

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MANIZALES

TESIS DE GRADO
MAESTRÍA EN INGENIERÍA-INGENIERÍA QUÍMICA

*ACTIVIDAD ENZIMÁTICA, DEGRADACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS
ORGÁNICOS Y GENERACIÓN DE BIOMASA ÚTIL DEL MACROMICETO
GRIFOLA FRONDOSA*

Sandra Montoya Barreto

Directores:

Ing. Químico Carlos Eduardo Orrego Alzate
Candidato a Doctor
Director Universidad Nacional Sede Manizales

Dra. Laura Levin
Directora externa Universidad de Buenos Aires

Manizales, mayo de 2008

A mi hijo Agustín y a mi esposo Francisco por su infinita paciencia y amor.

Agradecimientos

Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales

Universidad de Caldas

SENA Regional Caldas

Universidad de Buenos Aires-Argentina

A la Dra. Laura Levin Docente de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Buenos Aires – Argentina, Directora externa de la Tesis, por sus grandes aportes de conocimiento y experiencia profesionales para el desarrollo de este trabajo.

A Dra. Gloria Inés Giraldo, quien siempre me brindó su apoyo y colaboración en la fase experimental de la tesis.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio general del comportamiento del macromiceto *Grifola frondosa* en varios medios de cultivo y en sus diferentes fases de desarrollo. Se determinaron las actividades enzimáticas de las enzimas celulolíticas: endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa; ligninolíticas: lacasa, lignin peroxidasa (LiP) y manganeso-peroxidasa (MnP) y xilanolíticas: endoxilanasas del hongo en estado micelial sobre agar papa dextrosa (PDA) en cinco generaciones, encontrándose que las enzimas más activas bajo estas condiciones de cultivo son la endoglucanasa y la exoglucanasa, mientras que la de menor actividad fue la β -glucosidasa. Se calculó la capacidad de degradación del hongo *G. frondosa* sobre dos formulaciones de sustratos sólidos orgánicos basadas en aserrín de roble y borra de café como materiales básicos. Se compararon las actividades enzimáticas del hongo en las dos formulaciones de sustratos, para cinco tiempos de fermentación (20, 30, 45, 60 y 75 días) durante la fase de incubación, obteniéndose siempre una mayor actividad para los sustratos formulados con aserrín de roble. Se evaluó también, la variación de las sustancias almidón, celulosa y hemicelulosa, lignina, azúcares reductores y fibra bruta, así como, la cantidad de glucosamina formada en el tiempo total de fermentación para cada una de las formulaciones; el tiempo de fermentación para la fórmula suplementada con borra de café fue de 75 días y 107 días para los sustratos formulados con aserrín de roble. Se realizó una correlación entre la cantidad de azúcares reductores presentes en el medio y la formación de glucosamina para 107 días de fermentación en los sustratos con aserrín de roble. Los sustratos con borra de café no fructificaron por alguna sustancia tóxica presente que puede causar inhibición en el desarrollo del hongo y evitar su formación de carpóforo. Por último se cuantificó y se calificó la producción de carpóforos obtenidos en los sustratos de aserrín de roble.

Palabras claves: *Grifola frondosa*, actividad enzimática, fermentación en estado sólido, carpóforo

ABSTRACT

In this paper we conducted a comprehensive study of the behaviour of macromiceto *Grifola frondosa* in several growth media and in their different stages of development. It identified the enzyme activities of enzymes cellulolitic: endoglucanasa, exoglucanasa and β -glucosidase; ligninolytic: laccase, lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) and xilanolíticas: endoxilanasa fungus in the state mycelial on potato dextrose agar (PDA) in five generations, we found that the enzyme more active under these growing conditions are endoglucanasa and exoglucanasa, while the lowest activity was the β -glucosidase. We calculated the capacity of degradation fungus *G. frondosa* on two formulations of organic substrates based on solid such coffee spent-ground and oak-sawdust as basic materials. We compared the enzyme activities of the fungus in the two formulations of substrates for five days of fermentation (20, 30, 45, 60 and 75 days) during the incubation phase, obtaining always greater activity for substrates made with oak sawdust. It also evaluated the variation of substances starch, cellulose and hemicellulose, lignin, reducing sugars and crude fiber, as well as the amount of glucosamine formed in the total time of fermentation for each of the formulations, the fermentation time for formula supplemented with coffee spent-ground was 75 days and 107 days for substrates made with oak sawdust. We conducted a correlation between the amount of reducing sugars present in the environment and the formation of glucosamine for 107 days of fermentation substrates with oak sawdust. The substrates with coffee spent-ground not bear fruit for some toxic substance that can cause inhibition in the development of the fungus and prevent its formation carpóforo. Lastly was quantified and qualified production carpóforos obtained substrates oak sawdust.

