y *A. terreus* (36 y 35, respectivamente) y los calculados de los trabajos de da Silva (2005) con *Thermoascus* (X/C, 3.7)

Para concluir el análisis de resultados de este capítulo se realizaron tres gráficos (Fig. 8.10 a 8.12) para los diferentes tamaños de partícula, en los que se presenta por separado el cálculo relativo de la producción de proteína y crecimiento (a) así como las actividades enzimáticas relativas (b).

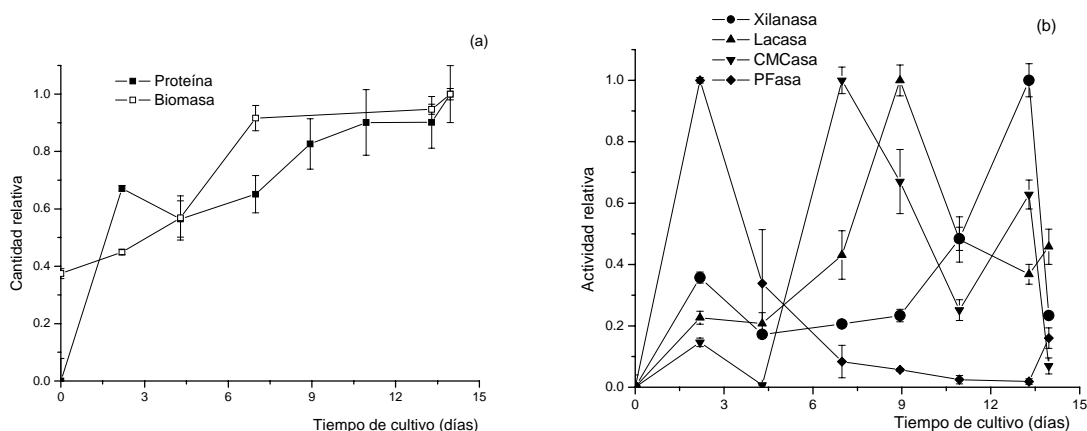


Figura 8.10. Patrones relativos de actividad enzimática, proteína y biomasa para *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar de 0.92 mm diámetro (L/D , 12). (a) Las cantidades equivalentes al 100% son 523 $\mu\text{g/gss}$ para proteína y 9.08 mg/gss para biomasa. (b) La actividad máxima de xilanasa es 17.3 UI/gss ; y las actividades de referencia en mU/gss son 3.76, 229.58 y 130.5 para lacasa, CMCasa y PFasa, respectivamente.

Respecto a la figura 8.10, a los tres días de cultivo se presenta la producción de los cuatro tipos enzimáticos estudiados, después la producción de xilanasa se mantiene estable entre 20 y 50% de actividad (3.46 y 8.65 UI/gss) y la PFasa abajo del 10% (menos de 13 mU/gss). Por otro lado, la actividad lacasa sigue las mismas subidas y caídas que la

actividad relativa CMCasa después de los tres días de cultivo. La producción de proteína es más baja durante el cultivo que la producción de biomasa.

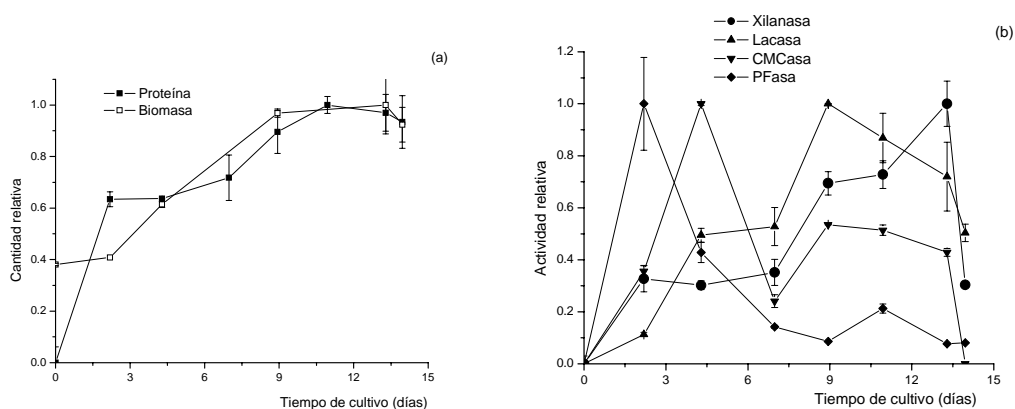


Figura 8.11. Patrones relativos de actividad enzimática, proteína y biomasa para *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar de 1.68 mm diámetro (L/D , 9). (a) Las cantidades equivalentes al 100% son 488.8 $\mu\text{g/gss}$ para proteína y 8.92 mg/gss para biomasa. (b) La actividad máxima de xilanasa es 9.99 UI/gss ; y las actividades de referencia en mU/gss son 5.48, 2.016 y 25.68 para lacasa, CMCasa y PFasa, respectivamente.

En la figura 8.11(a) puede observarse que los patrones de crecimiento y producción de proteína son similares para partículas medianas (1.68 mm). La sección (b) de esta figura permite observar una subida estable para xilanasa, siempre arriba de 30% (3 UI/gss) y una caída también estable para PFasa (menos de 10 mU/gss , correspondientes al 40% de actividad); mientras sube la actividad xilanolítica baja la actividad de exocelulasa. La actividad lacasa y de endocelulasa presenta patrones parecidos excepto en el día siete, y a partir del día nueve patrones de aumento y disminución de actividad relativa parecidos con una diferencia porcentual de 40, siendo las máximas para lacasa y las menores para endocelulasa.

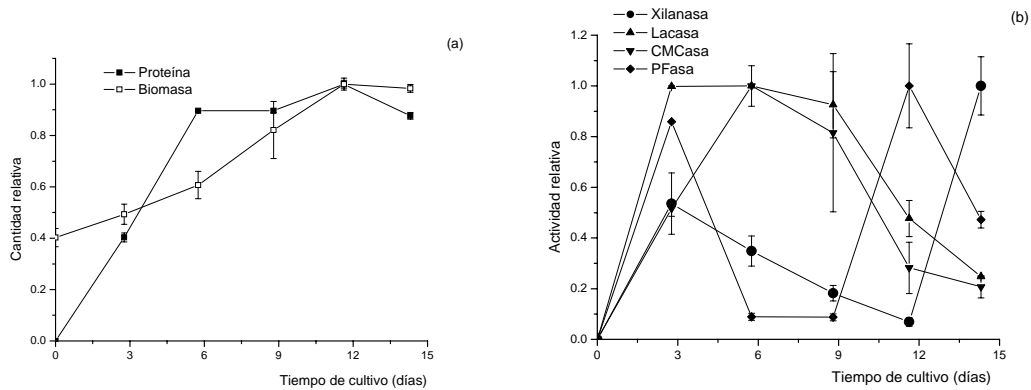


Figura 8.12. Patrones relativos de actividad enzimática, proteína y biomasa para *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de azúcar de 2.9 mm diámetro (L/D , 18). (a) Las cantidades equivalentes al 100% son 809 $\mu\text{g/gss}$ para proteína y 8.45 mg/gss para biomasa. (b) La actividad máxima de xilanasa es 19.98 UI/gss ; y las actividades de referencia en mU/gss son 24.56, 82.86 y 23.57 para lacasa, CMCasa y PFasa, respectivamente.

La producción de proteína y biomasa presentan pendientes distintas a lo largo del cultivo para partículas de 2.9 mm (Fig. 8.12 (a)), sin embargo en el día doce alcanzan sus determinaciones máximas. De nueva cuenta, la tendencia relativa en la producción de xilanasas es opuesta a la tendencia en la actividad de exocelulasa (Fig. 8.12 (b)) y los patrones de comportamiento de lacasa y endocelulasa son similares.

El análisis de estas tres figuras sugiere que en función de como se presenten los sustratos, es decir su disponibilidad, es posible que actúen de manera conjunta lacasa y endocelulasas, así como la actividad xilanolítica predomina cuando la actividad de exocelulasas es disminuida; así pues la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* degrada selectivamente hemicelulosa o celulosa. También se nota un máximo en la producción de proteína que coincide con las actividades relativas más elevadas de PFasa y lacasa.

Lo anterior indica que la degradación del sustrato se da en etapas en función del material que queda expuesto; al principio, se presenta la degradación de lignina (pared secundaria del material) un poco antes que la de celulosa por efecto de la CMCasa principalmente,

seguida de la acción de las xilanasas que actúan sobre la hemicelulosa. Por otro lado, no se descarta que las enzimas que presentan actividad en los diferentes tiempos correspondan a diferentes isoformas. En este sentido, la tipificación del sustrato tiene un efecto importante en la síntesis de isoenzimas específicas de las diferentes enzimas lignocelulolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus*. Por tal razón, en el capítulo siguiente se describen los resultados de degradación de cada componente del material, caracterización de sustrato, pruebas de estabilidad enzimática y estudio zimográfico para los tres tamaños de partícula.

9

RESULTADOS:
Disponibilidad y expresión

Los resultados de los capítulos anteriores indican que la degradación del material celular se da en etapas en función de los componentes que quedan expuestos, como resultado de tendencias cíclicas en los patrones de actividad de distintas enzimas lignocelulolíticas. Aparentemente, conforme se modifican las condiciones del medio se expresan distintas isoenzimas a lo largo de la cinética, para aceptar o rechazar esta hipótesis, en este capítulo de resultados, se presentan los análisis químicos y microscópicos de las fibras de bagazo, la estabilidad y un estudio zimográfico de los extractos crudos de lacasa para el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña con diferente tipificación obtenidos en una serie de experimentos independientes. La comparación de estas variables corresponde a un mismo tiempo de fermentación (12 días), que es, de acuerdo al estudio cinético, un tiempo en que se expresan los tipos enzimáticos de nuestro interés.

9.1 Composición de las fibras de sustrato, crecimiento y producción de enzimas

Con el fin de encontrar relaciones entre la producción de actividad enzimática y las características del sustrato, se realizaron balances de materia para cada uno de los componentes del bagazo de caña. Se consideró la cantidad de material fermentado en base seca, su contenido de FDN y la fracción de cada uno de los materiales presentados en la figura 9.1. Las tasas de consumo de cada uno de los componentes del sustrato se presentan en la tabla 9.1. Tomando en cuenta que al inicio del cultivo el sustrato contenía 90,51% de FDN en un gramo de sustrato seco, es posible calcular los porcentajes de degradación del sustrato en 33.37, 41.77 y 36.25 para partículas de 0.92, 1.68 y 2.9 mm

de diámetro, respectivamente; aparentemente, al hongo le resulta más rápido descomponer partículas cortas ($L/D=9$).

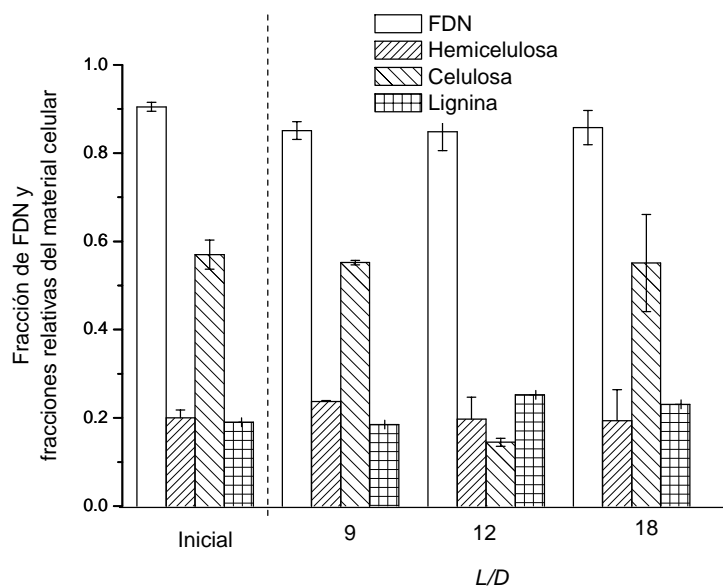


Figura 9.1. Composición del material celular para la degradación de bagazo de caña por la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* en partículas de características diferentes después de doce días de cultivo. A la izquierda de la línea punteada se encuentran el contenido de material vegetal (FDN) y su composición antes de ser fermentado. A la derecha, se presenta el contenido de FDN del material fermentado y las proporciones de hemicelulosa, celulosa y lignina en cada fracción de FDN.

Tabla 9.1. Caracterización del sustrato y su efecto en el crecimiento, enriquecimiento proteico y degradación del bagazo de caña para la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* después de 12 días de cultivo

| Diámetro (mm) | L/D | Peso seco del material fermentado (g) | Biomasa (mg BM/gss) | Proteína soluble ($\mu\text{g/gss}$) | Material vegetal consumido, % | | |
|---------------|-------|---------------------------------------|---------------------|--|-------------------------------|-------|-------|
| | | | | | HC | C | L |
| 0.92 | 12 | 0.603 | 5.34 \pm 0.32 | 432.0 \pm 47 | 34.38 | 83.05 | 11.46 |
| 1.68 | 9 | 0.527 | 4.93 \pm 0.43 | 399.7 \pm 19.7 | 30.94 | 43.66 | 43.35 |
| 2.9 | 18 | 0.577 | 5.45 \pm 0.91 | 443.2 \pm 10.7 | 38.17 | 38.38 | 22.50 |

HC= hemicelulosa, C= celulosa, L =lignina

En el concentrado de las características del sustrato y su efecto en la producción de proteína y biomasa presentado en la tabla 9.1 no se observan diferencias significativas sobre la producción de biomasa y proteína utilizando diferentes tamaños de partícula, lo que es notable es la diferencia entre el tipo de enzimas que se inducen en función de la exposición de los diferentes materiales que constituyen las paredes celulares el bagazo de caña.

El efecto de las características del sustrato en los perfiles enzimáticos obtenidos después de doce días de fermentación se presenta en la Fig. 9.2; la máxima actividad de xilanasas en las partículas pequeñas (7.71 UI/gss) coincide con la mínima actividad de PFasa, tal como se presentó al final del capítulo anterior; sin embargo, en las partículas heterogéneas con diámetro promedio de 2.9 mm se determinó la mayor degradación de hemicelulosa (38%). Parece que las partículas alargadas favorecen la producción de xilanasas. Respecto a la actividad celulolítica, tanto para endocelulasas como exocelulasas, la menor producción corresponde a las partículas de diámetro pequeño (L/D de 12), no obstante éstas presentaron la mayor degradación de celulosa calculada en 83% como se presenta en la tabla 9.1. Para los doce días de cultivo, ya se habrían alcanzado los máximos de actividad de CMCasa y PFasa con anterioridad, esto puede explicar la baja actividad celulolítica. Por otro lado, la lignina se degradó en mayor medida (43%) en partículas de geometría corta (L/D , 9) seguida de las partículas heterogéneas (22.5%) en las que se alcanzó el título más alto de 7.03 mU/gss de actividad lacasa en los doce días de cultivo, en el capítulo anterior, los títulos de lacasa estuvieron invertidos, esto puede explicarse por la heterogeneidad del sustrato con diámetro promedio de 2.9 mm.

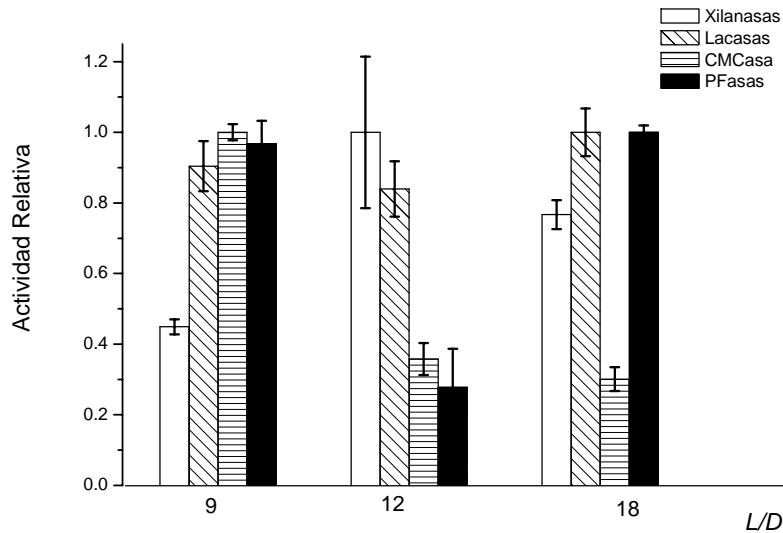


Figura 9.2. Perfiles enzimáticos obtenidos para la cepa IE-8 en partículas de diferente tipificación. Las actividades de referencia son de 7.71 UI/gss para xilanasas; 7.03, 32.76 y 17.2 mU/gss para lacasas, CMCasa y PFasa, respectivamente.

