

**Evaluación de enzimas degradadoras de lignina producidas por aislamientos
fúngicos de cultivos de arroz**

Laura Daniela Muñoz Duarte

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de ciencias
Carrera de Microbiología Industrial
Bogotá D.C.**

Diciembre 2012

**Evaluación de enzimas degradadoras de lignina producidas por aislamientos
fúngicos de cultivos de arroz**

Laura Daniela Muñoz Duarte

**Trabajo de grado Presentado como requisito parcial para optar al título de
Microbióloga Industrial**

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de ciencias

Carrera de Microbiología Industrial

Bogotá D.C.

Diciembre 2012

**EVALUACIÓN DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA PRODUCIDAS
POR AISLAMIENTOS FÚNGICOS DE CULTIVOS DE ARROZ**

LAURA DANIELA MUÑOZ DUARTE

INGRID SHULER

DECANA ACADEMICA

FACULTAD DE CIENCIAS BASICA

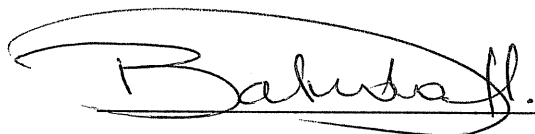
JHANETH ARIAS PALACIOS

DIRECTORA DE CARRERA

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

**EVALUACIÓN DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA PRODUCIDAS
POR AISLAMIENTOS FÚNGICOS DE CULTIVOS DE ARROZ**

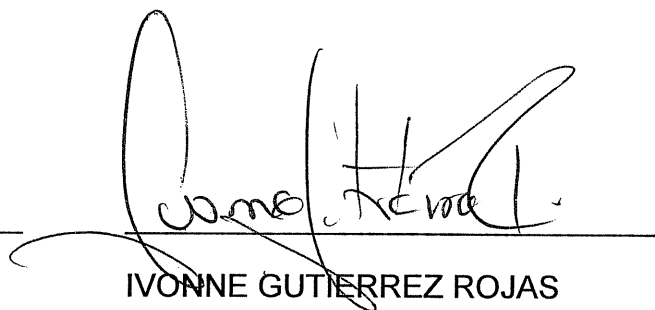
LAURA DANIELA MUÑOZ DUARTE



BALKYS QUEVEDO HIDALGO

INGENIERA QUIMICA, Ph.D.

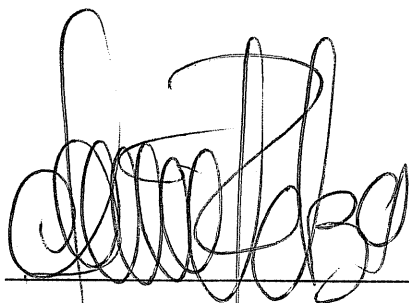
DIRECTORA



IVONNE GUTIERREZ ROJAS

BACTERIOLOGA, M.Sc

CODIRECTORA



AURA MARINA PEDROZA

BACTERIOLOGA, Ph.D.

JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946 “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar enorme agradecimiento a mis padres porque si ellos no habrían logrado ser la persona que soy ahora, por sus consejos, apoyo, paciencia y cariño.

A mi directora Balkys Quevedo por abrirme las puertas de su laboratorio y poner en mí su confianza. Por su paciencia, dedicación y acompañamiento durante todo este proceso y por todos sus consejos que además de formar a un científico buscaban hacerme crecer como persona. También a mi co directora Ivonne Gutiérrez que a pesar de que esta en medio de su doctorado siempre estuvo ahí para orientarme.

Con mi mayor afecto quisiera agradecer a María Alejandra Jaramillo, Marco Rincón, Jessica Díaz, Paola Palacios, Melissa Sánchez, Shirley Rojas y Miguel Rincón por ser un apoyo incondicional en todo sentido y por hacer de esta experiencia un recuerdo muy gratificante para mi vida.

Y finalmente a Diosito por poner tantas cosas y personas bonitas en mi vida.

RESUMEN

En Colombia, los cultivos de arroz son una importante fuente de ingresos, sin embargo, son causantes de la acumulación de residuos agroindustriales que al no ser tratados resultan en un serio problema ambiental. Dichos residuos son ricos en lignocelulosa y son de difícil degradación debido a la presencia de lignina en su composición. En este trabajo se estudió la capacidad ligninolítica de aislamientos fúngicos provenientes de cultivos de arroz. *Pleurotus ostreatus* MF 1-83 fue seleccionado por presentar la mayor actividad cualitativa de ligninasas. Posteriormente se evaluó el efecto de la adición de sulfato de cobre 7,5mM al medio salvado de trigo sobre la producción de enzimas lacasa (Lac) y manganeso peroxidasa (MnP). Se encontró que la mayor producción de lacasa corresponde a 10.913,9 U/L en el día 15 y de manganeso peroxidasa 782,4 U/L en el día 8, en ausencia de sulfato de cobre, por las técnicas de oxidación de [ácido 2,2' azino-bis-(3 etilbenzotiazoline sulfato) y oxidación del 2,6-dimetoxifenol respectivamente. La enzima lacasa fue estable durante 24 horas a pH 5 manteniendo el 61,7% de la actividad enzimática y la manganeso peroxidasa a pH 6 mantuvo 64,4% de su actividad por 24 horas. La mayor termoestabilidad para lacasas se dio a 25°C con 61,7% de actividad por una hora y para manganeso peroxidasa a 30 °C por una hora manteniendo el 60,7% de su actividad. Se logró obtener un extracto enzimático con lacasa y manganeso peroxidasa provenientes del cultivo en fermentación líquida de *Pleurotus ostreatus* MF 1-83 que será parte de un extracto lignocelulolítico para la degradación de residuos agroindustriales.

Tabla de contenido

INTRODUCCION.....	13
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
MARCO TEORICO REFERENTES CONCEPTUALES.....	18
Actividad agrícola y cultivos de arroz en Colombia.....	18
Residuos de la agroindustria y su composición.....	19
Microorganismos con actividad ligninolítica.....	20
Degradación biológica de residuos ligninolíticos.....	21
OBJETIVOS.....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Específicos.....	23
METODOLOGIA.....	24
Microorganismos.....	24
Reactivación de los aislamientos.....	24
Evaluación cualitativa de actividad ligninolítica.....	24
Fermentación Líquida.....	25
Evaluación de la influencia del sulfato de cobre sobre la expresión enzimática.....	25
Evaluación de la actividad proteolítica.....	26
Actividad de lacasa.....	26
Actividad Manganese peroxidasa (MnP).....	26
Evaluación de la estabilidad frente al pH.....	27
Evaluación de la estabilidad térmica de las enzimas.....	27
RESULTADOS/ DISCUSIÓN.....	28
Selección del aislamiento con mejor actividad ligninolítica en agar lignina.....	28
Fermentación Líquida y evaluación del efecto de la adición de sulfato de cobre.....	29
Efecto del sulfato de cobre sobre la producción de lacasa.....	30
Efecto del sulfato de cobre sobre la producción de manganese peroxidasa.....	33
Evaluación de la estabilidad a pH y termoestabilidad de la actividad enzimática.....	34
Pruebas de estabilidad para lacasa.....	35
Pruebas de estabilidad para manganese peroxidasa.....	36
Evaluación de la presencia de proteasas.....	38
CONCLUSIONES.....	39

RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad enzimática del extracto obtenido en la fermentación líquida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Halos de oxidación en mm de guayacol en agar lignina de los hongos correspondientes a los códigos MF 1-83, MF 3-90, MF3-86, MF 8-80 y MF 3-88. (Ver ANEXO 1).....	28
Figura 2. Fotografía del hongo seleccionado MF 1-83 identificado como <i>Pleurotus ostreatus</i> . A la izquierda su crecimiento en agar salvado de trigo. A la derecha el halo de oxidación del guayacol.	29
Figura 3. Efecto de la adición de sulfato de cobre 7,5 mM sobre la actividad enzimática lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> MF 1-83 a través del tiempo.	30
Figura 4. Efecto de la adición de sulfato de cobre sobre la actividad enzimática manganeso peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> MF 1-83 a través del tiempo.	33
Figura 5. Efecto de la temperatura (A) y pH (B) sobre la estabilidad de la actividad enzimática de la lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> MF 1-83 representada en porcentaje de actividad residual. Las letras minúsculas representan la clasificación homogénea según Scheffé (ver ANEXO 4).	35
Figura 6. Efecto de la temperatura (A) y pH (B) sobre la estabilidad de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> representada en porcentaje de actividad residual. Las letras minúsculas representan la clasificación homogénea según Scheffé (ver ANEXO 4).	36

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Medición de los halos de hidrólisis del guayacol en agar lignina.....	47
Anexo 2. Resultado del análisis ANOVA.	48
Anexo 3. Estabilidad enzimática frente a pH y temperatura de lacasa y manganeso peroxidasa.....	49
Anexo 4. Distribución de los datos de estabilidad según el test de Scheffé.....	50

INTRODUCCION

Los cultivos agrícolas, entre ellos los cultivos inundados de arroz, generan grandes cantidades de residuos agroindustriales como la cascarilla y el tamo. Un pequeño porcentaje de estos residuos es aprovechado como alimentación animal o utilizados en el campo, sin embargo, la mayor parte se descarta sinningún tratamiento, causando daños en el medio ambiente (Melo 2011).