Keywords: *Grifola frondosa*, enzyme activity, fermentation in solid state, carpóforo

CONTENIDO

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. ESTADO DEL ARTE.....	16
3.1. HONGO <i>GRIFOLA FRONDOSA</i>	16
3.2. MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS.....	20
3.2.1. CELULOSA.....	21
3.2.2. HEMICELULOSA.....	22
3.2.3. LIGNINA.....	23
3.3. ENZIMAS EXTRACELULARES (MECANISMO ENZIMÁTICO).....	26
3.3.1. ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	27
3.3.2. ENZIMAS XILANOLÍTICAS.....	31
3.3.3. ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	36
4.2. EQUIPOS.....	36
4.3. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	36
4.4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CRUDOS.....	38
4.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	39
4.5.1. HIDROLASAS QUE LIBERAN AZÚCARES.....	39
4.5.2. ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	40
4.6. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE QUITINA, ALMIDÓN, AZÚCARES REDUCTORES, BIOMASA ÚTIL Y COMPONENTES DE FIBRA (CELULOSA-HEMICELULOSA Y LIGNINA).....	41
4.7. MANEJO ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN.....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
5.1. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA Y LIGNINOLÍTICA DEL MACROMICETO DE <i>G. FRONDOSA</i>	44
5.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DEL MACROMICETO <i>G. FRONDOSA</i> SOBRE DOS RESIDUOS SÓLIDOS SELECCIONADOS.....	47

5.2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE <i>G. FRONDOSA</i> EN DOS FORMULACIONES DE SUSTRATOS	48
5.2.2. CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE <i>G. FRONDOSA</i>	62
5.3. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA ÚTIL EN FUNCIÓN DE LA APARICIÓN DE CUERPOS FRUCTÍFEROS Y EL CONSUMO DE SUSTRATO	66
5.3.1. MODELO MATEMÁTICO PARA LA FORMACIÓN DE GLUCOSAMINA	68
5.3.2. PRODUCCIÓN DE CARPÓFOROS DE <i>G. FRONDOSA</i>	74
6. CONCLUSIONES	756
7. RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la quitina	13
Figura 2. Etapas de cultivo del hongo <i>G. frondosa</i> (maitake) en Colombia	15
Figura 3. Estructura de la celulosa mostrando enlaces β -1,4-glicosídicos	17
Figura 4. Sección de celulosa estabilizada por puentes de hidrógeno	17
Figura 5. Segmento de estructura plana de hemicelulosa	18
Figura 6. Monómeros precursores de la molécula de lignina	19
Figura 7. Estructura de lignina	20
Figura 8. Representación del modo de acción de las celulasas, glucosa	25
Figura 9. Estructura de xilano o de monocotiledóneas y enzimas involucradas en su degradación	28
Figura 10. Esquema de acción del sistema ligninolítico	30
Figura 11. Sección de sustrato de aserrín de roble con 75 días de incubación	48
Figura 12. Hongo <i>G. frondosa</i> inoculado en agar PDA y azure B	52
Figura 13. Fotografías de carpóforos de <i>G. frondosa</i> de calidad 1	66

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Fluctuación de la actividad enzimática endoglucanasa en cinco generaciones de <i>G. frondosa</i> sobre agar PDA (90% de colonización)	37
Gráfica 2. Fluctuación de la actividad enzimática exoglucanasa en cinco generaciones de <i>G. frondosa</i> sobre agar PDA (90% de colonización)	38
Gráfica 3. Fluctuación de la actividad enzimática β -glucosidasa en cinco generaciones de <i>G. frondosa</i> sobre agar PDA (90% de colonización)	38
Gráfica 4. Fluctuación de la actividad enzimática lacasa en cinco generaciones de <i>G. frondosa</i> sobre agar PDA (90% de colonización)	38
Gráfica 5. Fluctuación de la actividad enzimática de la Manganese-peroxidasa en cinco generaciones de <i>G. frondosa</i> sobre agar PDA (90% de colonización)	39
Gráfica 6. Progreso de la actividad enzimática del hongo <i>G. frondosa</i> en el tiempo total de fermentación para los sustratos de formulación de aserrín de roble.	41
Gráfica 7. Progreso de la actividad enzimática del hongo <i>G. frondosa</i> en el tiempo total de fermentación para los sustratos de formulación de aserrín de roble y borra de café.	41
Gráfica 8. Variación de la actividad de la enzima endoglucanasa en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato	43
Gráfica 9. Variación de la actividad de la enzima exoglucanasa en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato	44
Gráfica 10. Variación de la actividad de la enzima β -glucosidasa en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato	46
Gráfica 11. Variación de la actividad de la enzima Endoxilanasas en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato	47
Gráfica 12. Variación de la actividad de la enzima Lacasa en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato	50
Gráfica 13. Variación de la actividad de la enzima Manganese peroxidasa (MnP) en cuatro tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato	51
Gráfica 14. Variación de la actividad de la enzima Lignin-peroxidasa (LiP) en cinco	

tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato	53
Gráfica 15. Variación de la masa seca en el progreso de la fermentación en estado sólido del hongo <i>G. frondosa</i> sobre las dos formulaciones de sustrato propuestas	54
Gráfica 16. Variación en la cantidad de almidón y sacarosa sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble	55
Gráfica 17. Variación en la cantidad de azúcares reductores sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble	55
Gráfica 18. Variación en la cantidad de Celulosa y hemicelulosa sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble	56
Gráfica 19. Variación en la cantidad de lignina sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble	57
Gráfica 20. Variación en la fibra bruta sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble	57
Gráfica 21. Producción de glucosamina sobre los sustratos sólidos seleccionados en el tiempo de fermentación correspondiente a la fase de incubación de <i>G. frondosa</i> .	59
Gráfica 22. Tendencia de los datos experimentales obtenidos de la relación de azúcares reductores como sustrato (▪) y glucosamina como producto (•) en el tiempo total de fermentación de <i>G. frondosa</i> sobre sustrato de aserrín de roble y la línea a trazos indica la cantidad de glucosamina presente en el carpóforo del hongo.	61
Gráfica 23. Ajuste de datos experimentales al Modelo I (modelo logístico), donde (•) representan los datos de sustrato experimentales (consumo de azúcares reductores) en el tiempo, y (▪) representa los datos experimentales de producción de glucosamina en el tiempo de fermentación	63
Gráfica 24. Ajuste de datos experimentales al Modelo II (modelo de dos fases), donde (•) representan los datos de sustrato experimentales (consumo de azúcares reductores) en el tiempo, y (▪) representa los datos experimentales de producción de glucosamina en el tiempo de fermentación	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de desarrollo para el cultivo de <i>G. frondosa</i> en bloques de sustrato sintético en Manizales (Colombia) (Montoya <i>et al.</i> , 2007)	32
Tabla 2. Variación de la actividad enzimática promedio del micelio de <i>G. frondosa</i> sobre agar PDA (90% de colonización)	39
Tabla 3. Actividad máxima y mínima de la endoglucanasa UE($\mu\text{mol}/\text{min. g sustrato seco}$) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)	43
Tabla 4. Actividad máxima y mínima de la Exoglucanasa UE($\mu\text{mol}/\text{g sustrato seco. min}$) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)	45
Tabla 5. Actividad máxima y mínima de la β -glucosidasa UE($\mu\text{mol}/\text{g sustrato seco. min}$) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)	46
Tabla 6. Actividad máxima y mínima de la Endoxilanasas UE($\mu\text{mol}/\text{g sustrato seco. min}$) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)	47
Tabla 7. Actividad máxima y mínima de la Lacasa UE($\mu\text{mol}/\text{g sustrato seco. min}$) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)	50
Tabla 8. Actividad máxima y mínima de la manganeso peroxidasa UE($\mu\text{mol}/\text{g sustrato seco. min}$) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)	51
Tabla 9. Actividad máxima y mínima de la Lignin-peroxidasa UE ($\mu\text{mol}/\text{g sustrato seco. min}$) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)	53
Tabla 10. Formas diferenciadas e integradas de las ecuaciones empíricas que son aplicadas en sistemas de fermentación en estado sólido	60
Tabla 11. Parámetros de ajuste de los modelos I (logístico) y II (de dos fases) con los datos experimentales del trabajo	64
Tabla 12. Parámetros estadísticos para realizar la selección del modelo que más ajusta para correlacionar los datos experimentales del proceso de fermentación en estado sólido	65

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Composiciones de sustrato en el tiempo de fermentación