9.2 Estudio de la disponibilidad del material vegetal

Como se indicó en el apartado de antecedentes, es difícil determinar la naturaleza de las fibras de bagazo de caña con base en las estructuras de los polisacáridos que las constituyen, los estudios microscópicos ayudan a comprender mejor las propiedades mecánicas y biodegradabilidad de estos materiales como resultado de sus dimensiones y morfología (Gañán y col., 2008; Pinto y col., 2008). En este trabajo el bagazo de caña se tiñó con azul de toluidina y se analizó por microscopía óptica, también se estudió por microscopía de fuerza atómica para estimar la composición de la superficie transversal de

las fibras de bagazo de caña de tipificación diferente, con el fin de evaluar la disponibilidad de los distintos materiales (lignina, hemicelulosa y celulosa) para el ataque de las enzimas de *Pleurotus ostreatus* y contar con más herramientas para interpretar los cambios en los patrones de actividad enzimática que se han presentado en los capítulos anteriores.

En la figura 9.3 se presenta el tipo de imágenes que se obtienen con la tinción de azul de toluidina. Se nota con claridad que la presencia de biomasa cambia la estructura del material. Las mediciones de la fracción superficial correspondientes a cada material se concentran en la tabla 9.2 y son el resultado del análisis de 10 muestras de fibra para cada tamaño de material estudiado. Por otro lado, en la figura 9.4 se presentan imágenes del bagazo de caña analizado mediante microscopía de fuerza atómica de contacto intermitente o semicontacto y en la figura 9.5, las imágenes de microscopía de fuerza atómica de contacto. Las muestras se analizaron por duplicado en el estudio microscópico y el resultado superficial se obtuvo de hacer un análisis de imágenes por triplicado (sensibilidad baja, media y alta en el analizador Image Pro Plus® para Windows) para cada duplicado. Las fracciones superficiales calculadas también se concentran en la tabla 9.2.

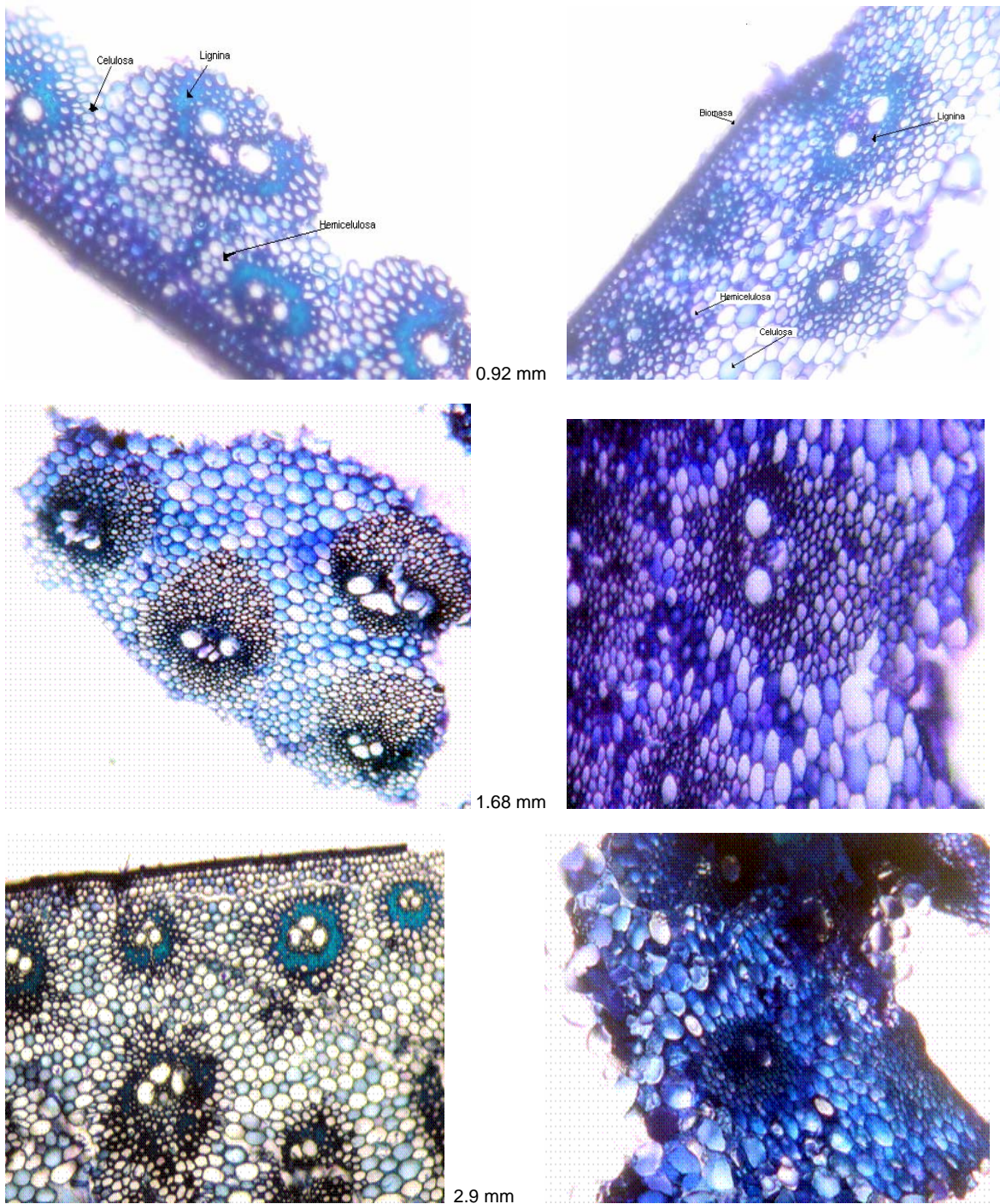


Figura 9.3. Tinción con azul de toluidina para estimar la disponibilidad del material vegetal. Turquesa: lignina, azul claro: celulosa, rosa-violeta: hemicelulosa, gris: biomasa. Las imágenes del lado izquierdo corresponden al bagazo sin fermentar y las del lado derecho al bagazo después de 12 días de FMS.

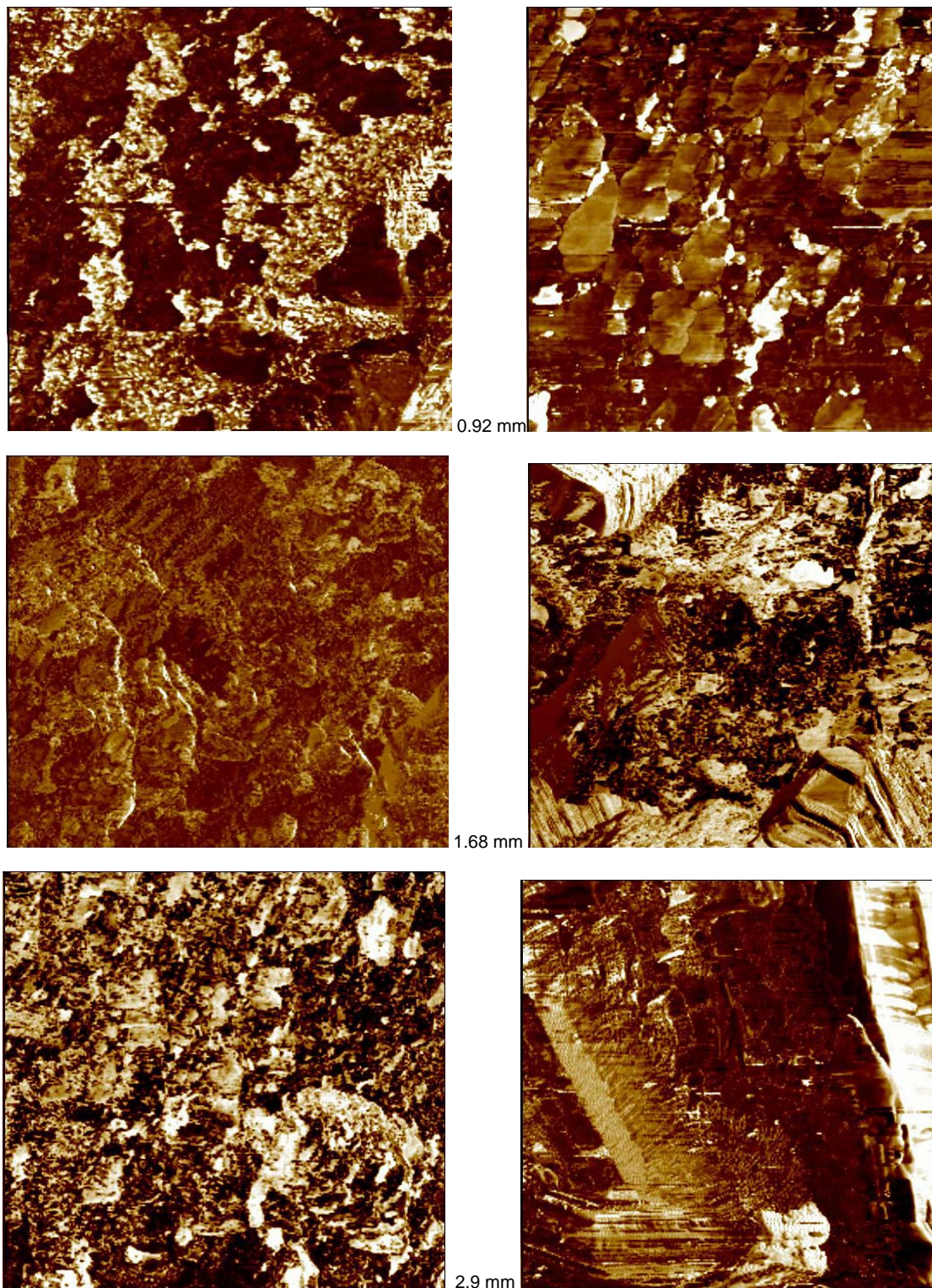


Figura 9.4. Microscopía de fuerza atómica modo de contacto intermitente del material vegetal. Las zonas más claras corresponden a lignina, que es el material más duro, las más oscuras a celulosa y las intermedias a hemicelulosa. Las imágenes del lado izquierdo corresponden al bagazo sin fermentar y las del lado derecho al bagazo después de 12 días de FMS.

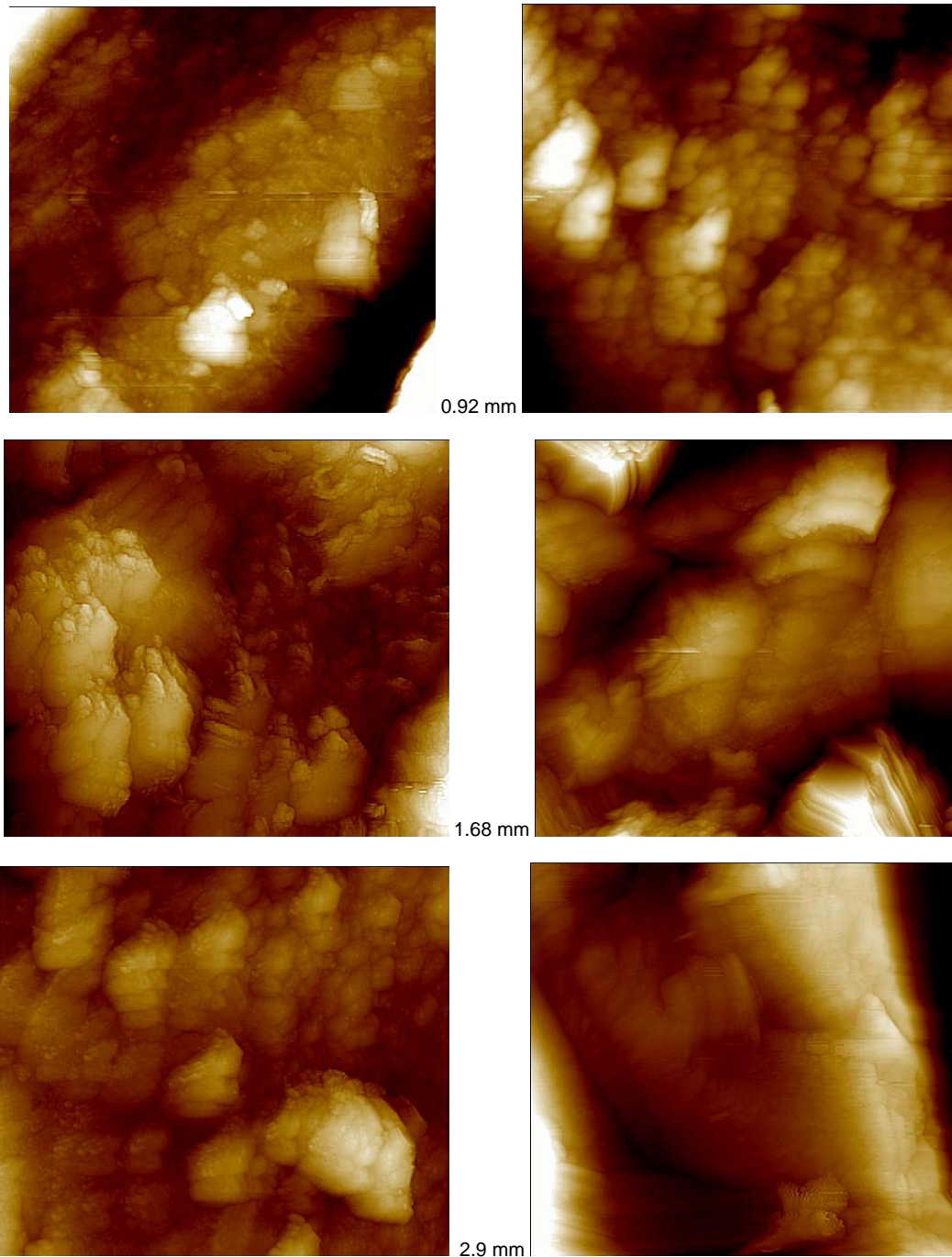


Figura 9.5. Microscopía de fuerza atómica de contacto del material vegetal. Las zonas más claras corresponden a lignina, que es el material más duro, las más oscuras a celulosa y las intermedias a hemicelulosa. Las imágenes del lado izquierdo corresponden al bagazo sin fermentar y las del lado derecho al bagazo después de 12 días de FMS.

Destaca que sólo para las partículas pequeñas (0.92 mm, L/D 12) disminuyó la superficie disponible de lignina, aumentó la superficie de hemicelulosa y disminuyó la disponibilidad de celulosa por las tres técnicas comparadas, además que se alcanzó un 83% de degradación de celulosa. Esto puede explicarse si consideramos las mediciones obtenidas por microscopía de fuerzas (cuarta y sexta columnas de la tabla 9.2); en estas partículas existe mayor superficie de celulosa en el sustrato sin fermentar, casi 22% (dos órdenes de magnitud mayor que la superficie expuesta en las partículas grandes de acuerdo a la microscopía de contacto). Esta diferencia notable en la superficie del sustrato ocupada por celulosa facilita que al principio se consuma este componente y quede libre la superficie expuesta de hemicelulosa. En general, del análisis de nuestros resultados, proponemos los cambios en la composición superficial del sustrato como sigue: primero se consume celulosa, queda libre la lignina, ésta se comienza a degradar y deja disponible hemicelulosa, después otra vez la celulosa. El hongo requiere de la degradación por etapas de los constituyentes del bagazo, lo que permite explicar que durante las cinéticas de hidrólisis realizadas se hayan presentado altibajos en la medición de las actividades enzimáticas. La degradación en etapas que encontramos se puede comparar con los estudios de Nandakumar y col.(1994), quienes estudiaron el cambio del tamaño de partículas de salvado de trigo por el crecimiento de *Aspergillus niger*, ellos proponen una liberación secuencial de enzimas extracelulares como respuesta al tamaño de las partículas únicamente que se refleja en la facilidad con que las enzimas del microorganismo llegan a su sustrato en el siguiente orden: α -amilasa y glucoamilasa, seguido de la producción de xilanasas y CMCasa.