Los residuos agroindustriales están compuestos mayoritariamente por lignocelulosa; a menudo son retirados del suelo y desechados sin tener en cuenta que no se degradan fácilmente; a raíz de esto se ha dado origen a un serio problema ambiental relacionado con los métodos que usan los agricultores para deshacerse de los desechos, como por ejemplo: la quema a cielo abierto, que genera la emisión de gases efecto invernadero como el metano (CH₄) y el dióxido de carbono (CO₂); la aplicación directa sobre los suelos causando erosión y la acumulación ya que su descomposición natural es un proceso muy lento(Eriksson y Bermek2009) .

Por esta razón se estudia la degradación y reutilización de residuos agroindustriales desarrollando métodos físicos, químicos y en especial biológicos para evitar el daño ambiental que generan y aprovechar su potencial para diferentes aplicaciones (Kumar *et al.*, 2009). Como una alternativa surge la bio digestión con microorganismos, encontrándose una amplia variedad de estos capaces de degradar los polisacáridos de los tejidos vegetales , sin embargo un grupo reducido de microorganismos, los hongos de podredumbre blanca, tienen la capacidad metabólica de producir enzimas denominadas ligninolíticas que actúan sobre la lignina; un polímero irregular e insoluble, componente de la lignocelulosa que se presenta como la primera barrera para la degradación y se interpone a la utilización de la celulosa y hemicelulosa ricas en azúcares (Feng *et al.*, 2012).

Las enzimas lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasade los hongos de podredumbre blanca se han usado ampliamente en el campo biotecnológico,

porque tienen la capacidad de degradar sustancias recalcitrantes con estructuras aromáticas similares a las de la lignina(Sánchez 2009), por ejemplo se reporta que han sido usadas para la descontaminación de aguas residuales de la industria textil contaminadas con colorantes sintéticos(Asgheret *al.*, 2009), para la degradación de residuos de productos farmacéuticos como el ibuprofeno (Marco *et al.*, 2009), pesticidas organoclorados (Xiao*et al.*, 2011), aceites de palma(Rahman*et al.*, 2011) , entre muchas otras aplicaciones.

Basados en este panorama, el presente proyecto plantea un estudio descriptivo de la actividad y estabilidad de enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus*, aislado de cultivos de arroz de Colombia, con el fin de generar información fundamental para lograr la obtención de un extracto de estas enzimas para ser usadas como una alternativa a gran escala de tratamiento de residuos agroindustriales siendo una herramienta esencial para la resolución del problema antes expuesto. Todo esto enmarcado dentro de un proyecto general que tiene como objetivo final la obtención de un extracto enzimático lignocelulolítico para la degradación de residuos agroindustriales. Por lo anterior, en este trabajo se propuso como objetivo evaluar la actividad enzimática de ligninasas obtenidas a partir aislamientos fúngicos de cultivos de arroz.

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las industrias agrícolas en Colombia representan una de las mayores fuerzas económicas debido a la fertilidad de los suelos y el clima que favorece una gran variedad de productos, en consecuencia cultivos como el arroz generan anualmente alrededor de 5.989.573 toneladas (t) de residuos agroindustriales de los cuales solo una mínima cantidad son reutilizados (Orduz *et al.*, 2012).

La lignocelulosa es el componente más abundante de los residuos vegetales y consta de tres tipos de polímeros: celulosa $(C_6H_{10}O_5)_n$, hemicelulosa $(C_5H_8O_4)_n$ y lignina $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}]_n$ que se encuentran fuertemente unidos por enlaces covalentes y no covalentes (Pérez *et al.*, 2002), la proporción de cada uno varía de una especie vegetal a otra y se encuentra organizada como una estructura fibrosa que lo hace altamente resistente a la degradación (Kumar *et al.*, 2009).

La acumulación de residuos lignocelulósicos es un problema ambiental que ha ido creciendo y que además contribuye a la contaminación de los suelos, aguas y a la producción de gases efecto invernadero producto de la quema a cielo abierto (Pérez *et al.*, 2002)(Mohamed *et al.*, 2010). En consecuencia se desaprovecha el gran potencial de estos residuos para diferentes usos como por ejemplo en el control de la erosión, la devolución de nutrientes al suelo, como sustrato de biocombustibles, alimento de animales, entre otros; pero para poder ser reutilizados es necesario someterlos a un pre tratamiento adecuado (Huang *et al.*, 2010)(Ortiz y Uribe., 2010).

Los procesos físicos y químicos empleados como pre tratamiento para degradar los residuos vegetales, en algunos casos implican procedimientos de alto costo energético o el uso de altas concentraciones de productos químicos, como por ejemplo los procesos de hidrólisis ácida que necesitan temperaturas y presiones muy altas o altas concentraciones de ácidos y largos tiempos de retención, lo que implica elevados costos de procedimiento además de llevar a la formación de

sustancias tóxicas que pueden interferir en posteriores fermentaciones. Otros pretratamientos como la trituración mecánica conllevan un gasto intensivo de energía, la ozonólisis que se dice que no es económicamente rentable o la explosión con CO₂, son tratamientos frente a los cuales la hidrólisis enzimática podría traer ciertas ventajas, ya que utiliza condiciones de temperaturas y pH más suaves que en los tratamientos químicos, permitiendo la eficaz ruptura de los polímeros con un bajo consumo de energía sin la formación de subproductos tóxicos (Kumar *et al.*, 2009) (Pandey *et al.*, 2011).

Como primera limitante en la aplicación de tratamientos a los residuos lignocelulósicos, se encuentra la estructura heterogénea, estable e hidrófoba de la lignina, este polímero añade fuerza, estructura y protección a los tejidos vegetales por lo cual es altamente resistente a la degradación química y biológica (Huang *et al.*, 2010) (Castillo *et al.*, 2005) (López *et al.*, 2006).

Como alternativa se encuentra la degradación biológica de la lignina, para lo cual los denominados hongos de podredumbre blanca presentan complejos enzimáticos (manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y lacasa) que catalizan la degradación del polímero y otros compuestos aromáticos por procesos de oxidación, obteniendo como productos compuestos húmicos, CO₂ y agua (Huang *et al.*, 2010) (Cabaleiro *et al.*, 2002). Los consecuentes intermediarios de la degradación pueden ser componentes fácilmente asimilables en los metabolismos de organismos presentes en los suelos; y conjuntamente la degradación de la lignina permite que otros organismos tengan acceso fácilmente a la celulosa y hemicelulosa como fuente de carbohidratos asimilables (Mohamed *et al.*, 2010) (Cabaleiro *et al.*, 2002).

Esta investigación hace parte del proyecto **“Obtención de un extracto enzimático lignocelulolítico para la degradación de residuos agroindustriales”** financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana. El objetivo general del proyecto es la producción de

enzimas celulolíticas y ligninolíticas, las que se usarán para degradar residuos de cultivo de arroz. Por tal razón en este trabajo se pretende obtener los extractos enzimáticos con mayor actividad ligninolítica a partir de aislamientos fúngicos del arroz y caracterizar su estabilidad frente a pH y temperatura; que finalmente en conjunto con extractos celulolíticos hará parte de un producto que sea efectivo para la degradación de residuos agroindustriales.

MARCO TEORICO REFERENTES CONCEPTUALES

Actividad agrícola y cultivos de arroz en Colombia

En Colombia pese a que algunos planteamientos afirman que las condiciones agroecológicas para la producción de arroz no son las más óptimas, por tener la ventaja de ser un país tropical sin estaciones, se reporta que el cultivo presenta indicadores de mejoramiento competitivo con rendimientos por hectárea por encima del promedio mundial y, en el caso del arroz tecnificado en el Tolima que es la región con mayores volúmenes de producción se asemejan a los promedios de los Estados Unidos, el país con mayores rendimientos en el mundo (Martínez *et al.*, 2005).

Para el 2010, el arroz en Colombia se cultivó en 420.721 hectáreas del territorio nacional; que rindieron 2.099.195 toneladas (t) de arroz (Fedearroz 2012) y generando en promedio anual 5.989.573 t de residuos lignocelulosicos(Orduz *et al.*, 2008), es decir que por cada tonelada de arroz producida se generan cerca de 3 t de residuos. Según Agrocadenas Colombia, el arroz es el tercer producto agrícola en extensión, después del café y el maíz. Representa el 13% del área cosechada en Colombia y el 30% de los cultivos transitorios. Su producción representa el 6% del valor de la producción agropecuaria y el 10% de la actividad agrícola Colombiana. El valor generado por este producto es equivalente al 58% del valor constituido por el cultivo del café(Martínez *et al.*, 2005).

