

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**“OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO, PARA LA  
PRODUCCION DE ENZIMAS LIGNINOLITICAS, POR CEPAS  
FUNGICAS AISLADAS DEL ALTIPLANO BOLIVIANO”**

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIATURA EN  
BIOQUIMICA**

**POSTULANTE: PAMELA LAURA USNAYO GONZALES**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2007**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**“OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO, PARA LA  
PRODUCCION DE ENZIMAS LIGNINOLITICAS, POR CEPAS  
FUNGICAS AISLADAS DEL ALTIPLANO BOLIVIANO”**

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIATURA EN  
BIOQUIMICA**

**POSTULANTE: PAMELA LAURA USNAYO GONZALES**

**ASESORES: ENRIQUE TERRAZAS SILES Ph.D.  
MARIA TERESA ALVAREZ Ph.D.  
ALBERTO GIMENEZ TURBA Ph.D.**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2007**

*"De todo éxito, por pequeño  
que sea, surgirá un día un  
esfuerzo más grande  
que lo completará."*

*"Whitman"*



## *Dedicatoria*

*"A mis padres, Heriberto y Susana a quienes amo  
y admiro por la fortaleza que tienen, y les agradezco todo,  
porque a ellos debo lo que soy hoy en día y por estar  
siempre a mi lado apoyándome y confiando en mi"*



## *Agradecimientos*

*A Dios por haberme dado la vida y lo mejor de este mundo mi familia.*

*A la Universidad mayor de San Andrés, en especial a la facultad de Cs. farmacéuticas y Bioquímicas, por darme la oportunidad de convertirme en profesional.*

*A la cooperación del proyecto "Biodiversidad microbiana" del programa UMSA, ASDI-SAREC de Suecia, ya que sin su colaboración este trabajo no se habría realizado.*

*A la cooperación del IFS (Internacional Foundation for Science) por la colaboración brindada.*

*Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) por abrirme las puertas y darme la plena libertad de trabajar en este proyecto, por incentivarirme a salir adelante cada día.*

*Al Instituto de Investigaciones de Productos Químicos (IIDEPROQ) y todo su personal, por acogerme en sus instalaciones y brindarme la ayuda necesaria para realizar el presente trabajo.*

*Muy especialmente al Dr. Enrique Terrazas por ser un gran maestro en mi formación, por transmitirme sus conocimientos, por la paciencia, sobre todo por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo.*

*A la Dra. Teresa Alvarez por su paciencia, apoyo, toda la ayuda que me brindo para hacer realidad este trabajo, a pesar de ser una gran docente es una gran amiga, la cual agradezco haber encontrado.*

*Al Dr. Alberto Gimenez por abrirme las puertas del Instituto, por su constante apoyo, y por sacarse tiempo para brindarme su ayuda.*

*Al Ing. Cristhian Carrasco quien siempre me brindo su colaboración, por toda la confianza puesta en mi, apoyo y su sincera amistad brindada.*

*A la Ing. Daysy Torrico por su constante apoyo y confianza, más aun por su amistad.*

*A Karen Cabero por su amistad incondicional, su ayuda permanente, y por tus palabras de aliento.*

*A Laura Mendoza por su ayuda desinteresada, apoyo y consejos.*

*A todo el personal del IIFB Dra. Greis, Dr. Avila, Dra. Magui, Dra. Flores, Crispin, a mis compañeros Kenny, Neida, Efraín, Romina, Silvia, Luis, Juan, Lencho, Hugo, Marina, Carla, Guido, Nelson, Rosita, gracias por todos los momentos vividos, por la paciencia que me tuvieron, y por la amistad que nos une.*

*Gracias a todos mis amigos y amigas de la facultad de Bioquímica y Farmacia, de Ingeniería, a mis amigos del CBA, y otros, que si bien no escribo cada uno de sus nombres los llevo en mi corazón, gracias por todo el apoyo brindado y su amistad que alegra mi vida.*



## Abreviaturas

<b>ASDI/SAREC</b>	The Swedish International Development Agency / Swedish Agency for Research Cooperation
<b>ABTS</b>	2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)2NH <sub>4</sub> -salt
<b>BFP</b>	Bifenilos policlorados
<b>°C</b>	Grados centigrados
<b>CMC</b>	Carboxi – Metil – Celulosa
<b>DMF</b>	Dimethoxyphenol
<b>DNS</b>	Acido 3,5 Dinitrosalicilico
<b>g</b>	Gramos
<b>IB</b>	Ingeniería y Bioquímica
<b>IIDPROQ</b>	Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos
<b>IIFB</b>	Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>IUB</b>	International Union of Biochemistry
<b>KDa</b>	Kilo Daltons
<b>L</b>	Litros
<b>Lac</b>	Lacasa
<b>LiP</b>	Lignina peroxidasa
<b>M</b>	Concentración molar
<b>MnP</b>	Manganeso peroxidasa
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetro
<b>PB</b>	Podredumbre blanca
<b>PCF</b>	Pentaclorofenol
<b>PDA</b>	Papa dextrosa agar
<b>PV</b>	Peroxidasa versátil
<b>PHA</b>	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µmol</b>	Micromol
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>UI</b>	Unidad Internacional



# Índice de Contenido

<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>12</b>
<i>1.1 OBJETIVOS.....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.1 Objetivo General.....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.2 Objetivos Específicos.....</i>	<i>13</i>
<i>1.3 JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION.- .....</i>	<i>14</i>
<b>2. MARCO TEORICO CONCEPTUAL.- .....</b>	<b>17</b>
<i>2.1 LA LIGNINA.- .....</i>	<i>17</i>
<i>2.1.1 Estructura y biodegradación de la molécula de lignina.- .....</i>	<i>17</i>
<i>a. Propiedades físicas.....</i>	<i>19</i>
<i>b. Ligninas comercializadas .....</i>	<i>20</i>
<i>2.1.2 Funciones de la lignina.- .....</i>	<i>20</i>
<i>2.2 DEGRADACION DE LA LIGNINA POR HONGOS.- .....</i>	<i>20</i>
<i>2.2.1 Hongos.- .....</i>	<i>21</i>
<i>a. Características generales.-.....</i>	<i>21</i>
<i>b. Estructura.- .....</i>	<i>22</i>
<i>c. Hábitat.- .....</i>	<i>24</i>
<i>d. Reproducción.-.....</i>	<i>24</i>
<i>e. Clasificación.- .....</i>	<i>25</i>
<i>f. Fisiología de los Hongos.- .....</i>	<i>25</i>
<i>g. Hongos ligninolíticos.- .....</i>	<i>27</i>
<i>2.3 ENZIMAS.-.....</i>	<i>27</i>
<i>2.3.1 Estructura y características generales.-.....</i>	<i>28</i>
<i>a. Especificidad.-.....</i>	<i>28</i>
<i>b. Actividad Enzimática.- .....</i>	<i>28</i>
<i>c. Cinética de reacción (Michaelis-Menten).- .....</i>	<i>28</i>
<i>d. Temperatura.- .....</i>	<i>29</i>
<i>e. pH.- .....</i>	<i>29</i>
<i>f. Clasificación Internacional de las enzimas.- .....</i>	<i>29</i>
<i>2.3.2 Enzimas ligninolíticas.-.....</i>	<i>30</i>
<i>a. Peroxidasas ligninolíticas.-.....</i>	<i>30</i>
<i>b. Lacasas.-.....</i>	<i>32</i>
<i>2.3.3 Aspectos biotecnológicos.-.....</i>	<i>34</i>
<i>2.4 RECURSOS LIGNOCELULOSICOS.- .....</i>	<i>36</i>
<i>2.4.1 Paja Brava.- .....</i>	<i>37</i>



2.4.2 Bagazo.- .....	38
2.4.3 Aserrín.- .....	38
2.4.4 Residuos de quinua real.- .....	39
2.4.5 Cáscara de arroz.- .....	40
<b>3. METODOS.- .....</b>	<b>41</b>
3.1 RECOLECCION DE MUESTRAS.- .....	43
3.2 METODOS DE AISLAMIENTO DE CEPAS FUNGICAS.- .....	45
3.2.1. Codificación de cepas fúngicas aisladas.- .....	48
3.3 METODOS DE IDENTIFICACION DE CEPAS FUNGICAS.- .....	49
3.3.1 Identificación Macroscópica.- .....	49
3.3.2 Identificación Microscópica.- .....	50
3.3.3 Elaboración de Historial de cepas fúngicas.- .....	52
3.4 METODOS DE DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.- .....	52
3.4.1 Determinación Cualitativa.- .....	52
3.4.2 Determinación Cuantitativa.- .....	55
a. Manganeso Peroxidasa.- .....	60
b. Lignina Peroxidasa.- .....	61
c. Lacasa.- .....	62
3.4.3 Cuantificación de las Enzimas.- .....	63
3.5 OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRDUCCION DE ENZIMAS LIGNINOLITICAS.- .....	63
3.5.1 Medios de cultivo con variación de concentración de Cobre.- .....	64
3.5.2 Medios de cultivo con diferentes sustratos lignocelulosicos.- .....	65
3.6 Determinación de Actividad Celulolítica.- .....	66
3.7 Cuantificación de proteínas totales.- .....	67
3.8 Comparación de la Actividad Enzimática Ligninolítica de las enzimas producidas frente a enzimas comerciales.- .....	68
3.9 Análisis estadístico.- .....	69
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>70</b>
4.1 DETERMINACION CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA LIGNINOLITICA.- .....	70
4.2. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA LIGNINOLITICA.- .....	71
4.2.1. Manganeso Peroxidasa.- .....	71
4.2.2. Lignina Peroxidasa.- .....	76
4.2.3. Lacasa.- .....	81





<b>4.3. OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRDUCCION DE ENZIMAS</b>	
<b>LIGNINOLITICAS.-</b> .....	<b>87</b>
<b>4.3.1 Medios de cultivo con variación de concentración de Cobre.-</b> .....	87
<b>a. Manganeso Peroxidasa.-</b> .....	88
<b>b. Lignina Peroxidasa.-</b> .....	92
<b>c. Lacasa.-</b> .....	95
<b>4.3.2. Medios de cultivo con diferentes sustratos lignocelulosicos.-</b> .....	100
<b>I. Paja Brava.-</b> .....	101
<b>a. Manganeso Peroxidasa.-</b> .....	101
<b>b. Lignina Peroxidasa.-</b> .....	102
<b>c. Lacasa.-</b> .....	103
<b>II. Bagazo.-</b> .....	105
<b>a. Manganeso Peroxidasa.-</b> .....	105
<b>b. Lignina Peroxidasa.-</b> .....	107
<b>c. Lacasa.-</b> .....	108
<b>III. Aserrín.-</b> .....	110
<b>a. Manganeso Peroxidasa.-</b> .....	110
<b>b. Lignina Peroxidasa.-</b> .....	111
<b>c. Lacasa.-</b> .....	112
<b>IV. Residuos de Quinoa Real.-</b> .....	114
<b>a. Manganeso Peroxidasa.-</b> .....	114
<b>b. Lignina Peroxidasa.-</b> .....	115
<b>c. Lacasa.-</b> .....	116
<b>V. Cáscara de Arroz.-</b> .....	118
<b>a. Manganeso Peroxidasa.-</b> .....	118
<b>b. Lignina Peroxidasa.-</b> .....	119
<b>c. Lacasa.-</b> .....	121
<b>4.4. Determinación de Actividad Celulolítica.-</b> .....	<b>122</b>
<b>4.5. Determinación de proteínas totales.-</b> .....	<b>123</b>
<b>4.6. Comparación de la Actividad Enzimática Ligninolítica de las enzimas producidas frente a enzimas comerciales.-</b> .....	<b>124</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>127</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>131</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>132</b>



# Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Estructura parcial de la lignina.....	19
<i>Figura 2.</i> Corte esquemático de un hongo de la clase basidiomiceto y orden de los agaricales. ....	23
<b><i>Figura 3.</i> Procedimiento general “Producción de enzimas ligninolíticas, a partir de cepas fúngicas del Altiplano boliviano”.</b> ....	42
<b><i>Figura 4.</i> Orillas del Lago Titicaca en la localidad de Llamacachi.</b> .....	43
<b><i>Figura 5.</i> Orillas del Río Desaguadero en el departamento de Oruro.</b> .....	43
<i>Figura 6.</i> Paja Brava a orillas del río Desaguadero. ....	44
<b><i>Figura 7.</i> Suelo donde crece la planta Paja Brava a orillas del lago Titicaca.</b> .....	44
<b><i>Figura 8.</i> Métodos de aislamiento de las cepas fúngicas.</b> .....	46
<b><i>Figura 9.</i> Tronco de madera que contiene cepas fúngicas, recolectada de orillas del lago Titicaca.</b> .....	47
<b><i>Figura 10.</i> Preparación de medio Papa Dextrosa Agar (PDA).</b> .....	47
<i>Figura 11.</i> Cepas fúngicas en crecimiento a temperatura ambiente.....	48
<b><i>Figura 12.</i> Morfología macroscópica de la cepa fúngica</b> .....	50
<i>Figura 13.</i> Identificación microscópica .....	51
<b><i>Figura 14.</i> Morfología microscópica</b> .....	52
<b><i>Figura 15.</i> Preparación de medio ABTS y Poli – R.</b> .....	53
<b><i>Figura 16.</i> Decolorización del medio sólido Poly R</b> .....	54
<b><i>Figura 17.</i> Decolorización del medio sólido ABTS.</b> .....	54
<b><i>Figura 18.</i> Estructura generaliza de ABTS (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)·2NH<sub>4</sub>-salt)</b> .....	55
<b><i>Figura 19.</i> Determinación cualitativa de la actividad enzimática ligninolítica.</b> .....	56
<i>Figura 20.</i> Fotografía del equipo Espectrofotómetro de absorción.....	58



<i>Figura 21.</i> Medio de cultivo Mn (II) para determinación cuantitativa.....	58
<b><i>Figura 22.</i> Determinación actividad enzimática ligninolítica por métodos espectrofotométricos.</b> .....	59
<i>Figura 23.</i> Reacción enzimática para MnP por oxidación de 2,6 dimetoxifenol.....	60
<b><i>Figura 24.</i> Reacción enzimática para LiP por oxidación de ABTS.</b> .....	61
<b><i>Figura 25.</i> Reacción enzimática para Lac por oxidación de ABTS.</b> .....	62
<b><i>Figura 26.</i> Diagrama determinación enzimática en medio de cultivo Cu (II).</b> .....	64
<b><i>Figura 27.</i> Determinación enzimática en medios de cultivo con diferentes sustratos.</b> 66	
<b><i>Figura 28.</i> Determinación de la actividad Celulolítica.</b> .....	67
<b><i>Figura 29.</i> Determinación de proteínas totales.</b> .....	68
<b><i>Figura 30.</i> Determinación de la actividad enzimática de enzimas comerciales.</b> .....	69
<b><i>Figura 31.</i> Actividad enzimática Manganeso peroxidasa para la cepa fúngica IB-26C (<i>Trinacrium</i>) de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn.</b> .....	73
<b><i>Figura 32.</i> Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad MnP para la cepa fúngica IB-26C (<i>Trinacrium</i>)</b> .....	74
<b><i>Figura 33.</i> Efecto de la glucosa y Mn sobre la actividad MnP para la cepa fúngica IB-26C (<i>Trinacrium</i>)</b> .....	75
<b><i>Figura 34.</i> Actividad enzimática Lignina peroxidasa para la cepa fúngica IB-26C (<i>Trinacrium</i>) de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn.</b> .....	77
<b><i>Figura 35.</i> Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad LiP para la cepa fúngica IB-26C (<i>Trinacrium</i>)</b> .....	79
<b><i>Figura 36.</i> Efecto de la glucosa y Mn sobre la actividad LiP para la cepa fúngica IB-26C (<i>Trinacrium</i>)</b> .....	80
<b><i>Figura 37.</i> Actividad enzimática Lacasa para la cepa fúngica IB-29B (<i>Blastomyces</i>) de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn.</b> .....	83
<b><i>Figura 38.</i> Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad Lacasa</b>	



para la cepa fúngica IB-29B ( <i>Blastomyces</i> ).....	85
<b>Figura 39. Efecto de la glucosa y Mn sobre la actividad Lacasa para la cepa fúngica IB-29B (<i>Blastomyces</i>).</b> .....	85
<i>Figura 40. Actividad enzimática Manganeso peroxidasa para la cepa fúngica IB-29B (<i>Blastomyces</i>) de 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Cu.</i> .....	89
<b>Figura 41. Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad MnP para la cepa fúngica IB-29B (<i>Blastomyces</i>).</b> .....	90
<b>Figura 42. Efecto de la glucosa y Cu sobre la actividad MnP para la cepa fúngica IB-29B (<i>Blastomyces</i>).</b> .....	91

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación Internacional de las enzimas.....	30
Tabla 2. Características principales de enzimas ligninolíticas .....	34

## RESUMEN

Las enzimas ligninolíticas junto a las enzimas celulolíticas son importantes en los procesos de fermentación *in situ*. En este trabajo se realizó la producción de enzimas ligninolíticas Manganeso Peroxidasa (MnP), Lignino Peroxidasa (LiP) y Lacasa a partir de hongos aislados de muestras recolectadas del Altiplano Boliviano. De un total de 31 hongos, 4 cepas fúngicas presentaron actividad ligninolítica cualitativa determinada por Poly R-478 y ABTS. Las cepas que presentaron mayor actividad fueron: IB-29B (*Blastomyces*), IB-18Cb (*Bdellospora*), IB-26C (*Trinacrium*), IB-15Da (*Cephalosporium*).

Para la optimización de la producción de estas enzimas se desarrollo un diseño factorial  $2^3$  con dos diferentes concentraciones glucosa o sustratos lignocelulósicos paja brava, bagazo,



aserrín, residuo de quinua, cascarilla de arroz, extracto de levadura, manganeso o cobre. La cuantificación de enzimas ligninolíticas fue determinado espectrofotométricamente por oxidación de ABTS y 2,6 DMF. La máxima actividad enzimática fue de 245,56 UI/L para MnP, de 487,82 UI/L para LiP y de 287,30 UI/L Lacasa.

**Palabras Claves:** Enzimas ligninolíticas, manganeso peroxidasa, lignino peroxidasa, lacasa.



## **ABSTRACT**

The ligninolytic and cellulolytic enzymes are important in fermentation processes *in situ*. In this thesis three kind of ligninolytic enzyme has been produced, Manganese peroxidase (MnP), Lignin Peroxidase (LiP) and Laccase from fungi isolated using samples collected of the Bolivian Andean High Plateau. Thirty one fungal strains were isolated, four fungal strains showed a qualitative ligninolytic activity by Poly R-478 and ABTS. The strains that presented greater activity were: IB-29B (*Blastomyces*), IB-18Cb (*Bdellospora*), IB-26C (*Trinacrium*), IB-15Da (*Cephalosporium*).

In order to optimize the production of these enzymes a factorial design  $2^3$  was developed with two different concentrations of lignocellulosic material such as brave straw, bagasse, sawdust, remainder of quinua, husk of rice or glucose, yeast extract, manganese or copper.



The ligninolíticas enzyme quantification was determined spectrophotométrically by oxidation of ABTS and 2.6 DMP. The greater enzymatic activity was of 245.56 UI/L for MnP, 487.82 UI/L for LiP and 287, 30 UI/L for Lacasa.

Key words: Ligninolíticas enzymes, manganese peroxidasa, lignino peroxidasa, laccasa.

## **1. INTRODUCCION**

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, proteínas que tienen la capacidad de acelerar ciertas reacciones químicas. En los últimos años su uso en gran cantidad de industrias ha adquirido gran relevancia. El desarrollo de técnicas y métodos para el desarrollo de estos procesos han sido un importante requisito para el avance en la enzimología en las últimas tres décadas y por muchos es considerada un arte [17, 11].

Actualmente en Bolivia, la producción de enzimas viene desarrollándose por los métodos de la biotecnología clásica que incluye dos etapas principales: fermentación, en la que se multiplica el microorganismo productor de la enzima, y la de recuperación y purificación, en la que se aísla la enzima y se lleva al grado de pureza adecuado para su uso,



éste último en plena proyección, cuyo pionero es el Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas desde el año 1999.

Diversas investigaciones sobre producción de enzimas ligninolíticas; Lignina peroxidasa, Manganese peroxidasa y Lacasa, obtenidos a partir de cultivos fúngicos, han ayudado a lograr un mayor entendimiento sobre las cualidades que éstas brindan, cuyas aplicaciones industriales son variadas, basta mencionar algunas: relacionadas con procesos de deslignificación, detoxificación de suelos y efluentes industriales, versátil y atractivo para fines ambientales porque puede servir para eliminar diversos contaminantes difíciles de degradar, como los hidrocarburos del petróleo, plaguicidas, explosivos, colorantes sintéticos que se utilizan en la industria textil y otros compuestos que son tóxicos para la flora, fauna y el hombre.

La finalidad del presente estudio fue investigar la capacidad de producción de enzimas ligninolíticas por los hongos del Altiplano boliviano y encontrar mayores rendimientos de actividad enzimática ligninolítica, mediante la optimización de condiciones de cultivo a través del establecimiento de diseños factoriales de los diferentes componentes del medio

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General**

- Optimizar medios de cultivo para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fúngicas aisladas del Altiplano boliviano.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Aislar cepas fúngicas a partir de muestras recolectadas de las regiones cercanas al lago Titicaca y río Desaguadero a través de técnicas de aislamiento axénico.
- Identificar y caracterizar taxonómicamente las cepas fúngicas aisladas.



- Seleccionar cepas fúngicas capaces de producir enzimas con actividad ligninolítica (Manganeso peroxidasa, Lignina peroxidasa, Lacasa) a través de un método cualitativo (Poly- R y ABTS).
- Optimizar la producción de enzimas ligninolíticas a través de un diseño factorial  $2^3$ , considerando la variación de glucosa, manganeso, extracto de levadura como nutrientes que influyen en la síntesis de enzimas ligninolíticas.
- Optimizar la producción de enzimas ligninolíticas a través de un diseño factorial  $2^3$ , considerando la variación de glucosa, cobre, extracto de levadura como nutrientes que influyen en la síntesis de enzimas ligninolíticas.
- Evaluar medios de cultivo complejos con diferentes sustratos lignocelulósicos como paja, bagazo, aserrín, residuos de quinua, cáscara de arroz en base las condiciones optimizadas de extracto de levadura y manganeso, para la determinación de enzimas ligninolíticas.
- 

### **1.3 JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION**

La lignina en la madera confiere una protección física a la celulosa y hemicelulosa contra el ataque enzimático. Existe una gran cantidad de organismos (bacterias y hongos) con enzimas hidrolíticas necesarias para degradar celulosa y hemicelulosa, pero en lo referente al ataque y mineralización de la lignina el número de organismos es mucho más limitado. Los únicos organismos descritos con la capacidad de degradar y mineralizar la lignina son un grupo de basidiomicetes causantes de pudrición blanca [4]. Estos hongos, poseen un complejo de enzimas oxidasas y peroxidadas que catalizan las primeras reacciones que rompen uniones dentro de la compleja molécula de la lignina, generando moléculas más pequeñas [5], y luego hay una incorporación de estos productos de degradación a los ciclos metabólicos del





organismo que como producto final dan CO<sub>2</sub> [3].

Después de los polisacáridos, la lignina es el polímero orgánico más abundante en el mundo vegetal. Es importante destacar que la lignina es la única fibra no polisacárido que se conoce [16]. El conocimiento del proceso de biodegradación de la lignina es importante para comprender aspectos claves del ciclo bioquímico del carbono en la Tierra, dado que la mayor parte del carbono y la energía fijados por fotosíntesis se acumulan en la molécula de celulosa, un polímero de glucosa que es el constituyente mayoritario de la biomasa vegetal y que está íntimamente ligado a la lignina en las plantas [9].

Sin duda, uno de los grandes retos de la humanidad en este inicio del siglo XXI es el convertir los procesos productivos en procesos limpios y eficientes energéticamente. Por otro lado, se quiere tener la capacidad tecnológica para restaurar los sitios dañados ambientalmente, La biotecnología tiene un papel importante que desempeñar en esta transformación tecnológica. La investigación deberá estar enfocada en al utilización de nuevas herramientas biotecnológicas para la prevención, control y remediación de las contaminaciones ambientales [12].

Este sistema ligninolítico, ha demostrado ser muy versátil y atractivo para fines ambientales, porque puede servir para eliminar diversos contaminantes difíciles de degradar, como los hidrocarburos del petróleo, plaguicidas, explosivos, colorantes sintéticos que se utilizan en la industria textil y otros compuestos que son tóxicos para la flora, fauna y el hombre [8].

Todos los mencionados anteriormente son compuestos muy contaminantes y los sistemas actualmente implantados para su depuración se basan en la aplicación de tratamientos físicos o químicos, la mayoría de los cuales son caros [12]. El tratamiento biológico representa una alternativa atractiva. En este sentido, los hongos ligninolíticos se han estudiado como posibles agentes para tales procesos debido a que sus sistemas enzimáticos extracelulares inespecíficos les permite degradar diversos tipos de sustancias recalcitrantes. La capacidad de estos microorganismos para degradar distintos tipos de compuestos



contaminantes ha sido demostrada [10].

Adicionalmente, las enzimas ligninolíticas pueden ser aplicadas como indicadores del deterioro de jugos y vinos y para la síntesis químico-enzimática de nuevos antibióticos y alcaloides [8]. Además tienen amplias aplicaciones industriales; actualmente, las enzimas son empleadas principalmente para la obtención de lácteos, edulcorantes, fármacos, alimentos, licores, detergentes, etc. [11].

Por otro lado, uno de los problemas que encara el mundo es el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles no renovables. Al mismo tiempo, el consumo de energía aumenta a ritmos cada vez más crecientes. De otro lado, el consumo global de combustibles genera enormes cantidades de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera. Este tipo de contaminación ha causado cambios en el clima del planeta, por lo que se ha convertido en una de las problemáticas que mas preocupan a los gobiernos. La única forma de encarar esta problemática es mediante de recursos energéticos renovables. Para ello la biotecnología ofrece múltiples alternativas tecnológicas. Una solución renovable es el uso de energía solar en forma de biomasa, la cual esta representada en los materiales lignocelulósicos y en cultivos de plantas ricas en energía [13].

Los hongos causantes de la pudrición blanca están adaptados a una amplia variedad de desechos lignocelulósicos, tales como paja brava, bagazo de caña de azúcar, aserrín, residuos de quinua, cáscara de arroz, entre otros. La producción de estas enzimas es importante en el proceso de biodegradación de los mencionados sustratos lignocelulósicos, ya que son muy poco aprovechados, pero no seria posible la utilización de estos como materia prima para la producción de alcohol, sin la intervención de enzimas como las ligninolíticas y de enzimas celulolíticas [15].

En este sentido en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), con el apoyo de la cooperación Sueca ASDI/SAREC, en el proyecto “Biodiversidad Microbiana”



conjuntamente con el Instituto de Investigaciones y Desarrollo de Procesos Químicos (IIDEPROQ), con la colaboración del IFS (Internacional Foundation for Science) debido al alto costo de este tipo de enzimas comerciales se toma la iniciativa de producir enzimas ligninolíticas, requiriendo identificar al hongo capaz de producir dichas enzimas.

El presente estudio de investigación se enfoca íntegramente en la producción de enzimas ligninolíticas, a partir de hongos aislados de muestras recolectadas del Altiplano boliviano, en el cual se verifica cualitativamente a la cepa fúngica capaz de producir este tipo de enzimas redox, utilizando medios sólidos que tiene como indicadores Poly-R y ABTS, posteriormente se desarrollara diseño factorial  $2^3$  con dos diferentes concentraciones de los nutrientes: glucosa o sustratos lignocelulósicos (paja brava, bagazo, aserrín, residuo quinua, cáscara arroz), extracto de levadura, manganeso o cobre, se tomen en cuenta las unidades de color y el consumo de sustrato sintéticos como ABTS y 2,6 DMF por oxidación, los cuales fueron determinados por métodos espectrofotométricos, la posterior purificación y aplicación de dicha enzima en diferentes procesos ya descritos, se realizara en trabajos posteriores.

## **2. MARCO TEORICO CONCEPTUAL**

### ***2.1 LA LIGNINA***

La palabra lignina proviene del término latino *lignum*, que significa madera; así, a las plantas que contienen gran cantidad de lignina se las denomina “leñosas” [16]. La lignina está en las plantas, íntimamente ligada a la celulosa, constituyente mayoritario a su vez de la biomasa vegetal. Actúa como pegamento entre las fibras vegetales, recubre y protege a las moléculas de celulosa en la pared de las fibras [9].

#### ***2.1.1 Estructura y biodegradación de la molécula de lignina***



La lignina, después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y forma más abundante de material aromático en la biosfera. La composición química de la madera y otros tejidos vasculares es muy variable. Se compone principalmente de celulosa, lignina, hemicelulosa, y de un 5% a un 10% de otros materiales. La lignina representa entre un 16 % hasta un 33% del peso según el tipo de madera u otro tejido lignocelulósico [19]. La mayor parte de esta se encuentra dentro de las paredes celulares, entremezclada con las hemicelulosas y formando una matriz que rodea las ordenadas microfibrillas de celulosa. Este compuesto provee de rigidez a las plantas superiores ya que actúa como pegamento entre las fibras de celulosa formando la lámina media [5]. Además, protege a los carbohidratos fácilmente degradables (celulosa, hemicelulosa) de la hidrólisis enzimática microbiana [12].

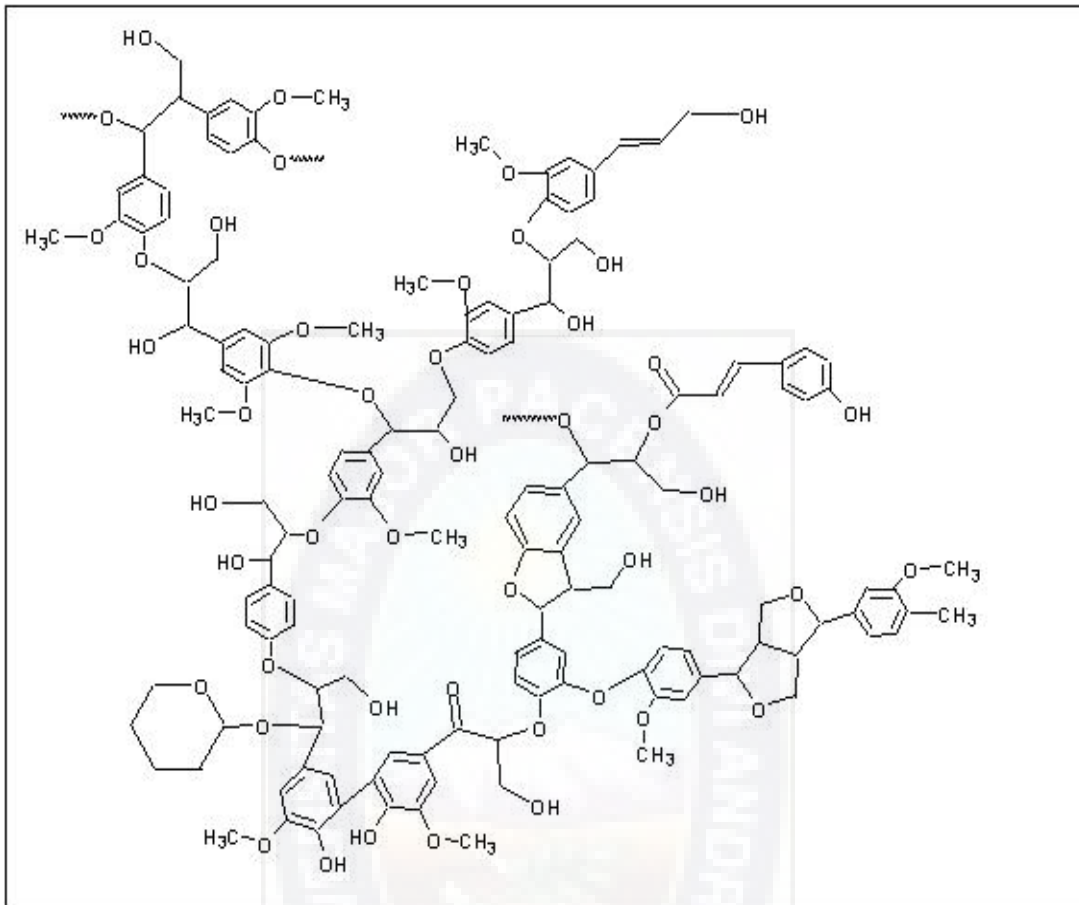
Una estructura química representativa de la lignina se muestra en la figura 1. Este biopolímero contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilo fenolitos que le confieren rigidez a la pared celular de las plantas y además las protege del ataque de organismos patógenos [12, 19].

Biosintéticamente, la lignina proviene de tres alcoholes precursores: el alcohol p-hidroxicinámico (cumarílico), el alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico (coniferílico) y el alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico. La copolimerización por radicales libres de estos alcoholes, iniciada por peroxidasa vegetales, da lugar al polímero de lignina [5].

Químicamente este polímero es heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo, y altamente ramificado [12].

La lignina es un caso especial en el que la biodegradabilidad depende de la disponibilidad de oxígeno. A menudo no existe una degradación sustancial por que la mayoría de los hongos filamentosos que degradan lignina, pueden actuar solo en presencia de oxígeno [22].





**Figura 1. Estructura parcial de la lignina**

Fuente: Rev Temuco Universidad de la Frontera [20].

Las características estructurales de este heteropolímero vegetal imponen ciertas restricciones para su biodegradación. Definiendo a una molécula de lignina con un peso molecular de entre 600-1000 kDa, es evidente que su tamaño le impide poder ser degradada intracelularmente [7, 9]. Además por el tipo de enlaces covalentes que presenta (aril-eter, aril-aril y carbono-carbono) y su heterogeneidad, no puede ser degradado por mecanismos típicos de hidrólisis [21]. Por lo tanto, cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben ser además de extracelulares, no hidrolíticas y bastante inespecíficas.

### ***a. Propiedades físicas***



Las ligninas son polímeros insolubles en ácidos y en álcalis fuertes, que no se digieren ni se absorben y tampoco son atacados por la microflora del colon. Pueden ligarse a los ácidos biliares y otros compuestos orgánicos (por ejemplo, colesterol), retrasando o disminuyendo la absorción en el intestino delgado de dichos componentes. El grado de lignificación afecta notablemente a la digestibilidad de la fibra [19]. La lignina, que aumenta de manera ostensible en la pared celular de la planta con el curso de la maduración, es resistente a la degradación bacteriana, y su contenido en fibra reduce la digestibilidad de los polisacáridos fibrosos.

### ***b. Ligninas comercializadas***

Sólo existen dos tipos de lignina comercialmente disponibles: las ligninas sulfonadas y las kraft ligninas. La capacidad de elaboración de productos de lignina en el mundo oriental es aproximadamente de 1,4106 toneladas/año. Sólo una compañía produce kraft ligninas; las restantes producen ligninas sulfonadas. Los productos de lignina han empezado a tener una importancia creciente en distintas aplicaciones industriales [19].