Tabla 9.2. Fracciones superficiales del material vegetal obtenidas por análisis de las imágenes microscópicas de la estructura del sustrato

| 0.92 mm | | | | | | |
|----------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | Azul de toluidina | | MFA-contacto intermitente | | MFA-contacto | |
| | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> |
| L | 42.83 ± 3.74 | 42.37 ± 0.59 | 14.55 ± 4.06 | 14.02 ± 4.36 | 44.48 ± 3.42 | 40.84 ± 3.69 |
| HC | 31.99 ± 10.68 | 35.83 ± 4.18 | 52.16 ± 11.53 | 68.95 ± 7.78 | 33.58 ± 6.84 | 57.07 ± 2.93 |
| C | 25.18 ± 10.31 | 21.79 ± 3.58 | 33.28 ± 12.1 | 17.03 ± 2.36 | 21.94 ± 6.55 | 2.09 ± 0.63 |
| 1.68 mm | | | | | | |
| | Azul de toluidina | | MFA-contacto intermitente | | MFA-contacto | |
| | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> |
| L | 31.98 ± 5.49 | 55.68 ± 11.1 | 14.51 ± 5.43 | 27.31 ± 4.28 | 31.00 ± 4.41 | 71.81 ± 4.64 |
| HC | 35.83 ± 9.3 | 23.45 ± 5.25 | 64.15 ± 8.07 | 37.81 ± 5.96 | 68.38 ± 9.38 | 27.12 ± 4.78 |
| C | 32.19 ± 10 | 20.87 ± 4.5 | 21.34 ± 7.11 | 34.88 ± 2.61 | 0.82 ± 0.2 | 1.07 ± 0.24 |
| 2.9 mm | | | | | | |
| | Azul de toluidina | | MFA-contacto intermitente | | MFA-contacto | |
| | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> | <i>t₀</i> | <i>t₁₂</i> |
| L | 42.24 ± 4.3 | 54.42 ± 9.23 | 30.87 ± 4.41 | 35.00 ± 2.35 | 19.10 ± 3.19 | 34.26 ± 6.69 |
| HC | 29.77 ± 6 | 17.56 ± 4 | 41.12 ± 7.64 | 33.43 ± 6.03 | 80.70 ± 4.19 | 65.47 ± 3.94 |
| C | 27.99 ± 5.7 | 28.02 ± 3.6 | 28.01 ± 10.21 | 31.56 ± 5.24 | 0.20 ± 0.03 | 0.27 ± 0.019 |

L= lignina, HC= hemicelulosa, C= celulosa. Bagazo sin fermentar: *t₀*, bagazo fermentado después de 12 días de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*: *t₁₂*

Con los valores presentados en la tabla 9.2 es posible hacer el cálculo de los cambios en la fracción superficial de cada uno de los componentes estructurales del bagazo de caña. Estos resultados se presentan en la tabla 9.3, en esta tabla, también aparece el porcentaje de material consumido (última columna) que se calculó a partir de los análisis químico-nutritivos del bagazo de caña de azúcar. El análisis se efectuó para cada tipo de partícula. Respecto a las partículas pequeñas, los cambios en los tres materiales coinciden con las tres técnicas, bajan la lignina y celulosa disponibles y aumenta la

disponibilidad de hemicelulosa. Los porcentajes de variación en la disponibilidad son más altos para la microscopía intermitente, en el caso de disminución de superficie de lignina el cambio es 8 veces mayor, para hemicelulosa la diferencia va de 12% con azul de toluidina a casi 70% con microscopía de fuerzas de contacto y para celulosa la disminución de la superficie es de alrededor de 13.5% por la técnica de azul de toluidina y de 90.5% por microscopía de contacto.

Tabla 9.3. Cambio en la fracción superficial de los componentes estructurales del sustrato obtenidos del análisis de las imágenes microscópicas

| 0.92 mm | | | | |
|----------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | Azul de toluidina, (%) | MFA-semi- contacto (%) | MFA-contacto, (%) | Material consumido, % |
| L | (-) 1 | (-) 3.64 | (-) 8.16 | 11.46 |
| HC | (+) 12 | (+) 32.19 | (+) 69.95 | 34.38 |
| C | (-) 13.46 | (-) 48.83 | (-) 90.5 | 83.05 |
| 1.68 mm | | | | |
| | Azul de toluidina, (%) | MFA-semi- contacto, (%) | MFA-contacto, (%) | Material consumido, % |
| L | (+) 74.1 | (+) 88.2 | (+) 132 | 43.35 |
| HC | (-) 34.55 | (-) 41.06 | (-) 60.33 | 30.94 |
| C | (-) 35.17 | (+) 63.44 | (+) 30.5 | 43.66 |
| 2.9 mm | | | | |
| | Azul de toluidina, (%) | MFA-semi- contacto, (%) | MFA-contacto (%) | Material consumido, % |
| L | (+) 28.8 | (+) 13.4 | (+) 79.4 | 22.5 |
| HC | (-) 41 | (-) 18.7 | (-) 18.9 | 38.17 |
| C | (+) 0.11 | (+) 12.7 | (+) 35 | 38.38 |

L= lignina, HC= hemicelulosa, C= celulosa.

Las partículas de tamaño intermedio, las de degradación mayor, presentan el mayor consumo de lignina, como se presentó en el capítulo anterior. La disponibilidad de lignina aumentó por las tres técnicas y disminuyó la disponibilidad de hemicelulosa; en este caso único no existió correspondencia para la superficie disponible de celulosa entre las técnicas de microscopía de fuerzas con las mediciones realizadas para la tinción de azul de toluidina. Una actividad de lacasa alrededor de 63 mU/gss (90% del máximo presentado en la figura 9.2) es consistente con un incremento en la superficie de lignina, así como alrededor de 3.5 UI/gss de xilanasa corresponden a una baja en la superficie de hemicelulosa.

Las partículas heterogéneas de diámetro promedio 2.9 mm presentan correspondencia entre las tres técnicas microscópicas. El aumento en las superficies disponibles de celulosa y lignina es consistente con los máximos de actividad lacasa y PFasa. En estas partículas se consiguió la máxima tasa de degradación de hemicelulosa (38.17%), una baja actividad de xilanasa concuerda con poca disponibilidad de este material en el momento que se detuvo el cultivo.

Los estudios de Chiparus y Chen (2003) con fibras textiles obtenidas de bagazo de caña libre de lignina mediante microscopía electrónica de barrido les permitieron obtener un modelo lineal que relaciona la fineza de las fibras con el área de la sección transversal de éstas, ellos establecen un modelo con una correlación superior al 95% de confianza después de analizar las imágenes de 24 muestras. Por otro lado, Nandakumar y col. (1994) proponen un modelo para la reducción del tamaño de partícula polinomial basado en la longitud inicial de partículas de salvado de trigo y la fracción correspondiente al tiempo de fermentación en estado sólido, estos autores comparan su modelo con las mediciones obtenidas para cinco tamaños de partícula. Con los resultados presentados en este trabajo, se procedió a establecer una correlación entre la tasa de degradación y la

superficie disponible inicial (y_0) para cada material. Se presentan ajustes de primero y segundo orden; el valor de los coeficientes de correlación puede ser engañoso porque únicamente se analizaron tres tamaños de partícula; esto sugiere que sería conveniente intentar encontrar un modelo que relacione la degradación del sustrato con la superficie inicial disponible para cada material determinada por métodos microscópicos, la relación L/D y alguna de las caracterizaciones del sustrato: fracción de espacios vacíos (ε), esfericidad (ϕ_s) y superficie específica (a).

Lignina

| | | |
|---|---------------|-------------------|
| % degradación = $-2.5362 y_0 + 124.73$ | $R^2 = 0.913$ | Azul de toluidina |
| % degradación = $48.773*(y_0)^2 - 2214.6*(y_0) + 21908$ | $R^2 = 1$ | MFA-intermitente |
| % degradación = $-0.1622*(y_0)^2 + 9.8807*(y_0) - 107.03$ | $R^2 = 1$ | MFA-contacto |

Hemicelulosa

| | | |
|--|----------------|-------------------|
| % degradación = $-1.1603 y_0 + 72.241$ | $R^2 = 0.9676$ | Azul de toluidina |
| % degradación = $0.1339*(y_0)^2 - 9.9763*(y_0) + 216.5$ | $R^2 = 1$ | Azul de toluidina |
| % degradación = $-0.3136 y_0 + 50.9561$ | $R^2 = 0.9973$ | MFA-intermitente |
| % degradación = $0.0024*(y_0)^2 - 15.17*(y_0) + 57.538$ | $R^2 = 1$ | MFA-intermitente |
| % degradación = $0.0146*(y_0)^2 - 1.5826*(y_0) + 71.114$ | $R^2 = 1$ | MFA-contacto |

Celulosa

$$\% \text{ degradación} = 2.4471*(y_0)^2 - 146.01*(y_0) + 2208 \quad R^2=1 \quad \text{Azul de toluidina}$$

$$\% \text{ degradación} = -0.3183*(y_0)^2 + 33.741*(y_0) + 33.741 \quad R^2=1 \quad \text{MFA-intermitente}$$

$$\% \text{ degradación} = -0.9882*(y_0) + 115.2 \quad R^2=0.9787 \quad \text{MFA-contacto}$$

9.3 Estabilidad de los extractos enzimáticos a diferentes pH

Las mediciones de la actividad enzimática residual se realizaron para los tres tamaños de partícula probando dos pH (6 y 7). A los resultados obtenidos se les realizó un tratamiento matemático para encontrar el modelo cinético que represente mejor la inactivación, el ajuste matemático se probó con las ecuaciones integradas (ecuaciones 6.7, 6.9 y 6.11). En la figura 9.6 se presentan los valores experimentales y el ajuste empleando el mejor modelo de inactivación para la actividad xilanasa. En las figuras 9.7 y 9.8 se presentan los valores experimentales y ajustes cinéticos para la inactivación de lacasas y endocelulasas, respectivamente. Los resultados para los tres tipos de inactivación están en el apéndice G.

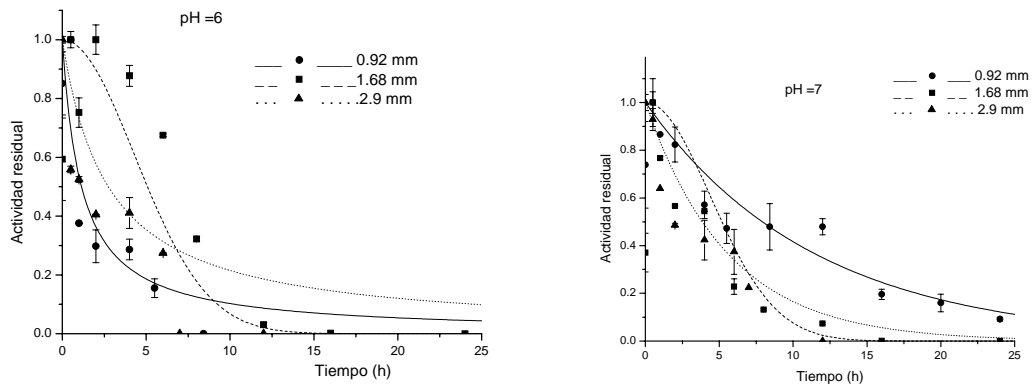


Figura 9.6. Cinética de inactivación de xilanasas de *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tipificación distinta.

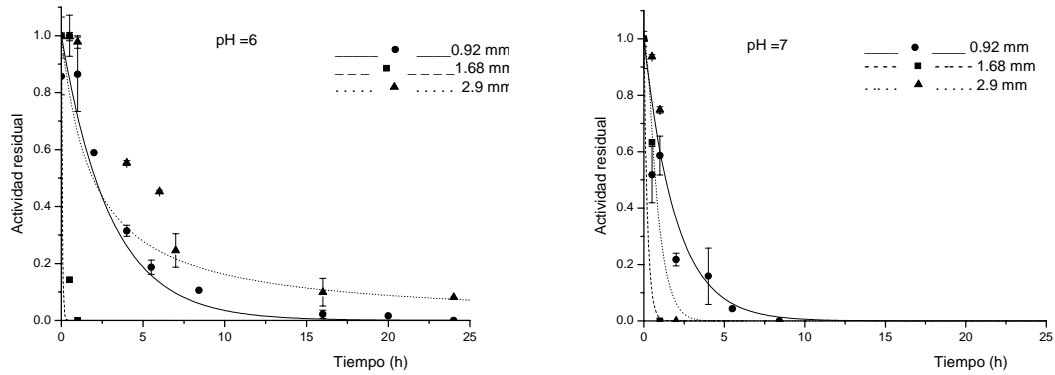


Figura 9.7. Cinética de inactivación de lacasas de *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tipificación distinta.

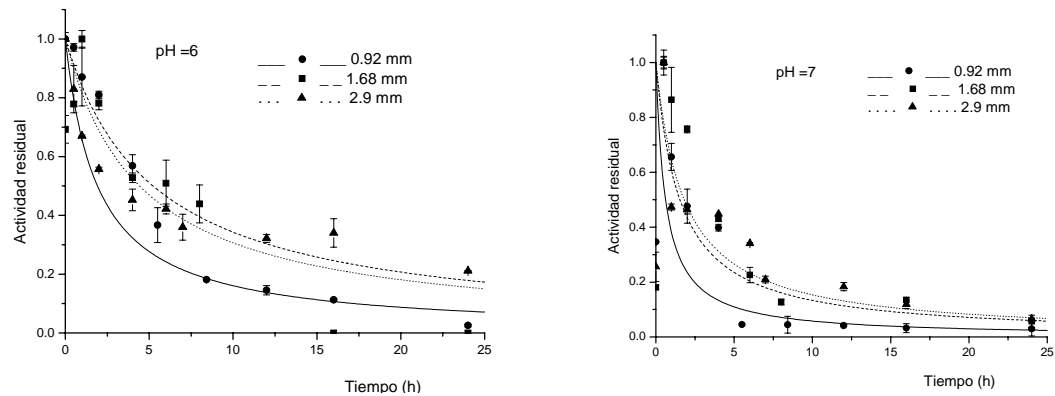


Figura 9.8. Cinética de inactivación de CMCasa de *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) sobre bagazo de caña de tipificación distinta

Recordamos las expresiones cinéticas propuestas: Primer orden (Ec. 6.6): $-\frac{dA}{dt} = kA$,

segundo orden (Ec. 6.8): $-\frac{dA}{dt} = kA^2$ y segundo orden dependiente de actividad residual

y del tiempo Ec (6.10): $-\frac{dA}{dt} = kAt$. En la Tabla 9.4 se presenta el resultado de los

ajustes seleccionados entre los modelos probados, indicando la ecuación cinética que mejor representa la inactivación, el tiempo de vida media de cada enzima calculado a partir del modelo seleccionado y los coeficientes de correlación. Se marcan en negritas los tiempos de vida media que son sensiblemente distintos. Estos resultados sugieren que los distintos tamaños de partícula inducen diferentes cantidades de actividad enzimática, que a su vez pueden ser el resultado de isoformas específicas.