La Cadena productiva de este cereal es un importante generador de empleo por lo tanto es uno de los cultivos mas representativos para la economía colombiana y uno de los mayores responsables de la generación de residuos agroindustriales (Castro 2004). Estos residuos agroindustriales tienen gran potencial de reutilización, los productos que se obtienen a partir de estas fuentes reciclables ayudan a reducir el impacto ambiental generado, disminuir los costos de tratamiento y muchas veces se aprovechan en las mismas industrias de las que se derivan (Rodríguez y Hanssen 2007).

Residuos de la agroindustria y su composición

Los residuos agroindustriales están compuestos principalmente por lignocelulosa a su vez compuesta en mayor proporción por celulosa, hemicelulosa y lignina (Pérez *et al.*, 2002).

La celulosa es un polímero no ramificado formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4 (Sanchez 2009). Está localizada en la pared celular vegetal en donde se encuentra como cadenas largas unidas por enlaces de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals por lo que se encuentra en forma de microfibrillas mientras la hemicelulosa y lignina recubren las microfibrillas (Kumare *et al.*, 2009).

La hemicelulosa es un polisacárido muy heterogéneo que constituye el segundo componente por orden de abundancia en la pared celular vegetal, presenta una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas que contienen habitualmente: xilanos, mananos, glucomanos, galactoglucomanos, xiloglucanos y calosa (Pérez *et al.* 2002) (Sánchez 2009).

La lignina es un polímero amorfo, no soluble en agua, formado por unidades fenilpropanoides, derivados de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí por enlaces aril-éter (C-O-C) o carbono-carbono. Debido al carácter hidrofóbico que posee, desplaza el agua de las paredes celulares secundarias, aumentando la resistencia química y la rigidez de la pared (Mohamed *et al.*, 2010) se une a la celulosa y a la hemicelulosa haciendo de la pared celular de las plantas, una barrera física muy estable, dando soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo (Sánchez 2009). La lignina impide la transformación de hemicelulosa y celulosa por lo tanto retarda los procesos de degradación de los residuos lignocelulosicos convirtiéndose en un paso limitante del proceso (López *et al.*, 2006).

Microrganismos con actividad ligninolítica

Muchos microorganismos son capaces de degradar la celulosa y la hemicelulosa para emplearlos como fuentes de carbono y energía. Sin embargo, un grupo mucho más pequeño de los hongos filamentosos ha evolucionado con la habilidad de descomponer la lignina, el componente más recalcitrante de las paredes celulares de las plantas. Estos son conocidos como los “hongos de podredumbre blanca”, y juegan un papel importante en el ciclo biogeoquímico del carbono, además son capaces de degradar una variedad de contaminantes ambientales, tales como compuestos aromáticos clorados, hidrocarburos aromáticos heterocíclicos, colorantes y diversos polímeros sintéticos de alto peso molecular (Sánchez 2009).

Los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca secretan una o más de tres enzimas extracelulares que son esenciales para la degradación de la lignina: lignino peroxidasa (CE 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (CE 1.11.1.13), y lacasa (EC 1.10.3.2). La aplicación potencial de las enzimas ligninolíticas en la biotecnología ha estimulado la investigación de la fermentación de hongos de podredumbre blanca con el fin de seleccionar los productores de enzimas prometedoras (Songulashvili et al., 2007).

Para la fermentación y crecimiento industrial de estos basidiomicetos se requieren varias condiciones de crecimiento apropiado (como el pH, la temperatura, la humedad, la concentración de fuentes de nitrógeno, la aireación, entre otras), así como la aclimatación de la biomasa a las condiciones del reactor y procesos de incubación; por esta razón para disminuir el tiempo de adaptación, una buena alternativa es utilizar microorganismos nativos de lugares ricos en el material a degradar ya que están bien adaptados a este medio (Yuet *al.*, 2006) (Reddy *et al.*, 2003).

Pleurotus sp. , comprenden el grupo de los hongos comestibles, con importantes propiedades medicinales y aplicaciones biotecnológicas y ambientales. Estos organismos son altamente adaptable para crecer y fructificar en una amplia

variedad de residuos lignocelulósicos agro-industriales, son productores de celulasas, xilanasas, lacasa y manganeso peroxidasas. Por lo cual estos microorganismos son tomados como modelos de la acción ligninolítica sobre residuos vegetales (Elisashvili *et al.* 2006) sin dejar de lado hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Stropharia coronilla*, y *Trametes versicolor* que también presentan una buena actividad ligninolítica (Swamy y Ramsay 1999).

Degradación biológica de residuos ligninolíticos

La degradación de lignina es un proceso de oxidación complejo, indirecto y al azar. Los hongos producen sustancias oxidantes que rompen los enlaces entre las diferentes subunidades y causan la despolimerización gradual de la molécula dando como resultado sustancias fenólicas, ácidos aromáticos y alcoholes aromáticos. Finalmente algunos residuos pueden terminar mineralizándose a CO₂ y agua y otros forman compuestos húmicos (Castillo 2005).

Los hongos de podredumbre blanca se caracterizan por su capacidad de producir enzimas oxidantes extracelulares (Vecchio *et al.*, 2012). Los complejos de enzimas ligninolíticas de estos hongos difieren significativamente en su composición ya que secretan una o más de tres enzimas extracelulares que son esenciales para la degradación de la lignina (Songulashvili *et al.*, 2007).

Los sistemas enzimáticos ligninolíticos trabajan con enzimas extracelulares sobre la heterogeneidad de la lignina. Este polímero no tiene enlaces hidrolizables sino que las enzimas implicadas en la degradación son oxidativas y los ataques degradadores no son específicos ya que es una molécula irregular (Pérez *et al.*, 2002).

Las enzimas implicadas son la lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14), una glicoproteína que oxida el anillo aromático del alcohol veratrílico y algunas estructuras no fenólicas eliminando un electrón y generando radicales catiónicos; esta enzima necesita H₂O₂ como oxidante (cofactor). La manganeso peroxidasa (EC

1.11.1.13) (glicoproteína) , oxida de Mn^{+2} a Mn^{+3} que a su vez oxida compuestos fenólicos a radicales fenoxi , también es dependiente de H_2O_2 como oxidante (cofactor) y de Mn para depolimerizar la lignina de alto peso molecular y la clorolignina. Conjuntamente las lacasas oxidasas (EC 1.10.3.2) contiene cobre en su centro catalítico que oxida fenoles con oxígeno molecular como aceptor de electrones hasta radicales fenoxi y otras reacciones con compuestos no fenólicos dependientes de mediadores (Díaz *et al.*, 2011) (Castillo 2005).

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la actividad enzimática de ligninasas obtenidas a partir aislamientos fúngicos de cultivos de arroz

Objetivos Específicos:

- Seleccionar mediante pruebas cualitativas los aislamientos fúngicos con capacidad ligninolíticas.
- Evaluar la actividad manganeso peroxidasa y lacasa de los extractos obtenidos a partir del aislamiento seleccionado.
- Evaluar la estabilidad frente a pH y temperatura de los extractos enzimáticos ligninolíticos obtenidos en fermentación sumergida.

METODOLOGIA

Microrganismos.

Se evaluaron 20 microrganismos aislados de cultivos de arroz en estudios anteriores (Reyes y Aguirre 2009) que presentaron actividad ligninolítica o celulolítica o ambas mediante métodos cualitativos. Estos se encuentran conservados a 4°C en el banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana.

Objetivo 1. Selección mediante pruebas cualitativas los aislamientos fúngicos con capacidad ligninolítica.

Reactivación de los aislamientos.

Se reactivaron los aislamientos del banco en agar salvado de trigo en g/L: glucosa, 10; peptona, 5; extracto de levadura, 2; $MnSO_4$, 0,075; KH_2PO_4 , 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5; salvado de trigo, 175; agar, 15 y se incubaron durante 8 días a 28°C (Pedroza *et al.* 2007).

Evaluación cualitativa de actividad ligninolítica.

La evaluación cualitativa de la actividad enzimática de los aislamientos recuperados se hizo en agar lignina (En g/L: K_2HPO_4 , 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2; NH_4NO_3 , 0,1; KCl, 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0,05; extracto de malta, 2; agar, 15; cloranfenicol, 0,06; penicilina G, 0,03; lignina alcalina, 1; KOH,

0,2; guayacol, 0,4ml/L; dioxano 104ml/L) y se incubó durante 8 días a 28°C. La actividad ligninolítica positiva se observó por una coloración rojiza del medio por la oxidación del guayacol (Greg *et al.*1996).

Objetivo 2. Evaluación de la actividad manganeso peroxidasa y lacasa de los extractos obtenidos a partir del aislamiento seleccionado.

Fermentación líquida.

El hongo seleccionado se inoculó en un matraz de 100mL, con 20 mL de caldo salvado de trigo (Pedroza *et al.*2007) suplementado con tween 80, 0,5ml/Ly sulfato de manganeso 0,34 g/L. Para el inóculo se tomaron 4 discos de agar (diámetro: 8mm) con micelio crecido del agar salvado y se inocularon por 20 días a 28°C y 150 rpm. Se evaluaron los días 0, 2, 4, 6, 8 ,12, 15, 18 y 20. Se realizaron fermentaciones por triplicado para cada tiempo evaluado. Se separó la biomasa centrifugando dos veces a 2500 g x 15 min y se filtró a través de una membrana de 0,45 µm para la posterior medición de actividad enzimática (Reyes y Aguirre 2009).