### ***2.1.2 Funciones de la lignina.-***

La lignina realiza múltiples funciones que son esenciales para la vida de las plantas. Por ejemplo, posee un importante papel en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos. Proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células de la madera, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones y flexiones. Realmente, los tejidos lignificados resisten el ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular.

## ***2.2 DEGRADACION DE LA LIGNINA POR HONGOS***

Los biocatalizadores o enzimas pueden ser obtenidos de animales, plantas, sin embargo la fuente mas importante constituyen los microorganismos como las bacterias, hongos y levaduras. El 90% de las enzimas empleadas industrialmente son de origen microbiano. Los microorganismos son fácilmente cultivables industrialmente bajo condiciones controladas y por lo tanto las enzimas son obtenidas con un buen rendimiento y de manera



constante. Además los microorganismos son productores inducibles y en algunos casos constitutivos de enzimas [29].

Existe un limitado número de microorganismos que producen esta clase de enzimas, principalmente hongos y bacterias, las enzimas ligninolíticas que se encuentran en el mercado principalmente provienen de cepas fúngicas, de esta forma las cepas fúngicas son un grupo de interés en la producción de enzimas. Hasta hoy día se conoce una sola clase de seres vivos capaces de degradar eficientemente lignina. Se trata de los hongos *Basidiomicetes*, denominados "pudrición blanca", ya que producen un blanqueamiento de la madera al degradar la lignina [20].

En este sentido debido a sus propiedades ya descritas, nos interesa estudiar las diferentes propiedades de los hongos.

## **2.2.1 Hongos**

### **a. Características generales**

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas [24].

Son un grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes. Los alimentos se disuelven mediante enzimas que secretan los hongos; después se absorben a través de la fina pared de la célula y se distribuyen por difusión simple en el protoplasma. Junto con las bacterias, los hongos son los causantes de la putrefacción y descomposición de toda la materia orgánica. Hay hongos en cualquier parte en que existan otras formas de vida. Algunos son parásitos de organismos vivos y producen graves enfermedades en plantas y animales. La disciplina científica que estudia los hongos se



llama micología.

Los hongos figuraban en las antiguas clasificaciones como una división del reino Plantas (*Plantae*). Se pensaba que eran plantas carentes de tallos y de hojas que, en el transcurso de su transformación en organismos capaces de absorber su alimento, habían perdido la clorofila, y con ello, su capacidad para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, en la actualidad los científicos los consideran un grupo completamente separado, que evolucionó a partir de flagelados sin pigmentos. Ambos grupos se incluyen dentro del reino Protistas, o bien se coloca a los hongos como un reino aparte, debido a la complejidad de su organización (ver clasificación más adelante). Hay unas cien mil especies conocidas de hongos. Se cree que los grupos más complejos derivan de los tipos más primitivos, los cuales tienen células flageladas en alguna etapa de su ciclo vital [25].

### ***b. Estructura.-***

Los hongos se diferencian en inferiores y superiores. Los inferiores son los que no se pueden ver a simple vista, teniendo que utilizar un microscopio para su observación, de aquí que se llamen también hongos microscópicos. Los superiores o macroscópicos, son las populares setas que se recolectan al bosque, y que en realidad se trata de la parte fructífera del hongo, figura 2-3 [24].

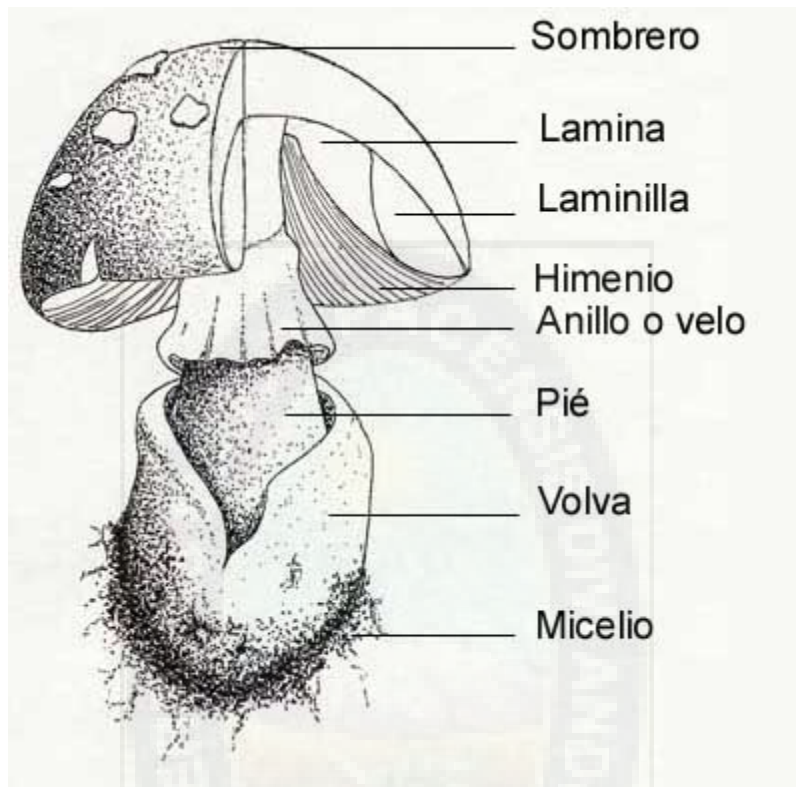
La pared celular de los hongos posee diferentes constituyentes químicos como ser polisacáridos, proteínas, lípidos y otras sustancias. La constitución varía entre las diferentes especies. También varía con la edad del hongo, ya que sustancias que pueden estar presentes en las hifas jóvenes, desaparecen en las más viejas o depositar otros materiales y enmascarar la presencia de constituyentes iniciales, también la composición del medio, el pH y la temperatura, influyen en la composición de las paredes de los hongos [25].

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que





ostenta el centro de cada septo.



**Figura 2.** Corte esquemático de un hongo de la clase basidiomiceto y orden de los agaricales.

Fuente: El reino de los hongos [24].

No obstante, hay un filo de hongos, que se asemejan a algas, cuyas hifas generalmente no tienen septos y los numerosos núcleos están esparcidos por todo el protoplasma. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio. Cuando el micelio se desarrolla puede llegar a formar grandes cuerpos fructíferos ya anteriormente mencionados, tales como las setas y los pedos o cuescos de lobo. Otros tipos de enormes estructuras de hifas permiten a algunos hongos sobrevivir en condiciones difíciles o ampliar sus fuentes nutricionales. Las fibras, a modo de cuerdas, del micelio de la armilaria color de miel (*Armillaria mellea*), facilitan la propagación de esta especie de un árbol a otro [27].



### ***c. Hábitat.-***

Los hongos están muy distribuidos en todos los ecosistemas, desde 0 a 25°C, aunque pocos a 0°C y con un máximo de 50°C. para los hongos del suelo el óptimo se ubica entre 20-30°C, en pH muy variados: el óptimo estaría de Ph 6 y dominan en ambientes ácidos [25]. La luz esencial para la esporulación de muchas especies [25].

### ***d. Reproducción.-***

La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular. El champiñón silvestre puede formar doce mil millones de esporas en su cuerpo fructífero; así mismo, el pedo o cuesco de lobo gigante puede producir varios billones.

Las esporas se forman de dos maneras. En el primer proceso, las esporas se originan después de la unión de dos o más núcleos, lo que ocurre dentro de una o de varias células especializadas. Estas esporas, que tienen características diferentes, heredadas de las distintas combinaciones de genes de sus progenitores, suelen germinar en el interior de las hifas. Los cuatro tipos de esporas que se producen de esta manera (oosporas, zigosporas, ascosporas y basidiosporas) definen los cuatro grupos principales de hongos. Las oosporas se forman por la unión de una célula macho y otra hembra; las zigosporas se forman al combinarse dos células sexuales similares entre sí. Las ascosporas, que suelen disponerse en grupos de ocho unidades, están contenidas en unas bolsas llamadas ascas. Las basidiosporas, por su parte, se reúnen en conjuntos de cuatro unidades, dentro de unas estructuras con forma de maza llamadas basidios [27].

El otro proceso más común de producción de esporas implica la transformación de las hifas en numerosos segmentos cortos o en estructuras más complicadas de varios tipos. Este proceso sucede sin la unión previa de dos núcleos. Los principales tipos de esporas



reproductivas formadas así son: oídios, conidios y esporangiosporas. Estas últimas se originan en el interior de unos receptáculos, parecidos a vesículas, llamados esporangios. La mayoría de los hongos producen esporas sexuales y asexuales.

### ***e. Clasificación.-***

Existen dos tipos de clasificaciones:

#### **Según la forma de los órganos productores de esporas**

***Ascomicetos:*** Son aquellos hongos que producen sus esporas en el interior de unas pequeñas vainas a modo de saco microscópico llamadas ascas. Las esporas maduran en el interior de este pequeño saco, que se abrirá para expulsarlas al exterior. Cada asca contiene generalmente 8 esporas.

***Basidiomicetos:*** Producen sus esporas sobre unos pequeños órganos a modo de mazas, formando una especie de racimo microscópico de, generalmente, 4 esporas [26].

#### **Según sus características microscópicas y morfológicas**

Existen en realidad más categorías, como el *subgénero, sección, tribu, variedad, forma*, etc; pero las mencionadas antes son las principales, y la mayoría de las veces simplemente utilizaremos las dos últimas para referirnos a un hongo: el *Género y la Especie* [26].

Por ejemplo si observamos al microscopio una muestra podremos observar que, las esporas se producen en basidios, con lo cual pertenecerán a la subdivisión Basidiomicotina, clase Basidiomicetes, etc.

### ***f. Fisiología de los Hongos.-***

En la mayoría de los hongos las paredes de las hifas están compuestas principalmente



por quitina y algunas hemicelulosas. La celulosa, que está presente sólo en unos pocos grupos de hongos, es característica de los oomicetes. La proporción de agua de los hongos mucilaginosos generalmente es mayor del 90%. Las esporas pueden tener menos del 50% de agua; otras estructuras de resistencia, tales como los esclerocios, contienen aún menos. Los hongos requieren oxígeno para su crecimiento, así como grandes cantidades de agua y de hidratos de carbono u otras fuentes de carbono.

La mayoría de los hongos utilizan azúcares como la glucosa y la levulosa (D-fructosa), pero algunos usan otros compuestos orgánicos como alimento, según su capacidad para sintetizar las enzimas adecuadas. Ciertas micorrizas toman directamente el nitrógeno de la atmósfera; sin embargo, todos los demás hongos lo obtienen de nitratos, sales de amonio u otros compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno. Los hongos, además, precisan otros elementos como potasio, fósforo, magnesio y azufre. También son necesarios, aunque en muy pequeñas cantidades, hierro, manganeso, cobre, molibdeno, zinc y galio; así como factores de crecimiento [24]. Determinados hongos son deficitarios, al menos en parte, en uno o más factores de crecimiento.

Las enzimas de los hongos pueden actuar sobre una gran variedad de sustancias. Un grupo de enzimas, llamado el complejo zimasa, permite a las levaduras llevar a cabo la fermentación alcohólica [27]. Otras enzimas, como la protopectinasa, la pectasa y la pectinasa, hidrolizan los compuestos pectídicos que hay en las capas medias de las paredes celulares de las plantas. La amilasa, celobiasa, citasa, dextrinasa, invertasa, lactasa, maltasa, proteasa y la tanasa son también enzimas producidas por los hongos.

El glucógeno, sustancia relacionada con el almidón y con la dextrina, es la reserva de hidratos de carbono más común en los hongos. Además, algunos hongos forman polisacáridos y alcoholes polihidroxílicos, como el manitol y la glicerina. Otros producen proteínas y grasas en abundancia. Muchos hongos sintetizan ácido oxálico y otros ácidos orgánicos, como cítrico, fórmico, pirúvico, succínico, málico y acético; la producción de ácido láctico sólo la realiza una familia de hongos [26]. Otros productos del metabolismo fúngico son compuestos de azufre, sustancias que contienen cloro y numerosos pigmentos. Unos cuantos hongos tienen



la facultad de formar compuestos volátiles de arsénico cuando crecen sobre sustratos que lo contienen.

### ***g. Hongos ligninolíticos.-***

Estos hongos ligninolíticos denominados hongos de la pudrición blanca de la madera, comprenden un grupo de organismos cuya característica es su capacidad para mineralizar eficientemente la lignina. Presumiblemente esta degradación selectiva les permite tener acceso a la celulosa y/o hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de energía y carbono [12].

La mayoría de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo Basidiomycetes y son los microorganismos más eficientes en degradar totalmente la lignina. Estos organismos secretan varias enzimas extracelulares que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y que en conjunto logran su mineralización [28].

Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. La enorme diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les confiere un uso potencial en biorremediación.

Las enzimas ligninolíticas son expresadas por los hongos como un proceso idiofásico, el cual está a la limitación de carbono y/o nitrógeno o sulfato en el medio y su síntesis es particularmente activa con altas tensiones de oxígeno [23].

## **2.3 ENZIMAS.-**

Las enzimas o biocatalizadores son proteínas cuya función es catalizar las reacciones que realizan los seres vivos. Las enzimas son altamente selectivas para la reacción que



catalizan. Estas se unen a un sustrato y lo biotransforman.

### **2.3.1 Estructura y características generales.-**

Las enzimas, como proteínas globulares de diversos tamaños, tiene su estructura definida por la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

Existe también una serie de características que diferencian a las enzimas de otras sustancias. Algunas de ellas son: especificidad, actividad enzimática, cinética de reacción, temperatura, pH, activación enzimática e inactivación [31].

#### **a. Especificidad.-**

Las enzimas son específicas, es decir, hidrolizan y sintetizan un compuesto en particular. En algunos casos, su acción está limitada a ligaciones específicas dentro de los compuestos con los cuales ejercen reacción.

#### **b. Actividad Enzimática.-**

La actividad de una enzima o preparación enzimáticas se expresa por peso, en bases de volumen y/o también en unidades, que es lo más común. Las condiciones propicias para una óptima actividad enzimática, tales como pH óptimo, concentración de sustrato, cofactores e inhibidores, temperatura, tiempo de duración del análisis y actividad de agua, son utilizadas para determinar la unidad de actividad de la enzima.

#### **c. Cinética de reacción (Michaelis-Menten).-**

La acción enzimática se caracteriza por la formación de un complejo que representa el estado de transición.





El sustrato se une al enzima a través de numerosas interacciones débiles como son: puentes de hidrógeno, electrostáticos, hidrófobos, etc, en un lugar específico, el centro activo. Este centro es una pequeña porción del enzima, constituido por una serie de aminoácidos que interaccionan con el sustrato.

Algunas enzimas actúan con la ayuda de estructuras no proteicas. En función de su naturaleza se denominan:

Cofactor es cuando se trata de iones o moléculas inorgánicas.

Coenzima es cuando es una molécula orgánica. Aquí se puede señalar, que muchas vitaminas funcionan como coenzimas; y realmente las deficiencias producidas por la falta de vitaminas responden más bien a que no se puede sintetizar un determinado enzima en el que la vitamina es la coenzima [30,31].

#### ***d. Temperatura.-***

La velocidad de reacciones enzimáticas aumenta con el incremento de la temperatura, de modo semejante a las reacciones químicas.

#### ***e. pH.-***

La acción catalítica de una reacción enzimática es alcanzada dentro de límites muy estrechos de pH. Cada reacción tiene un pH óptimo, que para la mayoría de las enzimas se encuentra entre 4,5 y 8,0, y allí la enzima presenta su actividad máxima.

#### ***f. Clasificación Internacional de las enzimas.-***

Según la Internacional Comisión on Enzyme, han formado con el consentimiento de la



IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) y IUB (internacional Union of Biochemistry) un sistema para la nomenclatura de las enzimas [30,41] (ver tabla 2-1).

**Tabla 1.** Clasificación Internacional de las enzimas.

Nº	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H)
2	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis ( Transferencia de grupos funcionales al agua)
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O, C-H mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP

### 2.3.2 Enzimas ligninolíticas.-

Se han identificado dos familias de enzimas extracelulares, las peroxidasas y las lacasas. Estas enzimas son capaces de oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos y se diferencian en sus requerimientos catalíticos, potencial de oxido-reducción, y en su modo de acción que puede ser directo o indirecto [46].

#### a. Peroxidasas ligninolíticas.-

##### ***Lignina peroxidasa (LiP) diaril propano O<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductasa EC 1.11.1.14***

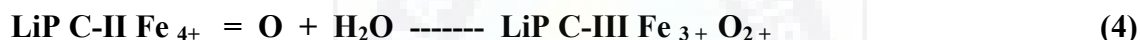
Esta enzima fue descrita por primera vez en *P. chrysosporium* [5, 47, 48]. Es una glucoproteína monomérica que contiene un grupo hemo.

El ciclo catalítico de esta peroxidasa comienza con la oxidación de la enzima por peróxidos, dando lugar al compuesto I, que contiene un complejo oxo-Fe<sub>+4</sub> radical





cationico de la porfirina [49] (1). El compuesto I es reducido en dos pasos consecutivos por compuestos aromáticos, para formar el Compuesto II y la enzima nativa (2) (3). El exceso de peróxido da lugar a una reacción irreversible en la que se forma en Compuesto III que es inactivo (4).



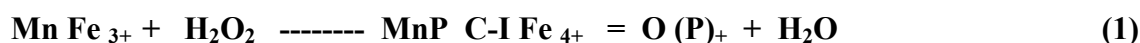
La LiP se diferencia de otras peroxidasas por su alto potencial de oxido-reducción, lo que permite oxidar directamente compuestos aromáticos no fenólicos, y por tanto, la mayor parte de las unidades de la lignina [48].

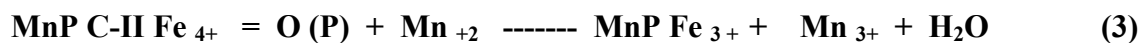
***Peroxidasas que oxidan el manganeso (MnP) Mn (II): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductasa EC 1.11.1.13***

Mas frecuente que la producción de peroxidasas que oxidan el Mn<sub>2+</sub> a Mn<sub>3+</sub> en presencia de peróxidos. Estas peroxidasas manganeso dependientes se han descrito en al mayoría de los hongos ligninolíticos de la podredumbre blanca de la madera [50].

El Mn<sub>3+</sub> formado en la reacción es un fuerte oxidante, que estabilizado con ácidos dicarboxilicos secretados por el hongo, actúa como intermediario de la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos [51].

El ciclo catalítico de la MnP es semejante al de otras peroxidasas incluidas la LiP y transcurre a través de la formación de intermediarios de la enzima MnP C-I y MnP C-II.





El primer producto de la reacción de la MnP nativa con el peróxido de hidrógeno es el compuesto I (1). La reducción monoelectrónica del compuesto I por  $\text{Mn}_{2+}$  conduce al compuesto II que de nuevo se reduce por  $\text{Mn}_{2+}$  para generar el enzima nativo. Mientras que el compuesto I puede ser reducido además de por el  $\text{Mn}_{2+}$  (2a), por otros donadores como los fenoles (2b), el compuesto II de la MnP solo puede ser reducido por  $\text{Mn}_{2+}$  por lo que depende de este catión para cerrar su ciclo (3).

Al igual que la LiP la MnP es sensible a altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que provocan la inactivación reversible del enzima al compuesto III que es un estado de oxidación inactivo catalíticamente (4).

La mayoría de estas peroxidasas se caracterizan por depender del  $\text{Mn}_{2+}$  para cerrar su ciclo catalítico [49]. Son enzimas que solo actúan de manera indirecta sobre la lignina.

### ***b. Lacasas.-***

#### ***Lacasas EC.1.10.3.2. Benzodiol oxígeno: oxígeno reductasa***

Las lacasas son fenoloxidasas ampliamente distribuidas en plantas, hongos de diferentes clases [52] y algunas bacterias [53].

Las lacasas se descubrieron en el látex de la planta *Rhus vernicifera* [54], como la sustancia termolábil responsable del endurecimiento de la resina. En plantas la lacasa tiene una función protectora frente a lesiones sufridas por el vegetal, pues la oxidación de fenoles del látex por la lacasa provoca radicales libres que tienden a polimerizar lo que origina una



cubierta protectora en la lesión.

La función de la lacasa en los hongos no está clara, se ha relacionado con la morfogénesis, con la pigmentación de los conidios, con la formación de rizoformas, con el desarrollo de cuerpos fructificantes [54], con la patogénesis [55] y en la protección frente a compuestos fenólicos tóxicos liberados durante la degradación de la lignina [56].

La lacasa mejor estudiada es la de *Trametes versicolor* [56]. Es una O<sub>2</sub> p-difenol oxidoreductasa que se diferencia de la mayoría de fenoloxidasas en que se produce agua en lugar de peróxido en la reducción del oxígeno. Son glucoproteínas con 4 átomos de cobre y de peso molecular variable [57]. Los átomos de cobre están clasificados en tres tipos (1, 2, 3) con diferentes propiedades [58].

**Cobre tipo 1 (T1):** es responsable del color azul de la proteína. Tiene una alta absorbancia en la región del visible (605nm) provocada por la unión covalente cobre-cisteína. Debido al alto potencial redox de este cobre es el sitio donde ocurre la oxidación del sustrato.

**Cobre tipo 2 (T2):** se caracteriza por no presentar absorbancia detectable en la región visible y por tener una alta afinidad por aniones (F, CN...) que actúan como inhibidores de la actividad del enzima.

**Cobre tipo 3 (T3):** es un complejo binario formado por un par de iones Cu<sup>2+</sup>-Cu<sup>2+</sup> unidos por puente hidróxido con un máximo de absorbancia a 330 nm y un espectro de fluorescencia característico. La reacción que cataliza la lacasa es la siguiente:



Los cobres T2 y T3 forman un cluster trinuclear que es el lugar donde se reduce el oxígeno. El cobre del centro T1 es el primer aceptor de electrones del sustrato. Después los electrones se transfieren secuencialmente al centro T2-T3 que tras recibir cuatro electrones reducen una molécula de oxígeno a agua. Así la oxidación monoeléctrica del sustrato va acoplada a la reducción por cuatro electrones del oxígeno molecular.



**Tabla 2.** Características principales de enzimas ligninolíticas

EC	MnP (1.11.1.13) Mn (II):H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidoreductasa	LiP(1.11.1.14)diarilpropano O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidoreductasa	Lac(1.10.3.2)pbenzodiol O <sub>2</sub> oxidoreductasa
<b>Grupo proteico</b>	Hemo	Hemo	Cobre I, II=1Cobre III=2
<b>PM (kDa)</b>	32,62,5(122)	38-47	59-110
<b>Glucosilacion</b>	N-	N-	N-
<b>Isoformas</b>	monomeros; acima de 11	monomeros; acima de 15	mono-,di-,tetrameros
<b>Punto Isoelectrico</b>	2,8-7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
<b>Punto de pH</b>	2,6-4,5	2,0-5,0	2,0-8,5
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	si	si	No
<b>Estabilidad</b>	+++	+	+++
<b>Med. naturales</b>	Mn <sup>2+</sup> , Mn <sup>3+</sup>	AV, 2CL-1, 4DMB	3-HAA
<b>Especificidad</b>	Mn <sup>2+</sup>	Amplia,aromáticos, incluidos no fenólicos	Amplia, fenólico
<b>Med. sintéticos</b>	Ácidos grasos insaturados	no	ABTS, HBT

### 2.3.3 Aspectos biotecnológicos.-

Los organismos productores de enzimas ligninolíticas han evolucionado para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. En tales condiciones cuando estas enzimas son secretadas, funcionan de manera inusual. Esta habilidad adaptativa es importante en términos de aplicaciones industriales, como por ejemplo en la degradación de diferentes compuestos descritos a continuación.

**Colorantes:** en la industria textil se estima que del 10-14% de los colorantes, después del teñido de telas, se vierten en efluentes de agua dulce, los más comunes son: azo, trifenilmetano o polimérico/heterocíclico, estables a la acción degradadora por la microbiota



natural, dada la similitud química de estos con los compuestos de los procesos vitales celulares. Para disminuir ese impacto negativo, existe la alternativa de usar hongos de la podredumbre blanca y/o sus enzimas extracelulares inespecíficas que oxidan la lignina [59].

**Aromáticos:** en la biorremediación de ambientes contaminados con xenobioticos aromáticos, se recomienda aplicar hongos de la PB. [60]

**Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP):** los HAP son compuestos homólogos de benceno formados por 2 o más anillos fusionados, que se liberan en emisiones industriales, durante la combustión incompleta de la gasolina en automotores, en plantas de generación de energía, naturalmente en depósitos de carbón, en el proceso de transformación de derivados aromáticos de terpenos, esteroides, quinonas etc., sin embargo estos compuestos son recalcitrantes y potenciales carcinogénicos. La literatura reporta que los hongos de la PB, así como sus extractos extracelulares, tienen la capacidad potencial para la degradación de HAP, por ello son una alternativa en la biorremediación de ambientes contaminados con estos poliaromáticos [61,62].

**Bifenilos policlorados (BFP):** los BFP se utilizan en la industria como fluidos dieléctricos e hidráulicos, como diluyentes orgánicos, plastificantes, etc., por su estabilidad química, son recalcitrantes a la biodegradación, por ello, causan serios problemas de contaminación, por esa razón existen estrategias de biorremediación para su eliminación. Diversos reportes en la literatura muestran la capacidad degradativa de los hongos de la PB sobre los BFP [63, 64].

**Pesticidas:** son los compuestos que contaminan aguas superficiales y subterráneas, causan un grave problema ambiental, pues algunos de estos químicos son carcinogénicos, más por su bioaumentación a través de la cadena alimenticia, son de alto riesgo para la vida, por eso es necesario su tratamiento mediante biorremediación para minimizar o reducir su negativo impacto ambiental. Los hongos de la PB y sus enzimas ligninolíticas son un recurso viable en la eliminación de los pesticidas o de algunos de sus componentes [65, 66].



**Nitroaromáticos:** estos son compuestos como: el nitrobenzeno, el nitrotolueno, los nitrofenoles y los nitrobenzoatos, se utilizan en síntesis de pesticidas, explosivos, colorantes, y farmacéuticos, pero son un problema ambiental por su recalcitrancia. Ciertos nitroaromáticos son tóxicos para humanos y animales. Investigación reporta que los hongos de la PB oxidan nitroaromáticos, como el trinitrotolueno (TNT) son una alternativa en la recuperación de ambientes contaminados con estos compuestos.

**Otros aromáticos:** existen otros compuestos sintéticos que por su estructura y su composición química compleja no se investigan, pero evidencia sugiere que pueden ser degradados y/o mineralizados por el sistema enzimático de los hongos de la PB como: *C. versicolor*, *Funalia trogii*, *P. chrysosporium* y *P. pulmonaris* en la decoloración de vinastas en cultivo estático. Los reportes al respecto muestran que no solo decoloran las vinastas sino también reducen su demanda química de oxígeno [67]. Otro estudio demostró la capacidad oxidativa de *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *Lentinus edodes*, *T. versicolor* en un licor residual del molido de pulpa y papel en un medio plástico poroso, donde los hongos de la PB oxidaron en un 71% la lignina para disminuir en un 48% la demanda química de oxígeno, lo que baja el costo de producción del proceso [68].

Además de estar implicadas en la degradación de otros compuestos aromáticos que producen problemas de contaminación ambiental, anteriormente ya descritos tiene amplias aplicaciones industriales; actualmente, las enzimas son empleadas principalmente para la obtención de lácteos, edulcorantes, fármacos, alimentos, licores, detergentes, el blanqueo de textiles y de pulpa de papel, síntesis orgánica, biorremediación ,detergentes de lavado, etc.

## **2.4 RECURSOS LIGNOCELULOSICOS.-**

Bolivia es uno de los países mas ricos del mundo en diversidad biológica, ya que en el país se encuentran entre el 35 a 45% de toda la diversidad biológica, aun que el territorio boliviano representa apenas el 0,2% de la superficie mundial, y sus bosques alcanzan el 3,5% de los bosques del mundo [27].



Dada la disminución de las reservas de materias orgánicas fósiles, en los últimos años en todo el mundo se dedica mucha atención al tratamiento químico y biotecnológico de la biomasa vegetal de madera y plantas agrícolas. La biomasa vegetal (fitomasa) se forma como resultado de la actividad fotosintética de las plantas. A diferencia de las fuentes fósiles, las reservas de fitomasa se renuevan como resultado de la actividad de las plantas superiores. Cada año en el planeta se forman cerca de 200 millones de toneladas de biomasa vegetal celulósica. La biosíntesis de la celulosa es la mayor de las síntesis en el pasado, presente y futuro.

En este siglo los principales tipos de materiales orgánicos serán la madera, las plantas agrícolas y el carbón de piedra que a su vez es de origen vegetal. Por una valoración aproximada, las reservas conocidas de petróleo son prácticamente iguales a las de la madera en nuestro planeta, sin embargo, los recursos petroleros se agotan, al tiempo que los de maderas y otros desechos agrícolas, como resultado del crecimiento natural, se elevan [72].

La generación de Biomasa a partir de materiales lignocelulósicos tiene gran importancia para todos los países. Los residuos agrícolas y forestales constituyen una fuente importante de sustratos orgánicos para organismos que son capaces de degradar en la naturaleza la lignina y la celulosa.

#### **2.4.1 Paja Brava.-**

En Bolivia se encuentran especies de plantas y animales de casi todas las zonas climáticas debido a la variada elevación de su territorio. La paja brava es una planta que crece en la zona más elevada del extenso Altiplano, se utiliza para confeccionar techos, denominados techos de quincha, es empleada como cama para animales, dígame en caballerizas, también se utiliza para mantener la humedad después de haber sembrado pasto, puede utilizarse como material de construcción

**Tabla 3: Composición química de la paja brava.**

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
Humedad	%	8,17



Cenizas	%	6,12
Fibra cruda	%	90,06
Lignina	%	22,89
Celulosa	%	54,13
Hemicelulosa	%	13,04

### 2.4.2 Bagazo.-

El material sólido y pulposo que queda después de la extracción del jugo de la caña de azúcar se llama bagazo, es el residuo leñoso. En estado fresco estos bagazos contienen un 40% de agua. Suelen utilizarse como combustible de las propias azucareras. También se utilizan en la industria del papel y fibras, por la celulosa que contienen, se aprovecha el bagazo de la caña en la elaboración de forrajes para ganado y fabricación de madera sintética.

**Tabla 4: Composición química del bagazo.**

Parámetro	Unidad	Valor
Humedad	%	6,7
Cenizas	%	8,62
Fibra cruda	%	85,06
Lignina	%	20,36
Celulosa	%	49,58
Hemicelulosa	%	17,44

La  
pro  
duc

ción de energía eléctrica, a partir de bagazo de caña, permite que los ingenios sean capaces de suplir su demanda de energía para la producción de azúcar.

### 2.4.3 Aserrín.-

Los materiales lignocelulósicos constituyen una fuente de materia prima importante para la obtención de productos de amplia utilización en la agricultura. Dentro de estos materiales se encuentran el aserrín y la corteza que resultan desechos de la industria de la elaboración primaria de la madera. En el mundo se desarrollan cada día nuevas tecnologías para dar un uso racional a estos residuos, que además contribuyen con su acumulación a la contaminación del entorno. En el presente trabajo se exponen los aspectos sociales de este problema y se ofrecen sugerencias para dar un aprovechamiento óptimo de los residuos con





enfoque ambientalista [71].

**Tabla 5 Composición química del aserrín.**

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
Humedad	%	5,9259
Cenizas	%	0,9884
Fibra cruda	%	81,8280
Lignina	%	17,2935
Celulosa	%	56,6415
Hemicelulosa	%	7,8929

El  
aserrín

solo, como fertilizante, es poco efectivo, ya que contiene bajo contenido de elementos nutritivos: aproximadamente 0,1 % de N, 0,02 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 0,12 % de K<sub>2</sub>O. Si se suministra fresco, sin compostar, puede provocar carencia de Nitrógeno en la planta en el primer y a veces en el segundo años de haberlo suministrado al suelo. Por otra parte, el complejo lignocelulósico del aserrín puede ser utilizado para aumentar el nivel de humus del suelo. Efecto positivo y continuado del aserrín se observó con su introducción en forma de capas para la reforestación en suelos pobres, arenosos. Ejemplo de esto se observó que durante un experimento en el cual al cabo de 14 años de plantado un bosque, se conservó sólo el 7 % sin enmienda, y para el suelo que tuvo aserrín, 43 - 50 %, con un diámetro y altura de los árboles 2 - 3 veces superior [73].

#### ***2.4.4 Residuos de quinua real.-***

La Quinua Real, es uno de los granos más importantes de los Andes, cuyo origen se remonta a más de 5000 años, fue el principal alimento que corresponde a las necesidades y requerimientos del mundo moderno. El ciclo vegetativo de la planta tiene una duración de 8 meses. La siembra generalmente se la realiza en el mes de septiembre, y la planta llega a su fase de maduración en el mes de abril, para efectuar la cosecha y trilla en los meses de Mayo y Junio.

**Tabla 6: Composición química de residuos de quinua.**



<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
Humedad	%	5,1003
Cenizas	%	4,0367
Fibra cruda	%	63,4581
Lignina	%	9,9323
Celulosa	%	52,6141
Hemicelulosa	%	0,9116

Dentro de las variedades más importantes de Quinoa Real y cultivadas con fines comerciales y de exportación. Sin embargo existe una gran variedad de semillas que son cultivadas con fines específicos de consumo, está considerado como uno de los granos más ricos en proteínas, dado por los aminoácidos que la constituyen como: la leucina, isoleucina, metionina, fenilamina, treonina, triptofano y valina. La concentración de licina en la proteína de la QUINUA es casi el doble en relación a otros cereales y gramíneas [74].

En este sentido es muy importante darle una función al residuo de quinua, ya que es bastante rico en celulosa ya que no se lo utiliza y existe en bastante cantidad en especial en el Altiplano boliviano.

#### ***2.4.5 Cáscara de arroz.-***

La cáscara del arroz, además de los componentes fibrosos, contiene también fitosteroles, con evidente capacidad de reducir los niveles de colesterol sanguíneo. Por tanto, personas con colesterol elevado, para obtener los beneficios mencionados será preciso que elijan el arroz integral que conserva la cáscara.

Una característica particular de la cáscara del arroz es su contenido en silicio. Este microelemento, ha llamado la atención a causa de su capacidad para estimular las células necesarias para la síntesis y formación de material óseo y por su rol en la formación de la sustancia fundamental de los tejidos cartilagosos, necesaria para la formación del cartílago y de la elastina.