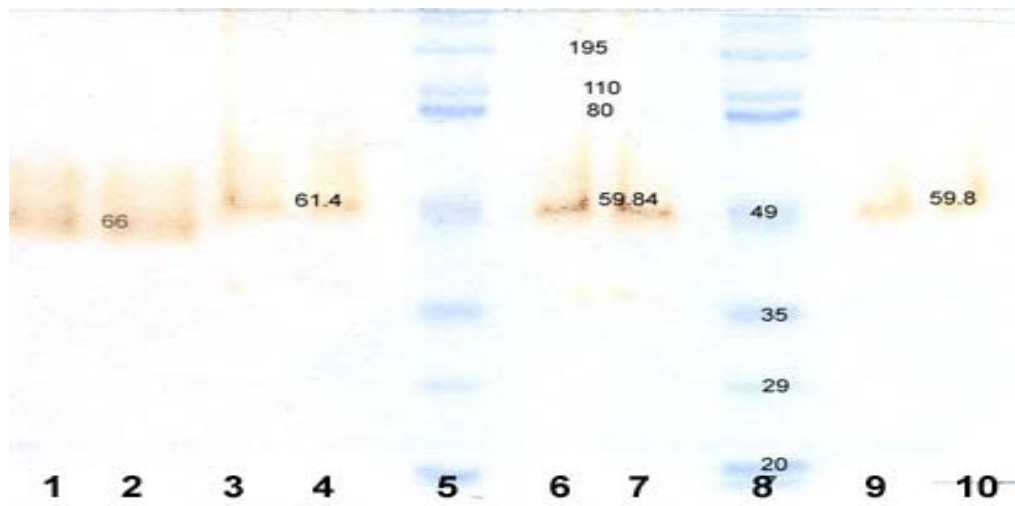
Tabla 9.4. Constantes cinéticas de inactivación para las enzimas lignocelulolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus* (cepa IE-8) en bagazo de caña de distinta tipificación.

| Diámetro de partícula (mm) | Ecuación cinética | K | $t_{1/2}$ (h) | R^2 | Ecuación cinética | K | $t_{1/2}$ (h) | R^2 |
|----------------------------|-------------------|---|---------------|--------|-------------------|--|---------------|--------|
| Lacasas pH 6 | | | | | pH 7 | | | |
| 0.92 | 6.6 | 0.3351 h ⁻¹ | 2.07 | 0.9992 | 6.6 | 0.508 h ⁻¹ | 1.36 | 0.9408 |
| 1.68 | 6.6 | 3.8918 h ⁻¹ | 0.17 | 1 | 6.6 | 0.9161 h ⁻¹ | 0.76 | 1 |
| 2.9 | 6.8 | 0.5182 h ⁻¹ A ⁻¹ | 1.93 | 0.9653 | 6.10 | 0.2927 h ⁻² | 1.54 | 0.9994 |
| Celulasas pH 6 | | | | | pH 7 | | | |
| 0.92 | 6.8 | 0.5221 h ⁻¹ A ⁻¹ | 1.92 | 0.8916 | 6.6 | 0.0876 h ⁻¹ | 7.91 | 0.9220 |
| 1.68 | 6.8 | 0.1914 h ⁻¹ A ⁻¹ | 5.22 | 0.9196 | 6.8 | 0.6505 h ⁻¹ A ⁻¹ | 1.53 | 0.9104 |
| 2.9 | 6.8 | 0.2261 h ⁻¹ A ⁻¹ | 4.42 | 0.9231 | 6.8 | 0.5222 h ⁻¹ A ⁻¹ | 1.91 | 0.9479 |
| Xilanasas pH 6 | | | | | pH 7 | | | |
| 0.92 | 6.8 | 0.8736 h ⁻¹ A ⁻¹ | 1.14 | 0.8916 | 6.6 | 0.0876 h ⁻¹ | 7.91 | 0.9220 |
| 1.68 | 6.10 | 0.0269 h ⁻² | 5.08 | 0.9906 | 6.10 | 0.0258 h ⁻² | 5.18 | 0.9500 |
| 2.9 | 6.8 | 0.36471 h ⁻¹ A ⁻¹ | 2.74 | 0.8793 | 6.6 | 0.1799 h ⁻¹ | 3.85 | 0.8964 |

Los tiempos de vida media calculados para lacasas están alrededor de dos horas a pH de 6 para las partículas alargadas (0.92 y 2.9 mm), respecto a las partículas de aspecto más corto (1.68 mm, L/D 9) el tiempo de vida media es de 10 minutos, esta diferencia puede sugerir formas enzimáticas diferentes, que se pueden relacionar con el hecho de que las partículas de esta tipificación se degradaron de manera más eficiente y son las que

presentaron un mayor consumo de lignina. Otros autores han encontrado valores distintos a los reportados aquí, por ejemplo, para lacasas de *Trametes gallica* se conserva la actividad en un 90% después de 24 horas de incubación a pH de 6 y 60° C (Dong y col., 2004); a pH de 7, lacasas purificadas de otras cepas de *Pleurotus ostreatus* tienen un tiempo de vida media de 16 horas y 7 días a 40 ° C (Palmieri y col., 2003), las lacasas de la cepa que hemos estudiado pierden la mitad de su actividad a pH 7 en menos de dos horas. Se realizó un estudio zimográfico para verificar si con partículas de 1.68 mm (en las que hubo mayor disminución del contenido celular y menor crecimiento) se producían isoenzimas distintas con actividad lacasa. En la figura 89 se presenta el zimograma utilizando dos sustratos para revelar. Con ambos sustratos el peso molecular promedio de estas enzimas está alrededor de 60 kDa y para el extracto de 1.68 mm se aprecia una leve mancha de actividad, principalmente con ABTS de aproximadamente 38 kDa. Estos resultados son similares a otros reportados para distintos basidiomicetos; por ejemplo Hublik y Schinner (2000) encontraron una lacasa de 67 ± 2 kDa; Palmieri y col. (2003) una de 67 kDa y una subunidad de entre 16 y 18 kDa; Tinoco y col. (2001) con la misma cepa IE-8 hallaron una lacasa entre 43 y 68 kDa; Jordaan y col (2003) una lacasa de 62 kDa y otra menor de 38 kDa para el basidiomiceto UD4; la lacasa de *Phanerochaete chrysosporium* tiene un peso molecular de 62 kDa (Gnanamani y col, 2006); Téllez-Téllez y col. (2005) encuentran dos subunidades a las que no les estiman peso molecular pero que sin duda, en los zimogramas presentan una posición semejante a los otros autores. Puede apreciarse que prácticamente no hay diferencia entre los pesos moleculares de las enzimas producidas, así que la diferencia entre los tiempos de vida media podría ser el resultado de la presencia de otros agentes desnaturizantes como sales, quelantes e incluso proteínas.

A



B

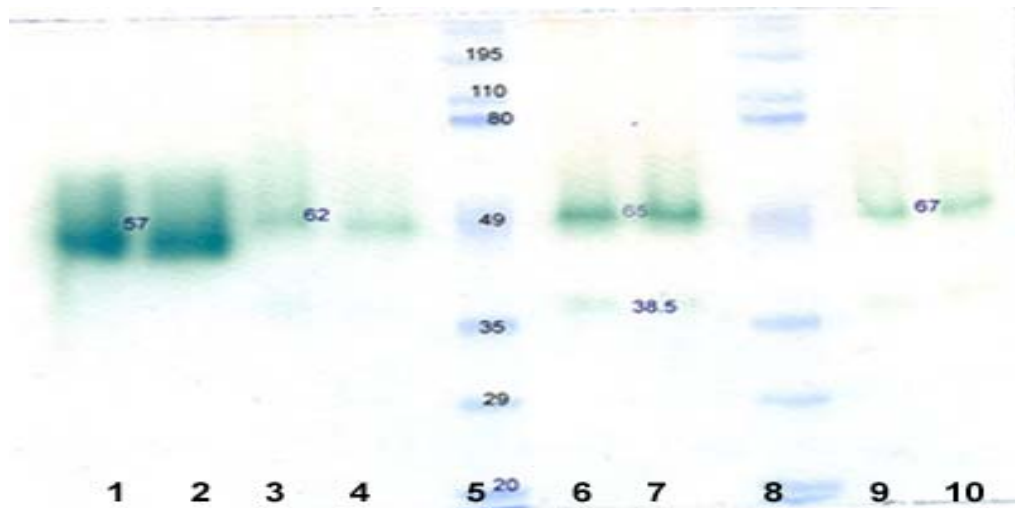


Figura 9 9. Geles de poliacrilamida con actividad lacasa. Se usó la técnica SDS-PAGE con gel al 12%. El número de carril se indica en la línea inferior de cada imagen del 1 al 10. De izquierda a derecha, carriles 1 y 2, control positivo de actividad (extracto de *Trametes sp.* EUM1), 3 y 4 (ECE de 0.92 mm), 5 y 8 (marcadores de peso molecular), 6 y 7 (ECE de 1.68 mm), 8 y 10 (ECE de 2.9 mm). A) Revelado con dimetoxifenol. B) Revelado con ABTS

Respecto a las celulasas, a pH 6 los tiempos de vida media calculados para los extractos producidos sobre bagazo de caña de 1.68 y 2.9 mm son cercanos a 5 horas; sin embargo el extracto obtenido de las partículas de 0.92 mm alcanzó un tiempo de vida media de 1.92 h; a este pH, las celulasas de *Bacillus* pierden la mitad de su actividad después de 24 horas (Fukomori y col., 1985). Por otro lado, a pH 7, las celulasas obtenidas sobre partículas pequeñas son más estables (7.91 h) que las obtenidas en las otras partículas estudiadas (casi dos horas), estas diferencias sugieren que es posible la producción de una forma endocelulolítica diferente en las partículas de 0.92 mm; de cualquier manera, la actividad de las celulasas de *Pleurotus* es pequeña comparada con la de las enzimas de *Trichoderma* ($t_{1/2}$ de 50 horas, Pitt, 1990).

Las xilanasas que produce la cepa estudiada en este trabajo presentan un tiempo de vida media mayor que las de *Aspergillus niger* a pH de 6 (1.25 h; Frederick y col, 1985), excepto las xilanasas producidas sobre partículas de 0.92 mm (1.14 h); a pH de 7, la actividad xilanolítica de la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* se mantiene casi 8 horas en el extracto enzimático obtenido de partículas pequeñas y 3.85 horas en el extracto de partículas heterogéneas, estos tiempos de vida media son menores a 10 horas que se reportan para la actividad xilanolítica de *Geobacillus stearothermophilus* a pH 7 (Khasin y col., 1993). Como puede notarse, los tiempos de vida media que se presentan para estas enzimas obtenidas sobre partículas de 0.92 mm son sensiblemente distintos a ambos pH de estudio.

De los resultados en este capítulo, sale a la luz la gran utilidad el tratar de correlacionar la composición de los materiales vegetales con la producción de enzimas para poder emplear esta información en el diseño de procesos en FMS, también surge la inquietud de realizar estudios microscópicos para poder explicar los fenómenos ocurridos durante este tipo de procesos y se hace patente la necesidad de realizar pruebas de geles de poliacrilamida con actividad enzimática para conocer mejor las enzimas producidas.

10

CONCLUSIONES

- Nuestros resultados muestran que la relación geométrica y el tamaño de las fibras de bagazo de caña afectan fuertemente el perfil de las actividades enzimáticas.
- En partículas con mayor relación L/D , la lignina es más abundante en la superficie, por lo tanto la inducción de lacasas se ve favorecida como se mostró para la cepa IE-8.
- El efecto regulatorio de N depende también de las diferencias inherentes a cada cepa y no puede asumirse como una característica general de la especie.
- La cepa IE-8 produjo los niveles más altos de todas las enzimas; en consecuencia este criterio se tomaría en cuenta en el diseño de aplicaciones biotecnológicas específicas.
- La producción de actividad lacasa y xilanasas está muy influenciada por el tamaño de partícula sólo para la cepa IE-8 sin adición de SA.
- Del análisis cinético de la cepa IE-8 de *Pleurotus ostreatus* degrada selectivamente hemicelulosa o celulosa.
- La degradación del sustrato se da en etapas en función del material que queda expuesto; al principio, se presenta la degradación de lignina (pared secundaria del material) un poco antes que la de celulosa por efecto de la CMCasa principalmente.
- Las partículas con menor relación L/D se degradan más rápido y presentan una mayor disminución en el contenido de lignina.
- Las partículas alargadas ($L/D > 10$) favorecen la producción de xilanasas por la cepa IE-8.
- La fracción superficial de lignina disponible se relaciona bien con el grado de degradación de este material.

- La cepa IE-8 produce una lacasa de 60 KDa con un tiempo de vida media de 2 horas a pH 6 y de 1.5 horas a pH 7.
- De los estudios de estabilidad de los extractos enzimáticos es posible suponer que la cepa IE-8 produjo una forma endocelulolítica diferente en las partículas de 0.92mm.

Con este trabajo se abre la posibilidad de realizar estudios microscópicos y de tipificación de sustratos para FMS, con el fin de poder explicar los fenómenos ocurridos durante estos procesos por medio de modelos que relacionen la degradación del sustrato con la superficie inicial disponible para cada material, la relación L/D y alguna de las caracterizaciones del sustrato: fracción de espacios vacíos (ε), esfericidad (ϕ_s) y superficie específica (a). Asimismo, se hace patente la necesidad de realizar pruebas de geles de poliacrilamida con actividad enzimática para conocer mejor las enzimas producidas.

11

REFERENCIAS

- Agüero C.J., Pisa J.R., Andina R.L. 2006. Consideraciones Sobre el Aprovechamiento Racional del Bagazo de Caña como Combustible. *Investigación y Desarrollo* **27**: 1-7
- Anthony, T.; Raj, K.C.; Rajendran, A.; Gunasekaran, P. 2003. High molecular weight cellulase-free xylanase from álcali-tolerant *KAspergillus fumigatus* AR1. **32**: 647-654.
- Antorini, M.; Herpoël-Gimbert, I.; Choinowski, T.; Sigoillot, J.C.; Esther, M.; Winterhalter, K.; Piontek, K. 2002. Purification, crystallization and X-ray diffraction study of fully functional laccase from ligninolytic fungi. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1594**: 109-114
- Aro, N; Pakula T.; Penttilä M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**: 719-739
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for the assays of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* **23**: 257-270
- Baldrian, P. 2004. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. **50**: 245-253.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases-ocurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*. **30**: 215-242.
- Bassi, T. 2004. [<http://www.mejorpasto.com.ar/UNLZ/2004/TX4.htm>] Fecha de la búsqueda 22/Octubre/2004.
- Bending, G.D.; Friloux, M.; Walker, A. 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*. **212**: 59-63.
- Bennett, J.W. 1998. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. **66**: 101-107.
- Bilba, K., Arsene, M.A., Ouensanga, A. 2007. Study of banana and coconut fibers. Botanical composition, thermal degradation and textural observations. *Bioresource Technology*. **98**: 58-68
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C. 2002. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 164-169.
- Bourbonnais, R., G. Paice M., B. Freiermuth, E. Bodie, and S. Borneman. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *App. Environ. Microbiol.* **63** (12): 4627 – 4632.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brenda, 2004.[www.brenda.uni-koeln.de]. Fecha de la consulta: Julio de 2004.
- Campos F.P., Sampaio A.A.M, Bose M.L.V., Vieira P.F., Sarmiento P. 2004. Evaluation of in vitro gas production of roughages and their mixtures using the curves subtraction method. *Animal Feed Science and Technology*. **116**: 161-172
- Cohen, R., Hadar, Y., Yarden O. 2001. Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by MN^{2+} . *Environmental microbiology* **3**: 312-322
- Coughlan, M. P. and Ljungdahl, L. G. 1998 Comparative Biochemistry of fungal and Bacterial Cellulolytic Enzyme Systems. In *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. J. P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (ed.). Academic Press, London, San Diego and New York, pp. 11-30.
- Chiparus, O.I., Chen, Y. 2003. An image method to evaluate bagasse fiber dimensions. *Bioresource Technology*. **90**: 305-309.
- D'souza, T.M.; Boominathan, K.; Reddy, C.A. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 3739-3744
- Da Silva, R.; Lago, E.S.; Merheb, C.W.; Macchione, M.M.; Park, P.K.; Gomes, El. 2005. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*. **36**: 235-241.
- De Buen, O. 2002. Propuesta de energía verde en México. [<http://www.cec.org/files/PDF/Mercado1.pdf>]. Fecha de la búsqueda Noviembre de 2004.