Anexo B: Composición de Glucosamina y Glucosa en el tiempo de fermentación

Anexo C: Análisis bromatológicos de los sustratos de aserrín de roble y aserrín de roble y borra de café crudos

Anexo D: Eficiencia Biológica de *G. frondosa*

1. INTRODUCCIÓN

Los tejidos lignocelulósicos de las plantas terrestres superiores constituyen el mayor depósito de energía fotosintética y materia orgánica renovable, y siendo la celulosa y la lignina los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, su descomposición a CO₂, H₂O y sustancias húmicas, constituye probablemente el evento biodegradativo más importante en el ciclo biosférico del carbono (Kirt, 1983). La producción de grandes cantidades de materiales lignocelulósicos en la naturaleza es explotada en industrias de diversos tipos tales como las del papel, la madera y la agricultura, entre otras. Los residuos lignocelulósicos de dichas industrias (residuos urbanos sólidos, aguas de desecho de las industrias del papel y la madera, residuos agrícolas como el bagazo de la caña de azúcar, rastrojos de cereales, estiércol, turba y otros) podrían transformarse en productos utilizables tales como proteína fúngica y forraje para el ganado, combustibles líquidos, ácidos orgánicos, glucosa, alcoholes, etc. Una de las formas posibles es por bioconversión (Levin, 1998).

Los vegetales y sus residuos son una importante fuente para el crecimiento de los hongos. Son muy abundantes en la naturaleza, sobre todo los polímeros de este origen que no pueden ser degradados por la mayoría de los organismos presentes en el ambiente. Los principales son los constituyentes de las paredes celulares, que en conjunto se denominan lignocelulósicos, compuestos por pectinas, celulosa, hemicelulosa y lignina y el almidón que es la sustancia de reserva en los vegetales. En las maderas las paredes celulares están altamente lignificadas y el contenido de pectinas es bastante bajo o nulo (Papinutti, 2003).

Los hongos no son plantas ni animales, aunque se parezcan en algunas de sus características tanto a las unas como a los otros. A las plantas, por ser organismos sedentarios que se encuentran fijos a un sustrato y, mientras están vivos, no cesan de crecer (Ruíz, 2001). Tienen en común con algunos animales el que las paredes celulares fúngicas son ricas en quitina, la misma sustancia que hace duro el esqueleto externo de los insectos. Constituyen un grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares heterótrofos que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes (Pelczar *et al.*, 1996). 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 (Miles & Chang, 2001). Junto con las bacterias, los hongos son los causantes de la

putrefacción y descomposición de toda la materia orgánica. Los integrantes del grupo son generalmente filamentosos, aunque hay unicelulares. El tipo unicelular es típico de las levaduras. Pero algunos hongos, especialmente algunos patógenos de animales, pueden existir tanto como filamentosos o como unicelulares (Moore, 1998).

Los hongos tanto por su capacidad hidrolítica como por su distribución, son los organismos lignocelulolíticos por excelencia. Entre ellos existen algunos con mayor capacidad degradativa de lignina: los que producen la llamada “pudrición blanca” que podrían utilizarse en el proceso de bioconversión. Esta categoría definida por el tipo de pudrición que causan en la madera contiene cientos de especies de Basidiomycetes. Todos son capaces de degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa de la madera, pero la velocidad y extensión de la degradación de cada componente de la pared celular varía considerablemente (Carlile *et al.*, 2001; Joselau & Ruel, 1994).

El basidiomiceto *Grifola frondosa* es un hongo de pudrición blanca capaz de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina. Se desarrolla bien en presencia de sustratos que contienen maderas duras no aromáticas, en su forma silvestre se encuentra en Norteamérica, Asia y Europa. Su producción a partir de sustratos sintéticos bajo condiciones controladas es reciente, se reporta el primer cultivo comercial en Japón en 1981 (Takama *et al.*, 1981; Mayuzumi & Mizuno, 1997). Los carpóforos son de color gris oscuro, uniformes y con píleos bien formados (Montoya *et al.*, 2007).