**Tabla 7: Composición química de la cáscara de arroz.**

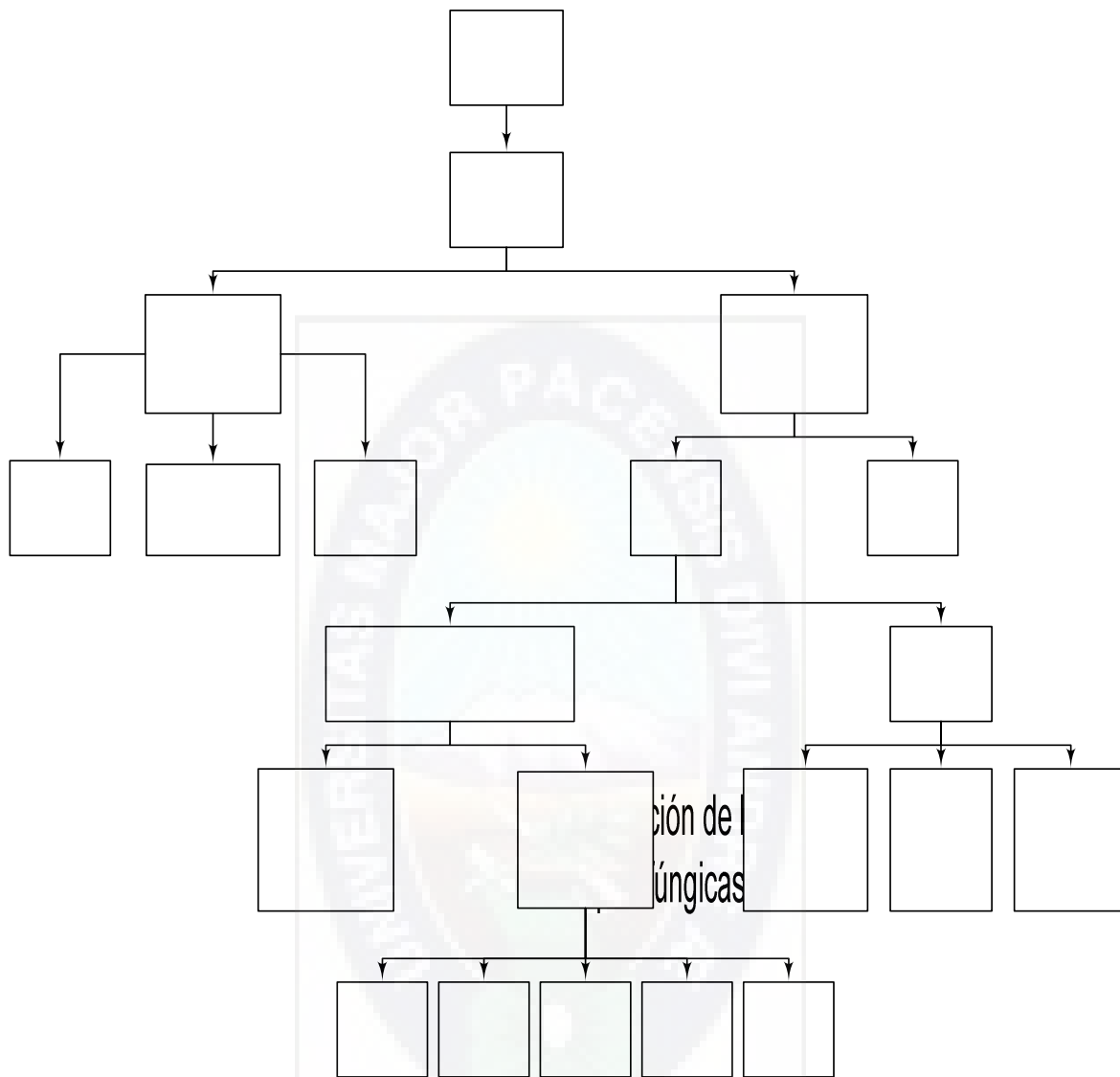
<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
Humedad	%	
Cenizas	%	
Fibra cruda	%	93,53
Lignina	%	31,56
Celulosa	%	62,49
Hemicelulosa	%	0,52

El aprovechamiento y la aplicación que se le puede dar a las cenizas de las cáscaras de arroz, desecho agrícola de bajo rendimiento económico cuyo volumen asciende a las 60 mil toneladas anuales. Al someter a la cáscara de arroz a una temperatura cercana a los 500-600 °C, se obtiene una sustancia similar a la arena de cuarzo con un porcentaje de sílice cercano.

### **3. METODOS.-**

El siguiente diagrama resume en forma general el procedimiento del presente trabajo.





Recolección de muestras

Aislamiento de cepas fúngicas

Identificación de cepas fúngicas

Historial de cepas fúngicas

Figura 3. Procedimiento general de producción de enzimas ligninolíticas, a partir de cepas fúngicas del Altiplano boliviano.

Macroscópica

Microscópica

Optimización de medio de cultivo con variación Mn(II)

Medio de cultivo con variación de Cu(II)

Med



### **3.1 RECOLECCION DE MUESTRAS.-**

Se realizo un viaje a lugares cercanos al lago Titicaca mas específicamente a la localidad de Llamacachi, cantón Compi (L.S. 17° 51, 966' NO 67° 20,603' 3737 m.s.n.m.) y el río Desaguadero (L.S. 17° 38,061' NO 67° 30,500' 3750 m.s.n.m.) ubicados en los departamentos de La Paz y Oruro respectivamente.



**Figura 4. Orillas del Lago Titicaca en la localidad de Llamacachi.**



**Figura 5. Orillas del Río Desaguadero en el departamento de Oruro.**



En los lugares mencionados se procedió a recolectar muestras de cepas fúngicas presentes en la parte baja de la paja brava y quinua real, las muestras se tomaron de la raíz, del tallo, del nudo vital, e incluso del suelo que rodeaba las mencionadas plantas, las muestras fueron tomadas utilizando pinzas estériles, preparadas a los métodos tradicionales. El muestreo se realizó utilizando frascos de vidrio estériles, frascos de plástico irradiados por luz U.V., y bolsas de polietileno.



**Figura 6. Paja Brava a orillas del río Desaguadero.**



**Figura 7. Suelo donde crece la planta Paja Brava a orillas del lago Titicaca.**



Se tomaron los datos de muestreo de cada espécimen recolectado con los siguientes parámetros: ubicación geográfica, la altura, descripción del lugar y apariencia general de la planta (ANEXO B-2).

En este viaje realizado se aprovecho para la recolección de algunos sustratos utilizados más adelante, tales como la paja brava, residuos de quinua real.

De la toma de muestra realizada se recolectaron 30 muestras diferentes, entre ellas 19 pertenecían a la paja brava, 5 a quinua real, 4 a tierra que rodeaba mencionadas plantas, y 2 a las setas.

### **3.2 METODOS DE AISLAMIENTO DE CEPAS FUNGICAS.-**

La inoculación se realizo de dos formas, una *indirecta* y otra *directa*.

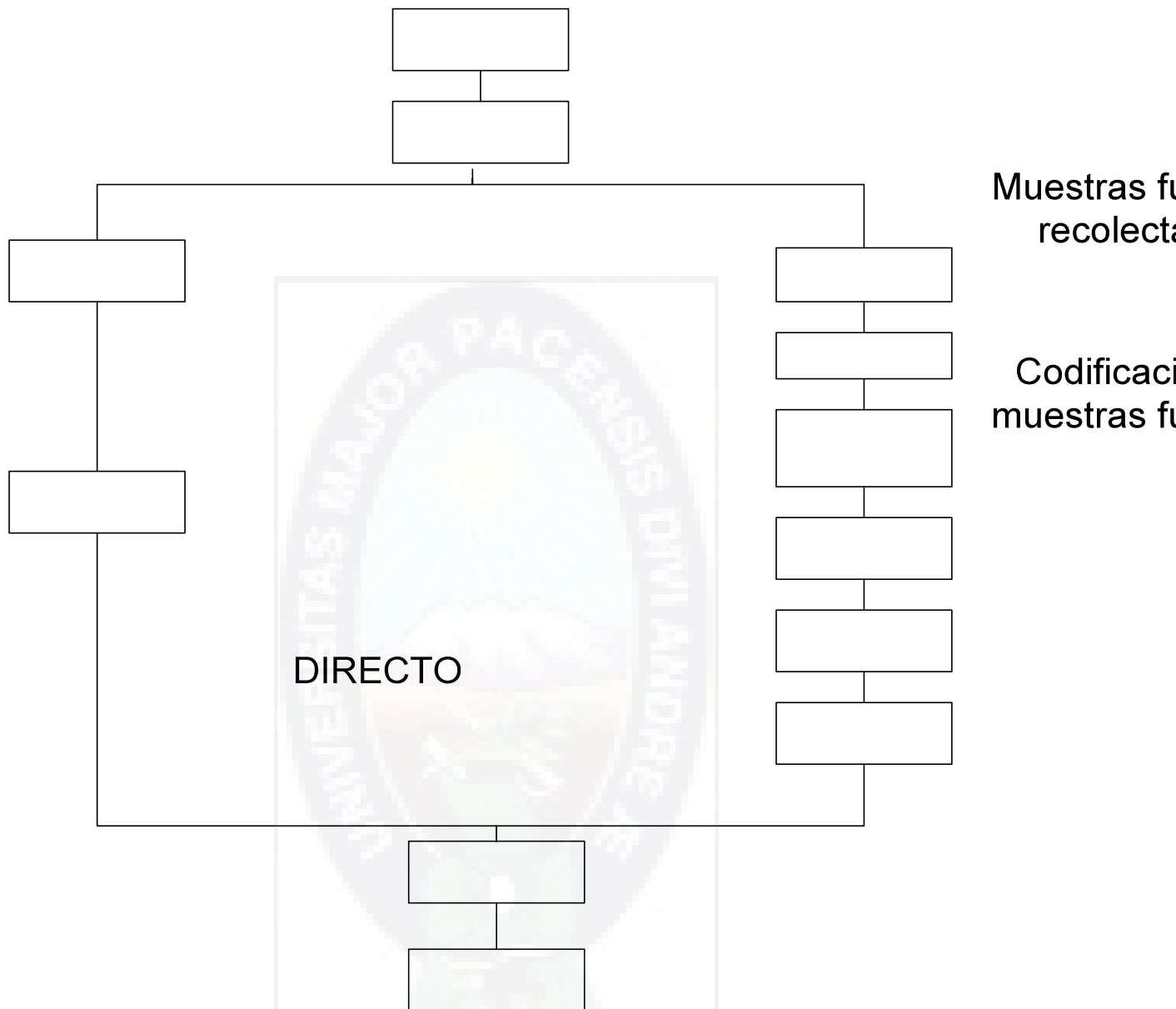
**INDIRECTO:** Se preparo diluciones de hipoclorito de sodio al 10% (v/v), alcohol al 70% (v/v). La muestra fue sumergida por 5 segundos en cada dilución y finalmente en agua destilada y fue trasladada a medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

**DIRECTO:** Se traslado la muestra directamente en medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

En ambos casos se incubo a temperatura de 20°C durante 5 días. Se comprobaron la pureza de las cepas aisladas mediante resiembras en medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

De las 30 muestras recolectadas, se logro aislar 102 cepas fúngicas, de las cuales muchas eran repetidas, obteniéndose 31 cepas fúngicas diferentes (anexo B-1).





**Figura 8. Métodos de aislamiento de las cepas fúngicas.**

**Cortar muestra**

Una vez aisladas dichas cepas fúngicas, fueron conservadas en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), en tubos pico de flauta, para posteriormente liofilizarlas.







**Figura 9.** Tronco de madera que contiene cepas fúngicas, recolectada de orillas del lago Titicaca.

Las muestras recolectadas fueron manipuladas con los debidos cuidados, y a las 24 hrs. de ser recolectadas.



**Figura 10.** Preparación de medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

La preparación de los medios de cultivo se realizó a condiciones estériles, usando los materiales adecuados y las normas de Bioseguridad.





**Figura 11. Cepas fúngicas en crecimiento a temperatura ambiente.**

El crecimiento de las cepas fúngicas aisladas fue a unos 20°C, teniendo cuidado de no cruzar las cepas, esto por la esporulación de los hongos.

### ***3.2.1. Codificación de cepas fúngicas aisladas.-***

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, en conjunto con el Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos (IIDEPROQ) de la Facultad de Ingeniería, motivo el cual se codificó a las cepas fúngicas aisladas como IB.

**I = Ingeniería    B = Bioquímica**

Para la codificación de las cepas fúngicas aisladas se les asignó un número según el orden de muestras recolectadas, seguidas de una letra mayúscula el cual representa el primer aislamiento de la muestra, seguido de una letra minúscula el cual significa el segundo aislamiento de la misma muestra.



### **3.3 METODOS DE IDENTIFICACION DE CEPAS FUNGICAS.-**

Una vez aisladas las cepas fúngicas se procedió a identificarlas mediante la identificación de los hongos filamentosos se basa en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas.

#### **3.3.1 Identificación Macroscópica.-**

Se observo cuidadosamente todas las características que pudieran presentar dichas cepas, tales como: tiempo de crecimiento, forma de crecimiento, color característico de la cepa fúngica, para así poder compararla con la bibliografía e identificarla según mencionadas características.

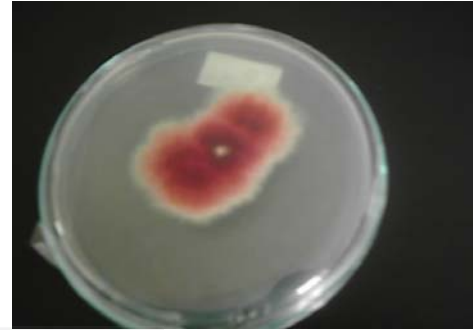
Semejanzas macroscópicas como la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos son muy útiles para la identificación.

En general, la morfología macroscópica de los hongos es estable y presenta pocas variaciones. La identificación definitiva se basa en la forma característica, método de producción y ordenamiento de las esporas, siendo también importante conocer el tamaño y la disposición de las hifas [18].





**A: Vista anterior de la cepa fúngica  
(se observa micelios algodónados)**



**B: Vista posterior (observamos el  
pigmento que produce el hongo)**

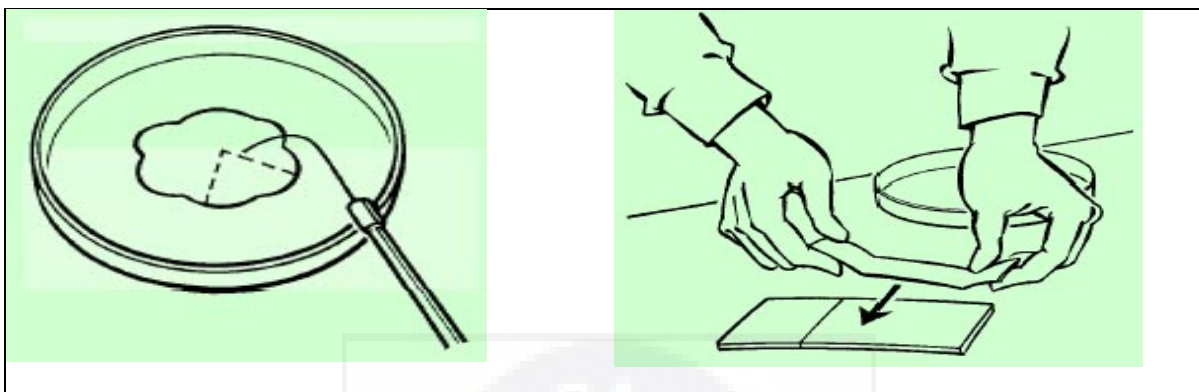
***Figura 12. Morfología macroscópica de la cepa fúngica***

Los estudios macroscópicos consistieron en evaluar el tipo de micelio aéreo, tipo de micelio vegetativo, color del micelio vegetativo y del micelio aéreo, producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo y consistencia de las colonias. Todas estas observaciones se realizaron en medio Papa Dextrosa Agar (PDA).

### ***3.3.2 Identificación Microscópica.-***

Se basa en la observación al microscopio con la lente (40x) de la muestra de la cepa fúngica en un portaobjetos, evaluar el tipo y disposición de hifas, micelios y esporas de cada una de las cepas, guiándonos en la bibliografía, y así poder identificarlas.





**A: Selección de colonia fúngica.**

**B: Preparación de muestra**

*Figura 13. Identificación microscópica*

La observación al microscopio permite distinguir la forma y disposición de las esporas. Este método permite la observación microscópica del hongo mientras se desarrolla directamente debajo del cubreobjetos, de forma que las características microscópicas se distinguen con facilidad, las estructuras se mantienen intactas y puede observarse un gran número de áreas representativas [18]. Se comparo información morfológica y taxonómica con bibliografía.

Muchas especies de hongos se pueden diferenciar, identificar y clasificar según su morfología, estructura, mecanismo de formación y elementos formadores de las esporas. El conocimiento de estas características puede ser suficiente para identificar especies que pertenecen al grupo de los hongos filamentosos; sin embargo, cuando se trata de identificar otras especies es imprescindible la aplicación de pruebas de biología molecular.

Se identificaron microorganismos de los géneros *Circinutrichum*, *Stephanoma*, *Cephalosporium*, *Bdellospora*, *Blatomyces*, *Trinacrium*, *Verticium*, *Dendrodochium*, *Choanephora*, *Botrytis*, *Paecielomyces*, *Mycotypha*.

De las 31 cepas fúngicas asiladas (100%), solo 25 cepas fúngicas (80,64%) fueron identificadas, el resto 6 (19, 35%) no pudieron ser identificadas, ya muchas de ellas no coincidían con la taxonómica de ninguna bibliografía utilizada.





**A: Morfología microscópica Botrytis**

**B: Morfología microscópica Cephalosporium**

**Figura 14. Morfología microscópica**

### ***3.3.3 Elaboración de Historial de cepas fúngicas.-***

Una vez identificadas las cepas fúngicas, se procedió a elaborar un historial de las cepas fúngicas recolectadas (ver anexo B).

Este contiene información sobre: número de muestra, lugar de origen, coordenadas de la ubicación geográfica, la altura, nombre común, la descripción general del hábitat, apariencia general, nombre científico de las cepas fúngicas identificadas.(ver anexo A-2). La identificación microscópica se realizó de acuerdo al procedimiento descrito (3.3.1). Se comparó información morfológica y taxonómica con bibliografía.

## ***3.4 METODOS DE DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.-***

### ***3.4.1 Determinación Cualitativa.-***

En este estudio, se determinó la actividad enzimática ligninolítica que sean capaces de producir cepas fúngicas.





**Figura 15. Preparación de medio ABTS y Poli – R.**

Ver composición en ANEXO A-1

Las cepas identificadas por sus características morfológicas en medio PDA de esos cultivos se tomo una pieza de micelio aproximadamente de 10mm de diámetro, esos fueron transferidos a un medio sólido Poly R-478, y otra pieza de micelio del mismo diámetro se traslado a un medio sólido ABTS, el diámetro de decolorización fue examinado después de 2 días, hasta los 5 días, a 20°C, se tuvo cuidado de incubarlas a oscuridad, ya que luz puede afectar al respuesta, y podríamos obtener resultados verdaderos positivos, por ultimo, fue comparado con las zonas formadas del medio de referencia de *Trametes versicolor*, esto por bibliografía [56].

Las figuras 4-5 muestra claramente el resultado de esta prueba, ya que se puede notar la decolorización del medio alrededor de la cepa fúngica en crecimiento, este resultado se vio entre el tercer y quinto día. La decolorización se debe a la oxidación del colorante Poly R-478 por acción de las enzimas ligninolíticas, lo que significa que el microorganismo es capaz de degradarlo y por ende producir dichas enzimas [34].





**Figura 16. Decolorización del medio sólido Poly R**  
Fuente: Elaboración propia

La figura 4-6 muestra el resultado de decoloración del medio sólido ABTS, este resultado se presentó a los 3 días y nos da a entender que el cambio de color es causado por la oxidación del colorante ABTS, lo cual indica que la cepa fúngica en el medio tiene la capacidad de producir enzimas ligninolíticas con actividad ligninolítica.

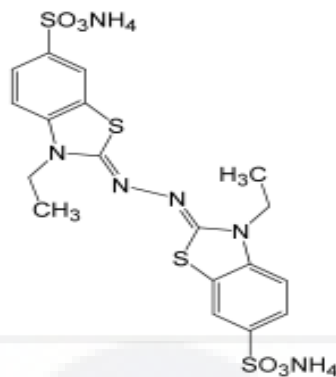


**Figura 17. Decolorización del medio sólido ABTS.**  
Fuente: Elaboración propia

El ABTS (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) $2\text{NH}_4$ -salt) (figura 4-6) es un compuesto el cual tiene una estructura compleja, en este sentido podemos decir que cuando hay una degradación de ABTS lo cual está representado por la decoloración, hay presencia de enzimas ligninolíticas [41].







**Figura 18.** Estructura generaliza de ABTS (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)2NH<sub>4</sub>-salt)

### **3.4.2 Determinación Cuantitativa.-**

De la cepa fúngicas que presentaron elevadas actividades según los criterios establecidos anteriormente, se seleccionaron las que como resultado dieron positiva, para determinar esta actividad enzimática se realizó un diseño factorial 2<sup>3</sup>, siendo los factores: glucosa, manganeso, extracto de levadura.

Obteniendo un diseño factorial 2<sup>3</sup> con 8 combinaciones posibles, se utilizaron frascos de vidrio de 100 ml de capacidad, cada uno con 10 ml de medio de cultivo Mn (II). A partir del cultivo agarizado, se tomó discos de agar de 10mm de diámetro que fueron transferidos a los frascos con medio de cultivo, y se incubó en oscuridad, a 20°C, durante 4 semanas, se tomó una muestra de cada medio de cultivo cada 7 días para determinaciones de las actividades enzimáticas, proteínas totales y celulasas, cabe recalcar que las pruebas fueron realizadas por triplicado, esto para confirmar resultados.



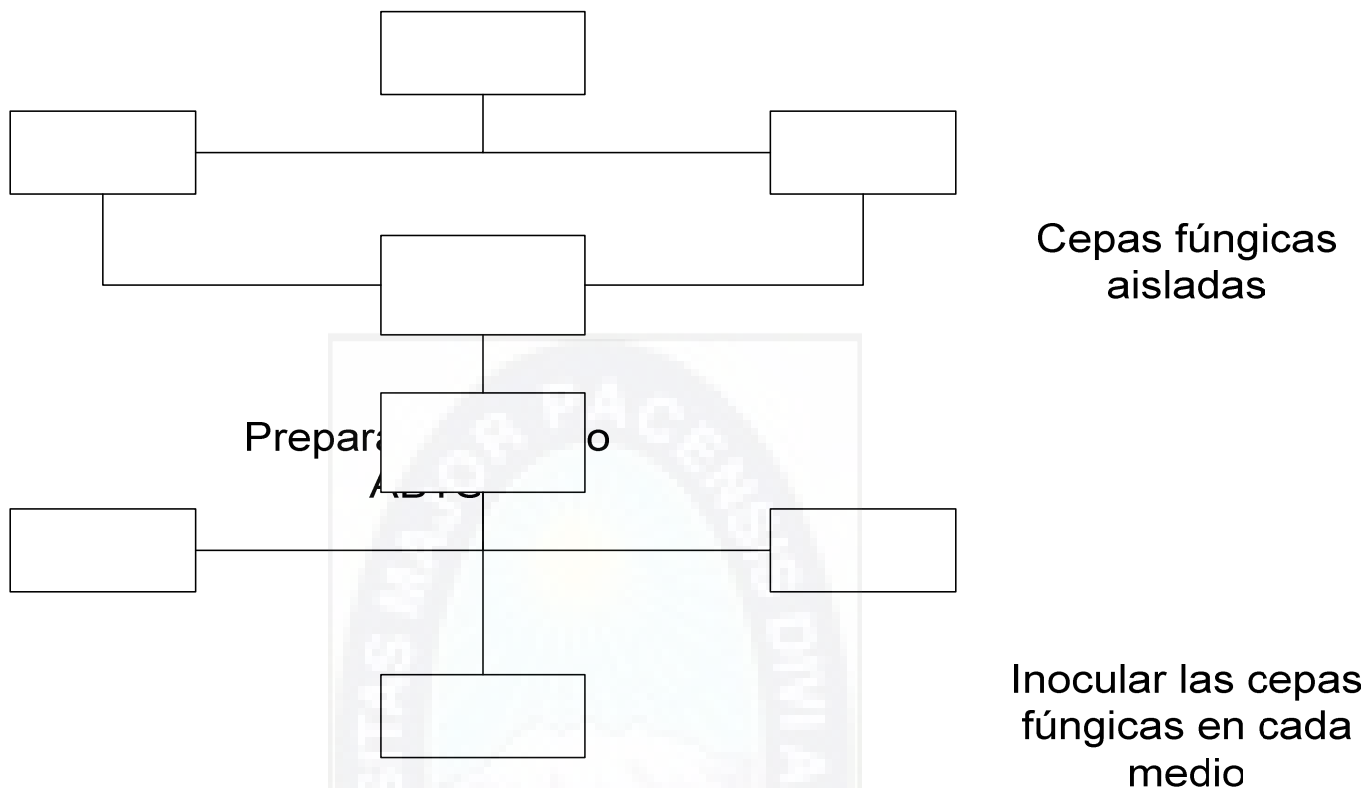


Figura 19. Determinación cualitativa de la actividad enzimática ligninolítica.

Tabla 8: Composición de medios de cultivo Mn (II), resultado del diseño factorial  $2^3$

Medio	Glucosa (g/L)	Manganeso(mg/L)	Ext. de lev. (g/L)
1	1	40	0.5
2	1	40	2
3	1	80	0.5
4	5	40	0.5
5	5	80	2
6	5	40	2
7	5	80	0.5
8	5	80	2

Cambio de color verde-plómo

Realizar observaciones diarias

Por otro lado se determinó la influencia de glucosa, extracto de levadura, manganeso, sobre la producción de las enzimas ligninolíticas por parte de los hongos seleccionados.

Selección de cepas fúngicas ligninolítica

**Glucosa: Fuente de carbono**



El medio de cultivo utilizado tiene como única fuente carbono a la glucosa, por tanto podremos verificar que tan importante es el carbono para la producción de este tipo de enzimas. Considerando a al glucosa como fuente de carbono e inductor de la actividad enzimática, en estudios en los cuales se utilizo fuente de carbono para producción de este tipo de enzimas fue observado que las fuentes utilizadas fueron eficientes y rápidamente utilizadas, resultando al altos niveles de actividades [34].

### ***Extracto de levadura: Fuente de nitrógeno y vitaminas***

El extracto de levadura contiene aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos. La producción de enzimas ligninolíticas esta en dependencia tanto de fuente de carbono como de nitrógeno, en este trabajo fue utilizado como fuente de nitrógeno y fuente de vitaminas el extracto de levadura, lo cual pueda explicar varias concentraciones encontradas, a pesar de la importancia de la fuente de nitrógeno para la producción de estas enzimas ha sido recientemente apuntada por algunos autores que su actividad es mayor en condiciones limitantes de nitrógeno [38].

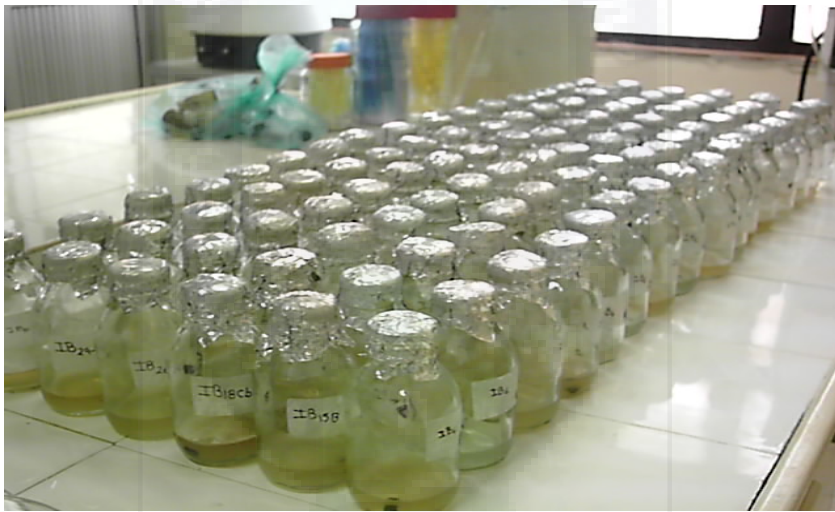
### ***Manganeso: Inductor de enzimas***

La producción de enzimas por hongos, por el medio modificado por el diseño factorial, requieren glucosa y manganeso según bibliografía. Las actividades de MnP, LiP aumentan simultáneamente por la adición del mencionado en el medio el cual puede estimular la producción de mas MnP que LiP [1].



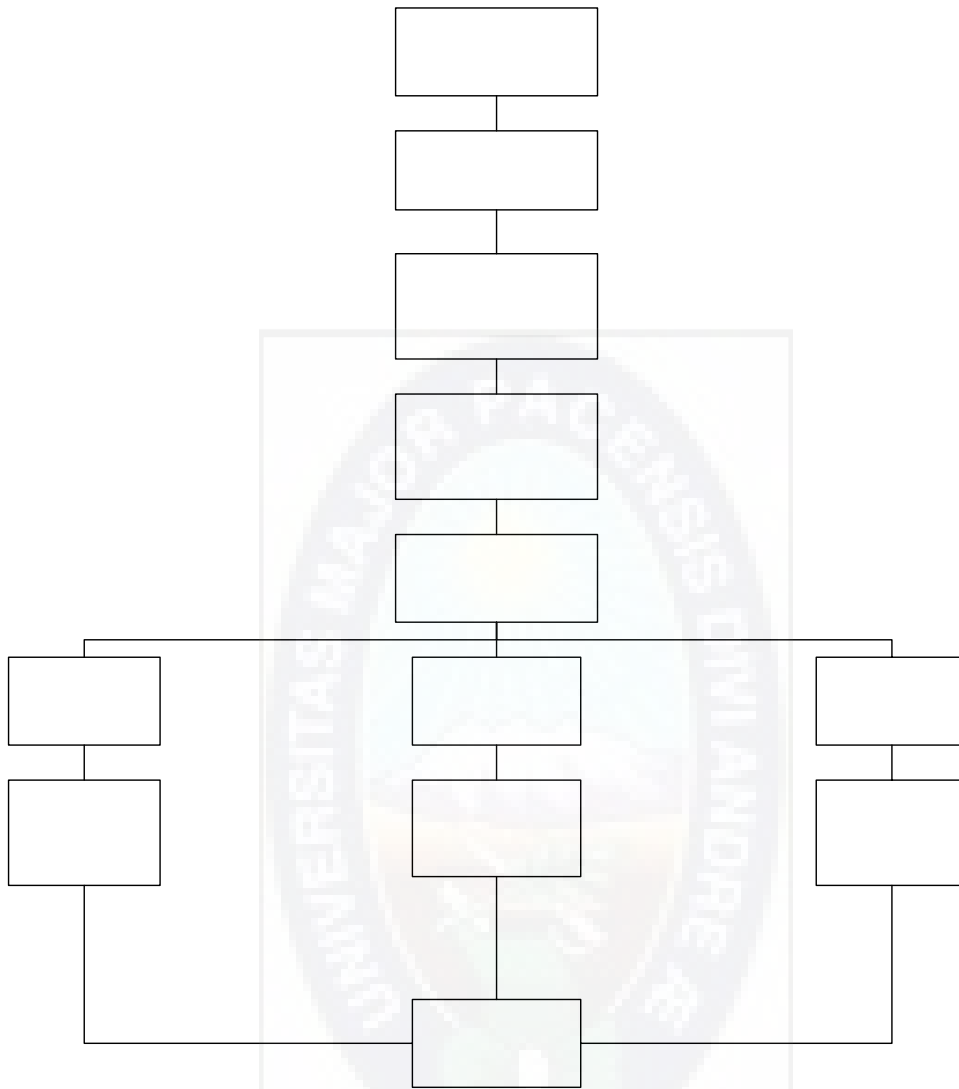


**Figura 20.** Fotografía del equipo Espectrofotómetro de absorción.



**Figura 21.** Medio de cultivo Mn (II) para determinación cuantitativa.





Cepas fúngicas  
actividad ligni

Preparacion de  
de cultivo M

Inocular las c  
fúngicas con a  
ligninolíti

Incubar los me  
cultivos inocu  
por 4 sema

Tomar una m  
cada 7 di

**Figura 22. Determinación actividad enzimática ligninolítica por métodos espectrofotométricos.**

De los medios de cultivo preparados se tomo muestra del sobrenadante de cada frasco, se tomo 0,5 mL de muestra, cuidando de no extraer micelio, se procedió a determinar tres tipos de enzimas ligninolíticas: Manganeso peroxidasa, Lignina peroxidasa y Lacasa.

### Manganeso peroxidasa

A continuación detallamos el procedimiento de cada enzima.

Lignina perox



### ***a. Manganeso Peroxidasa.-***

Para determinar la actividad de esta enzima se leyó la variación de absorbancia del cultivo (entre 120 segundos) en espectrofotómetro (470nm), en cubetas de plástico con: 2,6 DMF 1mM (100 $\mu$ ), MnSO<sub>4</sub> 3mM (100 $\mu$ l), buffer succinato pH 5 100mM (400 $\mu$ l), sobrenadante de medio de cultivo (100 $\mu$ l) y peroxido de hidrogeno 0,5mM (100 $\mu$ l).

La actividad para MnP fue estimada por oxidación de 2,6 dimetoxifenol, a coerulignona ( $\epsilon_{470} = 24500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) monitoreada a 470nm a pH 5.



**Figura 23. Reacción enzimática para MnP por oxidación de 2,6 dimetoxifenol**

La figura 4-8 muestra el cambio de coloración cuando se lleva a cabo la reacción producida por MnP, la diferencia es clara, para la cepa IB-26C (*Trinacrium*) que fue la que presento mayor actividad enzimática que las demás.

La MnP, esta enzima es una peroxidasa que oxida componentes fenólicos de la lignina, mediante la reacción de oxidación del Mn<sup>2+</sup> a Mn<sup>3+</sup>, la cual es dependiente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que la reacción es iniciada por este compuesto[80]. Una unidad de actividad enzimática de MnP es definida como la formación de coerulignona por minuto.



### ***b. Lignina Peroxidasa.-***

La actividad de esta enzima se determino mediante la variación de absorbancia del cultivo (entre 120 segundos) en espectrofotómetro (420nm) en cubetas de plástico con: ABTS 10mM (100µl), buffer acetato pH 3 100mM (400µl), sobrenadante de medio de cultivo (100µl) y peroxido de hidrogeno 0,5mM (100µl).

LiP fue medida a pH 3 por oxidación de ABTS en presencia de agua oxigenada a un catión radical ( $\epsilon_{420} = 36000 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) por el monitoreo en el cambio de absorbancia a 420 nm [34] (figura 4-12).

La LiP que su actividad depende del peroxido de hidrogeno, además posee algunas características con las hemoproteínas transportadoras de oxígeno.

La degradación que causa sobre de lignina se da por la ruptura de anillos aromáticos, por síntesis endógena oxida compuestos aromáticos no fenólicos, en la reacción se generan radicales arilo y alquilo que se anabolizan intracelularmente.