- Decker, S. R., Adney, W. S., Jennings, E., Vinzant, T.B., Himmel, M. E. 2003. Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **107**: 689-704.
- Díaz, G.G. 2003. Determinación y caracterización de la actividad de enzimas lacasas en cepas del género *Pleurotus*. En [<http://www.uatx.mx/investigacion/cif/proyectos/dca.html>]. Fecha de la búsqueda 7/Octubre/2003
- Dong, J.L.; Zhang, Y.Z.; 2004. Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus *Trametes gallica*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **34**, 179-194
- Farnet, A.M.; Tagger, S.; Le petit, J. 1999. Effects of copper and aromatic inducers on the lacasse of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *Life sciences.* **322**: 499-503.
- FDA-CFSAN. 2001. [[http://www.\(center for food safety and applied nutrition overview.htm.\)](http://www.(center for food safety and applied nutrition overview.htm.))] Fecha de la búsqueda Enero/2004.
- Fernandez-Larrea, J.; Stahl, U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserine*. *Molecular Genetics and Genomics.* **252**: 539-551
- Ferraz, A., Córdova, A.M., Machuca, A. 2003. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme and Microbial Technology* **32**: 59-65.
- Ferreira, G.; Boer, C.G.; Peralta, R.M. 2003. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaris* in solid state fermentation. *FEMS Microbiology Letters.* **173**: 335-339
- Flickinger, M.C.; Drew, S.W. 1999. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. Vol (1-5). John Wiley and Sons, inc. USA. Pp 1545-1551
- Frederick, M.M.; Kiang, C.H. Frederick, J.R.; Reilly, P.J.; 1985. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 525-532
- Fu, S.Y.; Yu, H.; Buswell, J.A. 1997. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus ostreatus sajor-caju*. *FEMS Microbiology Letters.* **147**: 133-137.
- Fukumori, F., T. Kudo, K. Horikoshi. 1985. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. no. 1139. *J. Gen. Microbiol.* **131**:3339-3345.
- Galhaup, C.; Wagner, H.; Hinterstoisser, B.; Haltrich, D. 2002. Increase production of laccase by *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology.* **30**: 529-536
- Gallardo, O.; Díaz, P.; Pastor, J. 2004. Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: Comparison with alkaline pl-Low molecular weight xylanases of family 11. *Current Microbiology.* **48**: 276-279.
- Gañán, P., Zuluaga, R., Cruz, J., Vélez, J.M, Retegi, A, Mondragon, I. 2008. Elucidation of the fibrous structure of *Musaceae* matured rachis. *Cellulose.* **15**:131-139.
- García, A. y Torres R. G. 2003 Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Rev. Col.. Biot.* **5**(1): 56-64.
- García, Y; Ibarra, A; Valiño, E; Dustet, JC; Oramas, A y Albelo, N. 2003. Estudio de un sistema de fermentación sólida con agitación en la biotransformación del bagazo de caña de azúcar por la cepa *Trichoderma viride* M5-2. [http:// lead.virtualcentre.org/es/enl/BTJ%](http://lead.virtualcentre.org/es/enl/BTJ%). Fecha consulta: 5/octubre/2004
- Gawande, P. V.; Kamat, M.Y. 1999. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *Journal of Applied Microbiology.* **87**: 511-519
- Geankoplos, C.J. 1998. Procesos de transporte y operaciones unitarias. 3ª edición. Ed. CECSA, México. 1007 p.
- González. A.M. 2004. "Estructura vegetal" in [<http://www.biologia.edu.ar>] Fecha de búsqueda: 16/marzo/2004.
- Guillén-Navarro, G K.; Márquez-Rocha, F. J. Y J. E. Sánchez-Vázquez. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* **15**: 302-305.
- Gutierrez-Correa, M., Tengerdy, R.P. 1998. Xylanase production by fungal mixed cultura solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnology Letters* **20**: 45-47.

- Guzmán, G.; Mata, G.; Salmones, D.; Soto-Velazco, C. y Guzmán-Dávalos, L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Dirección de Bibliotecas y Publicaciones del Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 245 p.
- Harris, P.; Smith, B.G. 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology*. **41**: 129-143.
- Hassoun P., Fulcheri C., Nabeneza S. 2002. Feeding dairy heifers untreated or urea-treated fibrous sugarcane residues: effect on dry matter intake, growth, and metabolic parameters. *Animal Feed Science and Technology* **100**: 31–41.
- Hernández, D.; Sánchez, J.E.; Yamasaki, K. 2003. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Bioresource Technology*. **90**: 145-150.
- Hublik, G.; Schinner, F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme Microb. Technol.* **27**: 330-336;
- Iriarte, H.C. 2003. Estudio de la producción y secreción de enzimas celulolíticas en micelios "rápidos" y "lentos" de *P. ostreatus*. Ingeniero Técnico Agrícola (Hortofruticultura y Jardinería). Universidad Pública de Navarra. Tesis doctoral. [<http://www.unavarra.es/genmic/research%20group/...arrera.htm>] Fecha búsqueda: 5/Octubre/2004.
- Jordaan, J. y Leukes, W. D. 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from mesophilic white-rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*. **33**(2-3): 212-219.
- Jordaan, J.; Leukes, W. D. 2003. Isolation of a thermostable laccase with DMAB and MBTH oxidative coupling activity from mesophilic white-rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*. **33**(2-3): 212-219.
- Joseleau, JP; Comtat, J and Ruel K. 1992 Chemical structure of xylans and their interactions in plant cell walls. In Xylan and Xylanases. J Visser, G Beldman, MA Kuster-van Someren and AGJ Voragen (Eds). Elsevier, Amsterdam. Pp: 1-15.
- Kapdan I.K., Kargi F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* **38**: 569–582.
- Kaur, J.; Chadha, B.S.; Kumar, B.A.; Saini, A H.S. 2007. Purification of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Bioresource Technology*. **98**: 74-81.
- Khandeparkar, R.D.S.; Bhosle, N.B. 2006. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**: 732-742
- Khasin,A., Alchanati, I., Shoham Y. 1993. Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and Environmental Microbiology*. **59** (6): 1725-1730
- Kiiskinen, L.; Cruz, K.; Bailey, M.; Ylösmäki, E.; Siika-aho, M.; Saloheimo, M. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of a purified enzyme. *Microbiology*. **150**: 3065-3074.
- Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. 1996. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*. **8**: 27-32.
- Klis, M.; Rogalski, J.; Bilewicz, R. 2006. Voltammetric determination of catalytic reaction parameters of laccase based on electrooxidation of hydroquinone and ABTS. *Bioelectrochemistry*. 10.1016/j. bioelechem. 2006.09.008
- Knapp, J.S. and J.D. Howell. 1980. Solid substrate fermentation. *Ezyme Ferment. Biotechnol.* **4**: 85-143.
- Krishna Prasad K., Venkata Mohan S., Sreenivas Rao R., Ranjan Pati B. P.N. Sarma, P.N. 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochemical Engineering Journal* **24**: 17–26.
- Kumaran, S., Sastry, C. A., Vikineswary, S. 1997. Laccase, celulase, and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**: 43-49.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lara, M., Arias, A., Villaseñor, L. 2002. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonaris* on spent brewers's grain and tequila maguey bagasse. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Sánchez et al (eds), 323-330.
- Loera, O., Barbosa JR, Villaseñor F. 2006. "LACCASES". In: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Ed: RG Guevara and I Torres. RESEARCH SIGNPOST EDITORIAL, Kerala, India. Chapter 15: 323-340.
- Loera, O., Córdova, J. 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archives of Biological Technology* **46**: 177-181.
- Madrigal, J., Motolinia, C., Arias, A. 2002. Biomasa production of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* on tequila vinasses. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Sánchez et al (eds), 331-336
- Márquez-Rocha, F.J., Guillén, N.G.K., Sánchez, J.F., Vázquez-Duhalt, R. 1999. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnology Letters* **13**: 29-32.
- Márquez-Rocha, F.J., Hernández-Rodríguez, V.Z., Vázquez-Duhalt, R. 2000. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* **22**: 469-472.
- Marsh, A.J.; Stuart, D.M.; Mitchell, D.A.; Howes, T. 2000. Characterizing mixing in a rotating drum bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. **22**: 473-477.
- Massadeh, M.I.; Yusoff W.M.W.; Omar, O.; Kader, J. 2001. Synergism of cellulase enzymes in mixed solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*. **23**: 1771-1774.
- Mayer, A. and Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. **60**(6): 551-565.
- Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H., Di Luccio, M. 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugar cane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 56-59.
- McCabe W L, Smith J C, Harriot, P. 2002. *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. 6a ed. Mc Graw-Hill. 1199 p.
- Medjo Eko, R., Riskowski G. 2001. A Procedure for Processing Mixtures of Soil, Cement, and Sugar Cane Bagasse. *Agricultural Engineering International : the CIGR Journal of Scientific Research and Development*. Manuscript BC 99 001. Vol. III.
- Meunchang, S., Panichsakpatana, S., Weaver, R.W. 2005. Co-compositing of filter cake and bagasse by-products from a sugar mill. *Bioresource Technology* **96**: 437-442.
- Milstein, O.; Hutterman, A.; Majcherczyk, A.; Schulse, K; Frund, R.; Ludemanna, H.D. 1993. Transformation of lignin-related compounds with laccase in organic solvent. *Journal of Biotechnology*. **30**: 37-47
- Miller, G. L.; Blum; R.; Glannon, W. E.; Burton, A.L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem*. **2**: 127-132.
- Monti, R.; Cardillo, L.; Custodio, M.F.; Goulard, A.J.; Sayama, A.H.; Contiero, J. 2003. Production and purification of an endo-1,4- β -xylanase from *Humicola grisea* var thermoidea by electroelution. *Brazilian Journal of Microbiology*. **34**: 124-128;
- Nandakumar, MP, Thakur, MS, Raghavarao, KSMS, Ghildyal, NP. 1994. Mechanism of solid particle degradation by *Aspergillus niger* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry* **29**: 545-551.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2000. *Lehninger, Principios de Bioquímica*. 3ª ed. Ed. Omega, Barcelona, España. 1264p.
- Noble R., Hobbs P.J., Mead A., Dobrovin-Pennington A. 2002. Influence of straw types and nitrogen sources on mushroom composting emissions and compost productivity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **29**: 99-110.
- Nogala, W.; Rozniecka, E.; Zawisza, I.; Rogalski, J.; Opallo, M. 2006. Immobilization of ABTS-laccase system in silicate based electrode for bioelectrocatalytic reduction of dioxygen. *Electrochemistry Communications*. **8**: 1850-1854.

- Novotný C., Rawal B., Bhatt M., Patel M., Sasek V., Molitoris H.P. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology* **89**: 113–122
- Okano, K.; Fukui, S.; Kitao, R.; Usagawa, T. 2006. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on in vitro digestibility and chemical composition. *Animal Feed Science and Technology*. **136**: 240-247
- Palmieri, G.; Cennamo, G.; Faraco, V.; Amoresano, A.; Sannia, G.; Giardina, P.; 2002. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **33**: 220-230
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Fontanella, B.; Sannia, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 920-924.
- Palmqvist, E.; Hähn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Biores. Technol.* **74**: 17-24.
- Pallares, J., Rodríguez, S., Sanromán, A. 1996. Citric acid production in submerged and solid state cultura of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering*. **15**: 31-33.
- Pandey A., Soccol, C.R., Nigam, P, Soccol, V.T. 2000 (b). Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* **74**: 69-80
- Pandey, A. 2003. Solid-State fermentation. *Biotechnol. Eng. J.* **13**: 81-84.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Brand, D., Mohan R., Roussos, S. 2000 (a). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* **6**: 153-162.
- Pinto, R, Amaral, A.L., Ferreira, E.C. Vilanova, M. Ruel, K. Gama, M. 2008. Quantification of the CBD-FITC conjugates surface cellulose fibres. *BMC Biotechnology*. **8**:1
- Pitt, R.E. 1990. A Model of Cellulase and Amylase Additives in Silage. *J Dairy Sci* **73**:1788-1799
- Quintanar A, Zárate-Castrejón JL, López C, Salgado-Ugarte, I. 2004. Anatomía e histoquímica de la corteza de cinco especies de moraceae. *Polibotánica*. Núm. **17**, pp.15-38, ISBN 1405-2768. México
- Reddy, G.V., Ravindra Babu, P., Komaraiah, P., Roy, K.R.R.M., Kothari, I.L. 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor.caju*). *Process Biochemistry* **38**: 1457-1462.
- Rodríguez C.S.; Sanromán, M. A. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*. **22**: 211-219.
- Rodríguez, C.S.; Toca, H. J.L. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*. **24**: 500-513.
- Roukas, T. 1994. Solid-State Fermentation of carob pods for ethanol production. *Applied Microbiology Technology* **41**: 296-301
- SAGARPA. 2006. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. www.siap.sagarpa.gob.mx. [Fecha de consulta: 23/10/2006]
- Sainos E., Díaz-Godínez G., Loera O., Montiel-González A.M., Sánchez C. 2006. Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Applied Microbiology Biotechnology*. **72**: 812-815.
- Salmones, D., Mata, G. 2002. Detection of extracellular enzymes produced by *Pleurotus* spp grown on coffee pulp. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Sánchez et al (eds), 213-219.
- Sapag, A.; Wouters, J.; Lambert, C.; de Ioannes, P.; Eyzaguirre, J. and E. Depiereux . 2002. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships *J of Biotechnology*. **95**(2): 109-131.
- Sariaslani, F.S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*. **9**: 171-257.
- Scotti, C.T.; Vergoignan, C.; Feron, G.; Durand, A. 2001. Glucosamine measurements as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochem. Eng. J.* **7**: 1-5.

- Senti, G.; Láser, C.; Lundberg, M.; Wüthrich, B. 2000. Allergic asthma to shiitake and oyster mushroom. *Allergy*. **55**: 975-987.
- Seyis I., Aksoz N., 2005. Xylanase Production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with Alternative Carbon and Nitrogen Sources. *Food Technology and Biotechnology*. **43**: 37-40
- Shuler, M.L., Kargi, F. 1992. *Bioprocess Engineering*. Prentice Hall. USA, 176.
- Silva, E.M., Machuca, A., Mllagres, A.M.F. 2005. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochemistry*. **40**: 161-164.
- Singh, D.; Kaur, P. 2001. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*. **77**: 89-91
- Smail, T., Salhi, O., Knapp, J.S. 1995. Solid-state fermentation of carob pods by *Aspergillus niger* for protein production: effect of particle size. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**: 171-173
- Solórzano, J. L.; Pereira, J. N. 2002. Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **45**(4): 431-437.
- Stajić, M.; Persky, L.; Friesem, D.; Hadar, Y.; Wasser, S.P.; Nevo, E.; Vukojević, J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* **38**(1-2): 65-73
- Subramaniyan S.; Prema P. 2002 *Biotechnology of microbial xylanases*. *Enzymology, Molecular Biology and Application*. *Crit. Rev. Biotechnol* **22**:33-64.
- Sugimoto, H.H.; Barbosa A.M.; Dekker R.F.H.; Castro-Gomez R. J.H. 2001. Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*. **194**: 235-238.
- Suzuki, T.; Endo, K.; Ito, M.; Tsujibo, H.; Miyamoto, K.; Inamori, Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence and expression. *Bioscience and Biotechnology Biochemical*. **6**(10): 2167-2175.
- Tellez-Tellez, M., Sanchez, C., Loera, O., Diaz-Godinez, G. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase for *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters* **25**: 1391-1394.
- Tengerdy, R. P., Szakacs, G. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biotechnology Engineering Journal* **13**: 169-179.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology*. **140**: 19-26
- Thygesen, A.; Thomsen, A.B.; Schmidt, A. S.; Jørgensen, H.; Ahring, B.K.; Olsson, L. 2003. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. *Enzyme Microb Technol*. **32**: 606-615.
- Tinoco, R.; Pickard M.A.; Vázquez-Duhalt R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. **32**: 331-335.
- Topakas, E.; Katapodis, P.; Kekos, D.; Macris, B.J.; Christakopoulos, P. 2003. Production and partial characterization of xylanase by *Sporotrichum thermophile* under solid-state fermentation. *World J. Microbiology & Biotechnology*. **19**: 195-198.
- Trinci APJ. 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal of General Microbiology* **81**: 225-236.
- Van Soest, P. J.; Wine, R.H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV. Determination of plant cell wall constituents. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **50**:50
- Villa-Cruz. V.; Huerta-Palacios, G; Sánchez-Vázquez, J. E. 1999. Fermentation of a mixture of corn-cobs and coffee pulp for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Micol. Neotrop. Apl.* **12**: 67-74.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gómez, S., Díaz-Godínez, G., Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biotechnology Engineering Journal* **13**: 157-167.
- Vliegthath JFG, Hoffmann RA and Kanerling JP. 1992 A ¹H-NMR spectroscopy study on oligosaccharides obtained from wheat arabinoxylan. In *Xylan and Xylanases*. J Visser, G Beldman, MA Kuster-van Someren and AGJ Voragen (Eds). Elsevier, Amsterdam. Pp: 17-37.