Evaluación de la influencia del sulfato de cobre sobre la expresión enzimática

Teniendo en cuenta que se ha reportado que el cobre es un inductor de la lacasa (Baldrian y Gabriel 2002) se realizaron experimentos en presencia y en ausencia de sulfato de cobre 7,5mM (Quevedo *et al.*, 2012) al caldo salvado de trigo con el fin de comparar su influencia sobre la actividad enzimática. Los ensayos se realizaron por triplicado y se evaluaron los siguientes tiempos: 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18 y 20 días.

Evaluación de la actividad proteolítica.

La estabilidad se puede ver afectada por la presencia de enzimas proteolíticas en la fermentación, por esta razón se evaluó la actividad proteolítica en agar leche de los extractos obtenidos en cada día de fermentación. Para lo anterior se inocularon 5 μL de cada extracto en el centro de la caja, se dejaron en incubación a 30°C por 24 horas (Pedroza et al.2007).

Actividad de lacasa.

Se midió monitoreando el cambio en la absorbancia a 436 nm ($\xi_{436} = 29300 \text{ L/ mol' cm}$) debido a la oxidación de ABTS [ácido 2,2' azino-bis-(3 etilbenzotiazoline sulfato)] en buffer acetato de sodio 60 mM (pH 4,5). El ensayo se realizó mezclando 100 μL de buffer, 100 μL de ABTS y 800 μL de muestra a 20°C. La formación de un radical verde se siguió espectrofotométricamente durante 3 minutos. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que permite la oxidación de 1 μmol de ABTS por minuto (Tinoco *et al.*, 2001).

Actividad Manganese peroxidasa (MnP)

Se monitoreó por la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP) a 468 nm ($\xi_{468}=49600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla consta de 450 μL de extracto enzimático, 500 μL de DMP 10 mM en solución tampón de acetato de sodio 100 mM, pH 5, 50 μL de sulfato de manganeso 0,4 mM y 30 μL de peróxido de hidrógeno 22 mM. La oxidación se siguió espectrofotométricamente durante 3 minutos. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que permite la oxidación de 1 μmol de 2,6-dimetoxifenol por minuto (Santoyo et al., 2008). Debido a que la lacasa y la manganese peroxidasa pueden oxidar el DMP, la actividad lacasa se midió y se sustrajo, realizando la misma mezcla pero en ausencia de peróxido de hidrógeno y de manganeso (Técnica modificada por Quevedo, 2011).

- En todas las mediciones de actividad enzimática se evaluó la muestra sin sustrato (reemplazando por solución tampón) tomándolo como blanco en la

medición espectrofotométrica para verificar interferencias provenientes de la muestra.

Objetivo 3. Evaluar la estabilidad frente a pH y temperatura de los extractos enzimáticos ligninolíticos obtenidos en fermentación sumergida.

Evaluación de la estabilidad frente al pH.

La estabilidad frente al pH se determinó manteniendo el extracto enzimático en diferentes soluciones tampón en un intervalo de pH 3-11 durante 24 horas a 25°C. Después de este periodo, todas las muestras se llevaron al pH correspondiente a la medición de reacción de cada enzima con NaOH 0,5 N o con HCl 0,5 N (Quevedo 1999). Las soluciones usadas fueron tampón citrato 100 mM para el rango de pH 3-6, solución tampón fosfato 100 mM el de pH 7-8 y solución fosfato NaOH para el de pH 9-11. Posteriormente se evaluó la actividad residual utilizando las técnicas descritas anteriormente.

Evaluación de la estabilidad térmica de las enzimas.

El efecto de la estabilidad térmica de las enzimas se estableció incubando los extractos a pH 5 a diferentes temperaturas (7, 15, 25, 30, 40, 50°C) por 60 minutos. Luego del periodo de incubación se pasaron a un baño de hielo por 5 minutos (Quevedo 1999). Posteriormente se evaluó la actividad residual utilizando las técnicas descritas anteriormente.

RESULTADOS/ DISCUSIÓN

Selección del aislamiento con mejor actividad ligninolítica en agar lignina

De los 20 aislamientos evaluados provenientes de cultivos de arroz, 5 presentaron actividad ligninolítica evidenciada por la aparición del halo de oxidación del guayacol en el agar lignina correspondiente a los códigos MF 1-83, MF 3-90, MF3-86, MF 8-80 y MF 3-88 (Figura 1). Mediante la respectiva medición de los halos, se seleccionó el morfotipo MF 1-83 con un promedio de halos de 57,2mm identificado como un *Pleurotus ostreatus* (Figura 2), la identificación se hizo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por secuenciación de la región ITS del gen 18s (Resultados sin publicar).

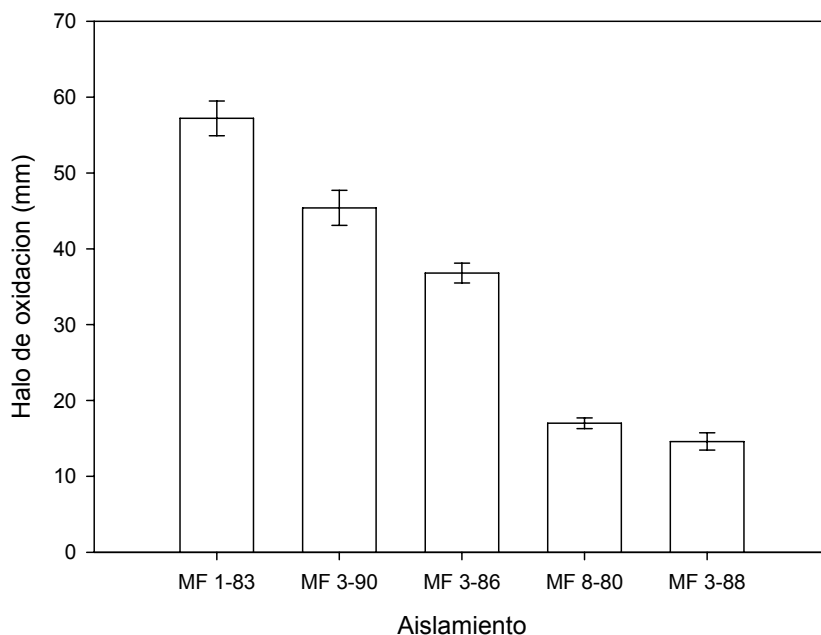


Figura 1. Halos de oxidación en mm de guayacol en agar lignina de los hongos correspondientes a los códigos MF 1-83, MF 3-90, MF3-86, MF 8-80 y MF 3-88. (Ver ANEXO 1).



Figura 2. Fotografía del hongo seleccionado MF 1-83 identificado como *Pleurotus ostreatus*. A la izquierda su crecimiento en agar salvado de trigo. A la derecha el halo de oxidación del guayacol.

El género *Pleurotus* hace parte de los basidiomicetes pertenecientes a los hongos de podredumbre blanca capaces de degradar compuestos vegetales ricos en lignina por un sistema enzimático del cual se reporta la producción de las enzimas manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac), en cuanto a la lignino peroxidasa (LiP) se ha encontrado que la secreción de esta enzima es muy baja para este género ya que si es producida se da en cantidades de difícil detección (Hong *et al.*, 2012) (Santoyo F *et al.*, 2008). Por esta razón solo fueron cuantificadas las enzimas Lac y MnP a los extractos obtenidos de la fermentación líquida.

Fermentación líquida y evaluación del efecto de la adición de sulfato de cobre.

La influencia de la adición de sulfato de cobre 7,5mM en el caldo de cultivo sobre la producción de enzimas ligninolíticas se muestra en la Figura 3. Solo se evaluó la adición de esta concentración de sulfato de cobre, debido a que en la investigación de Quevedo 2011 se estableció como valor óptimo para la producción de lacasa a partir de *P.ostreatus*. En la cuantificación de lacasa (EC 1.10.3.2) y manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) se observó de acuerdo al

análisis por ANOVA que los factores tiempo y concentración de sulfato de cobre tienen una influencia significativa sobre la respuesta de actividad enzimática con un $p < 0,05$ (ver ANEXO 2).