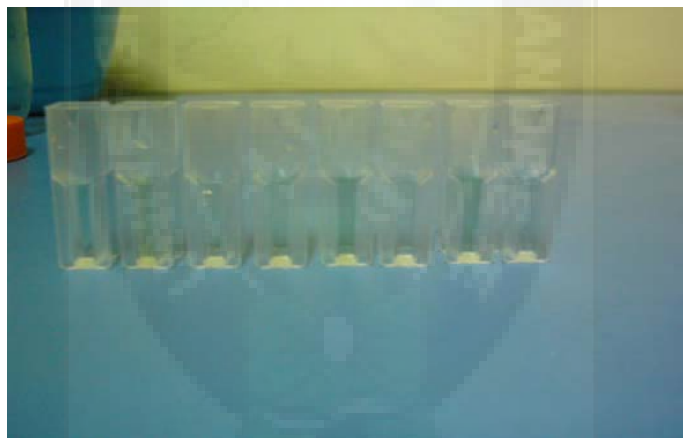
**Figura 24. Reacción enzimática para LiP por oxidación de ABTS.**



### ***c. Lacasa.-***

La actividad de la lacasa se determino mediante la variación de absorbancia del cultivo (entre 120 segundos) en espectrofotómetro (420nm) en cubetas de plástico con: ABTS 10mM (100µl), buffer acetato pH 3 100mM (400µl), sobrenadante de medio de cultivo (100µl).

La actividad de la lacasa se determino mediante la oxidación del sustrato ABTS la oxidación se midió mediante el incremento de absorbancia ( $\epsilon_{420} = 36000 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 420nm (ver figura 4-16). Lacasa una fenol oxidasa con cobre, enzima que reduce el oxígeno molecular a agua y a través la utilización de ciertos compuestos redox puedes ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina [12].



**Figura 25. Reacción enzimática para Lac por oxidación de ABTS.**

Esta enzima con cuatro átomos de cobre como cofactor y cuyo aceptor de electrones es el O<sub>2</sub> dando agua como producto [86]. La enzima oxidada ataca principalmente sustratos fenólicos, pero en este caso en presencia de ABTS [87,88]. Estos actúan como cooxidantes y capacitan ala enzima para atacar sustratos más difícilmente oxidables como los de tipo no fenólico.





Para todas las medidas de actividad enzimática, una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima, que catalizó la formación de 1 mol de producto por minuto bajo condiciones del análisis.

### 3.4.3 Cuantificación de las Enzimas.-

Determinado por la ecuación (1) según bibliografía.

$$[\text{Concentración}] = \frac{\text{Abs} \times 1000 \times V_t \times C}{\epsilon \times V_m} = Y \left( \frac{U}{L} \times \text{min}^{-1} \right)$$

**Abs:** variación de la absorbancia en los dos minutos (min.-1)

**Vt:** volumen total de la solución (mL)

**Vm:** volumen de la muestra

**ε:** coeficiente de extinción molar, donde:

**ε<sub>470</sub>** = 24500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Manganeso Peroxidasa)

**ε<sub>420</sub>** = 36000 m<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Lignina Peroxidasa – Lacasa).

**1000:** factor de conversión de moles a moles.

**C:** distancia de la cubeta por donde pasa el haz luminoso (1cm)

### 3.5 OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRDUCCION DE ENZIMAS LIGNINOLITICAS.-

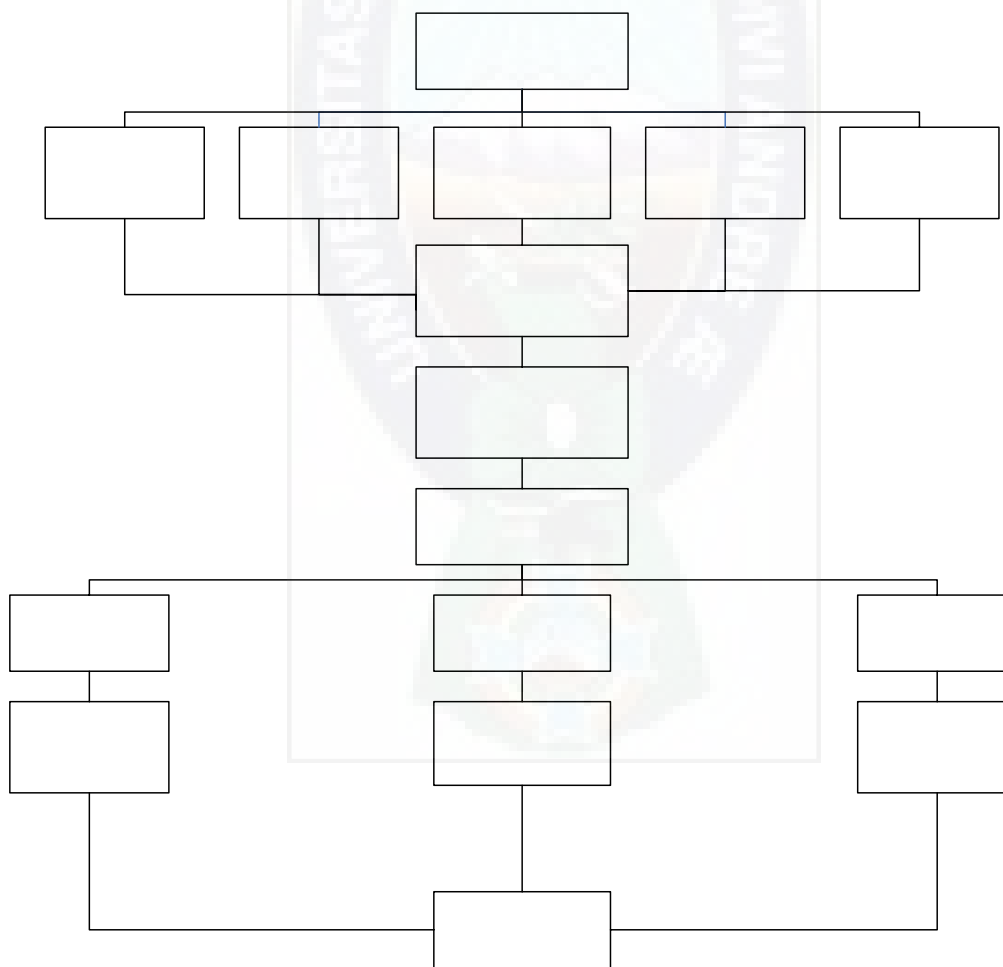
Una vez cuantificada la actividad enzimática ligninolítica, se procedió a realizar una





Se preparo un medio de cultivo Cu (II), en el cual se hizo un diseño factorial  $2^3$  con 8 combinaciones posibles, siendo los factores: glucosa, manganeso, extracto de levadura. Se inoculo las cepas fúngicas, se incubo a temperatura ambiente en oscuridad, a 20 °C, durante 4 semanas, se tomo una muestra de cada medio de cultivo cada 7 días, las pruebas fueron realizadas por triplicado, de igual forma que la anterior se procedió a determinar la actividad enzimática de MnP, LiP y Lacasa.

### 3.5.2 Medios de cultivo con diferentes sustratos lignocelulosicos.-



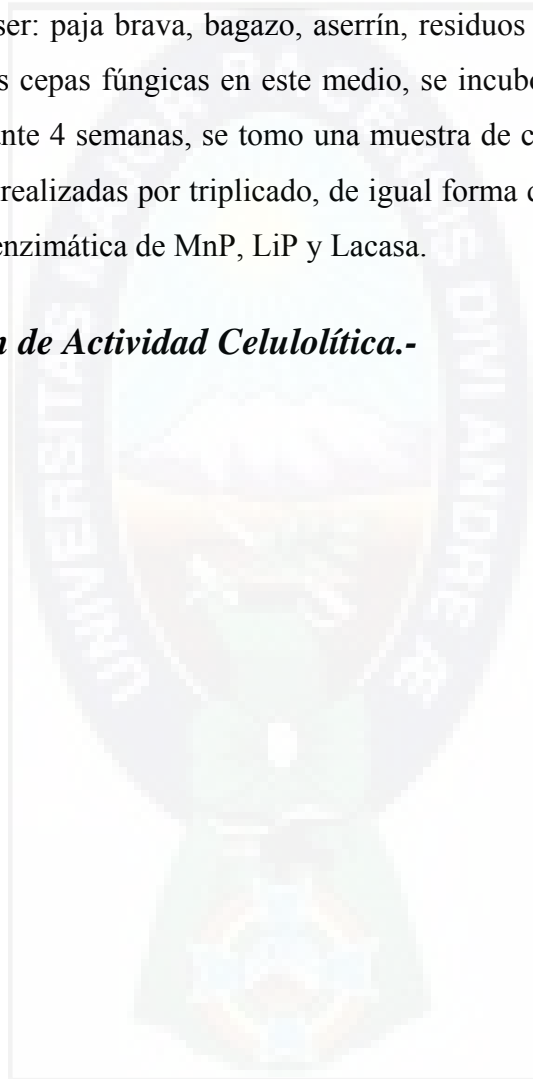
Cepas fúngicas  
actividad lignin

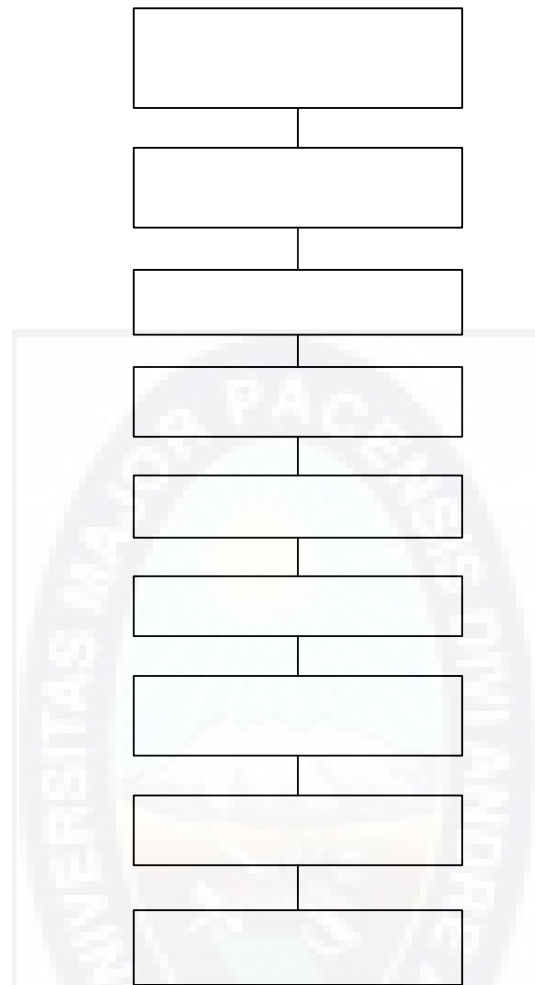


**Figura 27. Determinación enzimática en medios de cultivo con diferentes sustratos.**

Se preparo un medio de cultivo igual al anterior, con la diferencia de que en este medio de cultivo se suprimió la glucosa, y en su lugar se trabajo con diferentes sustratos lignocelulosicos, como ser: paja brava, bagazo, aserrín, residuos de quinua real, y cáscara de arroz., se inocularon las cepas fúngicas en este medio, se incubo a temperatura ambiente en oscuridad, a 20 °C, durante 4 semanas, se tomo una muestra de cada medio de cultivo cada 7 días, las pruebas fueron realizadas por triplicado, de igual forma que la anterior, se procedió a determinar la actividad enzimática de MnP, LiP y Lacasa.

### **3.6 Determinación de Actividad Celulolítica.-**





Muestra (so  
medio de c

Añadir 0,5  
cl

Añadir papel

Incubar a 50

**Figura 28. Determinación de la actividad Celulolítica.**

Se realizo la determinación cuantitativa de la actividad enzimática celulolítica combinada, se utilizo el método del “Acido 3,5 Dinitrosalicilico” (DNS), donde se agrego a la muestra (500µl) buffer citrato (1000µl) y se adiciono 100g de papel filtro, se dejo incubar por 60min., posteriormente se adiciono reactivo DNS (3000µl), ebulir la mezcla por 5min. y se procede a leer la absorbancia de la muestra en espectrofotómetro (550nm).

Agregar

Ebul

### **3.7 Cuantificación de proteínas totales.-**

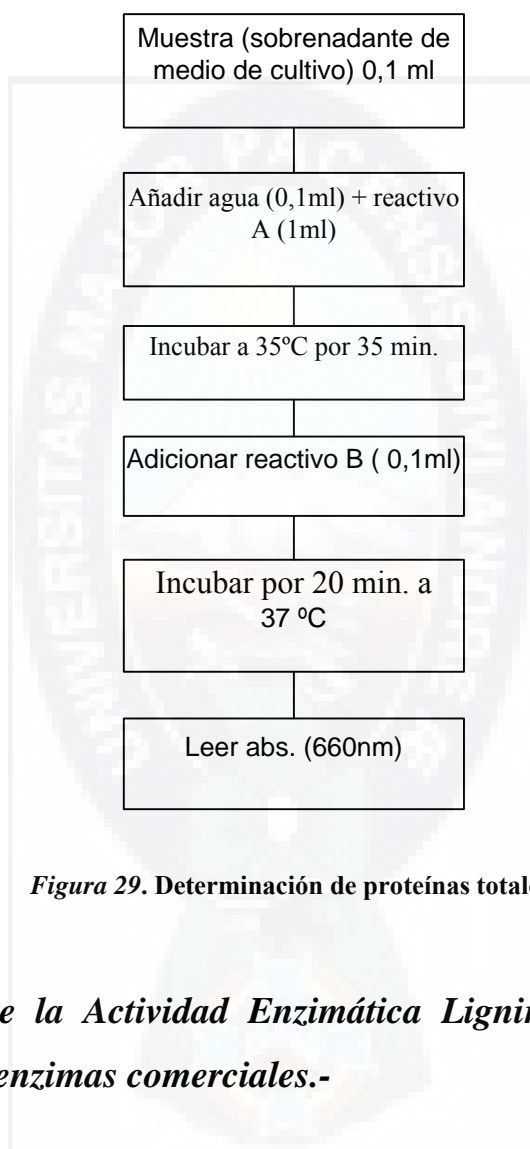
La concentración de proteínas de los sobrenadantes de los cultivos se midió por el

Enfriar a  
am



Leer ab

método de Lowry, utilizando el reactivo y el procedimiento de Bio-Rad reactivo folin Ciocalteu en un espectrofotómetro, teniendo en cuenta la capacidad de unión del colorante del reactivo a dichas moléculas, posteriormente se leyó de absorbancia de esta muestra en espectrofotómetro (660nm) en cubetas de plástico.

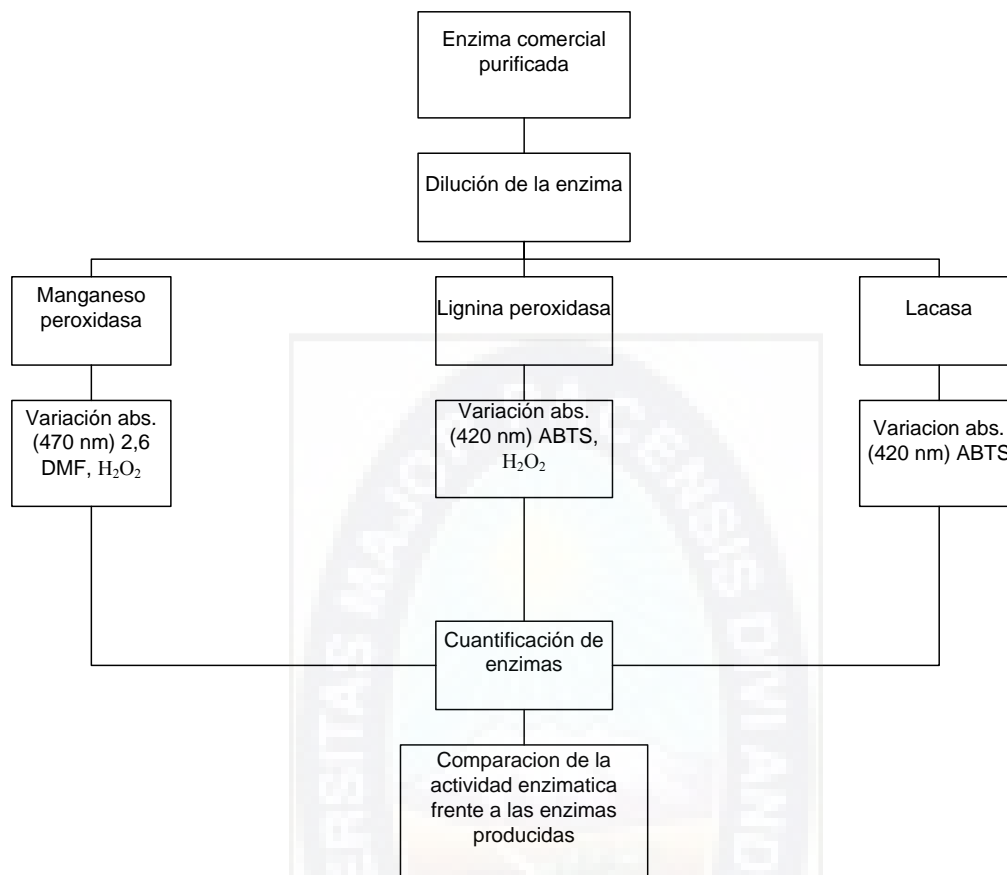


**Figura 29. Determinación de proteínas totales.**

### ***3.8 Comparación de la Actividad Enzimática Ligninolítica de las enzimas producidas frente a enzimas comerciales.-***

Para poder verificar la efectividad de las enzimas ligninolíticas producidas en el presente trabajo, se las comparo frente a enzimas comerciales, esto como una prueba no específica, ya que las enzimas producidas no están previamente purificadas.





**Figura 30. Determinación de la actividad enzimática de enzimas comerciales.**

Las enzimas comerciales utilizadas para esta prueba fueron Lacase de “Rhus vernificera” y Peroxidase de “Horseradish”.

### **3.9 Análisis estadístico.-**

El análisis de varianza (ANOVA), fue realizado en el software estadístico Statistica Release 6.0 Stat Soft con un nivel de confianza de 95%. Las superficies de respuesta fueron realizadas en el programa Microsoft Office Excel 2003.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### **4.1 DETERMINACION CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA LIGNINOLITICA.-**

A continuación se presenta la tabla 4-1 en la que se resume los resultados positivos, obtenidos en la determinación cualitativa de actividad ligninolítica.

**Tabla 10: Determinación de la actividad ligninolítica en medio solidó.**

Cepas fúngicas	ABTS	Poli-R
<b>IB-15B</b> ( <i>Stephanoma</i> )	+++	+
<b>IB-15Da</b> ( <i>Cephalosporium</i> )	++	-
<b>IB-26C</b> ( <i>Trinacrium</i> )	+++	+
<b>IB-18Cb</b> ( <i>Bdellospora</i> )	++	-
<b>IB-15A</b> ( <i>Dactylella</i> )	+	++
<b>IB-30B</b> ( <i>Sepedonium</i> )	-	++
<b>IB-29B</b> ( <i>Blastomyces</i> )	+	+++
<b>IB-5</b> ( <i>Spiromyces</i> )	-	+
<b>IB-20Ca</b> ( <i>Mycotypha</i> )	++	-
<b>IB-14A</b> ( <i>Triposporium</i> )	+	-
<b>IB-18B</b> ( <i>Fusoma</i> )	-	++
<b>IB-6</b> ( <i>Circinutrychum</i> )	+	-

Fuente: Elaboración propia

(-) No hubo decoloración

(+) decoloración poco visible

(++) decoloración media

(+++) buena decoloración

Cuatro cepas dieron positivo en los dos medios de cultivo, fueron: IB-15B (*Stephanoma*), IB-26C (*Trinacrium*), IB-15A (*Dactylella*), IB-29B (*Blastomyces*).

Cinco cepas fúngicas mostraron un resultado positivo para el medio sólido ABTS, fueron: IB-15Da (*Cephalosporium*), IB-18Cb (*Bdellospora*), IB-18Cb (*Bdellospora*), IB-20Ca (*Mycotypha*), IB-14A (*Triposporium*), IB-6 (*Circinutrychum*).





Las tres cepas restantes presentaron un resultado positivo respecto al medio sólido Poly R-478, fueron: IB-30B (*Sepedonium*), IB-5 (*Spiromyces*), IB-18B (*Fusoma*).

De las 31 (100%) cepas fúngicas aisladas que fueron inoculadas en medios ABTS y Poly-R, 12 (38,7%) cepas fúngicas presentaron cambio de coloración en el medio, es decir presentaron actividad ligninolítica, el resto de los hongos 19 (61,3%) no presentaron actividad ligninolítica, por que no se los tomo en cuenta para otras pruebas en adelante.

#### **4.2. DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA LIGNINOLITICA.-**

##### **4.2.1. Manganeso Peroxidasa.-**

De las doce cepas fúngicas con actividad enzimática, los resultados fueron los siguientes, para MnP.

Como se puede observar en la tabla 11 los resultados son muy variados para cada cepa fúngica, ya que varían en el medio de cultivo, ya que cada una tiene diferentes requerimientos, pero el tiempo necesario para alcanzar el máximo de producción (o actividad) de manganeso peroxidasa es el mismo. La concentración de enzima detectada es influida por el medio de cultivo que se utilice (ver anexo C-1).

Las doce cepas fúngicas alcanzo su actividad máxima a un tiempo de 28 días.

**Tabla 11: Actividad enzimática máxima para MnP de diferentes cepas fúngicas con variación Mn**

<b>Cepa fúngica</b>	<b>Medio</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Mn (mg/L)</b>	<b>Ext. Lev. (g/L)</b>	<b>Tiempo (días)</b>	<b>MnP (UI/L)</b>
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	6	5	40	2	28	<b>76,65</b>
IB-15B ( <i>Stephanoma</i> )	3	1	80	0.5	28	<b>57,89</b>
IB-29B ( <i>Blasthomyces</i> )	5	1	80	2	28	<b>40,24</b>

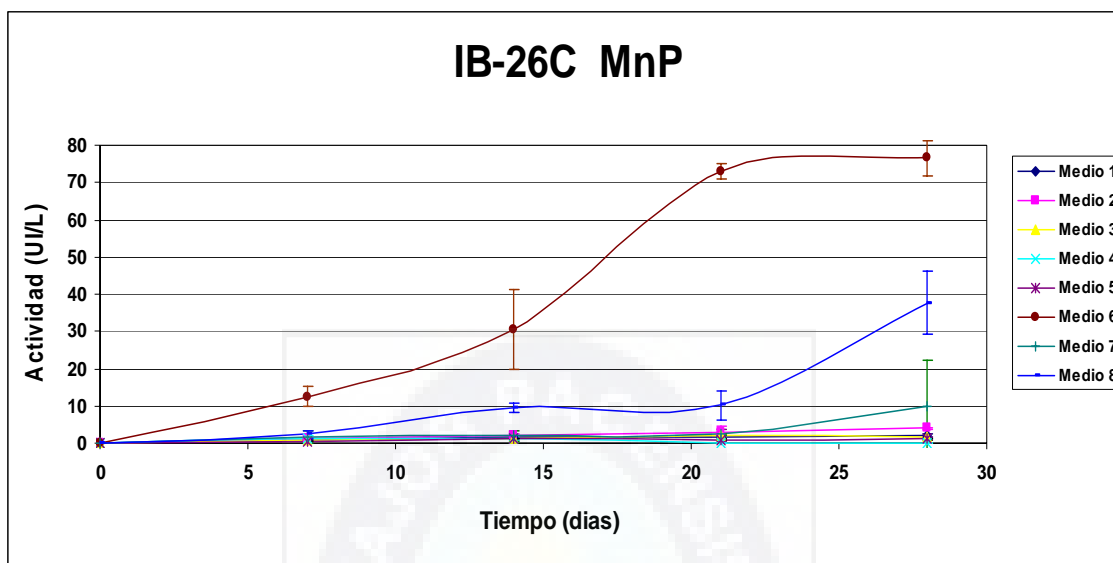


IB-18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	28	<b>17,68</b>
IB-15Da ( <i>Cephalosporiu</i> )	2	1	40	2	28	<b>13,60</b>
IB-6 ( <i>Circinutrychum</i> )	3	1	80	0,5	28	<b>6,80</b>
IB-20Ca ( <i>Mycotypha</i> )	5	1	80	20	28	<b>3,26</b>
IB-5 ( <i>Spiromyces</i> )	4	5	40	0,5	28	<b>2,72</b>
IB-18B ( <i>Fusoma</i> )	4	5	40	0,5	28	<b>2,31</b>
IB-14A ( <i>Triposporium</i> )	4	5	40	0,5	28	<b>2,31</b>
IB-30B ( <i>Sepedonium</i> )	7	5	80	0,5	28	<b>2,17</b>
IB-15A ( <i>Dactylella</i> )	6	5	40	2	28	<b>1,90</b>

La cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*) (figura 31) fue la que presento mayor actividad enzimática para Manganese peroxidasa (MnP) a los 28 días, en el medio 6, llegando a 76,65 (UI/L), en este medio existe mayor fuente de carbono, de vitaminas, de nitrógeno, pero la concentración de manganeso es la mínima, por lo podemos afirmar que esta cepa no necesita mayor concentración de manganeso para producir enzima.

La actividad de MnP es sensible a la presencia de algunos metales (manganeso, cobre, hierro, molibdeno, zinc, níquel) son esenciales para el crecimiento fúngico y también actúan como co-factores enzimáticos induciendo la actividad ligninolítica. Entretanto, estos metales son tóxicos para el hongo cuando existen en exceso, ya que pueden inhibir el crecimiento de la cepa fúngica y la actividad enzimática [83].





**Figura 31.** Actividad enzimática Manganeso peroxidasa para la cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*) de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn.

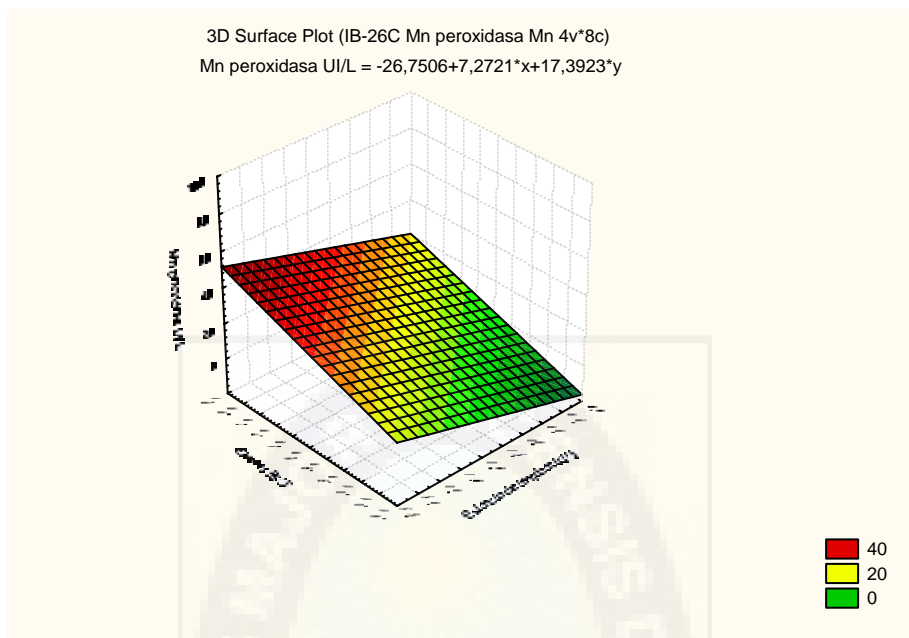
Los resultados del análisis de varianza de la cepa IB-26C (*Trinacrium*) que muestra (tabla 12) la interacción de los tres componentes como ser: glucosa, extracto de levadura y Mn tiene un valor de F igual a 4,599763 lo que implica que la interacción de estos tres es significativa. Por otro lado Prob > F menores a 0,23480 indican que los términos significantes del modelo.

**Tabla 12:** Análisis de efectos principales ANOVA para la cepa IB-26C. (*Trinacrium*) para MnP, de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn

Factores	SS Suma de cuadrados	DF Grados de libertad	MS Media de cuadrados	F Valor crítico	Prob > F	
<b>Interacción</b>	2259,566	1	2259,566	4,599763	0,098566	significativo
<b>Glucosa [g/L]</b>	1692,274	1	1692,274	3,444935	0,137025	significativo
<b>Mn [mg/L]</b>	137,306	1	137,306	0,279512	0,624997	
<b>Extracto de levadura [g/L]</b>	1361,213	1	1361,213	2,770999	0,171318	significativo
<b>Error</b>	1964,941	4	491,235			

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0



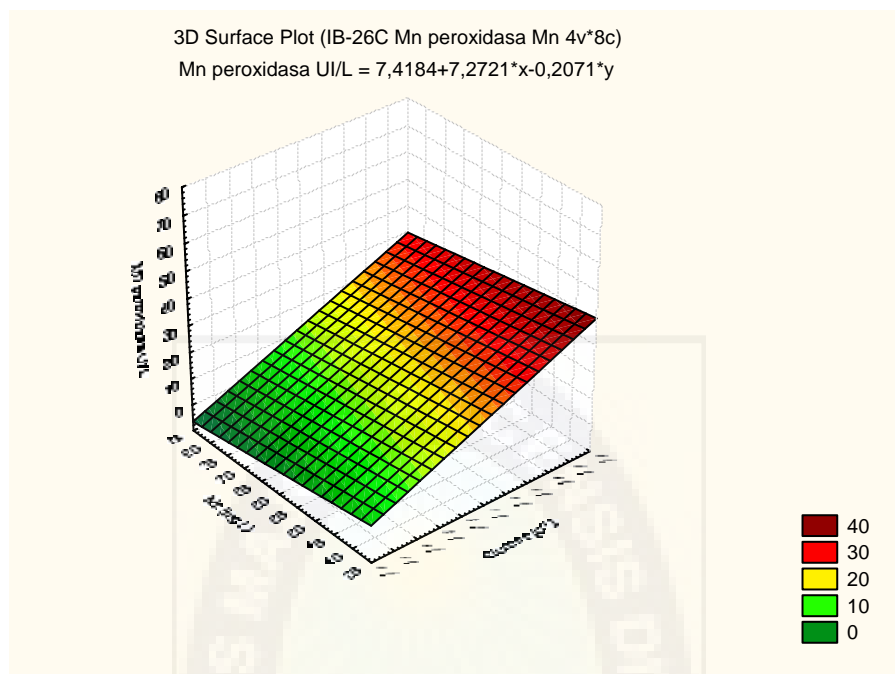


**Figura 32. Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad MnP para la cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*)**

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta grafica (Figura 32) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y menor concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Manganeso peroxidasa.





**Figura 33. Efecto de la glucosa y Mn sobre la actividad MnP para la cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*)**

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta grafica (Figura 33) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y menor concentración de Mn en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Manganese peroxidasa.

A mayor producción de enzimas ligninolíticas por IB-26C (*Trinacrium*) ocurre durante el metabolismo secundario, por la influencia de algunos nutrientes como carbono, y nitrógeno [81]. Durante el crecimiento de IB-26C (*Trinacrium*) la actividad MnP aumentara durante el metabolismo primario entre los 14 a 21 días, en paralelo con el crecimiento del hongo, evidenciando que esas enzimas no son metabolitos secundarios, mas parecen ser dependientes de crecimiento fúngico [82]. La producción de estas enzimas no fue inhibida por altas concentraciones de extracto de levadura.

IB-15B (*Stephanoma*) (ver anexo C-1) a mayor concentración de extracto de levadura y mayor concentración de manganeso, produciría una mayor actividad enzimática, esto según los resultados obtenidos según los análisis de estadística realizada, por otro lado se



puede notar que la concentración de glucosa no influye en la actividad enzimática de esta cepa fúngica (ver anexo D-1).

Otra cepa que alcanzó actividad enzimática significativa, fue la IB-29B (*Blastomyces*) (ver anexo D-1).

#### 4.2.2. Lignina Peroxidasa.-

**Tabla 13: Actividad enzimática máxima LiP de diferentes cepas fúngicas con variación Mn.**

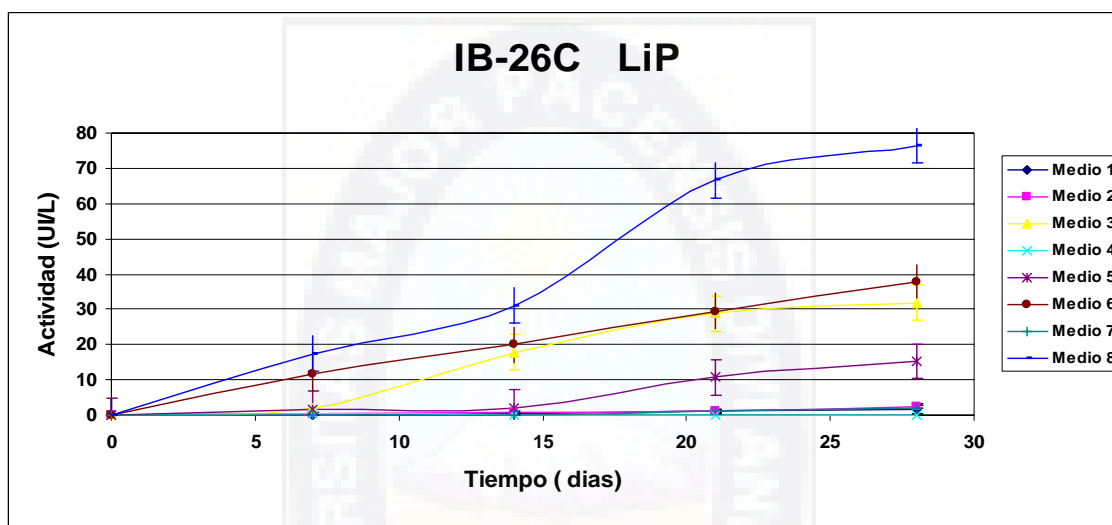
Cepa fúngica	Medio	Glucosa (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	LiP (UI/L)
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	28	<b>76,50</b>
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	28	<b>69,69</b>
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	3	1	80	2	28	<b>61,76</b>
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	8	5	80	2	28	<b>50,69</b>
IB15Da( <i>Cephalospori</i> )	3	1	40	2	28	<b>38,56</b>
IB6 ( <i>Circinutrychum</i> )	5	1	80	0,5	28	<b>12,25</b>
IB-5 ( <i>Spiromyces</i> )	4	5	40	0,5	28	<b>10,58</b>
IB-30B ( <i>Sepedonium</i> )	1	1	40	0,5	28	<b>4,66</b>
IB-18B ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	28	<b>3,76</b>
IB-20Ca ( <i>Mycotypha</i> )	7	5	80	0,5	28	<b>1,86</b>
IB-14A ( <i>Triposporium</i> )	5	1	80	2	28	<b>1,58</b>
IB-15A ( <i>Dactylella</i> )	8	5	80	2	28	<b>1,02</b>

En la tabla 13 se puede notar que el medio de preferencia para la producción de esta enzima es el medio 8, pero esto depende de la cepa fúngica, el tiempo óptimo para el alcance de la mayor actividad enzimática es a los 28 días (ver anexo C-2).

La cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*) (figura 34) fue la que presento mayor actividad enzimática para Manganeso peroxidasa (MnP) a los 28 días, en el medio 8, llegando a 76,50 (UI/L), este medio contiene mayor concentración de la composición del medio, por lo que se denota que esta fúngica es muy exigente en sus requerimientos nutricionales.



La producción de LiP aparentemente es limitada por ciertos hongos basidiomicetos, pero no se descarta la hipótesis de que otros hongos sean capaces de producir dicha enzima, su excepcional potencial degradativo no está limitado a la lignina, ya que la última década fueron descritos como posibles sustratos para esta enzima derivados geo-bioquímicos de lignina, y contaminantes orgánicos entre los cuales están los xenobioticos [76].