El propósito de este estudio fue determinar las actividades enzimáticas de las enzimas celulolíticas: endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa; enzimas ligninolíticas: lacasa, lignin peroxidasa (LiP) y manganeso-peroxidasa (MnP) y las enzimas xilanolíticas: endoxilanasas al hongo *G. frondosa* sobre dos formulaciones de sustratos sólidos a partir de aserrín de roble y aserrín de roble suplementado con borra de café. Así mismo, establecer la capacidad de degradación del hongo, proponiendo un modelo matemático para determinar la producción de glucosamina en el tiempo de fermentación correlacionado con el consumo de azúcares reductores en el medio de cultivo. Finalmente, se midieron los rendimientos de sustrato en términos de la producción de carpóforos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar la actividad enzimática y la generación de biomasa útil por el macromiceto *G. frondosa* (Hongo Basidiomiceto) en dos formulaciones con residuos sólidos.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Cuantificar la actividad enzimática celulolítica y ligninolítica del macromiceto *G. frondosa*
- 2.2.2. Evaluar la capacidad de degradación del macromiceto *G. frondosa* sobre dos residuos sólidos seleccionados.
- 2.2.3. Cuantificar la producción de biomasa útil en función de la aparición de cuerpos fructíferos y el consumo de sustrato.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. Hongo *Grifola frondosa*

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, Estos filamentos vegetativos de los hongos reciben el nombre de hifas. Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. Generalmente todo el cuerpo de un hongo está basado en filamentos uniseriados, ramificados (Miles & Chang, 2001). En la mayoría de los casos, ese cuerpo se diferencia en una parte vegetativa que absorbe nutrientes, y una parte reproductiva. Principalmente en hongos superiores (Ascomycota y Basidiomycota) la parte recolectada del hongo no es más que el órgano de reproducción del hongo, llamado carpóforo (Gow, 1995). El verdadero cuerpo del hongo, o cuerpo vegetativo, está escondido, formado por una red de filamentos microscópicos inmersa en el substrato, llamada micelio. La mayoría de los hongos se reproducen por esporas, diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular (Carlile *et al.*, 2001).

Los hongos pueden ser organismos simbioses, parásitos o saprófitos. Los saprófitos obtienen sus nutrientes de materiales muertos; y son los responsables principales del reciclaje de los componentes de las plantas muertas. Esta actividad realizada por los hongos es esencial para la continuación de la vida en el planeta. El ciclo del carbono involucra la fijación de dióxido de carbono atmosférico dentro de moléculas orgánicas por fotosíntesis; los hongos juegan un papel importante en la degradación de estas moléculas reponiendo nuevamente el dióxido de carbono a la atmósfera. Además de madera aprovechable, una explotación forestal produce anualmente dos toneladas por hectárea de residuos forestales húmedos, los cuales pueden ser degradados exclusivamente por hongos especializados (Carlile *et al.*, 2001). Cabe mencionar además, la importancia que tiene la degradación de estos residuos forestales en el ciclo de otros elementos como el nitrógeno, fósforo y potasio, los cuales deben ser incorporados como componentes insolubles de las células vegetales (Moore, 1998).

Su pared celular quitina un polímero de la N-acetil-D-glucosamina; esta sustancia puede ser vista como un derivado de la celulosa, en la cual los grupos hidroxilos del segundo carbono

de cada unidad de glucosa son reemplazados con grupos acetamido ($\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$), en la figura 1 se muestra la estructura química de la quitina (Carlile *et al.*, 2001).