Efecto del sulfato de cobre sobre la producción de lacasa

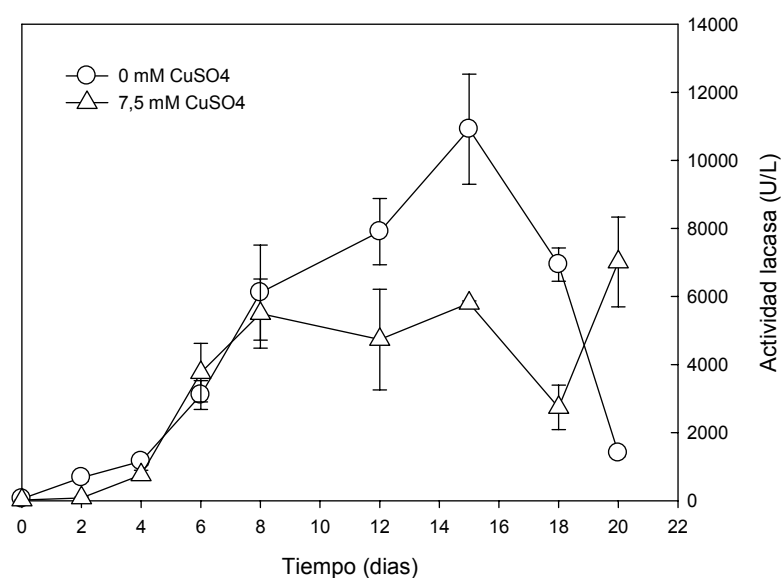


Figura 3. Efecto de la adición de sulfato de cobre 7,5 mM sobre la actividad enzimática lacasa de *Pleurotus ostreatus* MF 1-83 a través del tiempo.

El efecto sobre la actividad enzimática de lacasa causado por la adición de CuSO₄ 7,5 mM se puede observar en la Figura 3, donde se evidencia que la mayor actividad cuantificada correspondió a 10.913,9 U/L en el día 15 de fermentación sin sulfato de cobre (Tabla 1). El día 15 coincidió con el óptimo reportado por Hong Y *et al.*, 2012 para la obtención de lacasa de un aislamiento de *Pleurotus ostreatus* cuantificada por oxidación de ABTS, sin embargo la productividad obtenida en el presente trabajo es aproximadamente 160 veces mayor (723,53 U/L/día) que la obtenida en dicho reporte (4,46 U/L/día). El cultivo de basidiomicetes para la producción de lacasa generalmente se lleva a cabo en

tiempos prolongados (Télez-Télez *et al.*, 2008) lo que lleva a obtener bajas productividades por ejemplo de 0,576 U/L/día (Valášková y Baldrian 2006), o 2,88 U/L/día (Shahet *et al.*, 2006) por la técnica de ABTS contrario a lo logrado con *Pleurotus ostreatus* MF 1-83 donde la productividad fue evidentemente superior. Sin embargo mediante la optimización de medios naturales se ha logrado alcanzar producciones de hasta 4.694,4 U/L/día (Quevedo 2011).

En la presencia de sulfato de cobre 7,5mM la máxima actividad lacasa se presentó en el día 20 con 7.012,5 U/L (Tabla 1). La adición de cobre al medio no significó el aumento de la actividad lacasa en comparación con el medio basal, contrario a lo que se esperaba, puesto que se ha reportado que la adición de cobre en fermentación líquida resulta en una mejora sustancial de hasta 50 veces en la producción de lacasa (Shraddha *et al.*, 2011) teniendo en cuenta que su centro activo consta de 4 átomos de cobre para llevar a cabo la oxidación de compuestos aromáticos (Palmieriet *et al.*, 2000). Además se ha determinado que la acción inductora del Cu⁺² se da por la regulación de la síntesis de las diferentes isoenzimas lacasas a nivel traduccional o post traduccional (Tinoco *et al.*, 2011) (Fonseca *et al.*, 2010).

Tabla 1. Actividad enzimática del extracto obtenido en la fermentación líquida de *Pleurotus ostreatus*.

Tiempo (días)	Enzima			
	Lacasa (U/L)		Manganeso peroxidasa (U/L)	
	0 MnSO ₄	7,5 MnSO ₄	0 MnSO ₄	7,5 MnSO ₄
0	57,7 ± 1,5	20,2 ± 3,5	5,8 ± 1,2	14,73 ± 3,6
2	682,1 ± 115,02	83,9 ± 24,7	15,5 ± 1,2	14,1 ± 3,04
4	1161,3 ± 104,8	760,3 ± 135,1	18,3 ± 6,2	11,5 ± 2,6
6	3107,6 ± 424,1	3762,7 ± 862,2	390,8 ± 53,7	83,7 ± 31,5
8	6115,8 ± 1797,03	5498,6 ± 1015,5	782,4 ± 224,9	216,7 ± 14,1
12	7906,7 ± 975,7	4736,4 ± 1478,3	202,2 ± 74,2	164,1 ± 1606
15	10913,9 ± 1616,32	5802,04 ± 69,2	355,8 ± 145,5	298,1 ± 82,3
18	6939,7 ± 488,3	2741,7 ± 654	611,3 ± 139,3	671,14 ± 87,21
20	1403,1 ± 108,12	7012,5 ± 1319,4	468,14 ± 78,5	456,8 ± 202,4

Unidades/L ± Desviación estándar

La influencia negativa del sulfato de cobre 7,5mM sobre la producción de lacasa en el presente estudio podría deberse a la concentración empleada, ya que en las investigaciones en donde se presentó la acción inductora por adición de cobre en fermentación líquida manejan concentraciones menores como 0,5mM (Tinoco *et al.*, 2011), 0,15 mM (Palmieri 2003), y en otros evaluaron concentraciones en 0,5 a 5 mM obteniendo una mejor respuesta con la concentración final de 1mM y una disminución en la actividad en las concentraciones mayores (Baldrian y Gabriel 2002) lo cual puede indicar que es pertinente evaluar menores concentraciones de sulfato de cobre ya que la concentración adicionada puede ser la causante de que no se produjera un aumento en las unidades lacasa.

Por otro lado, el salvado de trigo contiene 16µg/g de cobre en su composición nutricional (Vargas y Murillo 1978), por lo tanto el medio Salvado de trigo utilizado aporta 0,044mM de cobre para la producción de las enzimas lacasa que pudo causar un efecto inductor sobre la producción de lacasa en el medio no suplementado.

Adicionalmente la diversidad de tipos de lacasas (isoenzimas) expresadas por el género *Pleurotus* codificadas en distintos genes (Karp *et al.*, 2012) puede ser otra causa para la discrepancia de resultados con los estudios mencionados ya que se ha visto que tiene características particulares con respecto a estabilidad, pH y temperatura óptimos o afinidad por sustratos (Madhavi y Lele 2009) y pueden ser estimuladas o restringidas por los mismos inductores, como por ejemplo el cobre que puede aumentar la producción de algunos tipos de lacasas y disminuir la de otras, además tener efecto sobre su estabilidad (Fonseca *et al.*, 2010).

De acuerdo con las investigaciones de Díaz *et al.*, 2011, quienes compararon la actividad enzimática de 5 aislamientos de *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido, afirmaron que el comportamiento de cada aislamiento fue totalmente distinto en las mismas condiciones. No todos los aislamientos respondieron de la misma manera a la adición de Cu^{+2} en el medio de cultivo, además de notar que en

algunos casos la presencia de cobre podía inhibir el crecimiento o ser tóxica para el organismo lo que resultó en una baja producción de lacasa.

Efecto del sulfato de cobre sobre la producción de manganeso peroxidasa

La MnP fue influenciada negativamente por la adición de sulfato de cobre 7,5mM como se observa en la Figura 4.

El sulfato de cobre no es un inductor común para la manganeso peroxidasa, sin embargo, se ha encontrado que el sulfato de manganeso es un factor mas influyente para producir una reacción positiva en dicha producción (Giardina *et al.*, 2000) por lo cual el medio salvado de trigo en su composición contiene adicción de este tipo de inductor. Una evidente diferencia entre los tratamientos se presentó en el momento de más alta producción correspondiente al día 8 con 782,4 U/L sin la adición de sulfato de cobre (Tabla 1) obteniendo una productividad de 97,8 U/L/día.

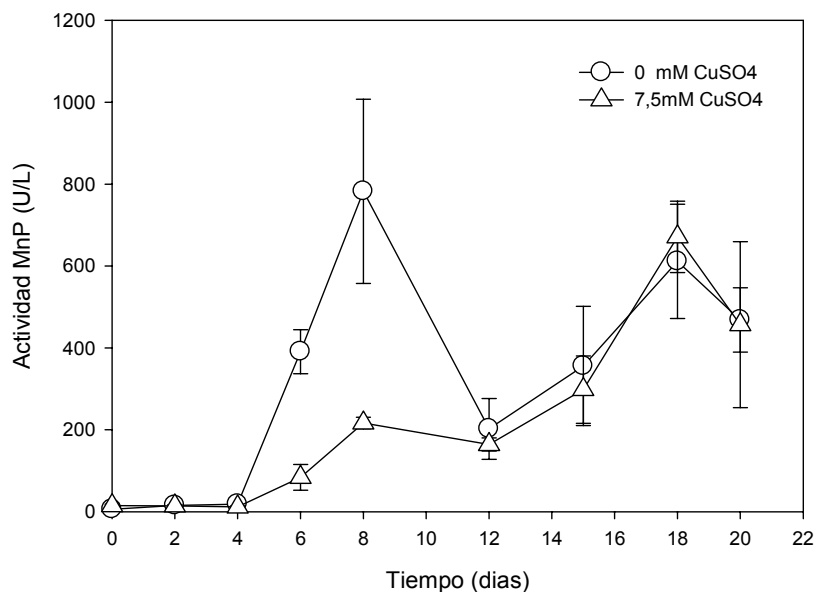


Figura 4. Efecto de la adición de sulfato de cobre sobre la actividad enzimática manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus*MF 1-83 a través del tiempo.