**Figura 34.** Actividad enzimática Lignina peroxidasa para la cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*) de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn.

Fuente: Elaboración propia

La secreción de esta enzima probablemente resulta de modificaciones fisiológicas características del metabolismo primario a metabolismo secundario, son diferentes condiciones y tipo de sustrato [76].

La actividad enzimática alcanzada se puede deber a la interacción de los componentes del medio y la concentración, lo cual favorezca al metabolismo del microorganismo y se pueda hacer posible la producción de enzima tipo LiP.



**Tabla 14: Análisis de efectos principales ANOVA para la cepa IB-26C. (*Trinacrium*) para LiP de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn**

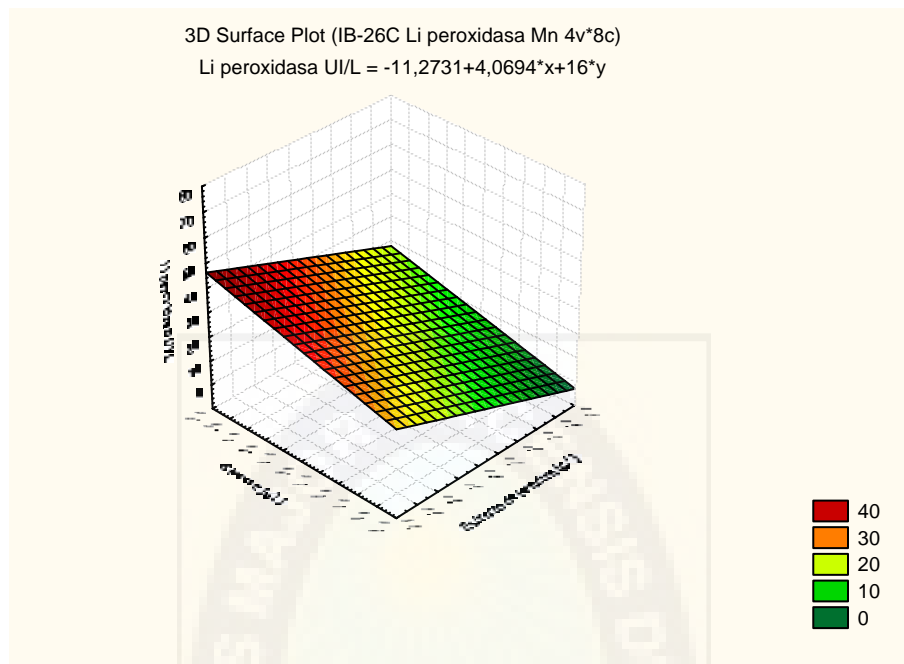
Factores	SS Suma de cuadrados	DF Grados de libertad	MS Media de cuadrados	F Valor critico	Prob > F	
<b>Interacción</b>	3506,256	1	3506,256	5,673609	0,075830	significativo
<b>Glucosa [g/L]</b>	529,932	1	529,932	0,857504	0,406850	significativo
<b>Mn [mg/L]</b>	870,372	1	870,372	1,408383	0,300991	significativo
<b>Extracto de levadura[g/L]</b>	1152,000	1	1152,000	1,864096	0,243896	significativo
<b>Error</b>	2471,975	4	617,994			

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

Los resultados del análisis de varianza de la cepa IB-26C (*Trinacrium*) que muestra (tabla 14) la interacción de los tres componentes como ser: glucosa, extracto de levadura y Mn tiene un valor de F igual a 5,673609 lo que implica que la interacción de estos tres es significativa. Por otro lado Prob > F menores a 0,37073 indican que los términos significantes del modelo.





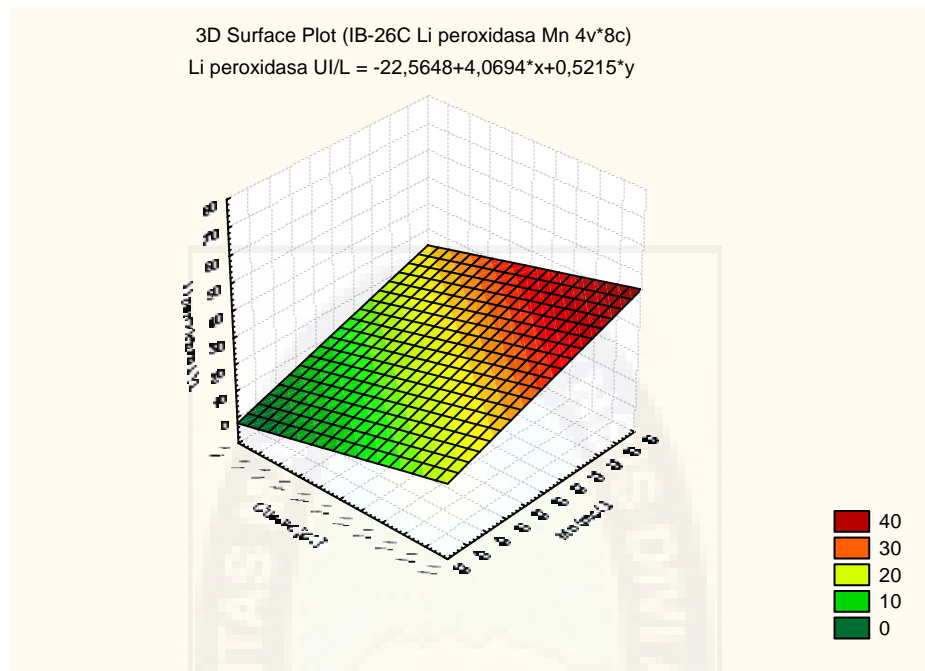


**Figura 35. Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad LiP para la cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*)**

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta gráfica (Figura 35) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y menor concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Lignina peroxidasa, es posible que este hongo requiera mayor fuente de carbono para aumentar su actividad enzimática, ya que la glucosa, como bien sabemos puede ser un co-factor para la producción de estas enzimas, de todas maneras el extracto de levadura no influye en la actividad de la enzima.





**Figura 36. Efecto de la glucosa y Mn sobre la actividad LiP para la cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*)**

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta grafica (Figura 36) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y mayor concentración de Mn en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Manganese peroxidasa, es muy importante el papel que juega el Mn ya que es un inductor de estas enzimas.

En IB-26C (*Trinacrium*) al parecer según los análisis estadísticos parece tener una gran influencia la fuente de carbono adicionada en el medio, ya que para esta misma cepa fúngica en el medio 6, el cual tiene la misma concentración de glucosa, pero no así de manganeso, tiene la segunda actividad enzimática mas alta, no olvidemos que la glucosa también puede actuar como inductor enzimático.

IB15B (*Stephanoma*) ( ver anexo C-2), requiere para una mejor actividad enzimática, una concentración mayor de extracto de levadura y una menor concentración de glucosa y



extracto de levadura, la influencia de la fuente de nitrógeno es muy importante en la producción de estas enzimas, por otro lado, el extracto de levadura contiene algunas vitaminas que pueden favorecer a la permeabilidad de la membrana plasmática, esto también puede influir en el proceso de expresión de enzimas (ver anexo C-2).

Los requerimientos nutricionales son muy distintos para cada una de las cepas fúngicas, es por eso que el medio de cultivo no se repite.

Algunos hongos productores de LiP no producen enzima en compuestos fenólicos, ya que acusan inactivación de la actividad de LiP e interfieren en la oxidación de ABTS, causando inhibición competitiva por el sustrato enzimático, En estas condiciones de cultivo se torna la necesidad la utilización de otros sustratos para la determinación de actividad LiP, como por ejemplo veratryl alcohol [83]. Talvez la baja actividad enzimática de algunas cepas se deba a que no se utilizo un sustrato adecuado.

#### **4.2.3. Lacasa.-**

Notamos claramente en la tabla 16 que solo cinco cepas fúngicas alcanzaron una actividad enzimática significativamente buena, ya que las restantes lograron producir enzimas de actividad lacasa, pero no con éxito, esto puede deber se a diferentes factores los cuales discutiremos mas adelante.

IB-18Cb (*Bdellospora*) (ver anexo C-3) a mayor concentración de extracto de levadura y manganeso, llegaría a una mejor actividad enzimática, podemos notar que la concentración de glucosa no afecta en la producción de enzima (ver anexo D-3).

La cepa IB-26C (*Trinacrium*) tuvo una actividad enzimática que fue significativa (ver anexo C-3), es por esta razón que se la considero entre las cepas fúngicas seleccionadas, para las pruebas que se realizaran mas adelante.



**Tabla 15: Actividad enzimática máxima Lac de diferentes cepas fúngicas con variación Mn.**

Cepa fúngica	Medio	Glucosa (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	Lac (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	2	1	40	2	28	<b>74,12</b>
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	5	1	80	2	28	<b>64,65</b>
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	28	<b>51,86</b>
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	5	1	80	2	28	<b>45,05</b>
IB6 ( <i>Circinutrychum</i> )	2	1	40	2	28	<b>29,41</b>
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	3	1	80	0,5	28	<b>3,06</b>
IB-20Ca ( <i>Mycotypha</i> )	4	5	40	0,5	21	<b>2,90</b>
IB-5 ( <i>Spiromyces</i> )	8	5	80	2	28	<b>2,00</b>
IB-18B ( <i>Fusoma</i> )	1	1	40	0,5	28	<b>1,82</b>
IB-14A ( <i>Triposporium</i> )	2	1	40	2	28	<b>1,79</b>
IB-30B ( <i>Sepedonium</i> )	2	1	40	2	28	<b>1,74</b>
IB-15A ( <i>Dactylella</i> )	5	1	80	2	28	<b>1,55</b>

En la tabla 16 observamos los resultados mas significativos ( ver anexo B-3)para la actividad enzimática lacasa, de igual forma notamos que el medio 2 y 5 son los preferidos por esta enzima, se puede afirmar que es por la concentración de extracto de levadura que contienen es tos medios, ya que al parecer se requiere una buena concentración de fuente de nitrógeno para producir esta enzima, las seis cepas fúngicas restantes no se las tomo en cuenta, ya que tuvieron actividades enzimáticas no significativas.

La cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*) (figura 4-17) fue la que presento mayor actividad enzimática para Lacasa (Lac) a los 28 días, en el medio 2, llegando a 74,12 (UI/L). IB-29B (*Blastomyces*) produce el sistema enzimático ligninolítico durante el metabolismo secundario, en respuesta a la limitación de fuente de carbono [57, 58]. Sin embargo, para otros hongos la degradación de la lignina se produce bajo condiciones de exceso en carbono y



nitrógeno [59, 60].

De forma general en los laboratorios, la producción de enzimas ligninolíticas y la propia ligninólisis se produce bajo elevadas tensiones de  $O_2$  [61] aunque los cultivos de IB-29B (*Blastomyces*) en la degradación selectiva de la lignina es estimulada por el aumento de fuente de nitrógeno y vitaminas (extracto de levadura) [62, 63].

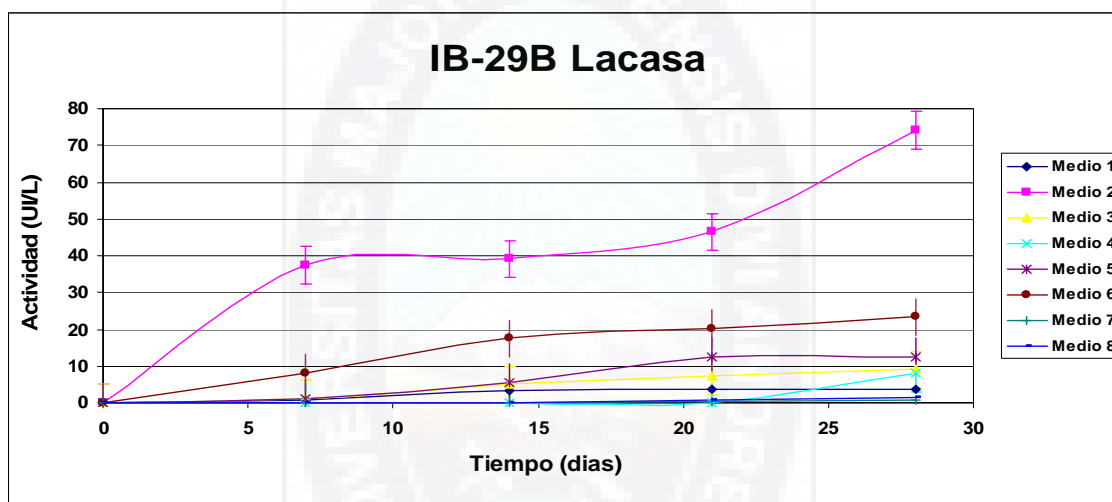


Figura 37. Actividad enzimática Lacasa para la cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*) de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn.

La actividad producida también tiene que ver con el crecimiento del hongo, ya que su actividad enzimática va incrementándose según el crecimiento de la cepa fúngica, podemos ver que el medio 2 lleva delantera en la producción de enzimas son respecto de los otros siete medios, lo esencial para esta cepa es la fuente de nitrógeno.

Tabla 16: Análisis de efectos principales ANOVA para la cepa IB-29B (*Blastomyces*) para Lacasa de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Mn

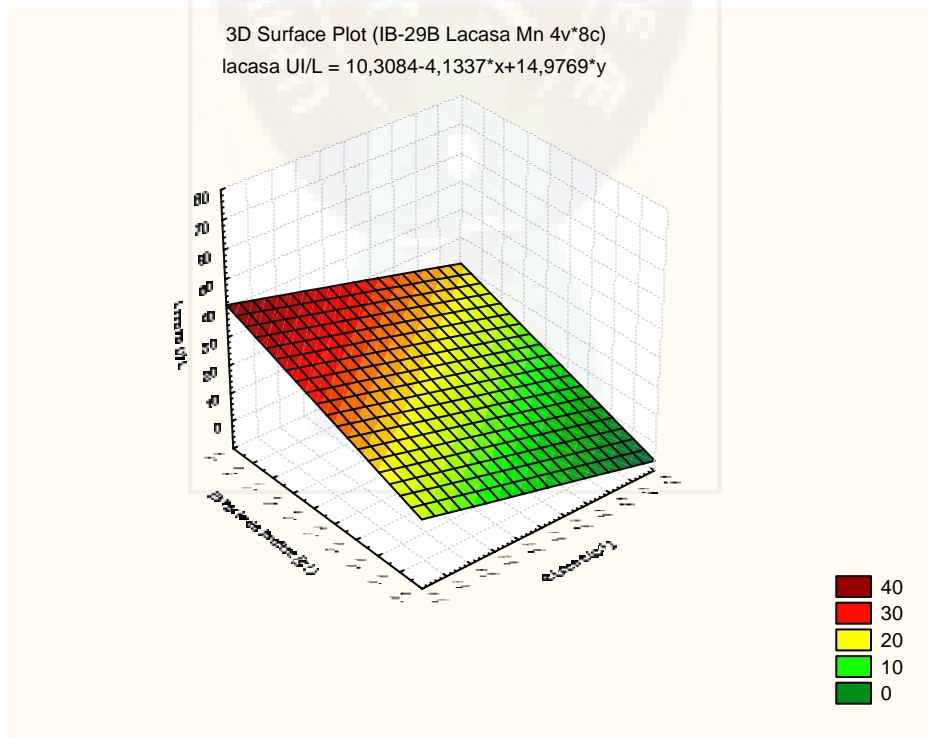
Factores	SS Suma de cuadrados	DF Grados de libertad	MS Media de cuadrados	F Valor crítico	Prob > F	
Interacción	2212,049	1	2212,049	5,260821	0,083521	significativo
Glucosa [g/L]	546,794	1	546,794	1,300417	0,317781	significativo
Mn [mg/L]	912,792	1	912,792	2,170854	0,214647	significativo
Extracto de	1009,377	1	1009,377	2,400559	0,196219	significativo



<b>levadura[g/L]</b>						
<b>Error</b>	1681,904	4	420,476			

Los resultados del análisis de varianza de la cepa IB-29B (*Blastomyces*) que muestra (tabla 15) la interacción de los tres componentes como ser: glucosa, extracto de levadura y Mn tiene un valor de F igual a 5,260821 lo que implica que la interacción de estos tres es significativa. Por otro lado Prob > F menores a 0,26245 indican que los términos significantes del modelo.

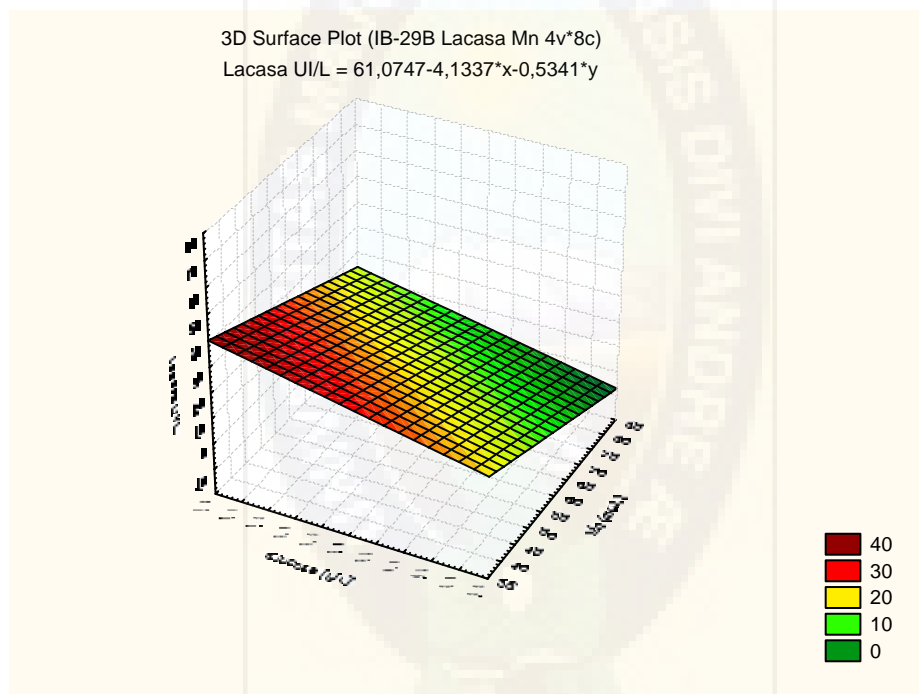
En esta grafica (Figura 38) podemos comprender que a menor concentración de glucosa y mayor concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Lacasa.



**Figura 38. Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad Lacasa para la cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*).**

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta grafica (Figura 39) podemos comprender que a menor concentración de glucosa y mayor concentración de Mn en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Manganese peroxidasa.



**Figura 39. Efecto de la glucosa y Mn sobre la actividad Lacasa para la cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*).**

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

También se dice que este tipo de enzimas pueden ser reguladas por metales como el manganeso [35]. La influencia del pH para oxidar el ABTS tanto como el DMF es importante, este fue conducido en el caso del ABTS por tampón acetato a pH 3 100mM y para DMF por



tampón succinato pH 5 100 mM, ya que según la bibliografía revisada [81], estos niveles de pH son óptimos para cada tipo de actividad enzimática que se requiere determinar.

Como las enzimas son proteínas, la variación de pH afecta profundamente al carácter iónico dos grupos carboxilo y amino de la superficie de la molécula, influenciando bastante en la naturaleza catalítica. Estas enzimas como ya lo mencionamos tiene un pH óptimo característico exactamente igual al medio en el que se encuentran [84].

Son muchos los factores que afectan la producción de enzimas ligninolíticas en hongos. Además, las diferentes cepas corresponden de un modo particular a cada uno de estos factores. Debido a esto, el estudio combinado de dos o más factores es acertado para estudiar no solo la producción de enzimas sino la posible interacción entre estos compuestos.

La entrada de aire u oxígeno tiene gran relevancia debido a que las enzimas ligninolíticas son activadas a diferentes tensiones de oxígeno en el medio.

Se ha demostrado que la lignina no es una fuente aprovechable para el crecimiento de los hongos sino que es necesaria la presencia de un co-sustrato [85]. Por lo tanto la adquisición de la habilidad para mineralizar lignina sería ventajoso por el aprovechamiento de otras moléculas más fácilmente metabolizables, teniendo en cuenta las relaciones intermoleculares presentes en la estructura de las paredes celulares.

El patrón de actividad de estas enzimas es específico del género y especie de hongo de la PB involucrado, algunos excretan la LiP, la MnP y no la Lac ó la MnP, la Lac y no la LiP; La síntesis fúngica de la LiP y la MnP se realiza bajo una alta tensión de oxígeno, se reprime en agitación o cuando los hongos de la PB, se cultivan en medio líquido, sin embargo la Lac se sintetiza sólo en agitación, estas tres enzimas son inespecíficas y se inducen en condición limitante de nutrientes, como la fuente de nitrógeno [39].

Según los resultados obtenidos, podemos comprobar las referencias de que una misma cepa fúngica es capaz de producir las tres enzimas ligninolíticas, ya que en este caso, cuatro cepas son capaces de producir al mismo tiempo MnP, LiP, Lac, unas con mas actividad





enzimática en LiP y otras con mayor actividad enzimática en Lac.

Las cepas que fueron capaces de producir los tres tipos de enzimas fueron: IB-29B, IB-26C, IB-15B, IB-18Cb, (ver anexos C-1, C-2, C-3) según la caracterización realizada se cree que son hongos basidiomicetos, pero esto aun esta por confirmarse, en posteriores pruebas moleculares.

Es interesante notar que las condiciones óptimas para la producción de estas enzimas son las mismas, este hecho es una ventaja para procesos de biorremediación dado que en un mismo medio se produce la máxima cantidad de enzima y fue demostrado que en estas actúan sinérgicamente en procesos de degradación [78].

De las doce cepas que se seleccionaron cualitativamente, solo seis mostraron una buena actividad enzimática, esto se debe a que muy pocas son las cepas fúngicas con actividad ligninolítica que están distribuidas ampliamente en el ecosistema.

#### **4.3. OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRDUCCION DE ENZIMAS LIGNINOLITICAS.-**

Con el objetivo de llegar a obtener una mayor actividad enzimática fue que se realizo una segunda modificación de medio de cultivo para producción de enzimas ligninolíticas. Esta prueba se llevo a cabo con seis cepas seleccionadas: IB-29B (*Blastomyces*), IB-18Cb (*Bdellospora*), IB-26C (*Trinacrium*), IB-15B (*Stephanoma*), IB-15Da (*Cephalosporium*), IB-6 (*Circinutrychum*). Esto por los resultados obtenidos en la anterior prueba

##### **4.3.1 Medios de cultivo con variación de concentración de Cobre.-**

Se realizo nuevamente un diseño factorial diseño factorial  $2^3$ , siendo los factores esta vez: glucosa, cobre, extracto de levadura. Esta prueba se debe a que según bibliografía revisada, el cobre es un buen inductor de este tipo de enzimas, especialmente lacasas, ya que estas llevan en su estructura cobre.



### a. *Manganeso Peroxidasa.-*

Se observa que la máxima producción de enzima, se da donde la concentración de cobre es más baja, Si bien es un hecho común que la MnP se induzca con otro metal que no sea Mn ya se ha mostrado que en *S. hirsutum* el Cd induce la síntesis de esta enzima. [77]. También se puede afirmar que la producción de MnP son incrementadas con el agregado de Cu al medio, tal no es el caso para IB-29B (*Blastomyces*) [76].

En la tabla 18 observamos que en las tres cepas con mayor actividad enzimática (ver anexo C-4), la concentración de cobre es mínima, lo cual confirma, que para la producción de esta enzima, es limitada la adición de cobre en el medio de cultivo. No podemos afirmar que esto sea cierto para todas las cepas fúngicas, ya que cada una tiene sus propios requerimientos.

**Tabla 17: Actividad enzimática MnP de diferentes cepas fúngicas con variación Cu.**

Cepa fúngica	Medio	Glucosa (g/L)	Cu (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	MnP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	6	5	40	2	21	245,56
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	4	5	40	0,5	21	122,84
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	1	1	40	0,5	28	121,64
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	5	1	80	2	28	91,31
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	7	5	80	0,5	28	82,68
IB-6 ( <i>Circinutrychum</i> )	5	1	80	2	21	61,03

En IB-29B (*Blastomyces*) la fuente de carbono y nitrógeno es muy importante ya que en el medio el cual se presentó la mayor actividad enzimática, se tiene la concentración de estos alta, de esta forma podemos decir que es muy importante la participación de nitrógeno y glucosa en el metabolismo de los hongos para la producción de esta enzima.



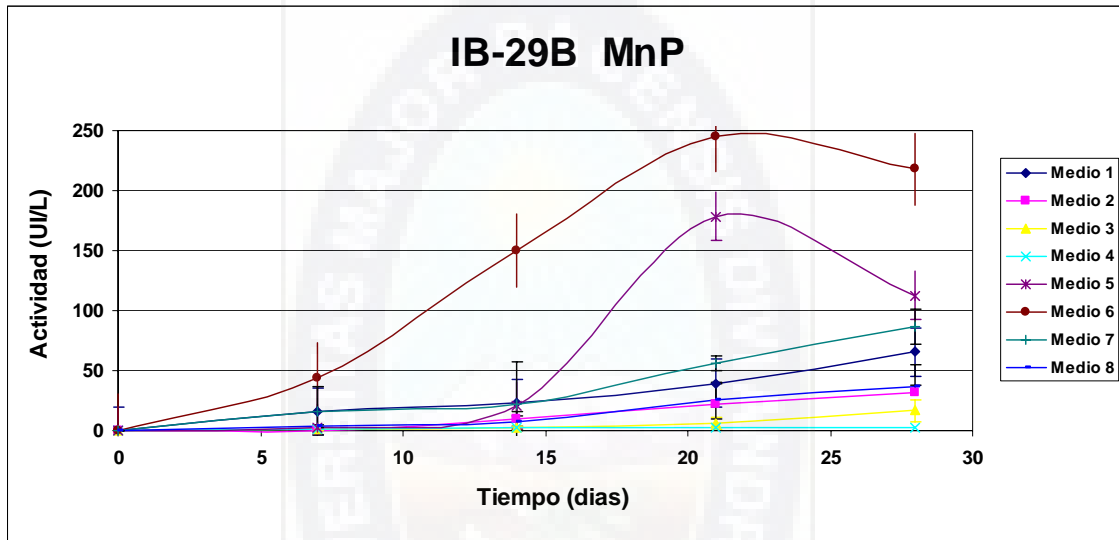


Figura 40. Actividad enzimática Manganese peroxidasa para la cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*) de 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Cu.

Tabla 18: Análisis de efectos principales ANOVA para la cepa IB-29B (*Blastomyces*) para MnP, de 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Cu.

Factores	SS Suma de cuadrados	DF Grados de libertad	MS Media de cuadrados	F Valor crítico	Prob > F	
Interacción	54992,36	1	54992,36	5,832676	0,073150	significativo
Glucosa [g/L]	791,59	1	791,59	0,083958	0,786402	significativo
Cu [mg/L]	95,82	1	95,82	0,010163	0,924550	no significativo
Extracto de levadura [g/L]	12859,93	1	12859,93	1,363968	0,307715	significativo
Error	37713,30	4	9428,32			

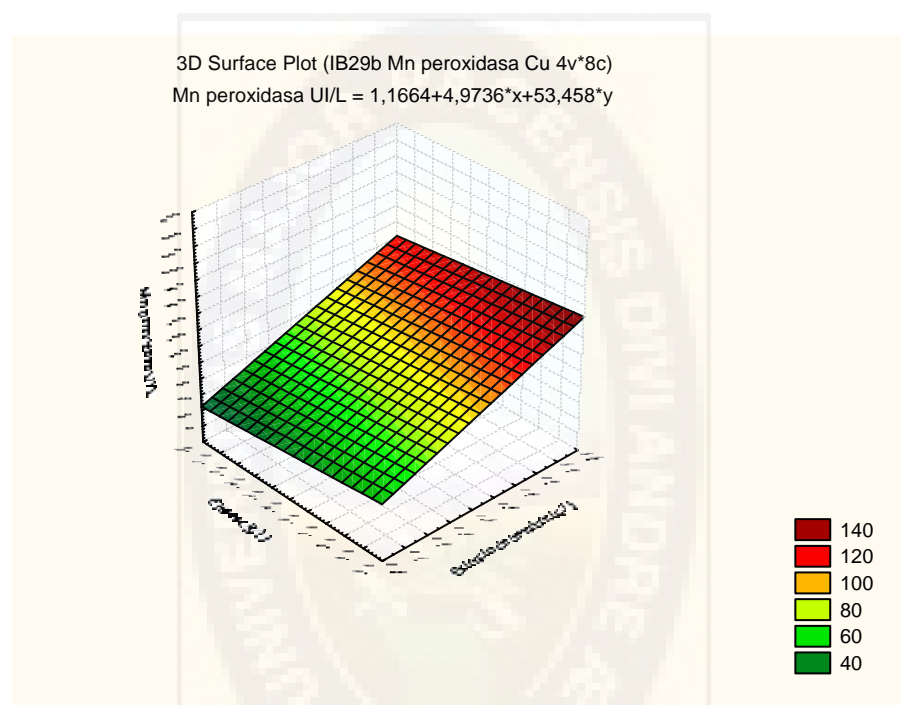
Fuente: Elaboración propia con datos

procesados en Statistica 6.0

Los resultados del análisis de varianza de la cepa IB-26C (*Trinacrium*) que muestra (tabla 17) la interacción de los tres componentes como ser: glucosa, extracto de



levadura y Cu tiene un valor de F igual a 5,832676 lo que implica que la interacción de estos tres es significativa. Por otro lado Prob > F menores a 0,71014 indican que los términos significantes del modelo.



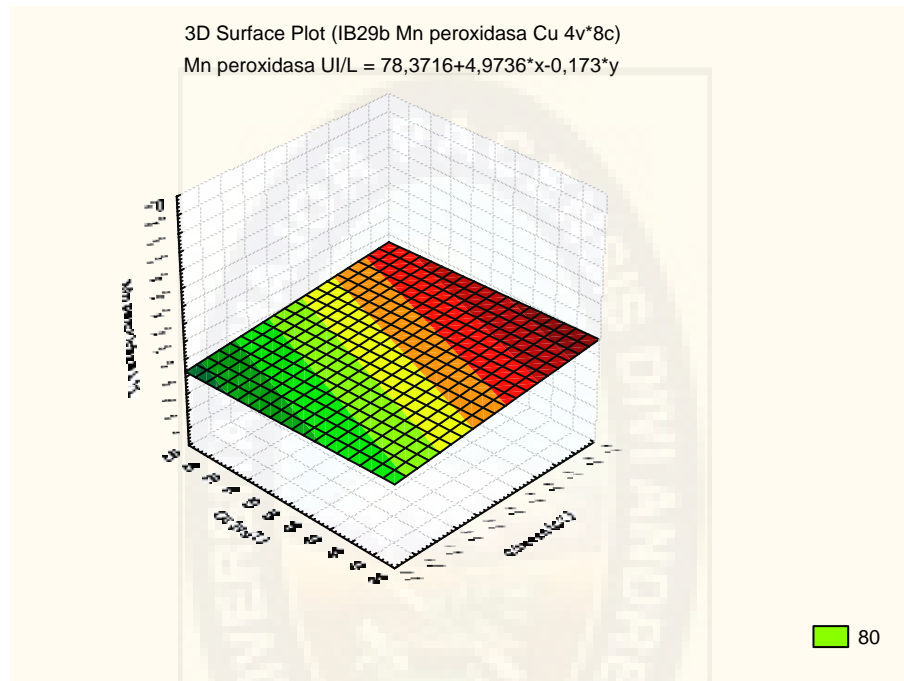
**Figura 41. Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad MnP para la cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*).**

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta gráfica (Figura 41) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y mayor concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Manganese peroxidasa, aunque se hace notar más la influencia de la fuente de nitrógeno que la fuente de carbono.

Lo interesante de este resultado, es conocer que la interacción de los tres componentes es esencial, ya que si bien tiene más influencia el extracto de levadura, también la tiene el cobre y la glucosa, ya que sin uno de estos elementos no se obtendría la misma actividad enzimática.





**Figura 42.** Efecto de la glucosa y Cu sobre la actividad MnP para la cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*).

Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta grafica (Figura 42) podemos comprender que la concentración de Cu en el medio de cultivo, no influye en la actividad enzimática para Manganese peroxidasa. Sin embargo si comparamos los resultados obtenidos para MnP con la influencia de manganeso, notaremos claramente que los resultados mejoraron notablemente con la intervención del cobre, pro lo cual no podemos afirmar que este metal no influya en los resultados obtenidos.

En la cepa fúngica IB-15Da (*Cephalosporium*) (ver anexo C-4) no influye la concentración de glucosa, pero en cambio la concentración de manganeso y extracto de



levadura incrementarían la actividad enzimática, según se adicione sus concentraciones el medio de cultivo (ver anexo D-4).

### **b. Lignina Peroxidasa.-**

**Tabla 19: Actividad enzimática LiP de diferentes cepas fúngicas con variación Cu.**

<b>Cepa fúngica</b>	<b>Medio</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>	<b>Cu (mg/L)</b>	<b>Ext. Lev. (g/L)</b>	<b>Tiempo (días)</b>	<b>LiP (UI/L)</b>
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	1	1	40	0,5	21	250,62
IB6 ( <i>Circinutrychum</i> )	1	1	40	0,5	14	243,18
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	2	1	40	2	21	242,61
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	5	1	80	2	28	229,87
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	1	1	40	0,5	28	108,63
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	2	1	40	2	21	94,81

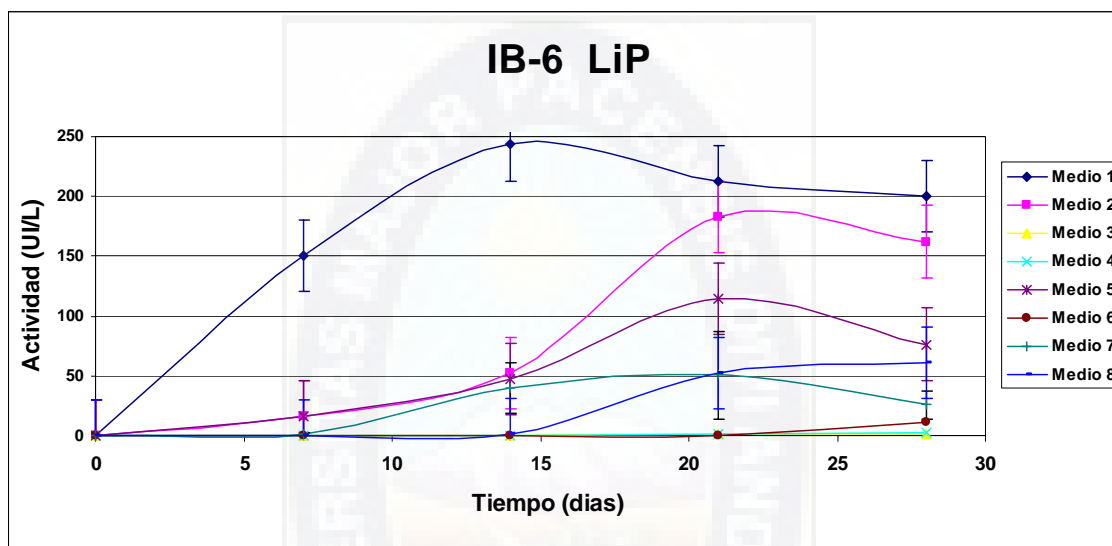
La tabla 20 muestra los resultados alcanzados de las seis cepas sometidas a esta prueba, donde resalta que las mayores actividades enzimáticas alcanzadas se dieron en el medio 1, lo cual da a entender que los nutrientes necesarios para la producción de esta enzima son mínimos, ya que este medio es que contiene nutrientes en baja concentración.