10. REFERENCIAS

- Wahleithner J.A., Xu, F.; Brown, S.H.; Golightly, E.J. 1996. The identification and characterization of a laccase from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*. **29**: 395-403.
- Woodward, J. and Wiseman, A. 1982 Fungal and other β -D-glucosidases: their properties and applications, *Enz. Microb. Technol.* **4**: 73-7379.
- Youngchim, S.; Morris-Jones, R.; Hay, R.J.; Hamilton, A.J. 2004. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*. **53**: 175-181.
- Zadrazil, F., Puniya, A.K. 1995. Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresource Technology* **54**: 85-87.

12

APÉNDICES

A. ANÁLISIS QUÍMICO NUTRITIVOS

Solución Fibra Detergente Neutro (FDN)

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Dodecil sulfato de sodio | 30 g |
| EDTA disódico | 18.61 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 4.56 g |
| Etilénglicol | 10 ml |
| Tetraborato de sodio decahidratado | 6.81 g |
| Agua | c.b.p. 1L |

Poner 0.5-1 g de muestra a reflejar con 100 ml de solución durante una hora, lavar con agua caliente y acetona de 2 a 3 veces con cada una. Secar por 8 horas.

Solución Fibra Detergente Ácido (FDA)

| | |
|---|------|
| Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) | 20 g |
| Solución de ácido sulfúrico 1 N | 1 L |

Poner 0.5-1 g de muestra a reflejar con 100 ml de solución durante una hora, lavar con agua caliente y acetona de 2 a 3 veces con cada una. Secar por 12 horas.

Van Soest y Wine (1967)

B. CÁLCULO DE LA RELACIÓN C/N PARA EL BAGAZO DE CAÑA

La composición del bagazo de caña de azúcar determinada en el Colegio de Posgraduados considerando la proteína bruta y los análisis químico-nutritivos es: 1.76% proteína bruta, 90% FDN, del cual: lignina 19% \pm 1.9, hemicelulosa 20% \pm 1.8, celulosa 57 % \pm 3.3 y cenizas.

La última edición de los principios de Bioquímica de Lehninger (Nelson y Cox, 2000) en el capítulo "Las proteínas y su función biológica" aparece la clasificación de las proteínas junto a su composición promedio: 50% C, 7% H, 23% O, 16% N, 0-3% S. Los cálculos se realizaron considerando 100 g de bagazo.

100 gramos de bagazo del que utilizamos contienen:

- 1.76 g de proteína
- 90 (0.57) g de celulosa
- 90 (0.2) g de hemicelulosa
- 90 (0.19) g de lignina

La fracción de carbono en celulosa es 0.4, corresponde a 72/180, tomando en cuenta la fórmula de la glucosa ($C_6H_{12}O_6$).

La fracción de carbono en hemicelulosa es 0.4, corresponde a 60/150, tomando en cuenta la fórmula de la xilosa y otras pentosas ($C_5H_{10}O_5$).

La fracción de carbono en lignina es 0.67, corresponde a 120/180, tomando en cuenta la fórmula del alcohol coniferílico ($C_{10}H_{12}O_3$).

Cantidad de nitrógeno en el bagazo: 1.76 (0.16) g = 0.2816 g de N

Cantidad de carbono en el bagazo:

| Proteína | Celulosa | Hemicelulosa | Lignina |
|----------|----------|--------------|---------|
|----------|----------|--------------|---------|

1.76 (0.50) g + 90 (0.57)(0.4) g + 90 (0.2)(0.4)g +90 (0.19) (0.67) g = 40.057 g de C

Así, la relación C/N es: $\frac{40.057g}{0.2816g} = 142.25$

C. CURVAS PARA MEDIR BIOMASA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Medición de biomasa

Curva de N-acetilglucosamina, solución patrón de 1.8 g/L

| | | | | | | |
|--------------------------------|---|-------|--------|-------|--------|--------|
| A ₅₃₀ | 0 | 0.256 | 0.4019 | 0.477 | 0.6101 | 0.7706 |
| Concentración de N-acetil, g/L | 0 | 0.36 | 0.72 | 1.08 | 1.44 | 1.8 |

$$A_{530} = 0.3975 \text{ N-acetil (g/L)} + 0.06052, r^2 = 0.97399$$

Curva de biomasa

| | | | | | | |
|------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| A ₅₃₀ | 0.007 | 0.02 | 0.035 | 0.046 | 0.143 | 0.212 |
| BM, g/L | 0.0354 | 0.0958 | 0.13 | 0.2356 | 0.4652 | 0.9304 |

$$A_{530} = 0.239 \text{ BM (g/L)} + 0.001525, r^2 = 0.96795$$

Al igualar la expresión para A₅₃₀ de ambas curvas, queda:

$$\text{BM (g/L)} = 1.6632 \text{ N-acetil (g/L)} + 0.2$$

Curva de xilosa

| | | | | | |
|------------------|---|--------|--------|------|-------|
| A ₅₄₀ | 0 | 0.1154 | 0.3282 | 0.42 | 0.682 |
| Xilosa, (mM) | 0 | 2 | 6 | 8 | 10 |

$$\text{Xilosa (mM)} = 15.2599 A_{540} + 0.4856, r^2 = 0.9626$$

Curva de glucosa para CMCasa

| | | | | |
|------------------|---|-------|--------|------|
| A ₅₇₅ | 0 | 0.104 | 0.2057 | 0.32 |
| Glucosa, g/L | 0 | 0.78 | 1.04 | 1.3 |

$$\text{Glucosa (g/L)} = 2.4038 A_{575} + 0.0611, r^2 = 0.9791$$

Curva de glucosa para PFasa

| | | | | | |
|------------------|---|-------|--------|------|------|
| A ₅₇₅ | 0 | 0.104 | 0.2057 | 0.32 | 0.43 |
| Glucosa, g/L | 0 | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1.0 |

$$\text{Glucosa (g/L)} = 2.3222 A_{575} + 0.00781, r^2 = 0.999$$

Curva de proteína (BSA) con reactivo de Bradford

| | | | | | |
|------------------|---|-------|--------|--------|--------|
| A ₅₉₅ | 0 | 0.508 | 0.7055 | 0.9265 | 1.0465 |
| Proteína (mg/ml) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 |

$$\text{Proteína (mg/ml)} = 0.7402 A_{595} - 0.7173, r^2 = 0.9295$$

D. ANALIZADOR DE IMÁGENES

Notas importantes para el uso del analizador Image Pro Plus

Es conveniente emplear filtros RGB para imágenes tomadas con computadora y HSI para imágenes digitalizadas.

En las opciones de segmentación:

- 1) Elegir "Count/size"
- 2) "Select colors", opción "histogram", "class" 1,2,3, etc y elegir un color para el fondo una vez que se seleccionó cada color con el tintero
- 3) Pedir % Area
- 4) Cerrar la selección de colores
- 5) Poner el puntero en "Count" y dar clic.
- 6) Ver "Range statistics" en la opción View/Count

Una vez obtenidas las áreas, pasar los valores a una hoja de cálculo de Excel para tomar en cuenta sólo lo que corresponde al material teñido, después tomar las fracciones necesarias.

E. ZIMOGRAFÍA

Soluciones requeridas para los geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Solución de monómeros de acrilamida (gel inferior)

29.2 g acrilamida, 0.8 g bis-acrilamida; disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml. Filtrar y guardar en botella ámbar de vidrio en refrigeración hasta por un mes.

Amortiguador del gel separador

18.15 g Tris, disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 8.8 con HCl, aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración.

Amortiguador del gel compactador (gel superior)

3.0 g Tris, disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 6.8 con HCl, aforar a 100 ml. Guardar en refrigeración.

Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10X)

15 g Tris, 72 g glicina, 5 g SDS; disolver en ~300 ml de agua. El pH debe quedar entre 8.3-8.4 si las pesadas son correctas (debe evitarse el ajuste del pH para no alterar la fuerza iónica de esta solución). Aforar a 500 ml. Guardar en refrigeración, diluir al momento de utilizar. Para una corrida en la cámara mini-PROTEAN II (Bio Rad) se requieren 750 ml de solución diluida.

Persulfato de amonio

Preparar al momento una solución al 10%. Este reactivo es muy higroscópico (sellar bien el frasco y mantener en desecador). Una alternativa es preparar alícuotas de 100 μ l en viales pequeños y congelarlas.

Solución de SDS

10 g de dodecilsulfato de sodio, disolver en 100 ml de agua. Guardar en botella de vidrio a temperatura ambiente.

Amortiguador de muestras no reductor (solución concentrada 2X)

10 ml de amortiguador del gel superior, 16 ml de solución SDS, 50 mg azul de bromofenol, 12 ml glicerol, 4 ml agua; mantener a temperatura ambiente no más de dos meses.

Protocolos para la preparación de los geles de poliacrilamida. En las tablas 1 y 2 se dan los detalles para la preparación del gel en función de la concentración requerida

Tabla 1. Protocolo para preparación del gel de separación (Tris 0.375 M, pH 8.8).

| Reactivo | 12% | 10% | 8% |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Agua destilada | 3.35 ml | 4.02 ml | 4.68 ml |
| Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8) | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml |
| SDS al 10% | 100 μ l | 100 μ l | 100 μ l |
| Acrilamida/bis (30%) | 4.0 ml | 3.33 ml | 2.67 ml |
| Persulfato de amonio 10% | 50 μ l | 50 μ l | 50 μ l |
| TEMED | 5 μ l | 5 μ l | 5 μ l |
| Monómero total | 10 ml | 10 ml | 10 ml |

Tabla 2. Preparación del gel de compactación al 4% (Tris 0.125 M, pH 6.8).

| Reactivo | 4% |
|--------------------------|-------------|
| Agua destilada | 6.02 ml |
| Tris-HCl 1.5 M (pH 6.8) | 2.5 ml |
| SDS al 10% | 100 μ l |
| Acrilamida/bis (30%) | 1.33 ml |
| Persulfato de amonio 10% | 50 μ l |
| TEMED | 5 μ l |
| Monómero total | 10 ml |

Para preparar las soluciones de monómero, combine todos los reactivos, excepto TEMED y persulfato de amonio, mediante una agitación suave de recipiente donde está la solución, agítela suavemente de manera manual. Inicie la polimerización agregando los otros dos reactivos, agite de nuevo y vacíe en la cámara ensamblada y libre de fugas.

F. TIPIFICACIÓN DEL SUSTRATO

La distribución de fracciones peso y relación geométrica para el bagazo de caña fue la siguiente

| L/D | W_i | $D_p(\text{malla}),$ mm |
|---------|--------|----------------------------|
| 10.55 | 0.1683 | 6.72 |
| 6 | 0.2468 | 3.36 |
| 10.3 | 0.085 | 2.6 |
| 8.7 | 0.0444 | 1.68 |
| 18 | 0.0524 | 1.095 |
| 12.3 | 0.0951 | 0.9205 |
| 16.6 | 0.111 | 0.774 |
| 35 | 0.106 | 0.5635 |
| 43 | 0.0524 | 0.349 |
| 90 | 0.0386 | 0.139 |
| Suma =1 | | |

Una vez estimadas la densidad de las partículas de bagazo y del lecho húmedo (después de esterilizado) para cada tamaño de partícula, fue posible calcular la fracción de espacios vacíos:

$$\varepsilon = \frac{\text{Volumen.lecho} - \text{Vol.partículas}}{\text{Volumenl.lecho}} \quad (1)$$

Se pone como ejemplo el cálculo para las partículas de 0.92 mm ($L/D= 12$): $\rho_{\text{lecho}}=244$ (kg/m³), $\rho_{\text{partículas}} =1131$ kg/m³.

Base de cálculo: 1 m³ de lecho, 244 kg de material

Volumen de los cilindros =244 kg/1131 kg/m³=0.2157 m³

Así, $\varepsilon=(1-0.2157)/1= \mathbf{0.7843}$

Conocemos la relación L/D para cada tamaño de partícula y su diámetro, contamos con las fórmulas para superficie y volumen de la esfera:

$$\text{Superficie.esfera} = \pi d_{\text{esfera}}^2 \quad (2)$$

$$\text{Volumen.esfera} = \frac{\pi}{6} d_{\text{esfera}}^3 \quad (3)$$

Una esfera de volumen igual a 1 cm^3 , tiene un diámetro de 1.24 cm.