En investigaciones de Kamitsujiet *al.* 2004 se midió la producción de MnP a partir de *P. ostreatus* en cultivo sumergido. Los niveles más altos fueron observados luego de 8 días del cultivo en medio peptona-glucosa-extracto de levadura. Además en Quevedo et al., 2012 se determinó que la aireación fue un factor determinante que mejoró la producción de MnP.

Se observó un efecto de la adicción de sulfato de cobre 7,5mM sobre el desarrollo morfológico de los hongos en los matraces en donde en los ensayos con adicción de sulfato de cobre la formación de agregados miceliales llamados *pellets* fue mínima en comparación con los que no tenían adicción de sulfato de cobre donde la formación de *pellets* fue abundante. Es posible que la concentración de sulfato de cobre este inhibiendo o afectando el ciclo de vida del microorganismo como se reporta en Guillén y Machuca 2008 en donde el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en medios con concentraciones de 3, 6 y 10 mMde cobre se afectó notoriamente y consecuentemente se obtuvieron menores actividades enzimáticas.

Según el análisis estadístico el día 8 permite obtener la mayor productividad de las dos enzimas, 764,5 U/L/día para lacasa y 97,8 U/L/día para manganeso peroxidasa, si se deseara elegir un solo día para la producción simultánea del extracto. Sin embargo esto conllevaría a una menor actividad enzimática para lacasa.

Evaluación de la estabilidad a pH y termoestabilidad de la actividad enzimática

Teniendo en cuenta que los extractos enzimáticos se usarán para la degradación de residuos agroindustriales, es importante estudiar la estabilidad de las enzimas. Por tal razón se presentan los resultados obtenidos en dichas pruebas representados como actividad residual medida después de cada tratamiento (ver ANEXO 3).

Pruebas de estabilidad para lacasa

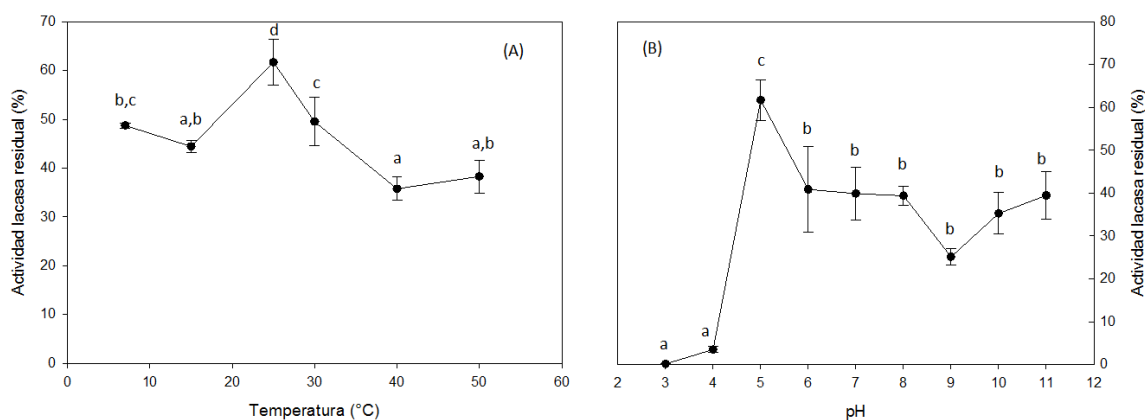


Figura 5. Efecto de la temperatura (A) y pH(B) sobre la estabilidad de la actividad enzimática de la lacasa de *Pleurotus ostreatus* MF 1-83 representada en porcentaje de actividad residual. Las letras minúsculas representan la clasificación homogénea según Scheffé (ver ANEXO 4).

La enzima lacasa fue estable a pH 5 manteniendo el 61,7% de la actividad enzimática después de 24 horas con respecto al control; mientras que a pH 3 se redujo la actividad hasta 0,2% durante el mismo tiempo. De acuerdo al test de Scheffé en los valores de pH entre 6 y 11 no existen diferencias estadísticas de la pérdida de actividad de hasta un 75% durante 24 horas.

Se observó que la enzima es muy sensible a pH ácidos inferiores a 4 con un comportamiento similar al reportado en Liu *et al.*, 2009 para la lacasa purificada producida por *Pleurotus ostreatus* que en los pH 1 y 2 solo conservó el 10 % de su actividad por 1 hora. Por otro lado se han descrito enzimas que presentan mayor estabilidad en rangos de pH alcalinos como la dos isoenzimas lacasa de *Pleurotus eryngii* que mantuvieron del 60 al 70% de su actividad después de 24 horas en pH de 8 a 12 (Muñoz *et al.*, 1996).

En la Figura 5, se puede observar que el 62% de actividad de lacasa se mantuvo a 25 °C durante 1 hora, mientras que 40 °C fue la temperatura que más afectó la estabilidad con una pérdida del 64,3% de actividad. Aunque se ha reportado la producción de lacasa de *P.ostreatus* que mantiene su actividad inalterada a 40°C

por mas de 4 horas (Shraddhaet *al.*, 2011) también se describe que lacasas de *Pleurotus eryngii* fueron mas estable a 25°C por 24 horas, con la reducción del 50% de su actividad a 55°C durante 1 hora. La misma enzima reportada por Liu *et al.*, 2009 durante 1 hora a 30 y 40 °C mantuvo entre 90 y 100% de su actividad residual y se redujo rápidamente a menos de el 10 % en temperaturas mayores a 60°C.

Es evidente que no hay un consenso en la bibliografía sobre los pH y las temperaturas a las cuales las lacasas sean mas estables, ya que a pesar de provenir de microorganismos del mismo género presentan comportamientos totalmente distintos y particulares en cada estudio. Es muy probable que esta variedad de comportamientos se deba a que muchos microorganismos productores de lacasas secretan isoformas distintas de la misma enzima y se ha encontrado que provienen del mismo o diferente gen que las codifica. El número de isoenzimas depende del microorganismo y se diferencian marcadamente por su estabilidad, condiciones óptimas de reacción y afinidad por diferentes sustratos. Es decir que una misma fermentación pueden encontrarse varios tipos de isoenzimas producidas por el mismo hongo (Sarkaret *al.*, 1997).

Pruebas de estabilidad para manganeso peroxidasa

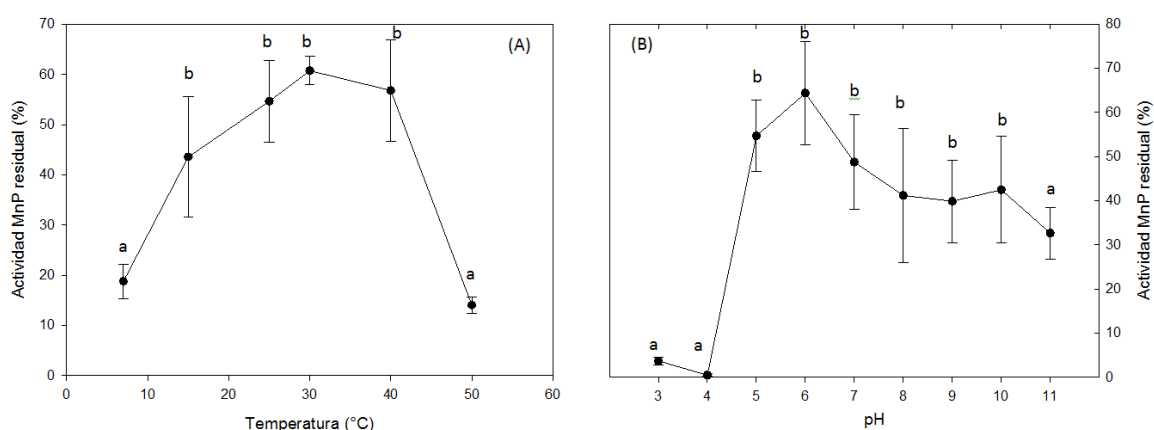


Figura 6. Efecto de la temperatura (A) y pH(B) sobre la estabilidad de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* representada en porcentaje de actividad residual. Las letras minúsculas representan la clasificación homogénea según Scheffé (ver ANEXO 4).

La enzima MnP fue estable a pH 6 manteniendo el 64,3% de la actividad enzimática después de 24 horas con respecto al control sin embargo según el test de Scheffe no existe diferencias entre la estabilidad de la enzima desde pH 5 hasta 11 mientras que a pH 3 y 4 se redujo la actividad disminuyendo hasta un 0,17% con respecto al control durante el mismo tiempo.

La mayor termoestabilidad para MnP se dio a 30°C por 1 hora con 60,7% de actividad residual sin presentar diferencias con 15, 25, 40°C, comportamiento que se observa en la Figura 6. La temperatura que mas afectó la estabilidad fue 50°C durante 1 hora con una pérdida del 86 % de la actividad.