La cepa fúngica IB-6 (*Circinutrychum*) (figura 43) fue una de las que presento mayor actividad enzimática para Lignina peroxidasa (LiP) a los 14 días, en el medio 1, llegando a 243,18 (UI/L).

Por otro lado se hace indispensable el estudio de las necesidades nutricionales de estos hongos debido a que se ha reportado que las enzimas ligninolíticas, son generadas como un proceso idiofasico y estimulado por la limitación de nutrientes como carbono y nitrógeno o sulfato, también se ha reportado que altas concentraciones de una fuente de carbono o de nitrógeno, pueden limitar la producción de las enzimas ligninolíticas. [36].



Figura 43: Actividad enzimática Lignina peroxidasa para la cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*) de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Cu.



Para la degradación de la lignina se necesita de una fuente adicional de carbono que funciona como un co-sustrato. Este mecanismo de degradación es regulado por los hongos [81].

Tabla 20: Análisis de efectos principales ANOVA para la cepa IB-6 (*Circinutrychum*) para LiP de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Cu.

Factores	SS Suma de cuadrados	DF Grados de libertad	MS Media de cuadrados	F Valor critico	Prob > F	
<b>Interacción</b>	55762,54	1	55762,54	7,847136	0,048748	
<b>Glucosa [g/L]</b>	21583,88	1	21583,88	3,037373	0,156325	significativo
<b>Cu [mg/L]</b>	5722,52	1	5722,52	0,805297	0,420245	significativo
<b>Extracto de levadura[g/L]</b>	651,00	1	651,00	0,091612	0,777225	significativo
<b>Error</b>	28424,40	4	7106,10			

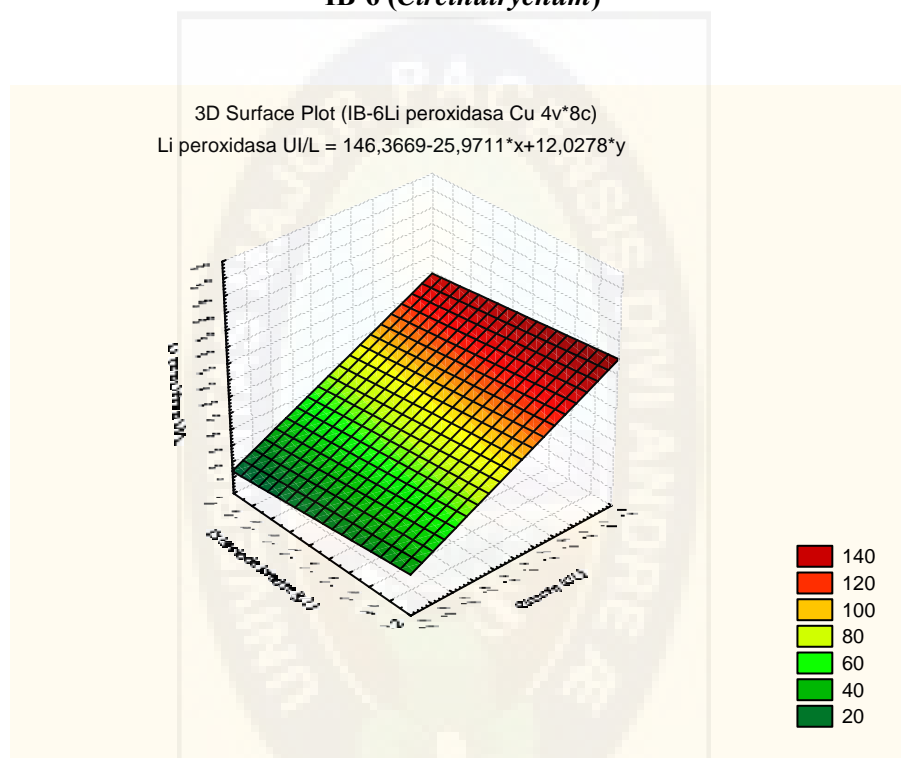
Fuente:  
Elaboración propia con dato

s procesados en Statistica 6.0



Los resultados del análisis de varianza de la IB-6 (*Circinutrychum*) que muestra (tabla 19) la interacción de los tres componentes como ser: glucosa, extracto de levadura y Cu tiene un valor de F igual a 7,847136 lo que implica que la interacción de estos tres es significativa. Por otro lado  $Prob > F$  menores a 0,38678 indican que los términos significantes del modelo.

**Figura 44: Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad LiP para la cepa fúngica IB-6 (*Circinutrychum*)**



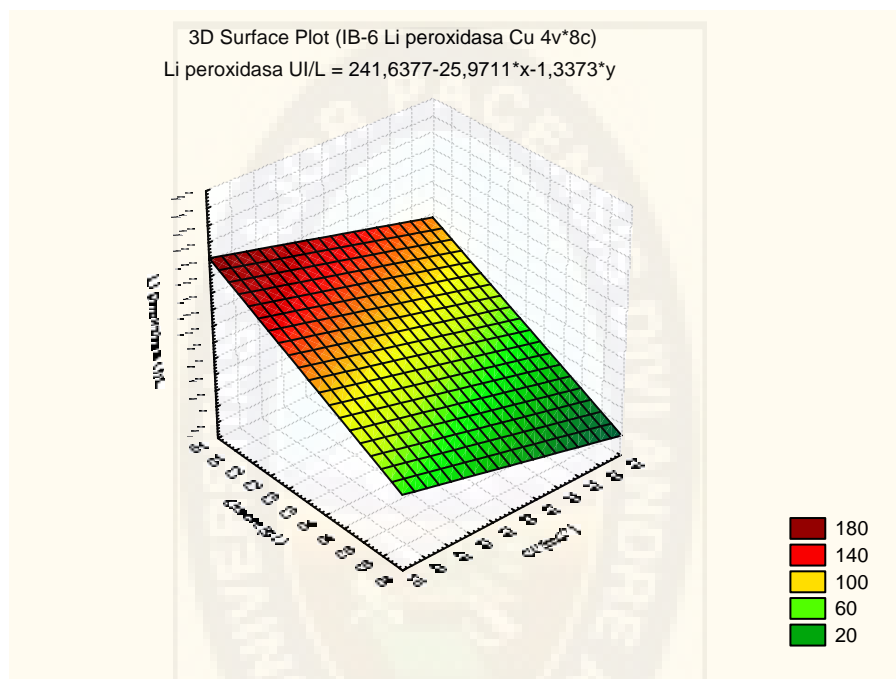
Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta grafica (Figura 44) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y menor concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Lignina peroxidasa, sin embargo en el medio 5 el cual tiene la misma concentración de extracto de levadura y cobre, y la concentración de glucosa aumenta, no se obtuvo una actividad enzimática buena, esto puede deberse a que el microorganismo requiere concentraciones nutricionales mínimas para llegar a su actividad máxima.





**Figura 45: Efecto de la glucosa y Cu sobre la actividad LiP para la cepa fúngica IB-6 (*Circinutrychum*).**



Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta grafica (Figura 45) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y menor concentración de Cu en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Lignina peroxidasa.

IB6 (*Circinutrychum*) (ver anexo C-5) a mayor concentración de glucosa, y menor concentración de extracto de levadura obtendría un actividad enzimática máxima, también se puede denotar que la concentración de cobre no afecta en la producción de enzima (ver anexo D-5).

### ***c. Lacasa.-***



De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 22 la producción de esta enzima con la variabilidad de cobre requiere una concentración mínima de glucosa, y la concentración de extracto de levadura es muy importante, ya que es muy necesaria la fuente de nitrógeno para estas enzimas, si comparamos los resultados alcanzados en esta prueba respecto a la determinación de lacasa con variación de manganeso, notaremos claramente que los resultados tiene mucha diferencia (ver anexo C-6).

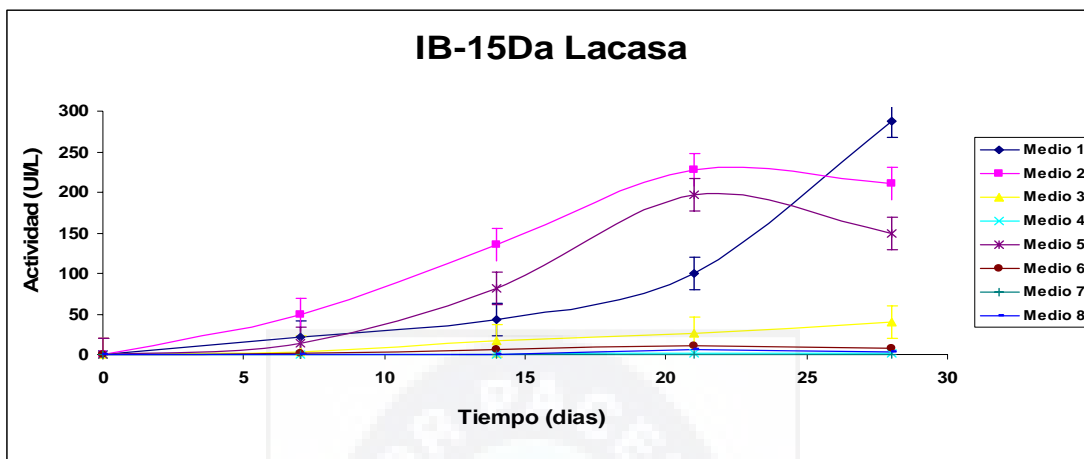
**Tabla 21: Actividad enzimática Lac de diferentes cepas fúngicas con variación Cu.**

Cepa fúngica	Medio	Glucosa (g/L)	Cu (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	Lac (UI/L)
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	1	1	40	0,5	28	287,30
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	1	1	40	0,5	21	265,25
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	5	1	80	2	21	220
IB6 ( <i>Circinutrychum</i> )	2	1	40	2	28	227,11
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	2	1	40	2	21	208,92
IB-18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	1	1	40	0,5	28	138,49

La cepa fúngica IB-15Da (*Cephalosporium*) (figura 46) alcanzo la mayor actividad enzimática para Lacasa (Lac) a los 28 días, en el medio 1, llegando a 287,30 (UI/L).

**Figura 46: Actividad enzimática Lacasa para la cepa fúngica IB-15Da (*Cephalosporium*) de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Cu.**





Experimentos con purificación de lacasa mostraron que Cu no solo induce la actividad enzimática lacasa por la expresión de genes de lacasa, ya que esto probablemente también sea efecto de la estabilidad y actividad de la enzima [90].

Una de las posibilidades es que las células posean mecanismos de regulación controlada de cobre, en los que el metal sea transportado y este disponible de acuerdo a las necesidades del hongo.

**Tabla 22: Análisis de efectos principales ANOVA para la cepa IB-15Da (*Cephalosporium*) para Lacasa de los 8 medios evaluados en función de glucosa, extracto de levadura, Cu.**

Factores	SS Suma de cuadrados	DF Grados de libertad	MS Media de cuadrados	F Valor crítico	Prob > F	
<b>Interacción</b>	67183,18	1	67183,18	11,57524	0,027221	
<b>Glucosa [g/L]</b>	60318,61	1	60318,61	10,39252	0,032166	
<b>Cu [mg/L]</b>	7545,72	1	7545,72	1,30008	0,317836	significativo
<b>Extracto de levadura[g/L]</b>	663,93	1	663,93	0,11439	0,752206	significativo
<b>Error</b>	23216,16	4	5804,04			

Fue  
nte:  
Ela  
bora  
ción  
pro  
pia  
con  
dato

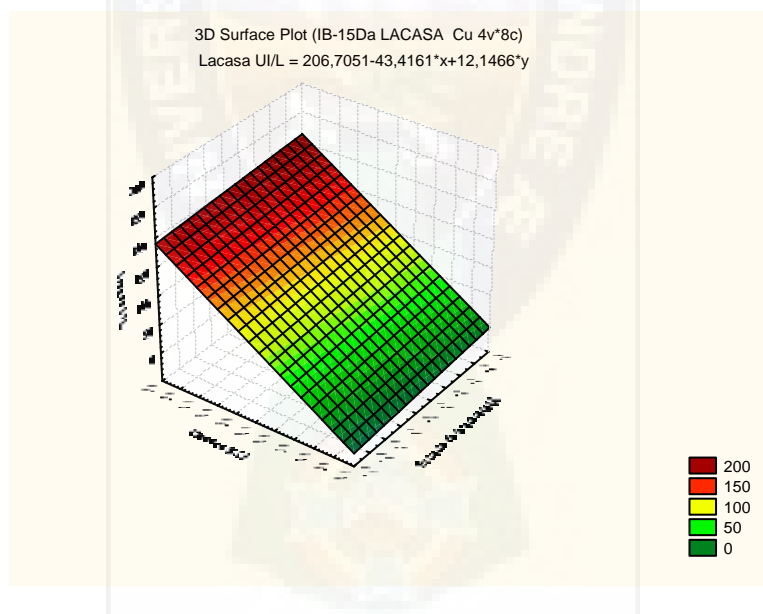
s procesados en Statistica 6.0

Los resultados del análisis de varianza de la cepa IB-15Da (*Cephalosporium*) que muestra (tabla 21) la interacción de los tres componentes como ser: glucosa, extracto de levadura y Mn tiene un valor de F igual a 11,57524 lo que implica que la interacción de estos tres es significativa. Por otro lado Prob > F menores a 0,10940 indican que los términos



significantes del modelo.

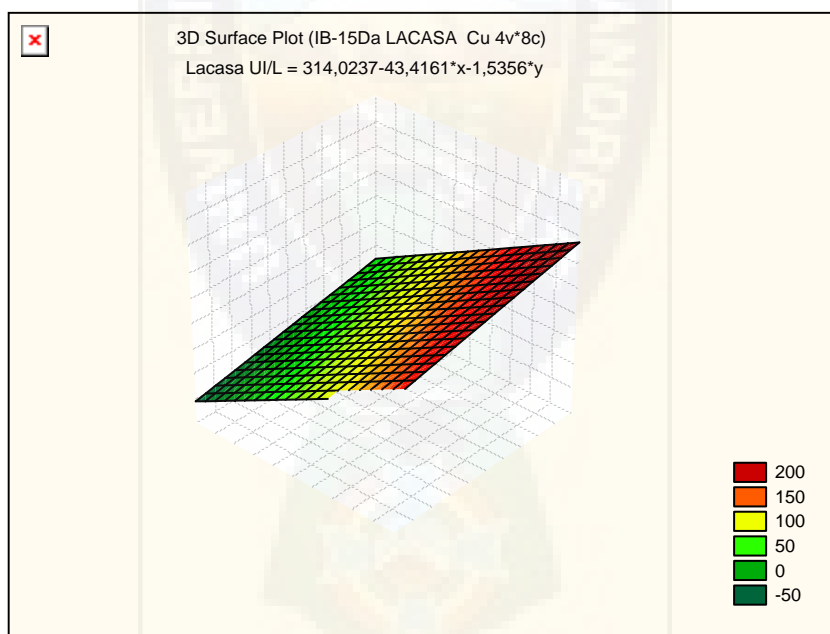
**Figura 47: Efecto de la glucosa y extracto de levadura sobre la actividad Lacasa para la cepa fúngica IB-15Da (*Cephalosporium*).**



En esta grafica (Figura 47) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y menor concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor actividad enzimática para Lacasa.



**Figura 48: Efecto de la glucosa y Cu sobre la actividad Lacasa para la cepa fúngica IB-15Da (*Cephalosporium*).**



Fuente: Elaboración propia con datos procesados en Statistica 6.0

En esta grafica (Figura 48) podemos comprender que a mayor concentración de glucosa y mayor concentración de Cu en el medio de cultivo, se llega a obtener una mayor



actividad enzimática para Lacasa. Sin embargo cuando la concentración de glucosa puede aumentarse esto puede resultar inhibidor de la producción de enzimas que inductor.

Talvez esto pueda deberse a que la lacasa no parece estar transcripcionalmente por el cobre, puesto que la suplementacion de cobre disminuye la cantidad de transcrito, en condiciones de exceso de cobre, el aumento observado en cultivos se debe a la sobre-expresión de los genes acumulando mRNA [32]. El aumento de la actividad lacasa que se produce al añadir cobre puede deberse a la incorporación de este a la apoproteína acumulada: por lo tanto, la actividad lacasa dependería de la disponibilidad de cobre y de la presencia de apoproteína inactiva.

La IB-29B (*Blastomyces*) no tuvo mucha diferencia en su actividad enzimática respecto a IB-15Da (*Cephalosporium*) (ver anexo C-6) sin embargo sus requerimientos nutricionales son muy diferentes ya que esta cepa requiere mayor concentración de fuente de nitrógeno y vitaminas (ver anexo D-6).

Los resultados obtenidos en la presente prueba son mucho más significativos que los resultados donde utilizo manganeso, esto nos conduce a afirmar, que el cobre es un mejor inductor para las cepas fúngicas con las cuales estamos trabajando.

En especial para la actividad enzimática lacasa, se obtuvo resultados óptimos, probablemente se deba a que esta enzima en su estructura lleve cobre, y este metal sea un excelente inductor para esta enzima, por esa razón.

Los resultados mas bajos de las tres actividades enzimáticas fueron para manganeso peroxidasa, aun que esto no fue con mucha diferencia significativa, sin embargo con medio de cultivo Cu, las enzimas llegaron a producir mas de tres veces mas que con el medio de cultivo Mn.

#### **4.3.2. Medios de cultivo con diferentes sustratos lignocelulosicos.-**

Estas enzimas son en términos biotecnológicos, uno de los grupos de enzimas que mas



importancia adquirieron en los últimos años debido a que podrían ser aplicadas en procesos de biorremediación. Por lo tanto se busca la producción de ligninasas mediante sistemas que sean baratos y justifiquen el proceso. Si bien la utilización de compuestos como el cobre, manganeso o sustancias aromáticas es ampliamente adoptada para la producción de estas enzimas, por que no pensar en medios de cultivo basados en sustratos naturales como bagazo, aserrín, cas. Arroz, etc [35].

Al variar las condiciones de cultivo se puede mejorar el rendimiento, optimizar la calidad y reducir costos del proceso de fermentación [89]. Se seleccionaron cuatro diferentes cepas con medios distintos, apoyados en los resultados anteriores.

## I. Paja Brava.-

### a. Manganeso Peroxidasa.-

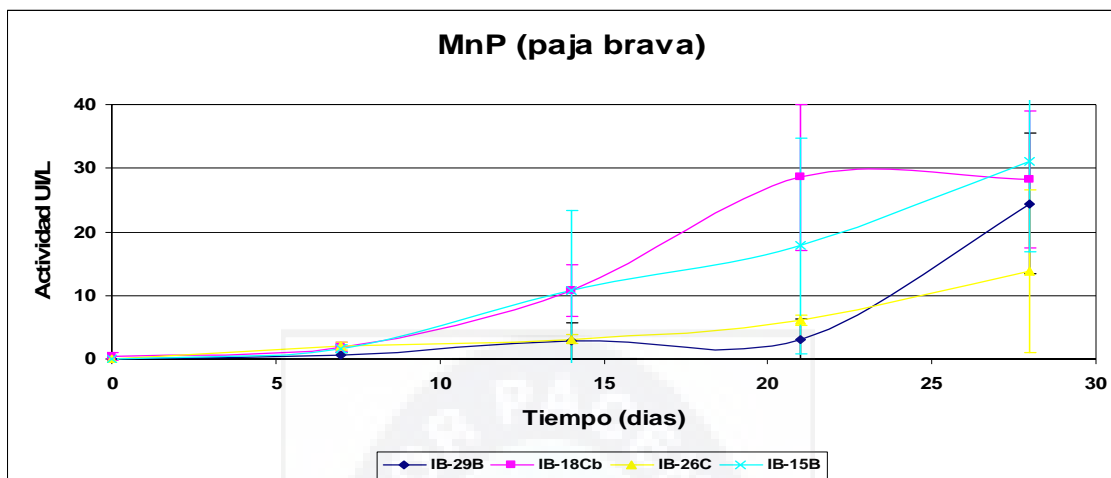
**Tabla 23: Actividad enzimática MnP de diferentes cepas fúngicas con variación de paja brava.**

Cepa fúngica	Medio	Paja brava (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	MnP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	5	1	80	2	28	24,46
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	21	28,59
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	6	5	40	2	28	13,78
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	3	1	80	0.5	28	31,15

La cepa fúngica IB-15B (*Stephanoma*) (figura 49) fue la que presento mayor actividad enzimática para Manganeso peroxidasa (MnP) a los 28 días, en el medio 3, llegando a 31,15 (UI/L).

**Figura 49: Actividad enzimática Manganeso peroxidasa de 4 cepas fúngicas en función de la paja brava.**





Con respecto a los anteriores resultados alcanzados en la pruebas que se adiciono en el medio glucosa, se alcanzaron valores más altos de actividad enzimática, si bien explicamos anteriormente que la fuente de carbono es muy importante para la producción de estas enzimas.

La paja brava en su composición química contiene un 54% de celulosa lo cual es fuente de carbono, en este caso esa fuente de carbono no esta libre, esta protegida por lignina, lo que se quiso comprobar es la efectividad de este tipo de enzimas, con este sustrato lignocelulósico.

### ***b. Lignina Peroxidasa.-***

**Tabla 24: Actividad enzimática LiP de diferentes cepas fúngicas con variación de paja brava.**

Cepa fúngica	Medio	Paja brava (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	LiP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	3	1	80	0.5	21	16,19
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	21	<b>133,97</b>
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	21	13,84
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	8	5	80	2	21	28,54
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	3	1	80	0.5	21	21,03

La cepa fúngica IB-

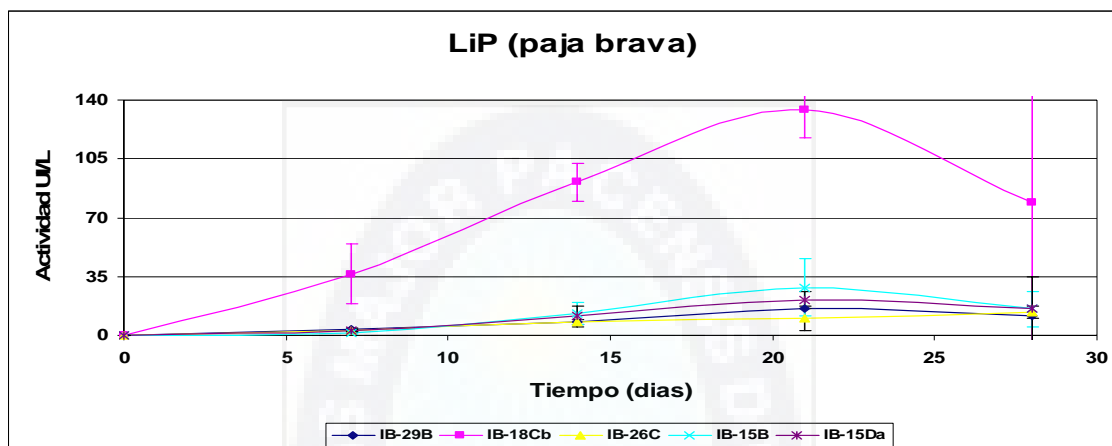
18Cb (*Bdellospora*) fue una de las que presento mayor actividad enzimática para Lignina





peroxidasa (LiP) a los 21 días, en el medio 8, llegando a 133,97 (UI/L).

**Figura 50: Actividad enzimática Lignina peroxidasa de 5 cepas fúngicas en función de la paja brava.**



El resultado alcanzado por la cepa IB-18Cb fue el mas significativo de las 5 cepas, incluso fue mayor que el alcanzado en la prueba con variación de manganeso. El medio en que se desarrollo esta actividad enzimática para LiP es aquel en el cual lleva en mayor concentración sus componentes.

Es posible que esta cepa requiera mayores cantidades de nutrientes para alcanzar una actividad máxima, también no se deja de lado la hipótesis de que esta actividad se deba a un producto del metabolismo del microorganismo.

### c. *Lacasa*.-

**Tabla 24: Actividad enzimática Lac de diferentes cepas fúngicas con variación de paja brava.**

Cepa fúngica	Medio	Paja brava (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	Lac (UI/L)
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	28	9,52
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	5	1	40	2	28	9,76
IB-6 ( <i>Circinutrychum</i> )	2	1	40	2	21	24,76
IB29B ( <i>Blastomyces</i> )	2	1	40	2	21	24,76
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	3	1	80	0.5	28	37,61

La cepa

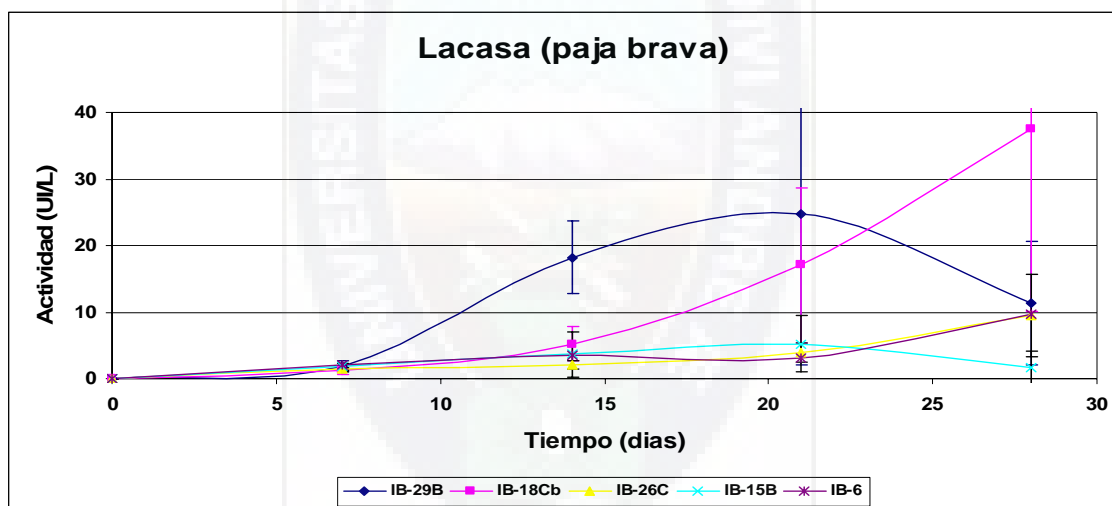


fúngica IB-18Cb (*Bdellospora*) fue una de las que presento mayor actividad enzimática para Lacasa (Lac) a los 28 días, en el medio 3, llegando a 37,61 (UI/L).

El medio 3 contiene en menor concentración de extracto de levadura, se ha explicado que el extracto de levadura es importante en la producción de enzimas ya que participa como fuente de nitrógeno y fuentes de vitaminas, pero en algunos hongos, esto tiene que ser limitado, ya que no todos las cepas fúngicas tienen los mismos requerimientos nutricionales.

Es posible que la paja brava no sea un buen sustrato para esta enzima, razón por la cual no se haya producido una actividad enzimática buena.

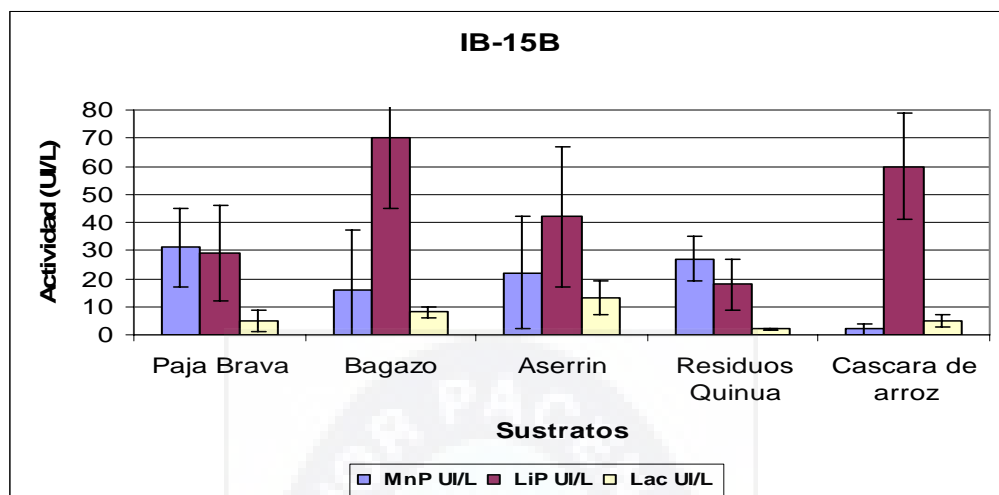
**Figura 51: Actividad enzimática Lacasa de 5 cepas fúngicas en función de la paja brava.**



Esta cepa fúngica IB-18Cb (*Bdellospora*) es muy peculiar, ya que si observamos la figura 4-31 notaremos que respecto a las demás cuatro cepas fúngicas que elevo su actividad enzimática en los últimos 14 días, por lo cual es posible que necesite mas tiempo para producir este tipo de enzimas.

**Figura 52: Actividad enzimática de la cepa fúngica IB-15B frente a diferentes sustratos lignocelulosicos**





De las seis cepas fúngicas escogidas la que mejor resultado presento para la paja brava fue la IB-18Cb como se observa en la figura 52, con respecto a otras cepas, fue la cepa que mejor resultado alcanzo para actividad MnP, sin embargo podemos notar que el bagazo y la cáscara de arroz presentan una mayor actividad enzimática para LiP, esto depende de los requerimientos nutricionales de cada hongo , para la expresión de una determinada enzima.

## II. Bagazo.-

### a. Manganeso Peroxidasa.-

Tabla 25: Actividad enzimática MnP de diferentes cepas fúngicas con variación de bagazo

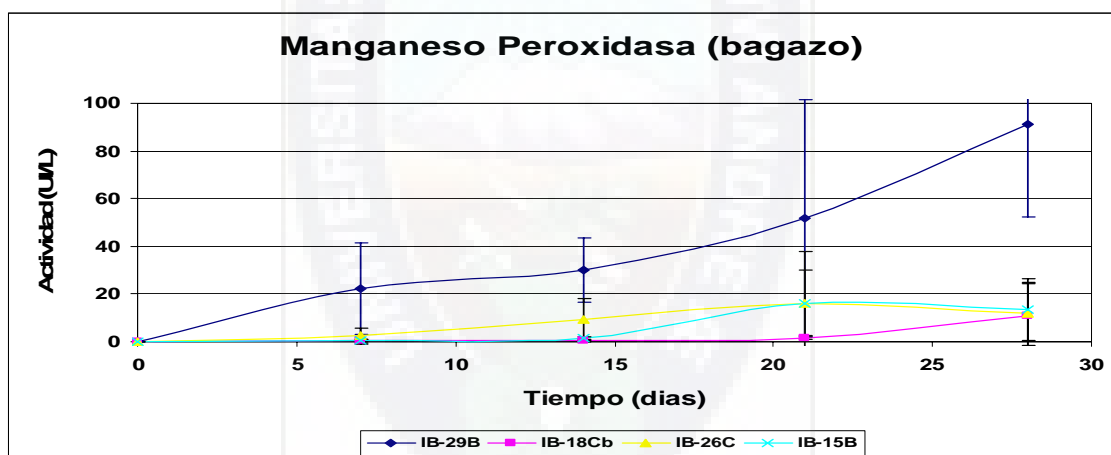
Cepa fúngica	Medio	Bagazo (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	MnP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	5	1	80	2	28	91,40
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	28	11,04
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	6	5	40	2	21	16,28
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	3	1	80	0.5	21	16,28

La  
cepa  
fúngi  
ca

IB-29B (*Blastomyces*) fue la que presento mayor actividad enzimática para Manganeso peroxidasa (MnP) a los 28 días, en el medio 5, llegando a 91,40 (UI/L).



Figura 53: Actividad enzimática Manganeso peroxidasa de 4 cepas fúngicas en función de bagazo.



IB-29B (*Blastomyces*) en comparación de las otras tres cepas alcanza una actividad enzimática cinco veces más, es posible que el hongo haya asimilado en forma positiva el sustrato, y que la glucosa no influya en la producción de enzima, lo interesante para este microorganismo es que depende de una fuente de nitrógeno, y un inductor en este caso el manganeso.

Las otras cepas en especial IB-18Cb (*Bdellospora*), IB-26C (*Trinacrium*) son dependientes de fuentes de carbono para la producción de MnP, es por esta razón que no tuvieron un buen resultado con este sustrato lignocelulósico.



## b. Lignina Peroxidasa.-

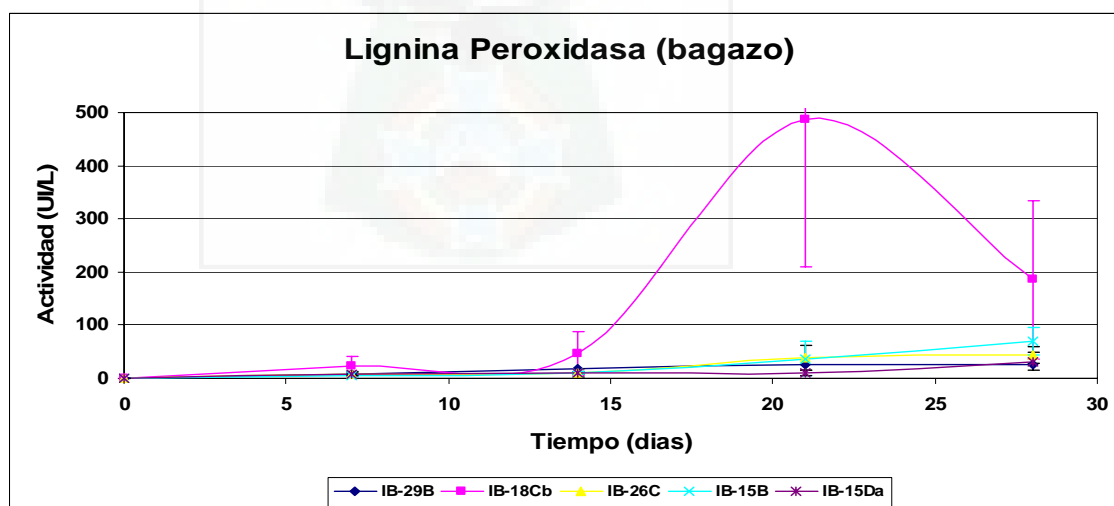
Tabla 26: Actividad enzimática LiP de diferentes cepas fúngicas con variación de bagazo

Cepa fúngica	Medio	Bagazo (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	LiP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	3	1	80	0.5	28	26,07
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	21	<b>487,82</b>
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	28	44,59
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	8	5	80	2	28	69,99
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	3	1	80	0.5	28	32,10

La cepa fúngica IB-18Cb (*Bdellospora*) fue la que presentó mayor actividad enzimática para Lignina peroxidasa (LiP) a los 21 días, en el medio 8, llegando a 487,82 (UI/L).