Conocemos las fórmulas del área y volumen de un cilindro (asumimos que las fibras son cilíndricas)

$$\text{Superficie.cilindro} = 2 \frac{\pi}{4} d_p^2 + \pi d_p L \quad (4)$$

$$\text{Volumen.cilindro} = L \frac{\pi}{4} d_p^2 = \left(\frac{L}{D}\right) \frac{\pi}{4} d_p^3 \quad (5)$$

Despejamos el d_p del cilindro de volumen unitario

$$d_p = \left(\frac{4}{\pi} \frac{1}{L/D} \right)^{1/3} \quad (6)$$

Sustituyendo en la ecuación 5.4

$$\phi_s = \left(\frac{\text{Superficie.de.la.esfera}}{\text{Superficie.de.la.partícula}} \right)_{\text{al.mismo.volumen}} \quad \text{Ec. (6.4)}$$

$$\phi_s = \left(\frac{\pi d_s^2}{2 \frac{\pi}{4} d_p^2 + \pi d_p L} \right) \quad (7)$$

$$L = \frac{L}{D} d_p \quad (8)$$

Sustituyendo la relación L/D el diámetro del cilindro calculado con (6) igual a 0.4695, la esfericidad es 0.55. Con este valor y tomando el diámetro de la esfera, el de la malla, de 0.92 mm, empleando la ecuación

$$a = \frac{6(1-\epsilon)}{\phi_s d_{\text{esfera}}} \quad \text{Ec. (6.5)}$$

la superficie específica es 2.56 mm^{-1}

G. CINÉTICA DE INACTIVACIÓN

Partículas 0.92 mm diámetro (L/D= 12)

| Enzima (pH) | Primer orden, k(h ⁻¹) | R ² | Segundo orden (1), K(h ⁻¹ A ¹) | R ² | Segundo orden (2), K(h ⁻²) | R ² |
|---------------|--------------------------------------|----------------|--|----------------|---|----------------|
| Lacasas (6) | 0.3351 | 0.9992 | 0.8469 | 0.9567 | 0.0538 | 0.9556 |
| Lacasas (7) | 0.508 | 0.9408 | 3.4304 | 0.7854 | 0.1086 | 0.3416 |
| Celulasas (6) | 0.1518 | 0.9519 | 0.5221 | 0.9725 | 0.0088 | 0.7900 |
| Celulasas(7) | 0.1615 | 0.7907 | 1.6239 | 0.9372 | 0.0068 | 0.6837 |
| Xilanasas (6) | 0.2410 | 0.8813 | 0.8736 | 0.8916 | 0.0428 | 0.6794 |
| Xilanasas (7) | 0.0876 | 0.9220 | 0.2492 | 0.8707 | 0.0044 | 0.8679 |

Partículas 1.68 mm diámetro (L/D= 9)

| Enzima (pH) | Primer orden, k(h ⁻¹) | R ² | Segundo orden (1), K(h ⁻¹ A ¹) | R ² | Segundo orden (2), K(h ⁻²) | R ² |
|---------------|--------------------------------------|----------------|--|----------------|---|----------------|
| Lacasas (6) | 3.8918 | 1 | 12 | 1 | 7.7836 | 1 |
| Lacasas (7) | 0.9161 | 1 | 1.1619 | 1 | 1.83 | 1 |
| Celulasas (6) | 0.1170 | 0.8687 | 0.1914 | 0.9196 | 0.0142 | 0.6586 |
| Celulasas(7) | 0.1163 | 0.8360 | 0.6505 | 0.9104 | 0.0043 | 0.6421 |
| Xilanasas (6) | 0.3891 | 0.8675 | 29.17 | 0.5514 | 0.0269 | 0.9906 |
| Xilanasas (7) | 0.3811 | 0.8644 | 49.17 | 0.5229 | 0.0258 | 0.9500 |

Partículas 2.9 mm diámetro (L/D= 18)

| Enzima (pH) | Primer orden, k(h ⁻¹) | R ² | Segundo orden (1), K(h ⁻¹ A ¹) | R ² | Segundo orden (2), K(h ⁻²) | R ² |
|---------------|--------------------------------------|----------------|--|----------------|---|----------------|
| Lacasas (6) | 0.1153 | 0.9206 | 0.5182 | 0.9653 | 0.0043 | 0.7351 |
| Lacasas (7) | 0.2906 | 0.9089 | 0.3372 | 0.8936 | 0.2927 | 0.9994 |
| Celulasas (6) | 0.0627 | 0.7295 | 0.2261 | 0.9213 | 0.0032 | 0.4661 |
| Celulasas(7) | 0.1003 | 0.9096 | 0.5222 | 0.9479 | 0.0039 | 0.7512 |
| Xilanasas (6) | 0.1673 | 0.7826 | 0.3647 | 0.8793 | 0.0244 | 0.6357 |
| Xilanasas (7) | 0.1799 | 0.8964 | 0.3985 | 0.8671 | 0.0225 | 0.6158 |

H. PUBLICACIONES



Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains

Isabel Membrillo^a, Carmen Sánchez^b, Marcos Meneses^d, Ernesto Favela^c, Octavio Loera^{c,*}

^a División de Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores Ecatepec, Ecatepec 55210, Mexico

^b Universidad Autónoma de Tlaxcala, CICB, Laboratorio de Biotecnología, C.P. 90000 Tlaxcala, Mexico

^c Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09340 Mexico D.F., Mexico

^d Programa en Ganadería, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5, Carr. Mexico-Texcoco, Montecillo 56230, Mexico

Received 8 August 2006; received in revised form 15 January 2008; accepted 16 January 2008

Available online 21 March 2008

Abstract

Two strains of *Pleurotus ostreatus* (IE-8 and CP-50) were grown on defined medium added with wheat straw extract (WSE). Mycelia from these cultures were used as an inoculum for solid fermentation using sugar cane bagasse (C:N = 142). This substrate was used separately either as a mixture of heterogeneous particle sizes (average size 2.9 mm) or as batches with two different particle sizes (0.92 mm and 1.68 mm). Protein enrichment and production of lignocellulolytic enzymes on each particle size was compared. The effect of ammonium sulphate (AS) addition was also analyzed (modified C:N = 20), this compound favored higher levels of protein content. Strain CP-50 showed the highest increase of protein content (48% on particle size of 1.68 mm) when compared to media with no additional N source. However, strain IE-8 produced the highest levels of all enzymes: xylanases (5.79 IU/g dry wt on heterogeneous particles) and cellulases (0.18 IU/g dry wt on smallest particles), both without the addition of AS. The highest laccase activity (0.040 IU/g dry wt) was obtained on particles of 1.68 mm in the presence of AS. Since effect of particle size and addition AS was different for each strain, these criteria should be considered for diverse biotechnological applications.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Particle size; Enzymatic activity; Fungal growth; Classified substrate; *Pleurotus ostreatus*

1. Introduction

Over the last three years in Mexico, sugar cane production was nearly 46 million ton annually (SAGARPA, 2006). Sugar cane production releases bagasse as a by-product, which is a lignocellulosic material providing an abundant and renewable energy source. Polysaccharides in this material can be used for bioethanol production, enzyme production, and fertilizing compounds for plant growth after a suitable composting process (Pandey, 2003; Viniegra-González et al., 2003). Although its digestibility is very poor due to the presence of lignin, sugar cane

bagasse represents a potential source of energy as a supplement in animal feeding (Campos et al., 2004).

The white rot fungus *Pleurotus ostreatus* produces a wide range of extracellular lignocellulolytic enzymes, also named fibrolytic enzymes, including: xylanases, cellulases, and laccases (Sun et al., 2004). All these enzymes contribute in the degradation of cell wall content in sugar cane bagasse. However, there are some reports describing that lignocellulolytic enzymes production by *P. ostreatus* depends strongly on the strain, substrate composition and conditions of cultivation (Stajić et al., 2006).

Since the last decade, many studies about the application of solid-substrate fermentation (SSF) were focused on adding an extra value to agro industrial residues; several processes have been developed in order to enhance protein content in starchy fruits residues, enzyme production, and

* Corresponding author.

E-mail address: loera@xanum.uam.mx (O. Loera).

metabolite synthesis (Pandey, 2003). In general, in those processes nutrient sources are simultaneously physical supports for microbial growth. Therefore substrate degradation is attributed to cell bound enzymes or extracellular enzymes (Nandakumar et al., 1994). Enzyme actions on the substrate depend upon the physical properties of the materials including the crystalline or amorphous nature, accessible area, surface area, porosity and mainly particle size (Pandey, 2003; Viniegra-González et al., 2003). The effect of particle size on growth and product formation in SSF has been studied by different authors (Reddy et al., 2003; Zadrazil and Puniya, 1995), but no reports are available concerning specific induction of lignocellulolytic enzymes as a response to particle geometry in sugar cane bagasse. The aim of the present work was to obtain a vigorous inoculum and then evaluate both the effect of an inorganic N source and different particle sizes of sugar cane bagasse, on the production of protein and lignocellulolytic enzymes on solid substrate fermentation using two *P. ostreatus* strains.

2. Methods

2.1. Microorganisms and mycelial growth

Two strains of *P. ostreatus* were used: IE-8 and CP-50. Both strains belong to the mycological culture collection of the Colegio de Posgraduados in Texcoco, Mexico. Strains IE-8 and CP-50 were grown on plates containing 20 ml of malt extract agar (MEA) enriched with different N sources (urea or ammonium sulphate) in order to obtain a C:N ratio of 20 g:g (according to the commercial medium composition of MEA by DIBICO®). In another series of experiments, MEA was also prepared entirely dissolved in wheat straw extract (WSE) which was obtained as follows: 100 g of chopped wheat straw were suspended in 1 L of distilled water and maintained at 85 °C during 1 h. The liquid was then filtered by a cotton cloth. Due to evaporation, volume was adjusted to 1 L with distilled water. All culture media were autoclaved at 15 psi for 15 min. Three plates per medium for every strain were inoculated with a 6 mm mycelium-agar plug, obtained from simple MEA plates, and maintained at 29.5 ± 0.5 °C for 5 d. Radial growth rate (mm/h) from triplicates was determined by measuring colony diameter every day (Trinci, 1974). Means from each medium were subjected to a statistical analysis using the NCSS 2001® software.

2.2. Substrate characterization

Dry sugar cane bagasse was subjected to a sieving procedure employing mesh-size sieves of: 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 35, 48, 50, and 60 (Mc Cabe et al., 2002). After this, bagasse particles were classified according to three diameter sizes and were used as substrates for SSF. The smallest particles (0.92 mm) were collected from fractions between meshes 16 and 20 (−16, +20), intermediate particles

(1.68 mm) were collected from fractions (−8, +12), finally, heterogeneous bagasse (0.25–5.5 mm, average 2.9 mm diameter) was also used as a substrate. The geometrical ratio (fiber length: diameter or L/D) was determined for each particle size as an average value from 100 fibers per fraction. These L/D values corresponded to 12.3 ± 0.44 , 8.7 ± 1.1 , and 18 ± 0.55 for particles sizes of 0.92, 1.68, and 2.9 mm, respectively. For all three selected fractions, chemical composition was determined according to the methodology proposed by Bassi (2005) and Van Soest et al. (1991).

2.3. Solid substrate fermentation

Sugar cane bagasse was rehydrated with hot water (90 °C) for 30 min; then excess moisture was drained and final moisture content was determined to be 80%. Sugar cane bagasse was analyzed according to Bassi (2005) and Van Soest et al. (1991) and C:N ratio was determined to be 142:1 (protein 1.7%, cellulose 53.7%, hemicellulose 19.2%, lignin 18.2%, ashes 3.1%, and moisture 4.2%). This C:N value was obtained considering that N content in protein is 16% (Nelson and Cox, 2000), in this case 0.28% of bagasse corresponded to nitrogen and 40% of carbohydrates was considered as carbon. When ammonium sulphate (AS) addition was required in experimental trials, C:N ratio was adjusted to 20.

Five grams of this substrate were placed in 250 ml flasks and then were autoclaved at 121 °C for 15 min. Each flask was inoculated with four mycelium plugs (6 mm diameter each) obtained from MEA–WSE medium as described above. Biomass from mycelium plugs was carefully covered with substrate using a sterile spatula. Cultures were kept at 29.5 ± 0.5 °C during 8 d under static conditions.

After the incubation period, the content of each flask was suspended in 50 ml of sodium citrate buffer (50 mM, pH 5.0) for 30 min within an ice bath. Solids were separated by filtering through a gauze cloth, and filtrate was then centrifuged (4 °C, 10 000 rpm, 30 min). Supernatant was used for measurements of enzyme activity and soluble protein. Solids were dried at 70 °C 24 h, then ground in a blender to measure insoluble protein attached to substrate particles. Triplicates were used for each experimental treatment and statistical analyses were realized using the NCSS 2001® software.

2.4. Analytical procedures

Protein was determined according to Bradford (1976), Bovine Serum Albumin (40 mg/L) was used as standard; xylanase activity was estimated by DNS method (Miller et al., 1960) using a 0.5% solution of Birchwood xylan as substrate, previously dissolved in a sodium citrate buffer (50 mM, pH 5.3) according to Loera and Córdova (2003); laccase activity was determined registering oxidation of 2,2-azo-bis-(ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in an acetate buffer (0.5 mM, pH 5) at 420 nm

every 20 s during 2 min (Wolfenden and Willson, 1982); carboxymethyl cellulase (CMCase) activity was estimated by DNS method ($\lambda = 575$ nm) using a solution of 1% carboxymethyl cellulose as a substrate, dissolved in a sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) according to Miller et al (1960); filter paper activity (FPA) in the extracted filtrates was measured also at pH 4.8 employing a piece of filter paper (1 cm \times 6 cm, No. 41) according to the procedures by and Decker et al. (2003). All activities were calculated from triplicates and statistical analyses were realized using the NCSS 2001[®] software. Values were expressed in international units (IU), where one unit (IU) of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to release 1 μ mol of product per minute under the given assay conditions. Activities were referred to initial substrate dry weight (IU/g dry wt).

3. Results and discussion

3.1. Mycelial growth and inoculum preparation for SSF

P. ostreatus exhibited different growth patterns according to the type of inoculum used for SSF (Sainos et al., 2006). These authors also reported a correlation between productivity parameters and some enzymatic profiles in a variety of inocula using *P. ostreatus*. Consequently, inoculum preparation has to be considered as an important initial aspect for SSF cultures.

In order to obtain a rapid growing mycelium to be used as an inoculum, three different N sources were analyzed (Table 1). In the case of strain IE-8, the radial growth rate was 0.323 mm/h using WSE, only 5.0% higher than that value for AS (0.308 mm/h) and 38% higher than rates determined in urea containing medium (0.234 mm/h). For strain CP-50 the same pattern was observed. However, Novotný et al. (2001) observed that mycelia growth rates of *P. ostreatus* reached up to 1.25 mm/h (using enriched soil plus glucose and malt extract) and 2.5 mm/h (with glucose plus ammonium tartrate) indicating that some strains preferred more complex N sources. Our results did not show significant differences in radial growth for strains IE-8 and CP-50 using either AS or WSE (Table 1). Wheat straw extract was used as an N source for inoculum preparation for SSF studies, since this extract can easily be

Table 1
Radial growth rate (mm/h) for two strains of *P. ostreatus* on different nitrogen sources

| Nitrogen source | Strain | |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | IE-8 | CP-50 |
| Urea | 0.234 \pm 0.011 ^a | 0.167 \pm 0.008 ^a |
| Ammonium sulphate | 0.308 \pm 0.014 ^b | 0.275 \pm 0.017 ^b |
| Wheat straw extract | 0.323 \pm 0.008 ^b | 0.294 \pm 0.016 ^b |

Means per column with different superscript letters are significantly different after a Duncan's test comparison for every nitrogen source ($p \leq 0.05$).

incorporated in media for petri dishes. However, AS was added directly on sugar cane bagasse in order to modified the C:N ratio as mentioned below.

3.2. Analysis of protein and lignocellulolytic enzymes using different particle sizes

Sugar cane bagasse was classified after sieving and composition for all fractions was the same: Lignin 19% \pm 1.9, hemicellulose 20% \pm 1.8, cellulose 57% \pm 3.3, and ashes 3.2% \pm 0.7. Then fractions of sieved sugar cane bagasse alone (C:N = 142) or supplemented with AS (C:N = 20) were used for both strains as supports for SSF. After 8 d of incubation on every condition, both total protein and enzymes production were determined.

3.2.1. Total protein production

Protein enrichment after growth of *P. ostreatus* on sugar cane bagasse with different particle size is summarized in Table 2. In general, media supplemented with AS (C:N = 20) favored higher levels of protein content when compared to media with no additional N source (C:N = 142). Strain CP-50 showed the highest increase of protein content (48%) on particle size of 1.68 mm. However, for this strain after growing on substrate particles of 0.92 mm there was not significant difference in protein content after the addition of AS.

3.2.2. Enzymes production

Enzyme production was determined for different activities: xylanases, laccases, and cellulases, since these enzymatic families are involved in the breakdown of cell wall components. Xylanase activity produced by *P. ostreatus* growing on sugar cane bagasse with different particle size is shown in Fig. 1. Strain IE-8 was more susceptible to the presence of AS, since xylanase activity on 2.9 mm particles was 145% higher when AS was not added (5.79 IU/g dry wt) in comparison to that value obtained in presence of AS (2.36 IU/g dry wt). Similarly, using the smallest particle evaluated in this work (0.92 mm diameter) without AS,

Table 2
Protein enrichment by two strains of *P. ostreatus* after 8 d of growth on sugar cane bagasse added with ammonium sulphate (C:N = 20) and compared with the same substrate with no additional N source (C:N = 142)

| Strain | C:N ratio | Average particle diameter (mm) | | |
|--------|-----------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 0.92 | 1.68 | 2.9 |
| IE-8 | 20 | 0.630 \pm 0.09 ^a | N.D. | 0.430 \pm 0.04 ^a |
| | 142 | 0.526 \pm 0.02 ^a | 0.522 \pm 0.02 ^a | 0.342 \pm 0.01 ^b |
| CP-50 | 20 | 0.566 \pm 0.02 ^a | 0.742 \pm 0.03 ^b | 0.758 \pm 0.03 ^c |
| | 142 | 0.563 \pm 0.02 ^a | 0.500 \pm 0.02 ^a | 0.668 \pm 0.03 ^d |

Data represent a mean for triplicates and are expressed as mg of total protein per g dry weight of fermented substrate. Initial total protein was 0.3 \pm 0.028 mg/g dry wt.