Al igual que los estudios sobre lacasa, entre los estudios de caracterización de la enzima MnP se encuentran enzimas producidas por hongos de podredumbre blanca como *Phanerochaete chrysosporium* la cual presentó su máxima estabilidad en un rango de pH entre 4 y 6 a 25°C por una hora y su termoestabilidad no se vio afectada a 40°C por hora (Ürek y Kasikara 2004 ; en contraste una MnP de un hongo de podredumbre blanca llamado *Schizophyllum* sp. fue completamente estable en un rango de pH entre 4 y 7 por 1 hora pero fuera de este rango su estabilidad se veía gravemente afectada y frente a temperaturas su mayor estabilidad se dio a 35°C pero lograron determinar que a 4°C la enzima fue estable por mas de 1 mes (Chenget al.,2007) lo cual es importante para determinar si la refrigeración es un buen método de almacenamiento.

Reportes indican que la MnP es más susceptible a la denaturación por temperatura que otras enzimas ligninolíticas (Sutherland y Aust 1996) y al igual que la lacasa para *Pleurotus ostreatus* se han reportado hasta tres diferentes isoenzimas de MnP (Becker et al., 1993), lo que también explicaría los distintos comportamientos.

Evaluación de la presencia de proteasas

Durante la producción de enzimas ligninolíticas con diferentes fines se ha reportado la pérdida de actividad por la simultánea producción de proteasas durante la fermentación (Cabaleiro DR *et al.*, 2002), por lo cual los extractos obtenidos en cada hora de muestreo fueron sembrados en agar leche por triplicados para evaluar la posible presencia de las proteasas. Sin embargo, no se evidenció ningún tipo de actividad proteolítica mediante halo de hidrólisis para ninguna de las horas de fermentación.

Se ha visto que la producción de proteasas se ve estimulada por la baja disponibilidad de oxígeno, por fuentes limitadas de carbono y además varía dependiendo del sustrato y el microorganismo (Bai Y. *et al.*, 2008). Para *Pleurotus ostreatus* se ha descrito que la producción de proteasas no es significativa sobre sustratos como paja de arroz (Cisneros, F *et al.*, 1996) en esta ocasión con salvado de trigo la acción cualitativa de proteasas no se evidenció por lo tanto se descartó la adición de algún tipo de inhibidor de proteasas al extracto.

CONCLUSIONES

La obtención de enzimas ligninolíticas manganeso peroxidasa y lacasa fue efectiva mediante la fermentación líquida del aislamiento de *Pleurotus ostreatus* MF 1-83 proveniente de cultivos de arroz. La enzima lacasa arrojó, productividades mayores con respecto a las reportadas en otros estudios para hongos del mismo género en medios sintéticos.

La mayor concentración de ambas enzimas se obtuvo en el medio salvado de trigo sin el suplemento de sulfato de cobre 7,5 mM, por lo tanto la adición de cobre al medio en la concentración evaluada no favoreció el proceso de producción de las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa.

Las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa provenientes del cultivo de *P. ostreatus* MF 1-83 pierden su actividad en pH 3 y 4. La mayor estabilidad se obtuvo a valores de pH 5 y 6 respectivamente manteniendo aproximadamente un 60% de la actividad con respecto al control.

Las temperaturas que permitieron mantener la mayor estabilidad de la lacasa y manganeso peroxidasa fueron 25 y 30°C respectivamente, y a temperaturas como 7°C y 50°C se presentó la mayor pérdida de actividad.

RECOMENDACIONES

En vista de que los resultados obtenidos sobre el efecto de la adición de sulfato de cobre al medio de cultivo, presentaron incongruencias con la bibliografía sería importante evaluar la influencia de la concentración de cobre adicionada para determinar si fue un factor que alteró la inducción por adicción de cobre sobre las enzimas.

Como siguiente paso hacia el logro de los objetivos del proyecto general, se debe evaluar la capacidad productora de lacasa y manganeso peroxidasa en fermentación sólida y cual es su capacidad degradativa sobre sustratos sólidos ricos en lignina para determinar su aplicabilidad y comparar con la producción en fermentación líquida.

Teniendo la temperatura y el pH a los cuales la actividad enzimática se mantiene, se deben estudiar tiempos más prolongados debido a que sería fundamental para los posteriores procesos de degradación.

Se deben buscar estrategias para mejorar la conservación de la estabilidad de las enzimas además de estudiar las condiciones de almacenamiento para lograr la menor pérdida de actividad.

Es recomendable emplear métodos para concentrar las enzimas en el extracto por ejemplo con ultrafiltración, ya que permitiría separar algunas enzimas de diferente peso molecular y obtener un extracto más puro, teniendo en cuenta que posteriormente va a ser mezclado con el extractos celulolíticos lo cual van a diluir las enzimas.

BIBLIOGRAFÍA

- Asgher M, Naseema A, Haq Nawaz B. Decolorization of practical textile industry effluents by white rot fungus *Coriolus versicolor* BL-04. *Biochemical Engineering Journal* 2009; **47** (1–3): 373-384 p.
- BAI Y, Xiaoping Q, WEN X. Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* in air. *Journal of Environmental Sciences* 2008; **20**, 94–100 p.
- Baldrian P, Gabriel J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 2002; **206**: 69-74 p.
- Becker, H.G., Sinitsyn, A.P. Mn-peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: the action on the lignin. *Biotechnology Letters* 1993; **15**(3): 289-294 p.
- Cabaleiro DR, Rodríguez S, Sanromán A, Longo MA. Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media. *Process Biochemistry* 2002; **37**(9):1017-1023 p.
- Castillo FC, Roldan MD, Blasco R, Huertas M, Caballero F, Moreno C, Martinez M. *Biotecnología ambiental*. Primera edición. Editorial Tebar S.L Madrid, España. 2005, 406-408 p.
- Castro Y. Transferencias a la agricultura en los Estados Unidos y en Colombia: consecuencias para el TLC. Asesoría para el Acuerdo Comercial entre Estados Unidos y Colombia. Bogotá D.C., 2004.
- Cheng X, Jia R, Li P, Tu S, Zhu Q, Tang W, Li X. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 2007; **41** (3), 258-264 p.
- Cisneros F, Garcia IC, Padron X. Study of spent substrate of *Pleurotus ostreatus* as source of proteases. *Alimentaria* 1996; **273**: 69-71 p.
- Díaz R, Alonso S, Sanchez C, Araceli T, Bibbins-Martinez M, Díaz-Godinez G. Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *BioResources* 2011; **6**(1), 282-290 p.
- Elisashvili, M; Penninckx M; Kachlishvili, E; Asatiani, M; Kvesitadze G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; **38** (7), 998–1004p.
- Eriksson K, Berek H. Applied Microbiology: Industrial *Lignin, Lignocellulose, Ligninase*. Encyclopedia of Microbiology, Tercera edición. 2009, 373–384 p.

Feng C, Zeng G, Huang D, Hu S, Zhao M, Lai C, Huang C, Wei Z, Li N. Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting. *Process Biochemistry* 2011; **46**: 1515–1520 p.

Fonseca MI, Shimizu E, Zapata PD, Villalba LL. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme and Microbial Technology* 2010; **46**: 534–539 p.

Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Riviaccio V, Sannia G. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; **376**(1): 171-179 p.

Greg R, Adinarayana C, Harris D, Paul A. Isolation of Saprophytic Basidiomycetes from Soil. *Applied and environmental microbiology* 1996; **62** (11): 4288–4292 p.

Guillén Y, Machuca A. The Effect of Copper on the Growth of Wood-Rotting Fungi and a Blue-Stain Fungus. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2008; **24**: 31-37 p.

Hong Y. Enzyme Production and Lignin Degradation by Four Basidiomycetous Fungi in Submerged Fermentation of Peat Containing Medium. *International Journal of Biology* 2012; **4**. (1) .172-180 p.

Huang DL, Zeng GM, Feng CL, Hu S, Zhao MH, Lai C. Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 2010; **101**, 4062–4067 p.

Kamitsuji H, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004; **65**(3): 287-294 p.

Karp S, Faraco V, Amore A, Birolo L, Giangrande C, Thomaz V, Pandey A, Soccol C. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 2012; **114**: 735-739 p.

Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2009; **4**: 3713–3729 p.

Liu L, Lin Z, Zheng T, Lin L, Zheng C, Lin Z, Wang S, Wang Z. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology* 2009; **44** (6–7): 426–433 p.

López MJ, Vargas-García MC, Suárez-Estrella F, Moreno J. Biodelignification and humification of horticultural plant residues by fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2006; **57**, 24–30 p.

Madhavi V, Lele S. Laccase: properties and applications. *BioResources* 2009; **4**(4): 1694-1717 p.

Marco E, Pérez M, Vicent T, Caminal G. Ability of white rot fungus to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 2009; **74** (6): 765-772 p.

Martínez HJ, Espinal C, Acevedo X. La cadena del arroz. Una mirada global a su estructura y dinámica 1991-2005. Observatorio Agrociencias Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2005, 38p. http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112141728_caracterizacion_arroz.pdf. Consultado el 12 de Noviembre del 2012.

Melo PS. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. **Trabajo de Grado de Maestría**. Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidad de São Paulo, Piracicaba, 2010, 98 p.