Según los análisis para esta cepa fúngica, tendría mayor actividad enzimática con la adición de glucosa, sin embargo el resultado que se obtuvo en esta prueba fue inesperado ya que alcanzó cinco veces más actividad enzimática que los resultados obtenidos con glucosa, esto nos da a entender que la cepa asimiló la fuente de carbono que contiene el bagazo que es 49,58% en celulosa y este estimuló la actividad enzimática de este microorganismo.

Figura 54: Actividad enzimática Lignina peroxidasa de 5 cepas fúngicas en función de la bagazo.



De manera peculiar la cepa IB-18Cb (*Bdellospora*) fue la única de las cinco cepas testeadas que presento una buena actividad enzimática (figura 54) ya que las demás cuatro no llegaron ni a la sexta parte de lo que alcanzó esta enzima. Cabe recalcar que la LiP es la más escasa del sistema ligninolítico.

### c. *Lacasa*.-

**Tabla 27: Actividad enzimática Lac de diferentes cepas fúngicas con variación Bagazo**

Cepa fúngica	Medio	Bagazo (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	Lac (UI/L)
IB29B( <i>Blasthomyces</i> )	2	1	40	2	21	27,08
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	3	1	80	0.5	21	<b>56,24</b>
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	21	48,56
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	5	1	80	2	28	8,18
IB-6 ( <i>Circinutrychum</i> )	2	1	40	2	28	11,43

En la tabla 27 veremos el resumen de resultados para el sustituto bagazo, comparándolo con los resultados de variación manganeso, la actividad fue mas baja.

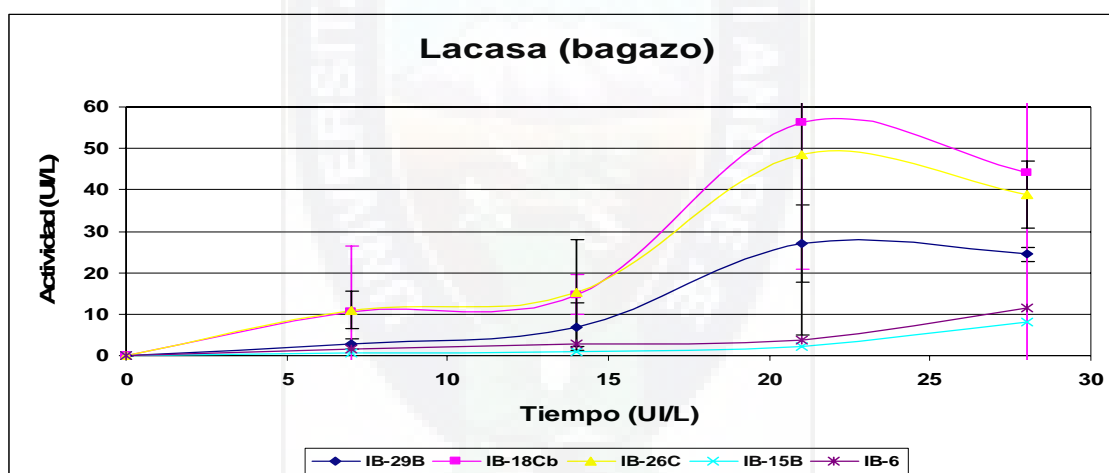
La cepa fúngica IB-18Cb (*Bdellospora*) fue una de las que presento mayor actividad enzimática para Lacasa (Lac) a los 21 días, en el medio 3, llegando a 56,24 (UI/L).

IB-18Cb (*Bdellospora*) según análisis realizados para esta cepa fúngica se dice que a mayor concentración de manganeso, se obtendría mayor actividad enzimática, también es importante la concentración de extracto de levadura en el medio, pero la concentración de



glucosa no influye en la actividad enzimática.

Figura 55: Actividad enzimática Lacasa de 5 cepas fúngicas en función del bagazo.

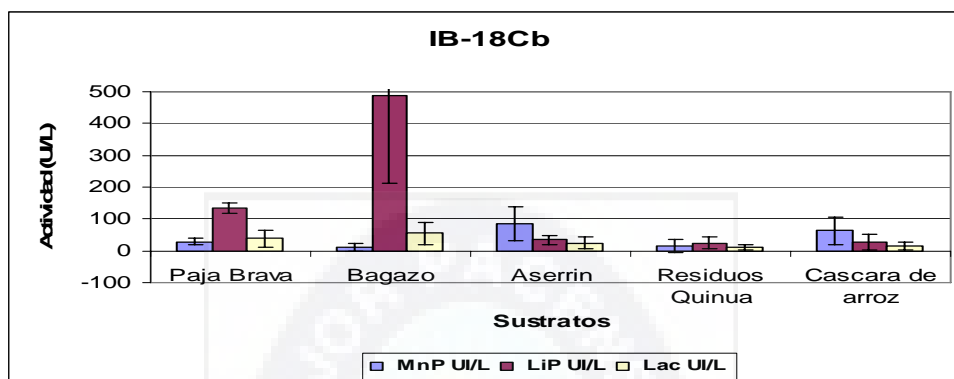


Si vemos la figura 4-34 notaremos que la cepa IB-26C (*Trinacrium*) no tiene mucha diferencia con IB-18Cb (*Bdellospora*), pero al contrario esta cepa es dependiente de glucosa, y por supuesto de manganeso.

La aceptación del sustrato bagazo, por la cepa IB-18Cb, para la producción de LiP como se observa en la figura 56 fue la que mejor resultado obtuvo, sin embargo el medio que contiene paja brava resulta ser un medio mucho mas confiable, que el medio del bagazo, esto por su rango de error que presenta.



**Figura 56: Actividad enzimática de la cepa fúngica IB-18Cb frente a diferentes sustratos lignocelulosicos**



### III. Aserrín.-

#### a. Manganeso Peroxidasa.-

**Tabla 28: Actividad enzimática MnP de diferentes cepas fúngicas con variación de aserrín**

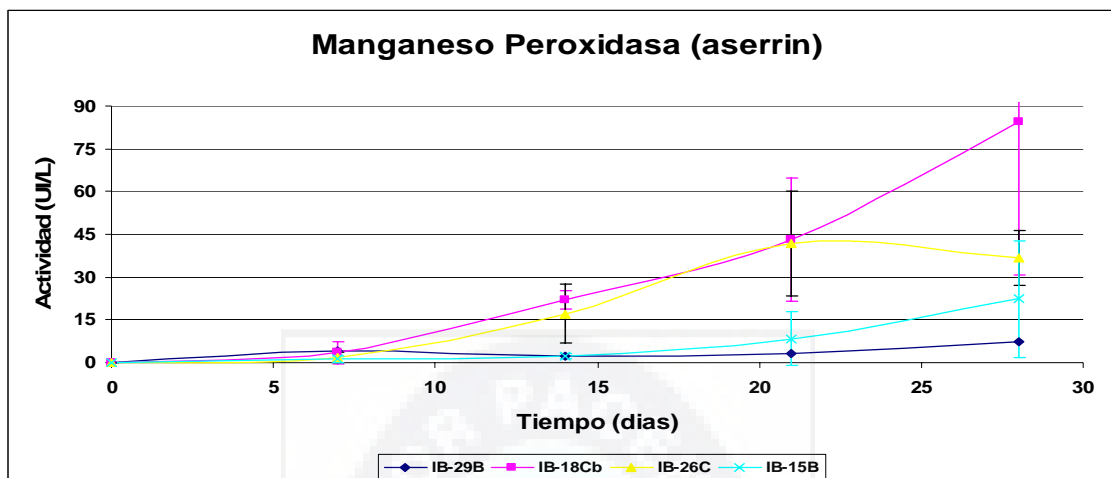
Cepa fúngica	Medio	Aserrín (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	MnP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	5	1	80	2	28	7,19
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	21	<b>84,70</b>
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	6	5	40	2	28	41,76
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	3	1	80	0.5	28	22,35

La cepa fúngica IB-18Cb (*Bdellospora*) fue la que presento mayor actividad enzimática para Manganeso peroxidasa (MnP) a los 28 días, en el medio 8, llegando a 84,70 (UI/L) de actividad enzimática.

**Figura 57: Actividad enzimática MnP de 4 cepas fúngicas en función de aserrín.**







En la figura 57 observaremos que hasta los 21 días las cepas IB-18Cb (*Bdellospora*) y IB-26C (*Trinacrium*) se asimilaban en su actividad pero ya a los 28 días IB-26C (*Trinacrium*) bajo su actividad enzimática, mientras IB-18Cb (*Bdellospora*) incrementó notablemente su actividad enzimática.

No podemos negar que el manganeso juega un papel muy importante en esta actividad enzimática, si observamos la composición de los medios escogidos, la mayoría tiene requerimientos nutricionales donde el manganeso tiene una alta concentración.

### b. Lignina Peroxidasa.-

Tabla 29: Actividad enzimática LiP de diferentes cepas fúngicas con variación de aserrín

Cepa fúngica	Medio	Aserrín (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	LiP (UI/L)
IB29B( <i>Blasthomyces</i> )	3	1	80	0.5	21	32,94
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	21	33,91
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	21	29,56
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	8	5	80	2	28	<b>42,25</b>
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	3	1	80	0.5	28	29,45

La  
cepa  
fúngi  
ca

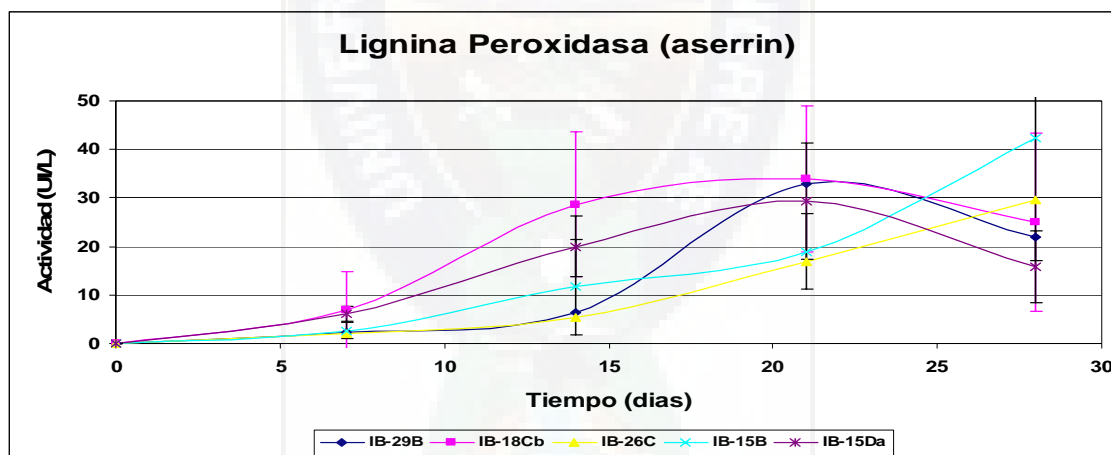
IB-15B (*Stephanoma*) fue una de las que presento mayor actividad enzimática para Lignina peroxidasa (LiP) a los 28 días, en el medio 8, llegando a 42,25 (UI/L).



La cepa que alcanzo la actividad máxima requería una fuente de manganeso alta, pero esto se presento a los 28 días, ya que de los 15 a 21 días, no tenia buen alcance enzimático como se puede ver en la figura 4-36.

Las actividades enzimáticas obtenidas en los medios con aserrín, probablemente se deba a que en las maderas existe una gran variedad de compuestos aromáticos que habrían pasado a la solución [3]. El manganeso que comúnmente esta presente en las maderas también pudo haber sido el inductor [88].

Figura 58: Actividad enzimática Lignina peroxidasa de 5 cepas fúngicas en función de la aserrín.



En la figura 58 observaremos que las cinéticas enzimáticas que presentaron las cinco cepas fúngicas no tuvieron diferencia como en anteriores casos, al parecer este sustrato fue asimilado por las cinco cepas, aunque esto no estimule una buena actividad enzimática.

### c. *Lacasa*.-



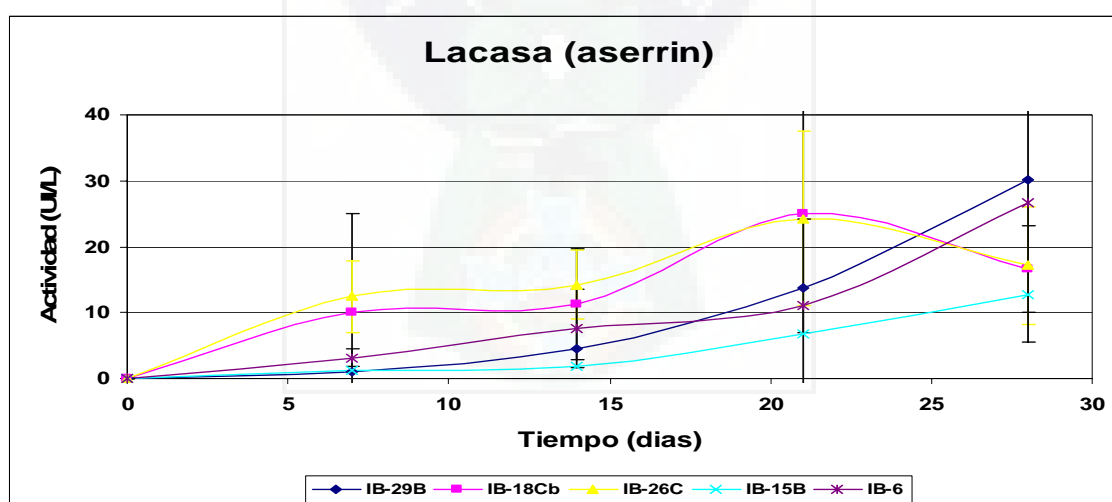
**Tabla 30: Actividad enzimática MnP de diferentes cepas fúngicas con variación de aserrín**

Cepa fúngica	Medio	Aserrín (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	LiP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	2	1	40	2	28	30,09
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	3	1	80	0.5	21	25,04
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	21	24,25
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	5	1	80	2	28	12,72
IB-6 ( <i>Circinutrychum</i> )	2	1	40	2	28	26,74

La cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*) fue la que presentó mayor actividad enzimática para Lacasa (Lac) a los 28 días, en el medio 2, llegando a 30,09 (UI/L).

Las respuestas enzimáticas para cada cepa son diferentes, ya que cuando una variación se realiza en el medio de cultivo, todas las condiciones cambian, como es el caso de IB-29B (*Blastomyces*) que en su caso, la concentración de manganeso y glucosa no influyen en la actividad enzimática.

**Figura 59: Actividad enzimática Lacasa de 5 cepas fúngicas en función del aserrín.**

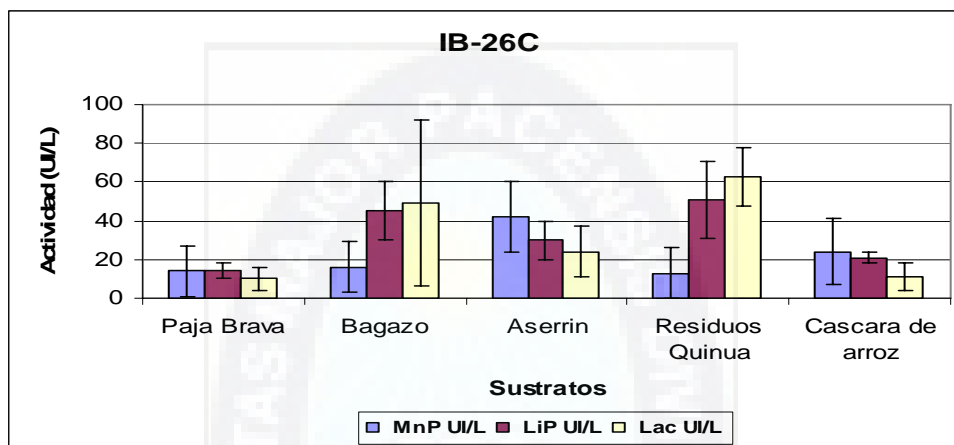


En la tabla 29 se puede notar claramente que los valores de las cinco cepas fúngicas



testeadas no tienen diferencia significativa, con excepción de IB-15B (*Stephanoma*) que no alcanzo buena actividad para LiP.

**Figura 60: Actividad enzimática de la cepa fúngica IB-26C frente a diferentes sustratos lignocelulosicos**



Por la composición química que presenta el aserrín se esperaba que fuera el sustrato mejor asimilado, en la cepa IB-26C tuvo una mayor actividad enzimática para Mn P , en cambio para LiP y Lacasa fue superado por el sustrato residuos de quinua.

#### IV. Residuos de Quinua Real.-

##### a. Manganeso Peroxidasa.-

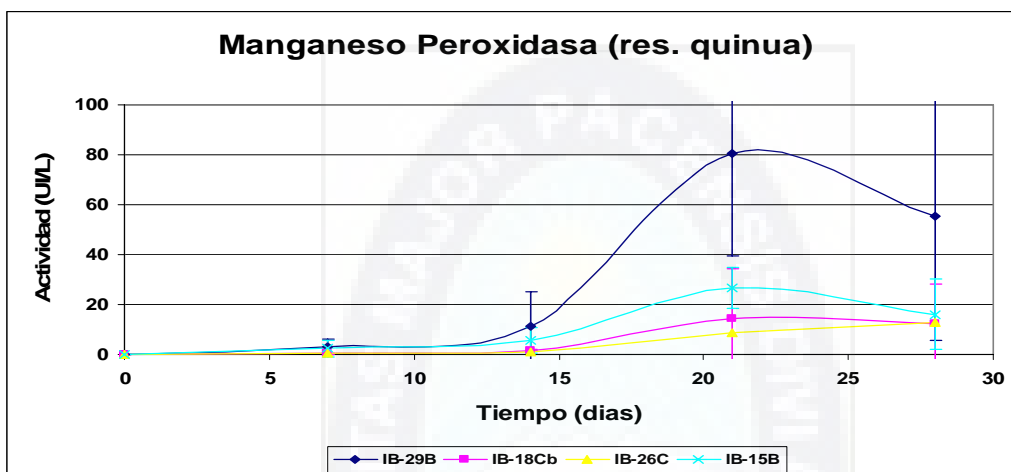
**Tabla 31: Actividad enzimática MnP de diferentes cepas fúngicas con variación de residuos de quinua.**

Cepa fúngica	Medio	Residuos quinua (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	MnP (UI/L)
IB29B( <i>Blasthomyces</i> )	5	1	80	2	21	<b>80,74</b>
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	21	14,55
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	6	5	40	2	28	13,07
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	3	1	80	0.5	21	26,72



La cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*) en el medio 5 fue la que presento mayor actividad enzimática para Manganeso peroxidasa (MnP) a los 21 días, llegando a 80,74 (UI/L).

**Figura 61: Actividad enzimática Manganeso peroxidasa de 4 cepas fúngicas en función de residuos de quinua.**



En este caso la cepa IB-29B (*Blastomyces*) tuvo una gran diferencia respecto a las demás tres cepas restantes, ya que ninguna alcanzo ni la mitad de la actividad enzimática producida por esta.

Al parecer este sustrato no tuvo gran aceptación por los hongos testeados, ya que con este en medio de cultivo, las actividades enzimáticas bajaron, con excepción de IB-29B (*Blastomyces*), es posible que este residuo lignocelulósico contenga otro tipo de enzimas el cual pueden llegar a inhibir la actividad enzimática que queremos encontrar, tal es el caso de la saponina, que esta presente en la planta de quinua.

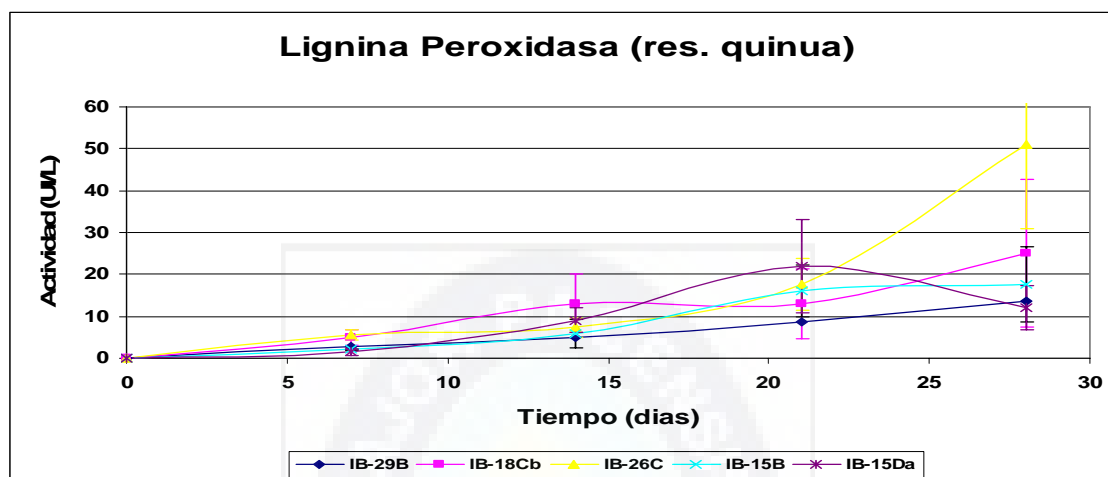
### ***b. Lignina Peroxidasa.-***

La cepa fúngica cepa IB-26C (*Trinacrium*) en el medio 8 fue la que presento mayor actividad enzimática para Lignina peroxidasa (LiP) a los 28 días, llegando a 50,99 (UI/L).

**Figura 62: Actividad enzimática Lignina peroxidasa de 5 cepas fúngicas en función de residuos**



de quinua.



Como se puede observar la cinética enzimática que produce este hongo se incremento en los últimos siete días, puede ser que la producción de esta enzima lleve un tiempo mas esto respecto al metabolismo que tiene el microorganismo, no olvidemos que el crecimiento del hongo va correlacionado con la actividad enzimática.

**Tabla 32: Actividad enzimática LiP de diferentes cepas fúngicas con variación de residuos de quinua**

Cepa fúngica	Medio	Residuos quinua (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	LiP (UI/L)
IB29B( <i>Blasthomyces</i> )	3	1	80	0.5	28	13,66
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	28	25,14
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	28	<b>50,99</b>
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	8	5	80	2	28	17,57
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	3	1	80	0.5	28	22,00

### c. *Lacasa*.-

La cepa fúngica IB-26C (*Trinacrium*) en el medio 8 presento mayor actividad



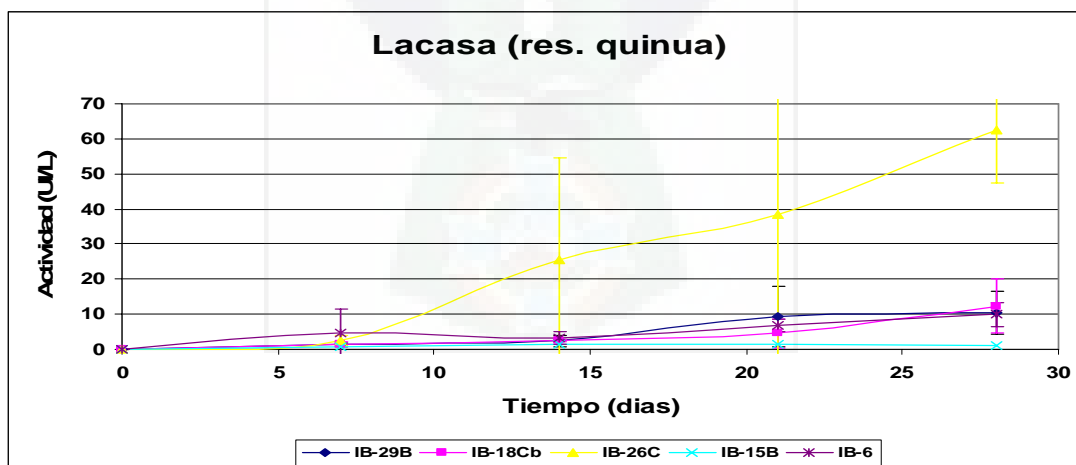
enzimática para Lacasa (Lac) a los 28 días llegando a 62,62 (UI/L).

**Tabla 33: Actividad enzimática Lac de diferentes cepas fúngicas con variación de residuos de quinua**

Cepa fúngica	Medio	Residuos quinua (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	Lac (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	2	1	40	2	28	10,57
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	3	1	80	0.5	28	12,25
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	28	<b>62,62</b>
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	5	1	80	2	28	1,42
IB-6 ( <i>Circinutrychum</i> )	2	1	40	2	28	9,94

IB-26C (*Trinacrium*) influenciada por la fuente de nitrógeno y vitaminas que contiene en su medio de cultivo alcanzo una actividad enzimática ala cual supera como cinco veces más a las de más cuatro cepas fúngicas, no olvidemos que en análisis anteriores de este hongo estaba inducida por la glucosa, esto puede afecta a que la actividad haya bajado según pruebas realizadas anteriormente.

**Figura 64: Actividad enzimática Lacasa de 5 cepas fúngicas en función de residuos de quinua.**

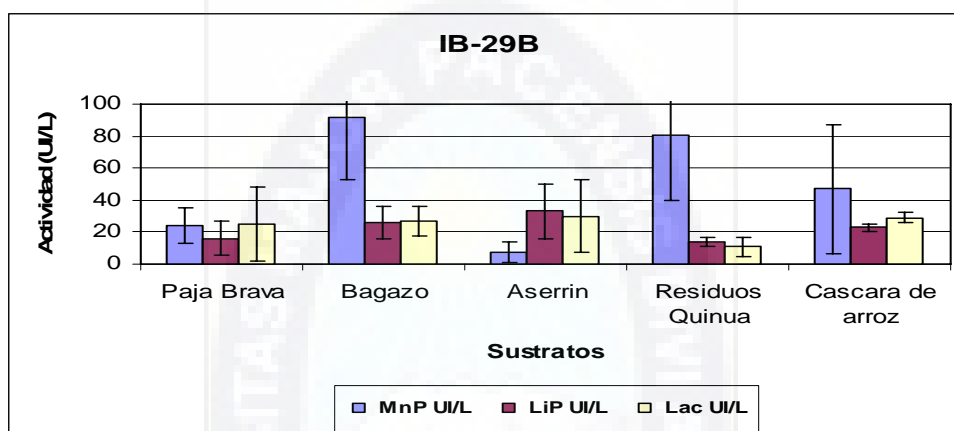


El sustrato bagazo fue el sustrato que asimilaron mejor la mayoría de las cepas fúngicas



para actividad MnP sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa con respecto a los residuos de quinua, en especial en la cepa IB-29B (figura 65) se observa una óptima producción de esta enzima comparándola con las otras cinco cepas.

**Figura 65: Actividad enzimática de la cepa fúngica IB-15B frente a diferentes sustratos lignocelulosicos**



## V. Cáscara de Arroz.-

### a. Manganeso Peroxidasa.-

**Tabla 34: Actividad enzimática MnP de diferentes cepas fúngicas con variación de cáscara de arroz**

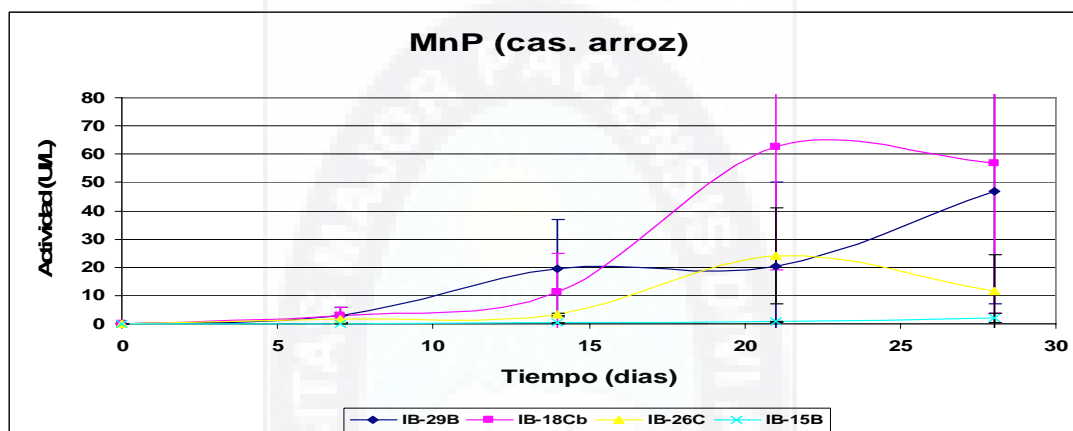
Cepa fúngica	Medio	Cáscara de arroz (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	MnP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	5	1	80	2	28	46,91
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	21	<b>62,72</b>
IB26C ( <i>Trinacrium</i> )	6	5	40	2	21	23,93
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	3	1	80	0.5	28	2,19





La cepa fúngica IB-18Cb (*Bdellospora*) fue la que presentó mayor actividad enzimática para Manganese peroxidase (MnP) a los 21 días, en el medio 8, llegando a 62,72 (UI/L).

**Figura 66: Actividad enzimática Manganese peroxidase de 4 cepas fúngicas en función de cáscara de arroz.**



La cinética enzimática de estas cepas fúngicas se puede observar en la figura 4-41, podemos notar que entre las cuatro cepas su cinética es muy diferente, para IB-18Cb (*Bdellospora*) que alcanzó una actividad tres veces más que en la prueba donde se utilizó glucosa, esto quiere decir que este medio es más óptimo para este hongo, se puede decir que la glucosa, extracto de levadura no influyen en la producción de enzimas.

La cepa IB-29B (*Blastomyces*) que depende exclusivamente del extracto de levadura, y siendo indispensable este en el medio de cultivo para que este microorganismo sea capaz de producir enzimas.

### **b. Lignina Peroxidasa.-**

**Tabla 35: Act enz LiP de diferentes cepas fúngicas con variación de cáscara de arroz**

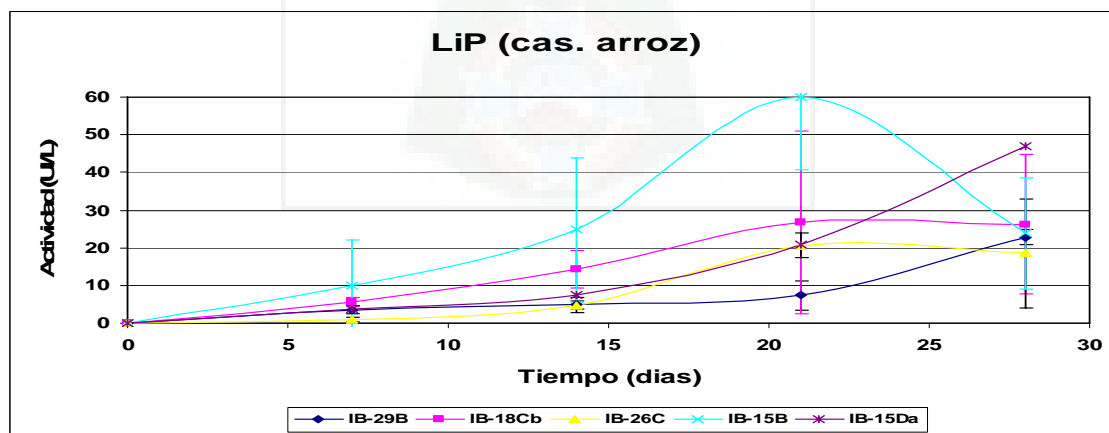
Cepa fúngica	Medio	Cáscara de arroz (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	LiP (UI/L)
IB29B ( <i>Blastomyces</i> )	3	1	80	0.5	28	22,82
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	8	5	80	2	21	20,55
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	21	20,55



IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	8	5	80	2	21	59,87
IB15Da( <i>Cephalosporium</i> )	3	1	80	0.5	28	46,87

La cepa fúngica IB-15B (*Stephanoma*) presento mayor actividad enzimática para Lignina peroxidasa (LiP) a los 21 días, en el medio 8, llegando a 59,87 (UI/L). en esta cepa la glucosa influye pero no del todo, ya que su valor no es significativo, en cambio la interacción de tres componentes de este medio como ser. Glucosa, extracto de levadura, manganeso, influyen bastante para que el hongo sea capaz de producir estas enzimas, en el medio se suprimió la glucosa, pero se adiciono cáscaras de arroz, la cual en su composición química contienen celulosa en un 62.49%, es posible que el microorganismo haya aprovechado esta fuente de carbono, la cual requiere para su metabolismo y por ende producir enzimas.

Figura 67: Actividad enzimática Lignina peroxidasa de 5 cepas fúngicas en función de cáscara de arroz.



Comparando con el medio que se utilizo glucosa, esta cepa alcanzo un similar resultado. En las cepas fúngicas restantes como la IB-15Da (*Cephalosporium*) el componente que realmente influye en la expresión de enzimas es el manganeso, por lo cual el resultado fue mas optimo en esta prueba que en la prueba donde se utiliza glucosa.

En cambio en la cepa IB-18Cb (*Bdellospora*) se obtuvo un resultado mas bajo que el anterior, esto, por que, para el metabolismo de este hongo, es indispensable una fuente de carbono, y en concentración alta.

### c. *Lacasa*.-

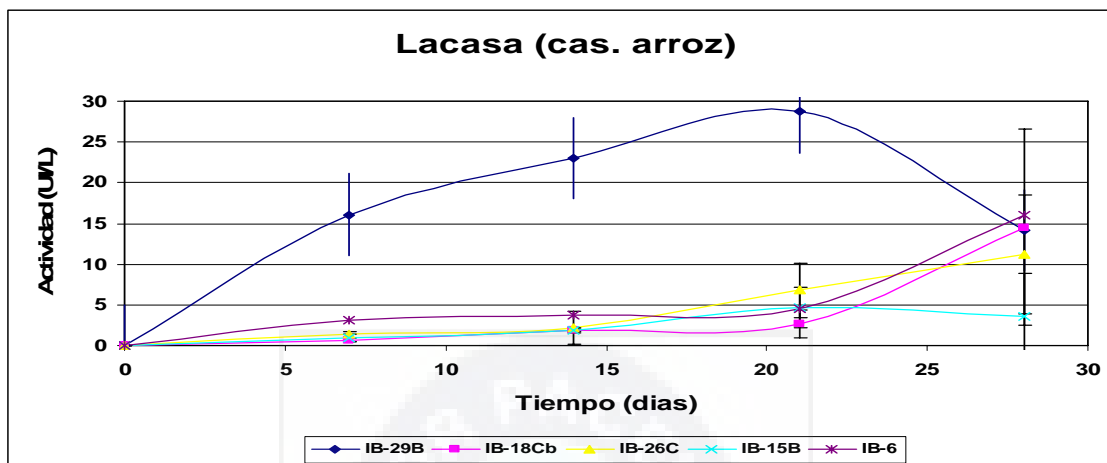
**Tabla 36: Actividad enzimática MnP de diferentes cepas fúngicas con variación de cáscara de arroz**

Cepa fúngica	Medio	Cáscara de arroz (g/L)	Mn (mg/L)	Ext. Lev. (g/L)	Tiempo (días)	LiP (UI/L)
IB29B( <i>Blastomyces</i> )	2	1	40	2	21	28,70
IB18Cb ( <i>Bdellospora</i> )	3	1	80	0.5	28	14,51
IB-26C ( <i>Trinacrium</i> )	8	5	80	2	28	11,22
IB15B ( <i>Stephanoma</i> )	5	1	80	2	21	4,67
IB-6 ( <i>Circinutrychum</i> )	2	1	40	2	28	15,99

La cepa fúngica IB-29B (*Blastomyces*) en el medio 2 fue una de las que presento mayor actividad enzimática para Lacasa (Lac) a los 21 días llegando a 28,70 (UI/L). Por lo visto anteriormente esta cepa no es dependiente de glucosa en concentraciones altas, pero si de extracto de levadura, el medio en el cual se realizo la prueba contenía a una alta concentración de fuente de nitrógeno, es por eso que se esperaba un mejor resultado.