ND = no determined. Means in a column with different superscript letters are significantly different after a Duncan's test comparison ($p \leq 0.05$).

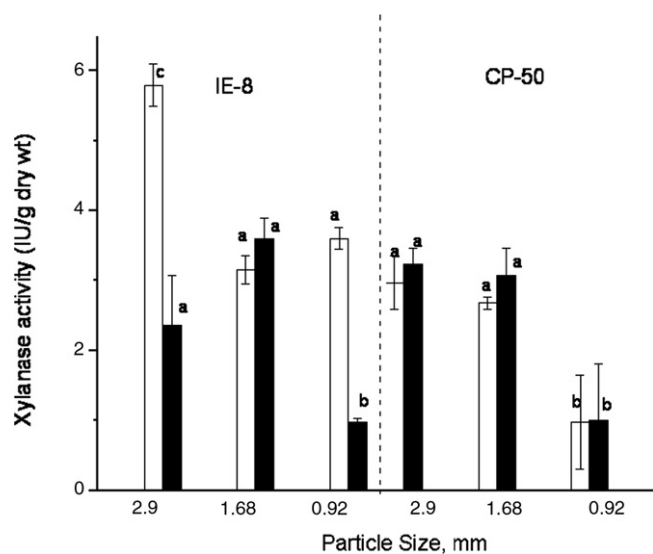


Fig. 1. Xylanases production by two strains of *P. ostreatus* grown on sugar cane bagasse after 8 d. Black bars correspond to ammonium sulphate addition. Means per column with different superscript letters are significantly different after a Duncan's test comparison ($p \leq 0.05$).

xylanase activity (3.6 IU/g dry wt) was almost four times higher than in sugar cane bagasse supplemented with this inorganic N source (0.98 IU/g dry wt). However, when enzyme activity was analyzed from extracts obtained on middle sized particles (1.68 mm diameter) no significant effect on xylanase production was observed. For strain CP-50 the presence of AS did not have a significant effect for all particle sizes (Fig. 1). Our production levels were substantially higher than those values reported by Reddy et al. (2003), who observed xylanases titre between 0.64 and 1.6 IU/g dry wt for *P. ostreatus* and between 2.4 and 3.4 IU/g dry wt for *Pleurotus sajor-caju* after 20 d of culture on banana wastes. More recently, Seyis and Aksoz (2005) reported xylanase levels as specific activity, in terms of units per mg of protein, by *Trichoderma harzianum* grown on agro industrial wastes in the presence of different N sources, where maximal production levels reached 26.5 U/mg after one week of culture, whereas our *P. ostreatus* strain IE-8 reached 16.5 U/mg as the highest value considering protein content shown in Table 2.

Laccase production by both strains is shown in Fig. 2. This figure shows that neither AS or particle sizes had an effect on laccase production by strain CP-50. However, presence of AS in medium with every particle size exhibited a strong effect on laccase titre by strain IE-8, with the highest variation for middle sized particles (1.68 mm), since activity levels were 0.04 IU/g dry wt and 0.006 IU/g dry wt, with or without ammonium sulphate, respectively. Similarly, for small particles (0.92 mm) the same trend was observed. However, on heterogeneous particles (2.9 mm average diameter), laccase activity production without AS addition was almost double (0.021 IU/g dry wt) compared to enzymatic extracts obtained in the presence of this N source (0.012 IU/g dry wt). Variation in laccase profiles

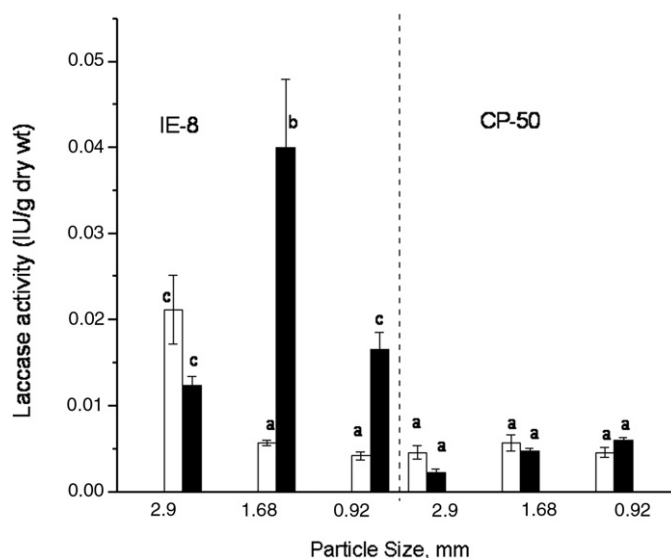


Fig. 2. Laccase production by two strains of *P. ostreatus* grown on sugar cane bagasse after 8 d. Black bars correspond to ammonium sulphate addition. Means per column with different superscript letters are significantly different after a Duncan's test comparison ($p \leq 0.05$).

attributed to intrinsic differences of *Pleurotus* strains have been reported (Tellez-Tellez et al., 2005).

For other *P. ostreatus* strains, which have been cultivated under SSF, phenol oxidases production was significantly higher. Krishna Prasad et al. (2005) showed that levels of laccase activity up to 750 IU/g dry wt can be achieved after optimizing culture conditions (glucose, wheat bran, urea, and yeast extract) and using inducers (xyloidine and N sources). Reddy et al. (2003), who worked with *P. ostreatus* found titres of 15.8 and 27.4 IU/g dry wt after 10 and 20 d, respectively. Although it has been suggested that N limitation is necessary for laccase production, Stajić et al. (2006) reported titres of laccase activity up to 32.1 IU/g dry wt after 10 d of cultivation for *P. ostreatus* under SSF on grapevine sawdust added with NH_4NO_3 (C:N = 40). Nandakumar et al. (1994) showed that the type of substrate available in wheat bran (starch or cellulose) causes sequential production of enzymes. They propose a mathematical model which gives the progression of substrate degradation (size reduction) during fermentation in terms of particle dimensions; our results agree with this point, since the present study suggests that exposure to different materials of sugar cane bagasse in particles with different size and geometry, affects laccase levels for both strains. Interestingly, a report by Tellez-Tellez et al. (2005) showed that for strains of *Pleurotus* belonging to the same species, differences in activity can be explained by the expression level of the same isoforms, rather than differential expression of laccase genes. These results were achieved comparing diverse strains under the same culture condition.

In the case of cellulases, both maximal CMCase (0.18 IU/g dry wt) and FPA activity (0.013 IU/g dry wt) were obtained for strain IE-8 in small particles (0.92 mm

diameter) with no AS added (Figs. 3 and 4). Other studies (Reddy et al., 2003) reported that CMCCase activity for *P. ostreatus* grown on banana waste reached 0.81 IU/g dry wt and almost nothing of FPA after 20 d. In the present study, both size particle and N source addition had an effect on CMCCase and FPase synthesis. Strain IE-8 produced CMCCase activity on 1.68 mm particles only with AS, whereas a strong increase was observed in FPA on small particles with no AS addition. However, the strongest effect of AS addition for strain CP-50 was detected in extracts obtained from large particles (Fig. 4). Blandino et al. (2002) have showed that both particle size and chemical composition of blends containing wheat grains and milled wheat affect the rate of microbial growth and therefore, the patterns observed by polysaccharides production in *Aspergillus awamori* after 7 d of cultivation at 30 °C. In relation to those observations, our results showed that enzymatic induction occurred to a different extend depending on particle sizes and the presence of AS, since sugar cane bagasse initially presented the same composition for every experiment.

Our results show that the geometrical ratio and size of sugar cane bagasse fibers strongly influence the profile of enzymatic activities. Sugar cane vascular beams exhibit a secondary wall, where a major fraction of rigid and cellulosic materials are located internally. Thus, in particles with greater *L/D* ratio, lignin is more abundant on the substrate surface; therefore the induction of laccases could be favored as shown for strain IE-8. It might be convenient to carry out some studies, based on cultures with periodic sampling, aimed at identifying variations intrinsically related to every strain. As mentioned above, variation in enzyme profiles attributed to strain differences have been

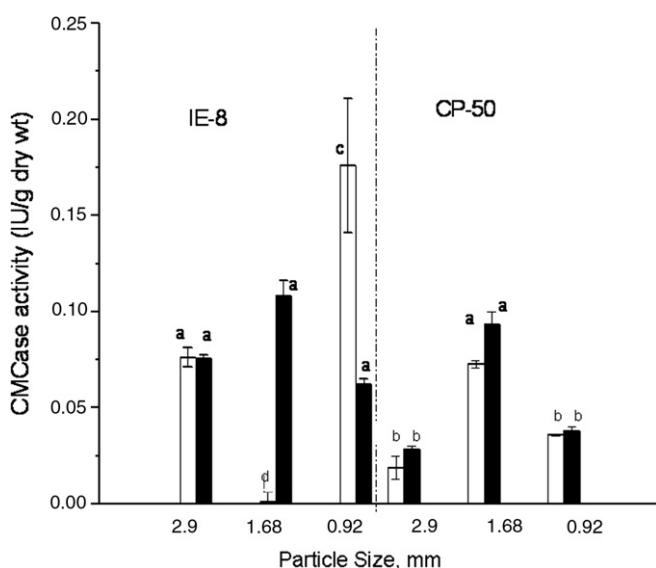


Fig. 3. CMCCase activity production by two strains of *P. ostreatus* grown on sugar cane bagasse after 8 d. Black bars correspond to ammonium sulphate addition. Means per column with different superscript letters are significantly different after a Duncan's test comparison ($p \leq 0.05$).

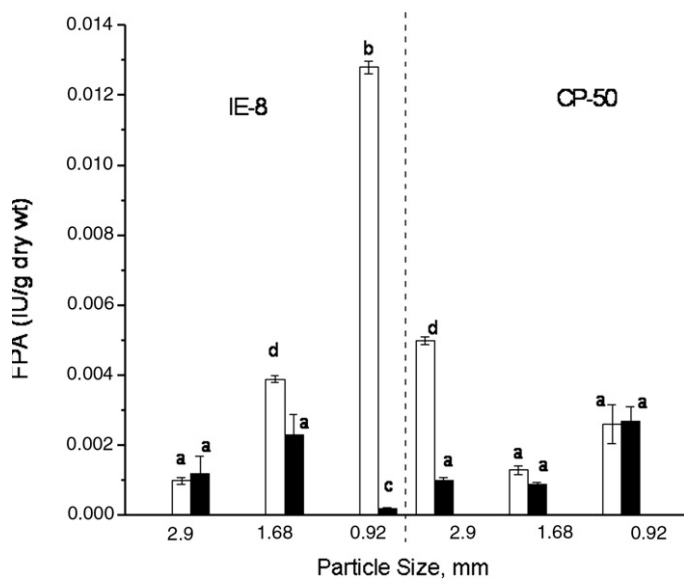


Fig. 4. FPAase production by two strains of *P. ostreatus* grown on sugar cane bagasse after 8 d. Black bars correspond to ammonium sulphate addition. Means per column with different superscript letters are significantly different after a Duncan's test comparison ($p \leq 0.05$).

reported (Tellez-Tellez et al., 2005; Arana et al., 2004; Reddy et al., 2003). In terms of enzyme synthesis response after AS addition, strain CP-50 was less sensitive than strain IE-8, which reveals that the regulatory effect of N depends also on differences inherent to every strain and it can not be assumed as a general feature. Finally, effect of particle size and addition AS was different for each strain: CP-50 showed the highest increase of protein content (48% on particle size of 1.68 mm) when compared to media with no additional N source. However, strain IE-8 produced the highest levels of all enzymes; in consequence these criteria should be considered when designing specific biotechnological applications.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of National Counsel of Science and Technology (CONACyT: Grant 61395 and Project 42782-Z).

References

- Arana, A., Téllez, A., Loera, O., Terrones, C., González, A., 2004. Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related *Polyporaceae* species under different culture conditions. *Journal of Basic Microbiology* 44, 79–87.
- Bassi, T., 2005. <<http://www.mejorpasto.com.ar/UNLZ/2004/TX4.htm>> (accessed 22.10.2005).
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., 2002. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 164–169.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.

- Campos, F.P., Sampaio, A.A.M., Bose, M.L.V., Vieira, P.F., Sarmiento, P., 2004. Evaluation of *in vitro* gas production of roughages and their mixtures using the curves subtraction method. *Animal Feed Science and Technology* 116, 161–172.
- Decker, S.R., Adney, W.S., Jennings, E., Vinzant, T.B., Himmel, M.E., 2003. Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 107, 689–704.
- Krishna Prasad, K., Venkata Mohan, S., Sreenivas Rao, R., Ranjan Pati, B.P.N., Sarma, P.N., 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochemical Engineering Journal* 24, 17–26.
- Loera, O., Córdova, J., 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archives of Biological Technology* 46, 177–181.
- Mc Cabe, W.L., Smith, J.C., Harriot, P., 2002. *Unit Operations in Chemical Engineering*, sixth ed. McGraw-Hill, pp. 1199.
- Miller, G.L., Blum, R., Glannon, W.E., Burton, A.L., 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* 2, 127–132.
- Nandakumar, M.P., Thakur, M.S., Raghavarao, K.S.M.S., Ghildyal, N.P., 1994. Mechanism of solid particle degradation by *Aspergillus niger* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry* 29, 545–551.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000. *Lehninger, Principios de Bioquímica*, third ed. Barcelona, España, Omega, pp. 1264.
- Novotný, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V., Molitoris, H.P., 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology* 89, 113–122.
- Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13, 81–84.
- Reddy, G.V., Ravindra Babu, P., Komaraiah, P., Roy, K.R.R.M., Kothari, I.L., 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor.caju*). *Process Biochemistry* 38, 1457–1462.
- SAGARPA, 2006. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. <<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>> (accessed 21.02.2006).
- Sainos, E., Díaz-Godínez, G., Loera, O., Montiel-González, A.M., Sánchez, C., 2006. Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Applied Microbiology Biotechnology* 72, 812–815.
- Seyis, I., Aksoz, N., 2005. Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources. *Food Technology and Biotechnology* 43, 37–40.
- Stajčić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E., Vukojević, J., 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (1–2), 65–73.
- 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, 220–231.
- Tellez-Tellez, M., Sanchez, C., Loera, O., Diaz-Godinez, G., 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase for *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters* 25, 1391–1394.
- Trinci, A.P.J., 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal of General Microbiology* 81, 225–236.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nostarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gómez, S., Díaz-Godínez, G., Augur, C., 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biotechnology Engineering Journal* 13, 157–167.
- Wolfenden, B.S., Willson, R.L., 1982. Radical cations as reference chromogens in studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate). *Journal Chemical Society, Perkin Trans, II*, 805–812.
- Zadrzil, F., Puniya, A.K., 1995. Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresource Technology* 54, 85–87.

México, DF a 30 de julio de 2008

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

“Efecto de la tipificación del bagazo de caña sobre el perfil de producción de enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*”

Que presentó: M. en C. Isabel de la Luz Membrillo Venegas

COMITÉ TUTORIAL

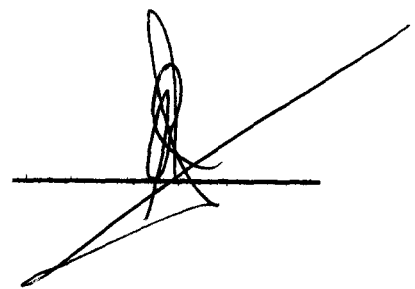
Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesora: Dra. Carmen Sánchez Hernández

JURADO:

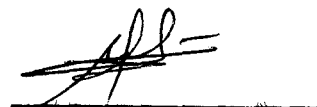
Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Secretaria: Dra. Carmen Sánchez Hernández
Universidad Autónoma de Tlaxcala



Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez
Universidad Autónoma de Tlaxcala



Vocal: Dr. Marcos Meneses Mayo
Colegio de Posgraduados