Mohamed AR, Mohammadib M, Darzi GN. Preparation of carbon molecular sieve from lignocellulosic biomass: A review. *Renewable and sustainable energy reviews* 2010; **14**, 1591-1599 p.

Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; **63**(6): 2166–2174 p.

Ortiz M, Uribe D. Determinación de la actividad lignocelulolítica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabana de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical. *Ciencia del suelo* 2010; **28** (2).

Palmieri G, Cennamo G, Farraco V, Amoresano A, Sannia G, Giardina P. A typical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; **33**: 220-230 p.

Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontallella B, and Sannina G. Copper induction of laccase isoenzyme in the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000; **66**: 920-924 p.

Pandey A, Larroche C, Ricke SC, Dussap CG, Gnansounou E. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes. Capítulo 7. Primera edición. Elsevier. España Madrid. 2011, 147-176 p**

Pedroza AM, Matiz A, Quevedo BE, Aguirre AC. Manual de Introducción a la Biotecnología. Primera Edición. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá DC, Colombia 2007. 112 p.

Pérez J, Muñoz T, De-la-Rubia J, Martínez. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Journal of Microbiology* 2002; **5** , 53–63 p.

Quevedo B, Narváez P, Pedroza A, Velásquez M. Degradation of *Chrysanthemum (Dendranthemagrandidiflora)* wastes by *Pleurotus ostreatus* for the Production of Reducing Sugars. *Biotechnology and BioprocessEngineering*2012; **17**: 1103-1112 p.

Quevedo B. Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. **Tesis de doctorado**. Universidad Nacional de Colombia. Ingeniería Química. Bogotá D.C. 2011.

Quevedo B. Purificación y determinación de algunas características de la enzima fosfolipasa en el veneno de *Bothropsatrox* proveniente de Chiriguaná, Cesar. **Trabajo de maestría**. Universidad Nacional de Colombia. Ingeniería Química. Bogotá D.C. 1999.

Rahman M, Lourenço M, Hassim H, Baars J, Sonnenberg A, Cone JW, De Boever J, Fievez V. Improving ruminal degradability of oil palm fronds using white rot fungus. *Animal FeedScience and Technology* 2011; **169** (3–4): 157-166 p.

Reddy G, Babu,P, Komaraiah P, Roy K, Kothari I. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *ProcessBiochemistry* 2003; **38**: 1457–1462 p.

Reyes Pineda E; Aguirre Morales M. Aislamiento de microorganismos celulolíticos y ligninolíticos a partir de muestras de suelo cultivado con arroz en los departamentos de Tolima y Meta. **Tesis pregrado**. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias Carrera de Microbiología Industrial Bogotá D.C. 2009.

Rodríguez OV, Hanssen H. Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostocmesenteroides* NRRL B512-F. *Revista EIA* 2007; **7**, 159-172 p.

Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 2009;**27** (2): 185-194 p.

Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 2009;**27** (2): 185-194 p.

Santoyo F, Gonzalez A, Terron M, Ramirez L, Pisabarro A. Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology* 2008; **43**(2): 137-143.

Sarkar S, Martinez A, Martinez MJ. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et BiophysicaActa* 1997; **1339** : 23–30 p.

Shah V, Baldrian P, Eichlerova I, Dave R, Madamwar D, Nerud F, Gross R. Influence of dimethyl sulfoxide on extracellular enzyme production by *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* 2006; **28**(9): 651-655 p.

Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, and Kumar A. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*.2011; 217861, 11 p.

Songulashvili G, Elisashvili V, Wasser SP, Nevo E, Hadar Y. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 2007;**41** (1–2): 57–61p.

Sutherland GRJ, Aust SD. The Effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 1996;**332**:128–134 p.
Swamy, J. Ramsay, J. The evaluation of white rot fungi for the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 1999; **24**, 130 – 137p

Tellez tellez M, Fernandez JF, Montiel-Gonzales AM , Sanchez C, Diaz Godinez G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid state fermentation , PPL . *Microbiology, Biotechnology*. 2008 ; **81** : 675-679 p.

Tinoco R, Pickard M, Vasquez-Duhalt R. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* 2001; **32**, 331-335 p.

Tinoco, R., Acevedo, A., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2011;**38**(4): 531-40 p.

Ürek RO, Kasikara N. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 2004; **39**: 2061–2068 p.

Valásková, V., & Baldrian, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology* 2006: **157**(2): 119-24 p.

Vargas E. y Murillo M. Composición química de subproductos de trigo y arroz y de granos de maíz y sorgo utilizados en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 1978; **2**: 9-15 p.

Xiao P, Mori T, Kamei I, Kiyota H, Takagi K, Kondo R. Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia* . *Chemosphere* 2011; **85** (2): 218-224 p.

Yu GC, Wen XH, Li R, Qian Y. In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of *Phanerochaetechrysosporium*. *Process Biochemistry* 2006; **41**: 1987–93p.

ANEXOS

Anexo 1. Medición de los halos de hidrólisis del guayacol en agar lignina

Código	mm de halo de oxidación					Promedio	DS	CV
MF 1-83	55	57	60	55	59	57,2	2,28035085	3,98662736
MF 3-90	47	43	43	48	46	45,4	2,30217289	5,07086539
MF 3-86	37	38	36	38	35	36,8	1,30384048	3,54304479
MF 8-80	16	17	18	17	17	17	0,70710678	4,15945165
MF 3-88	15	13	14	15	16	14,6	1,14017543	7,80942072

Anexo 2. Resultado del análisis ANOVA.

ANOVA for Selected Factorial Model					
Analysis of variance table [Partial sum of squares]					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	5.285E+008		173.109E+007	46.16	< 0.0001
significant					
	<i>A</i> 3.985E+008		<i>84.982E+007</i>	<i>73.97</i>	<i>< 0.0001</i>
	<i>B</i> 1.031E+007		<i>11.031E+007</i>	<i>15.31</i>	<i>0.0004</i>
	<i>AB</i> 1.196E+008		<i>81.495E+007</i>	<i>22.20</i>	<i>< 0.0001</i>
Pure Error	2.425E+007		366.735E+005		
Cor Total	5.527E+008	53			
<p>The Model F-value of 46.16 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.</p> <p>Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, AB are significant model terms.</p> <p>Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.</p>					
Std. Dev.	820.68		R-Squared	0.9561	
Mean	3817.23		Adj R-Squared	0.9354	
C.V.	21.50		Pred R-Squared	0.9013	
PRESS	5.455E+007		Adeq Precision	22.991	

Anexo3. Estabilidad enzimática frente a pH y temperatura de lacasa y manganeso peroxidasa

Tabla de resultados de estabilidad frente a diferentes de pH

PH	Actividad enzimática residual (%)	
	Lacasa	MnP
3	0,17 ± 0,05	3,66 ± 0,92
4	3,52 ± 0,66	0,44 ± 0,27
5	61,70 ± 4,69	54,63 ± 8,12
6	40,86 ± 9,98	64,37 ± 11,65
7	39,88 ± 6,14	48,72 ± 10,67
8	39,39 ± 2,2	41,16 ± 15,20
9	25,13 ± 1,81	39,85 ± 9,36
10	35,26 ± 4,81	42,44 ± 12,06
11	39,45 ± 5,5	32,63 ± 5,85

% ± Desviación estándar

Tabla de resultados de estabilidad frente diferentes temperatura

T°	Actividad enzimática residual (%)	
	Lacasa	MnP
7	48,7 ± 0,5	18,7 ± 3,4
15	44,5 ± 1,2	43,5 ± 12
25	61,7 ± 4,7	54,6 ± 8,1
30	49,5 ± 4,9	60,7 ± 2,8
40	35,7 ± 2,3	56,7 ± 10
50	38,2 ± 3,3	14,0 ± 1,6

% ± Desviación estándar

Anexo 4. Distribución de los datos de estabilidad según el test de Scheffé.

Test de Scheffé estabilidad frente diferentes pH

Lacasa

Scheffé^a

TTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
3	3	.1732		
4	3	3.5209		
9	3		25.1371	
10	3		35.2670	
8	3		39.3939	
11	3		39.4517	
7	3		39.8846	
6	3		40.8658	
5	3			61.7027
Sig.		.999	.127	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

MnPerox

Scheffé^a

TTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	3	.4411	
3	3	3.6627	
11	3	32.6335	32.6335
9	3		39.8515
8	3		41.1688
10	3		42.4401
7	3		48.7238
5	3		54.6319
6	3		64.3722
Sig.		.085	.093

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Test de Scheffé estabilidad frente diferentes temperaturas

Lacasa

Scheffé^a

TTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
40	3	35.7633			
50	3	38.2990	38.2990		
15	3	44.4532	44.4532	44.4532	
7	3		48.7586	48.7586	
30	3			49.5246	
25	3				61.7027
Sig.		.139	.055	.629	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

MnP

Scheffé^a

TTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
50	3	14.0426	
7	3	18.7588	
15	3		43.5572
25	3		54.6319
40	3		56.7931
30	3		60.7486
Sig.		.986	.238

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.