**Figura 68: Actividad enzimática Lacasa de 5 cepas fúngicas en función de cáscara de arroz.**





Algunos metabolitos que están presentes en el sustrato lignocelulósico pueden influenciar en la producción de enzimas [81].

Los resultados obtenidos con sustratos lignocelulosicos, reemplazando la glucosa, como componente del medio de cultivo, en algunos casos como es el de IB-18Cb (*Bdellospora*) en la actividad enzimática LiP utilizando como sustrato bagazo, alcanzo una actividad impresionante, en otros casos no se obtuvo buenos resultados, pero esto depende de cada cepa fúngica, ya que cada una tiene requerimientos nutricionales diferentes, realizando una comparación de la mejor cepa fúngica para cada sustrato y capacidad de producir enzima podemos ver el anexo C-7, C-8, C-9, donde se enguanta los hongos que presentaron mejor actividad para cada enzima.

Podemos resaltar que estos sustratos asimilaron mejor en la actividad lignina peroxidasa, que las otras dos enzimas

#### 4.4. Determinación de Actividad Celulolítica.-

De los resultados obtenidos para enzimas celulolíticas de actividad combinada, en esta prueba solo una cepa dio resultados significativos, fue la cepa IB-29B (*Blastomyces*) los cuales se resumen a continuación.

**Tabla 37: Actividad celulítica para -29B (*Blastomyces*).**



<b>IB-29B(<i>Blasthomyces</i>)</b>	<b>C (g/L)</b>
<b>Medio 6</b>	0,6
<b>Medio 7</b>	0,6

Los resultados obtenidos para las demás cepas fúngicas no fueron significativos, es por eso que no se los tomo en cuenta.

Para realiza esta prueba se realizo una curva de calibración la cual se puede observar en anexo E-1.

Esta prueba se realizo queriendo verificar si existen enzimas tipo hidrolasas, ya que esta enzimas trabajan en conjunto con las enzimas ligninolíticas, teniendo como fin degradar la celulosa, las primeras, y las otras degradar la lignina.

#### **4.5. Determinación de proteínas totales.-**

La absorción a 660 nm se transformo en ug/mL estandarizada con albúmina de suero bovino (Sigma).

Esta prueba se realizo con el objetivo de evaluar si existía alguna limitación en algunos nutrientes que estuviera afectando la producción de las actividades obtenidas en ambos medios [3]. Otro objetivo de era prueba era el de comprobar la existencia de enzimas en el medio , las cuales son proteínas especializadas.

Los resultados más importantes, fueron siguientes:

**Tabla 38: Concentración de proteínas totales para IB-26C (*Trinacrium*)**

<b>IB-26C (<i>Trinacrium</i>)</b>	<b>C<sub>i</sub> (g/L)</b>	<b>C<sub>f</sub>(g/L)</b>
<b>Medio 1</b>	0,28	0,4
<b>Medio 2</b>	0,18	0,3
<b>Medio 3</b>	0,19	0,2



<b>Medio 4</b>	0,05	0,2
<b>Medio 5</b>	0,21	0,3
<b>Medio 6</b>	0,11	0,3
<b>Medio 7</b>	0,1	0,2
<b>Medio 8</b>	0,22	0,4

Se obtuvieron resultados óptimos para la mayoría de las cepas. También se puede observar la curva de estandarización para esta prueba, en la cual se pueden relacionar los resultados obtenidos (ver anexo E-2).

#### **4.6. Comparación de la Actividad Enzimática Ligninolítica de las enzimas producidas frente a enzimas comerciales.-**

Las enzimas producidas por los hongos aislados, se compararon frente a enzimas comerciales por métodos colorimétricos, los resultados obtenidos para enzima se detallan a continuación.

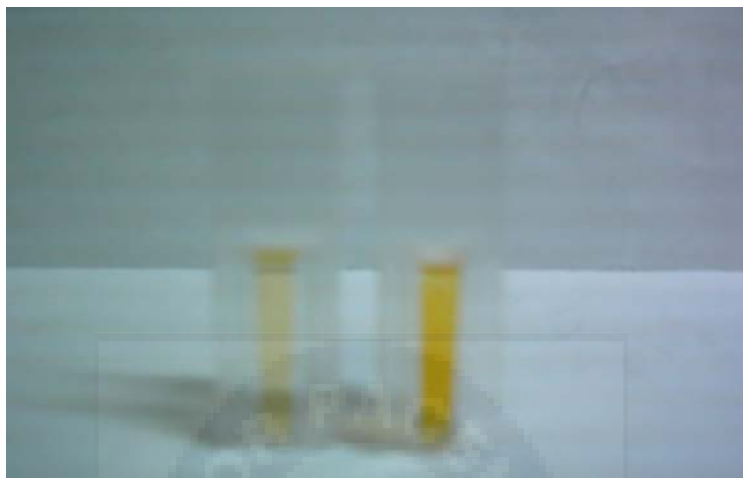
**Tabla 39: Comparación de enzimas comerciales para actividad MnP.**

<b>Manganeso peroxidasa</b>	<b>IB-26C (<i>Trinacrium</i>) medio Mn</b>	<b>IB-29B (<i>Blastomyces</i>) medio Cu</b>	<b>IB-29B (<i>Blastomyces</i>) medio bagazo</b>	<b>Enz. comercial Peroxidase de “Horseradish”.</b>
	77 (UI/L)	246 (UI/L)	91(UI/L)	4289 (U/L)

Podemos ver en la tabla 4-31, la diferencia entre la enzima comercial, para actividad MnP, en este caso la enzima comercial prácticamente supera la cantidad de actividad enzimática respecto ala cepa IB-26C (*Trinacrium*) en medio manganeso.

**Figura 69: Reacción enzimática para MnP de la cepa IB-26C (*Trinacrium*) Frente a una enzima comercial (peroxidasa).**





En la figura 4-44 podemos ver el cambio de coloración que sufrió la reacción gracias a la enzima MnP, en la cual la que mas oxidación produjo fue la enzima comercial.

**Tabla 40: Comparación de enzimas comerciales para actividad LiP.**

<b>IB-26C(<i>Trinacrium</i>) medio manganeso</b>	<b>IB-6(<i>Trinacrium</i>) medio cobre</b>	<b>IB18Cb(<i>Bdellospora</i>) medio bagazo</b>	<b>Enzima comercial</b>
76,50926 (UI/L)	251 (UI/L)	488 (UI/L)	4633 (UI/L)

Para la enzima LiP los resultados de IB-18Cb (*Bdellospora*) en un medio con variación de residuos de bagazo alcanza un 10% de la actividad enzimática de la enzima comercial (ver tabla 4-31).

**Figura 70: Reacción enzimática para LIP de la cepa IB-29B(*Blasthomyces*) frente a una enzima comercial (peroxidasa).**





En la figura 4-45 observamos la oxidación que produce LiP sobre el sustrato ABTS, como resultado se torna una coloración verde oscura.

**Tabla 41: Comparación de enzimas comerciales para actividad Lac.**

<b>IB29B(<i>Blastomyces</i>) medio manganeso</b>	<b>IB15Da(<i>Cephalosporium</i>) medio cobre</b>	<b>IB26C(<i>Trinacrium</i>) medio res quinua</b>	<b>Enzima comercial</b>
74 (UI/L)	287 (UI/L)	63 (UI/L)	4204 (UI/L)

Para la comparación de actividad enzimática de lacasa, las enzimas comerciales alcanzaron mayor actividad enzimática que las enzimas producidas.

Para la determinación de la actividad enzimática de las enzimas comerciales, se tuvo que realizar diluciones 1/10 para que así entren en el rango de linealidad y pueda ser comparadas con las enzimas producidas en el presente trabajo.

Cabe la pena aclarar que las enzimas producidas, están en bruto, ya que no han sido purificadas, esto puede influir bastante por que pueden haber elementos que estén inhibiendo su reacción enzimática, como puede haber elementos que incrementen su actividad enzimática, son bastantes los factores que pueden estar influyendo.

**Figura 71: Reacción enzimática para Lac de la cepa IB-15Da(*Cephalosporium*) frente a una**





**enzima comercial (lacasa).**



Esta prueba fue realizada, par tener una ida de la actividad enzimática de las enzimas producidas.

## **5. CONCLUSIONES**

Dentro de todos los objetivos planteados inicialmente se legaron a las siguientes conclusiones.

Se realizo un viaje de recolección de muestras, en el cual pudimos recolectar 30 muestras diferentes de diferentes fuentes, el viaje se realizo en una parte del Altiplano boliviano, en los departamentos de La Paz y Oruro, es importante mencionar que un porcentaje de hongos han sido aislados de diferentes zonas geográficas de Bolivia.

De las muestras recolectadas logramos aislar 31 cepas fúngicas diferentes, las cuales aun no han sido totalmente estudiadas, de igual forma, no hubiera sido posible realizar el presente trabajo sin la presencia de hongos. De los dos métodos que se utilizaron, el más efectivo fue el método indirecto, ya que se logro aislar más variedad de hongos que en el método indirecto, lo cual nos permite nuevos microorganismos con características interesantes, que despiertan ideas de investigación.



De las 31 cepas aisladas se identificó y caracterizó a un 80,64%, debido a la diversidad que presentan los hongos en el ecosistema, la identificación que se realizó solo fue apoyada en bibliografía, y se estima que sean correctos, por esta razón es necesario confirmarlos por métodos de biología molecular. Respecto al 19,35% que no fueron identificadas constituyen posiblemente a nuevas especies aun no estudiadas.

Debido a la capacidad de producir enzimas con actividad enzimática ligninolítica se realizó dos selecciones de cepas fúngicas, la primera selección realizada en medios sólidos específicos, prueba de la cual el 38,7% de los hongos aislados presentaron actividad ligninolítica, el resto de los hongos 61,3% no presentaron actividad ligninolítica, razón por la cual no se los tomó en cuenta para otras pruebas en adelante.

Este método cualitativo es muy práctico, para la determinación de actividad enzimática, ya que permite ahorrar materiales y tiempo en comparación con otras determinaciones cuantitativas, de todas maneras es indispensable confirmar los resultados con pruebas espectrofotométricas.

En cuanto a la segunda selección de las doce cepas seleccionadas, solo seis mostraron una buena actividad enzimática, esto se debe a que muy pocas son las cepas fúngicas con actividad ligninolítica que están distribuidas ampliamente en el ecosistema. Las seis cepas seleccionadas fueron: IB-29B (*Blastomyces*), IB-18Cb (*Bdellospora*), IB-26C (*Trinacrium*), IB-15B (*Stephanoma*), IB-15Da (*Cephalosporium*), IB-6 (*Circinutrychum*).

Se realizó un diseño factorial  $2^3$ , siendo los factores: glucosa, manganeso, extracto de levadura, con esto se obtuvo 8 diferentes medios con diferente composición, lo cual permitió obtener una mejor actividad enzimática, buscando además el medio específico para cada cepa fúngica y para cada enzima.

De acuerdo a las pruebas realizadas por métodos espectrofotométricos logramos cuantificar la actividad enzimática de las cepas fúngicas seleccionadas. Con estos resultados obtenidos llegamos a varias conclusiones.



Para actividad MnP y LiP la cepa que presento la mejor actividad enzimática en medio manganeso fue la IB-26C (*Trinacrium*) debido a la cinética que presento, podemos afirmar que esta cepa es capaz de producir enzimas peroxidasa óptimamente.

El hongo capaz de expresar enzimas de actividad lacasa óptimamente es IB-29B (*Blastomyces*).

Los medios de elección en la mayoría de las cepas fúngicas son el 5 y 8, para actividad MnP, esto se debe a que es importante la fuente de nitrógeno y necesitan un inductor en este caso es el manganeso para la producción de estas enzimas.

Para una mejor actividad enzimática LiP, los microorganismos requieren una mayor fuente de nitrógeno, pero la actividad enzimática no se produciría si no existiera la interacción de los tres compuestos.

La concentración de glucosa no influye en el medio de cultivo para la producción de enzimas de actividad enzimática lacasa, lo que es indispensable en este medio de cultivo es un inductor en este caso manganeso.

La mayor actividad enzimática para las enzimas ligninolíticas se da entre los 21 y 28 días, esto para el medio manganeso.

Cada microorganismo tiene diferentes requerimientos nutricionales.

Las tres enzimas ligninolíticas determinadas tienen diferentes exigencias para potenciar su actividad enzimática.

Las cepas que fueron capaces de producir los tres tipos de enzimas fueron: IB-29B (*Blastomyces*), IB-18Cb (*Bdellospora*), IB-26C (*Trinacrium*), IB-15B (*Stephanoma*).

De acuerdo a la segunda selección realizada de los hongos aislados se realizó con un segundo diseño factorial  $2^3$ , siendo los factores esta vez: glucosa, cobre, extracto de levadura, y se observó la actividad enzimática que puedan producir en estos medios.



En la prueba de variación cobre para actividades enzimática de enzimas peroxidadas se determinó que la concentración de cobre influye en la actividad enzimática, sin embargo no se necesita altas concentraciones de este metal para optimizar la actividad enzimática, según los resultados obtenidos, las concentraciones tienen que ser bajas, de lo contrario puede llegar a intoxicar al microorganismo e inhibir la síntesis de enzimas.

Con respecto a lacasas se requiere una concentración mínima de glucosa, y la concentración de extracto de levadura es muy importante, ya que es muy necesaria la fuente de nitrógeno para estas enzimas

Realizando una comparación de resultados alcanzados con la variación cobre con respecto a los resultados con variación de manganeso, notamos claramente que los resultados tienen mucha diferencia, en este sentido podemos afirmar, que el medio de cultivo de cobre es más efectivo que el medio de cultivo manganeso.

Se evaluó cinco sustratos lignocelulósicos diferentes para determinar la producción de enzimas ligninolíticas, en medios donde se suprimió la glucosa por: paja brava, bagazo, aserrín, residuos de quinua, cáscara de arroz.

Variando las condiciones de cultivo se consiguió mejorar el rendimiento, optimizando en algunos casos la producción de enzimas, como es el caso de LiP.

Con esta variación de aprovechamiento de sustratos lignocelulósicos se logró reducir costos del proceso de fermentación.

En los fermentos de cultivo fúngicos se encontraron dos tipos de actividad enzimática celulolítica y redox. Esta observación fue evidente con la cepa fúngica *Blatomyces*.

Se determinó la cuantificación de proteínas, resultados con los cuales afirmamos que existe una biomasa proteica, equivalente a la actividad enzimática determinada.

Como referencia, se determinó la comparación de la capacidad de la actividad



enzimática de las enzimas producidas frente a enzimas comerciales.

Las cepas fúngicas aisladas produjeron un 52 a 54% de la actividad enzimática producida por enzimas comerciales.

Las enzimas producidas de actividad enzimática LiP poseen mayor actividad enzimática que las comerciales, sin embargo tomamos en cuenta que estas enzimas producidas en el presente trabajo no están purificadas.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Realizar recolección de muestras explorando más regiones, en especial del altiplano boliviano, debido a la amplia diversidad del país.
- Hacer pruebas de biología molecular, para la identificación de las cepas fúngicas aisladas, para verificar, los resultados estimados de esta prueba.
- Realizar estudios profundos sobre las cepas fúngicas aisladas, con respecto a potenciales biotecnológicos.
- Determinar la actividad enzimática ligninolítica probando un medio de cultivo con otro tipo de metales que induzcan la actividad enzimática, por ejemplo cadmio.
- Realizar pruebas que confirmen el pH característico para cada enzima, ya que este punto es muy influyente en la actividad enzimática.
- Buscar la temperatura óptima para la fermentación de los medios de cultivo de producción de enzimas, y para la reacción enzimática.
- Determinar la biomasa de los medios de cultivo de producción de enzimas, por métodos específicos.
- Profundizar estudios en los medios de cultivo e producción de enzimas, tal vez con un diseño



factorial  $3^3$ , esto con el fin de mejorar la producción de enzimas.

- Incrementar el tiempo de cultivo para determinar si existen diferencias en la cinética de estas enzimas, ya que la actividad máxima en algunos casos se dio en los 28 días.
- Probar otro tipo de sustratos sintéticos, para la evaluación de enzimas ligninolíticas, por ejemplo veratryl alcohol para LiP.
- Se requieren experimentos más precisos para definir la producción de enzimas.
- Por los resultados alcanzados se recomienda realizar la purificación de dichas enzimas.
- Probar otros sustratos lignocelulosicos, para la producción de estas enzimas, estudiando su composición química.
- Realizar pruebas de este tipo de enzimas para la producción de alcohol, la aplicación de industrial como la fabricación de papel, en la industria farmacéutica para la modificación químico enzimático de fármacos y finalmente para procesos de biorremediación por su capacidad de oxidantes.

## **7. BIBLIOGRAFIA**



1. Terrazas-Siles Enrique, Álvarez Teresa, Benoit Guieysse, & Bo. Mattiasson. **Isolation and characterization of a white rot fungus *Bjerkandera sp.* Strain capable of oxidizing phenanthrene.** Ed 1. Lund Media – Tryck, Lund University 2005; 20: 845-851.
2. Terrazas-Siles Enrique. 2005. **Fungal Redox Enzymes Involved in the oxidation of organic pollutants.** Ed 1. Lund Media – Tryck, Lund University 2005; 20: 10-23.
3. Leandro Papinutti Victor, Luis DIorio, Flavio Forchiassin. **Degradación de la madera del álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro.** Rev Iberoam Micol 2004; 20: 16-20.
4. Pelaez F, Martinez MJ, Martinez AT. **Screening of 68 species of basidiomicetes for enzymes involved in lignin degradation.** Mycol Res 1999; 99: 37-42.
5. Kirt TK, Farrell RL. **Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin.** Annu Rev Microbiol 1987; 41: 465-505.
6. Kirt TK, Connors WJ, Zeikus JG. **Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two woodrotting fungi.** Appl Environ Microbiol 1976; 32: 192-194.
7. Perez J, Jeffries TW. **Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaetechrysosporium*.** Appl Environ Microbiol 1992; 58: 20402-2409.
8. Solís Sara. **Hongos que eliminan contaminantes.** Rev Instituto Tecnológico de Mérida 2005; 22: 10-11.
9. Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid. **El CSIC desarrolla alternativas ecológicas para eliminar la lignina en la producción de papel.** g.prensa@csic.es 2004; 25: 1-3.
10. Guisado, G., López, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F. y Moreno, J. **Decoloración *in vitro* de colorantes industriales por ligninasas de**



**microorganismos aislados a partir de pilas de compostaje.** Departamento de Biología Aplicada, Universidad de Almería. 2005; 211: 4120-4125.

11. García Torres Angélica María, Rodrigo Gonzalo Torres Sáez. **Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido.** Rev Universidad Industrial de Santander. 2003; 18: 635-638

12. Dávila Gustavo, Rafael Vázquez-Duhalt. **Enzimas Ligninolíticas fúngicas para fines ambientales.** Rev Universidad Nacional Autónoma de México. 2006; 108: 1000-1011.

13. Sánchez Oscar Julián, Carlos Ariel Cardona. **Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas.** Rev Interciencia. 2005; 30: 671-678.

14. Dirección Nacional de Promoción, Subsecretaria de Energía Eléctrica. **Energías renovables a partir de Biomasa.** Rev Tecnología de la información Secretaria de energía. 2004; 23: 6-19.

15. Murrieta Dulce Maria, Gerardo Mata, Lourdes Iglesias. **Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotas Pulmonarius*. Cultivado en pulpa de café en confrontación con *Tricoderma Viride Pers*, un mohó.** Red de Rev Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 2002; 4: 47-52.

16. Lin SY, Lin IS. **Lignin.** In: Ullmann's encyclopaedia of industrial chemistry. 2001; 15: 305-315.

17. Manzano Ana Margarita, Teresa León, Juan Argüelles. **Hongos de la podredumbre blanca con capacidad Ligninolítica y acción decolorante sobre el violeta cristal.** Rev Biología. 2004; 18: 123-127.

18. Campbell CK, Dagmar Schmidt **Identification of Pathogenic Fungi** Public Health Laboratory Service. London. 1996; 12: 299-335.





19. Lin, S.Y., Dence, C.W. **Methods in lignin chemistry**. Springer-Verlag, Berlin. 1999; 41: 465-505.
20. Fuentes Villagran, José Renan. **Simulación y modelo matemático de la deslignificación selectiva de la madera por hongos blancos en ambiente natural**. Rev Temuco Universidad de la Frontera. 1991; 24: 465-487.
21. Fengel, D., Wengener, G. **Chemistry, ultrastructure, reactions**. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 23: 3397-3413.
22. Kay RM, Strasberg SM, Petrunka CN. **Differential absorption of bile acids by lignins**. In: Inglett GE, Falkenhag I. Dietary fibres: Chemistry and nutrition. London: Academic Press, 1979; 57: 2300-2307.
23. C. Gómez-Dorado, M, Martínez-Salgado, D. Nieto-Mosquera. **Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-peroxidasa y Lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera**. Rev Facultad de Ciencias. 2005; 10: 37-45.
24. Bial, Aristegui. **El reino de los hongos**. Rev Iberoam Micol. 2002; 8: 1-4.
25. Lillian Frioni. **Procesos microbianos**. Ed de la Fundación nacional de Río Cuarto Argentina. 1999; 11: 723-736.
26. Popoff, Orlando. **Reino fungi**. Hipertextos del área de la Biología. 2006; 22: 24-29.
27. **Enciclopedia Microsoft Encarta Online**. Bolivia, consulado en septiembre 12, 2006.
28. Poiting, S. B. **Feasibility of bioremediation by white-rot fungi**. Appl. Microbiol. Biotechnology. 2001; 57: 20-33.
29. Álvarez Ma. Teresa., Terrazas S. Luis Enrique. **Manual para la producción y valoración de interés biotecnológico**. 2002; 1: 1-2.



30. Lehninger A., Nelson D., **Principios de Bioquímica**. Barcelona ediciones Omega. 2001; 2: 199-210.
31. Vargas Getulio. **La magia de las enzimas**. Rev énfasis en alimentación. 2006; 2: 75-82.
32. Rodríguez Rincón Francisco. **Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavidobialba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales**. Editorial de la Universidad de Granada. 2006; 84: 338-385.
33. K Griselda., Guillen-Navarro, Facundo J., Márquez-Rocha, José E. Sánchez Vázquez. **Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido**. Rev Iberoam Micol.1998; 15: 302-306.
34. M. Martínez-Salgado, A. Pedrosa-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez. **Efecto de la glucosa y nitratote amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración de un efluente papelerero en un biorreactor de lecho fluidado**. Revista de la Facultad de Ciencias. 2005; 10: 2, 27-36.
35. Mouso Nora, Leandro Papinutti, Flavio Forchiassin. **Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers**. Rev Iberoam Micol. 2003; 20: 176-178.
36. Alonso-Bozada S., M. Montiel\_Gonzales, A. Tomasini, C. Sánchez. **Comparación de las enzimas lacasas de *Pleurotus ostreatus* producidas por fermentación sólida y sumergida**. Revista de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. 2002; 12: 45-49.
37. Arana A., A. Téllez, S. Yague, e. Fermiñan, S. Moreno. **Deslignificación de pasta al sulfato de *Pinus radiata* utilizando levaduras recombinantes**. Centro de investigación forestal Madrid. 2004; 18: 34-45.
38. Chávez-López C., J. F. Esparaza-García, Ma. E. Hidalgo-Lara, O: Loera-Corral, R. Rodríguez-Vázquez. **Producción de la enzima lacasa por el hongo *Cladosporium***



*cladosporioides* en presencia de fenantreno. Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería Habana. 2005; 73: 158-163.

39. Andersson, B. E., Lundstedt, S., Tornberg, K., Schunurer, Y., Oberg, L.G., and Mattiasson, B. **Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria.** Environ Toxicol Chem. 2003; 22:1238-1243.

40. Maeztu Ramiro de. **Biodegradación de Lignina y Compuestos Recalcitrantes.** Centro de Investigaciones Biológicas. 2002; 9: 2840-2845.

41. Barrasa, J. M., Martínez, A. T. **Enzimas producidas por nuevos basidiomicetos aislados en al sierra de Ayllón capaces de degradar colorantes industriales.** Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá. 2003; 17: 372-376.

42. Addleman, K., Archibald, F. **Kraft pulp bleaching and delignification by dikaryons and monokaryons of *Trametes versicolor*.** Appl. Environ. Microbiol. 1993; 59: 266-273.

43. Adler, E. **Newer views of lignin formation.** Tappi. 1957; 40: 294-301.

44. Aisemberg, G., Grorewold, E., Taccioli, G., Judewiez, N., Major, A. **Transcript in the response of *Neurospora crassa* to protein synthesis inhibition by cycloheximide.** Exp. Mycol. 1989; 13: 121-128.

45. Akileswaran, L., Alic, M., Clark, E., Hornick, J., Gold, M. **Isolation and transformation of uracil autotrophs of the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.** Curr. Genet. 1993; 23: 351-356.

46. Higuchi, T. **Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase.** Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences. 2004; 80: 204-214.



47. Glenn, J., Morgan, Mayfield M., Kuwara M., Gold M. **An extracellular requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium***. Biochem. Biophys. Res. Común. 2002; 14: 1077-1083.
48. Tien, M., Kirk T. **Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds**. Science. 1983; 221: 661-663.
49. Schoemaker, H., Lundell T., Ataca A., Pirotek K., **The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignin models and lignin by lignin peroxidase- the redox cycle revisited**. FEMS Microbiol. Rev. 1994; 13: 511-518.
50. Hatakka, A. **Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation**. FEMS Microbiol. Rev. 1994; 13: 125-135.
51. Hammel, K., Tardote P., Moen M., Price J. A. **Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn (II): New observations on the oxidability of guaiacyl and syringyl substructures**. Asch. Biochem. Biophys. 1989; 270: 404-409.
52. Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J-M. **Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes**. Bioremed. J. 1999; 3: 1-25.
53. Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., Bally, R. **Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum***. Soil Biol. Biochem. 2000; 32: 919-927.
54. Thurston, C. **The structure and function of fungal Laccases**. Microbiology. 1994; 140: 19-26.
55. Lewis, N., Yamamoto E. **Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation**. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 1990; 92: 455-496.
56. Bollag, J-M., Leonowicz A. **Comparative studies of extracellular fungal Laccases**. Appl. Environ. Microbiol. 1984; 48: 849-854.



57. D'Souza, T., Dass, S., Rasooly, A., C. **Electrophoretic karyotyping of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium***. Mol. Microbiol. 1993; 8: 803-807.
58. Shin, W., Sundaran U., Cole J., Zhang M., Hedman B., Hodgson K., Solomon E. **Chemical and spectroscopic definition of the peroxide level intermediate in the multicopper oxidases. Relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction of water**. J. Am. Chem. Society. 1996; 118: 3202-3215.
59. Hess J., Leitner C., Galhaup C. **Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor***. Appl Biochem Biotechnol. 2002; 98-100: 229-241.
60. Demir G. **Degradation of toluene and benzene by *Trametes versicolor***. J. Environ Biol. 2004; 25:19-25.
61. Clemente A.R., Anazawa, T.A., and Durrant L. R. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by soil fungi**. Braz J Microbiol. 2001; 32: 255-261.
62. Novtny, C., Erbanova, P., Sasek, V., Kubatova, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krahl, J., Zadrzil, F. **Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi**. Biodegradation. 1999; 10:159-168.
63. Kubatova, A., Erbanova, P., Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F., and Sasek, V. **PCB congener selective biodegradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil**. Chemosphere. 2001; 43: 207-215.
64. Baudette, L. A., Ward, O. P., Pickard, M. A., and Fedorak P.M. **Low surfactant concentration increases fungal mineralization of a polychlorinated biphenyl congener but has no effect on overall metabolism**. Lett Appl Microbiol. 2000; 30:155.
65. Hiratsuka, N., Wariishi, H., and Tanaka, H. **Degradation of biphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor***. Appl Microbiol Biotechnol. 2001;



57:563-571.

66. Bending, G. D., Friloux, M., and Walker, A. **Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential.** FEMS Microbiol Lett. 2002; 212: 59-63

67. Kahraman S., Yesilada, O. **Decolorization and bioremediation of molasses wastewater by white-rot fungi in a semi-solid-state condition.** Folia Microbiol (Praha). 2003; 48: 525-528.

68. Wu, J., Xiao, Y. Z., and Yu, H.Q. **Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm.** Bioresour Technol. 2005; 12:1357-1363.

69. Barnett, H. L., Hunter, B. **Illustrated Genera of imperfect fungi.** 1972; 3.

70. Rodrigues Rincon Ramiro. **Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavidobalva*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales.** Ed. De la Universidad Granada España. 2006; 4: 1026-2006.

71. Álvarez, E. **Principales indicadores de la masa sacarificada de aserrín de pino y su efecto en la alimentación de pollos de ceba, Resúmenes del Primer Taller Internacional Bioforest.** Rev. Pinar del Río.2003

72. Jolkin, Y.I. **Tecnología de las producciones hidrolíticas.** Editorial Lesnaya Prom, Moscú. 1989:495 p.

73. Crez, R. **Utilización de aserrín como aditivo para mejorar la dinámica de los elementos nutritivos en el suelo.** Rev. 6 Congreso de las ciencias del suelo, Chile.pp.1996:173-176.

74. Ramírez M. **Instructivo técnico funcional de la empresa Agroindustrial ICU S.A.** Centro Nacional de Promoción de la Pequeña Industria y Artesanía. Quito. 1993: 76 p.



75. Prescott, Lasing M. **Microbiología**. 1999; 4: 539-555.
76. Maganhotto, Celia Maria de Souza Silva. **Producao de enzimas Ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado**. Jaguariuna, SP. 2004; 56:1516-1524.
77. Levin L, Forchiassin F, Ramos AM. **Cooper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii***. Mycologia. 2002; 377-383.
78. Baldrian P, Gabriel J; Nereud F. **Effect of cadmium on the ligninolytic activity oh *Stereum hirsutum* and *Phenerochaete chrysosporium***. Folia Microbiol 1996; 41: 363-367.
79. Galliano h, Gas G, Seris JL, Boudet AM. **Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase**. Enzyme Microb Technol. 1991; 13: 478-482.
80. Kapich A.N., Prior B.A., Botha A. **Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446**. Enzyme and microbial Technology. 2004; 34: 187-195.
81. Moreira Neto Sergio Luiz. **Enzimas Ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenceno**. Instituto de Botanica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 2006; 110: 376-398.
82. Papinutti, V.L., Diorio, L.A., Forchiassin, F. **Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermes* grow on wheat bran**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2001; 30: 157-160.
83. Baldrian. P., Valaskova, V., Merhautova, V., Gabriel, P. **Degradation of lignocellulose by *Pleurtus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc**. Research in Microbiology. 2005; 156: 670-676.
84. Harper, H.A., Rodwell, V.W., Mayes, P.A. **Manual de Química Fisiológica**. 1982; 5: 736.



85. Leatham G.F., **Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of lignocellulosic medium.** Appl Environ Microbiol. 1985; 50: 859-867.
86. Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Bomemen S. **Reactivities of various mediators and Laccases with kraft pulp and lignin model compounds.** Appl Environ Microbiol. 1997; 63: 4627-4632.
87. Soares G.M., de Amorim M.T., Costa Ferreira M. **Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R.** J Biotechnol. 2001; 89: 123-129.
88. Muñoz C., Guillen F., Martinez A.T., **Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*.** Curr Microbiol. 1997; 34: 1-5.
89. Furushima Y. Okada K., Kawai G. **Efficient production of mycelium of *Lentinus edodes* by a continuous culture.** Mushroom Science. 1991; 13: 721-725.
90. Baldrian, P. Gabriel J. **Cooper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*.** FEMS Microbiol. Lett. 2002; 206: 69-74.
91. Moldes D., Gallego P. **Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsute*.** Biotechnology Letters. 2003; 25: 491-495.
92. Chávez L., Esparza F., García E. **Producción de la enzima lacasa por el hongo *Cladosporium cladosporioides* en presencia de fenantreno.** Sociedad Cubana de Bioingeniería. 2005; 73; 76-89.
93. Michniewiez Anna, Ullrich Rene. **The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties.** Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 69: 682-688.
94. Heinfling, A. **Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotas eryngii* in a manganese-undependent reaction**





in **Applied and Environmental Microbiology** .Rev Applied Microbiol 1998; 64: 2788-2793.

95. Koh, S. **Plant terpenes and lignin as natural cosubstrates in biodegradation of polychlorinated bipheyls (PCBs) and polyeyelic aromatic hydrocarbons (HAPs).**

Documento de la universidad de la marina de Korea. Korea Pp1-3.

96. Cerniglia C. **Fungal metabolism of polyeyelic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 1997; 19: 234-333.

97. Society for Microbiology. **Introduction in Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.** 1997; 18:73-74.

98. Ulfig. K. **Microbiological aspects of bioremediation.** Institute for the ecology of industrial areas. EE. UU.1995; 76: 765-769.

99. Vidale, M. **Bioremediation.** An overview in Pure Applied Chemistry. 2001; 7:1163-1172.

100. Viñas, M. **Biodegradation of crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2002; 28: 252-260.

101. Beaudette, L. **Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in culture of white rot fungi.** Applied and Environmental Microbiology. 1998; 64:2020-2025.

102. Alvo P, Belkacemi K. **Enzymatic saccharification of milled timothy and alfalfa (*Medicago sativa L.*).** Bio resource Technol. 1997; 61: 185-198

103. Herrera-Mora, J. Rosas Acosta. **Estudio preliminar de la producción de enzimas Ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotas ostreatus* para el tratamiento de efluentes de la industria papelera.**



Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. Pontificada Universidad Javeriana, 2003; 151: 342-346.

104. Hawgood N, Evans S. **Enhanced ethanol production in multiple batch fermentations with an auto-flocculating yeast strain.** *Biomass*. 1985; 7: 255-273.

105. Wyman CE, Spindler DD, Grohmann K. **Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstock's to fuel ethanol.** *Biomasa Bioenerg*. 1992; 3: 301-307.

106. Deguchi. T. 1998. **Purification and characterization of a Nylon degradation enzyme.** *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1366-1371.

107. Seradati, M. **Transformation of high concentrations of chlorosphenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon.** *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003; 6: 106-114.

108. Eggert, C. **The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase.** *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62:1151-1158.

109. Kumari, M et al. 2000, **Secretion of lignin peroxidase by *Pencillium citrinum*, *fusarium oxysporum* and *Aspergillus terreus*.** *Indian Journal Experimental Biology*. 2000; 40: 802-806.