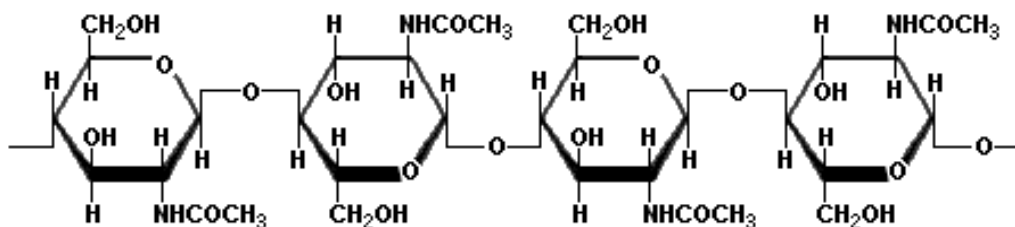


Figura 1. Estructura química de la quitina

El desarrollo fúngico se concentra en el ápice de la hifa, con numerosas vesículas liberando enzimas líticas y biosintéticas de la membrana plasmática a una alta velocidad. Se han desarrollado amplios estudios sobre la biosíntesis de la quitina y de otros componentes de la pared celular; pero aun resta por estudiar en profundidad las rutas metabólicas de biosíntesis y enzimas que involucran la conversión de glucosa-6-fosfato en el precursor de quitina (Carlile *et al.*, 2001 y Campbell & Farrell, 2004). La determinación de la biomasa fúngica, especialmente de hongos filamentosos sobre medios sólidos, no es posible por métodos directos individuales, debido a que su desarrollo es indeterminado y a la dificultad para establecer las fronteras de la colonia. Ésta puede ser estimada indirectamente por la medida de sustancias características de las colonias fúngicas, tal como la quitina o el ergosterol; por ejemplo por hidrólisis de quitina y producción de N-acetilglucosamina, la cual se estima colorimétricamente. Por lo tanto la determinación de quitina es un buen método para comparar la biomasa de hongos en muestras heterogéneas, como una valoración del desarrollo del hongo dentro del material orgánico natural sobre el cual está inoculado (Carlile *et al.*, 2001).

Grifola frondosa (Dicks:Fr.) S.F., *Boletus frondosus* Dicks., Plant Crypt. Brit., fasc. 1:18, 1785. –*Poliporus frondosus* Dicks.:Fr., Syst. Mycol. 1:355, 1821 (Corner, 1989). *G. frondosa* es un basidiomicete causante de pudrición blanca perteneciente a la familia Polyporaceae, orden Aphyllophorales (Lee *et al.*, 2003). Su carpóforo es comestible y se conoce con el nombre de Maitake en Japón, tiene en promedio 86% de humedad, 14% de materia seca, de la cual el 59% aproximadamente son carbohidratos totales, 21% de proteína cruda, 10 % de fibra cruda, 3% de grasa cruda y 7% de cenizas (Mau *et al.*, 2001). Además, el cuerpo fructífero contiene vitaminas y minerales (Stamets, 2000), dentro de los que se incluyen por cada 100 g de hongo seco: vitamina B1 (1,5 mg), vitamina B2 (1,6 mg), niacina (54 mg), vitamina C (63 mg), vitamina D (410 IU), magnesio (67 mg), hierro (0,5 mg), calcio (11 mg) y fósforo (425 mg) (Lee *et al.*, 2003 y Chang & Miles, 2004).

Los cuerpos fructíferos de *G. frondosa* se desarrollan en estado natural sobre maderas duras no aromáticas y esporádicamente en maderas semiduras como los pinos y castaños (Chen, 2001; Zhou & Wasser, 2004). En cultivos comerciales del hongo *G. frondosa* se requiere controlar diferentes parámetros ambientales como: Temperatura, humedad de sustrato, humedad relativa y oxígeno, entre otros. Es un hongo comercialmente cultivado en Japón y Norteamérica. Actualmente apenas está comenzando a ser investigado, ya que su cultivo se inició hace sólo dos décadas. Ha llamado la atención científica por sus compuestos activos, los cuales están siendo aislados y caracterizados *in-vivo* e *in-vitro* (Boh & Berovic, 2007). Se han desarrollado métodos de cultivo sobre sustratos artificiales a base de aserrín de madera o viruta de madera de residuos de aserríos (preferiblemente de maderas duras no aromáticas), suplementados con cascarillas, salvados o tortas de cereales, entre los que se destacan el maíz, trigo y arroz.

Las condiciones generales de cultivo para *G. frondosa* son:

- **Fase vegetativa:** La primera etapa luego de la inoculación del hongo, donde el micelio blanco empieza a invadir el sustrato, a condiciones fijas de temperatura, humedad relativa, concentración de CO₂ y en penumbra (50 lux o menos) luego de la invasión, el micelio blanco empieza a engrosar y a formar un abrigo micelial desigual que se pigmenta a café naranja. Esta etapa tiene un tiempo de duración de 75 días en Colombia (Montoya *et al.*, 2007).
- **Formación de primordios:** Ocurre el cambio de fase vegetativa, para lo cual se requiere realizar un cambio en las condiciones ambientales del hongo, que consiste en: Choque térmico de 10°C por 24 horas, choque de luz de aproximadamente 50-150 luxes al sustrato una vez presentes las características mencionadas en fase vegetativa, aumento en la humedad relativa (hasta 80%) y aumento en la concentración de O₂, con el fin de inducir la formación de los cuerpos fructíferos. Esta etapa tiene un tiempo aproximado de 7-10 días. Durante la fase de formación del hongo ocurren variaciones de forma y tamaño del carpóforo, pasando por unas subetapas donde el carpóforo se aprecia de diferentes formas y colores, pasando de una forma similar a un cerebro de color negro-grisáceo, a una de coliflor de color gris oscuro hasta obtener la forma propiamente dicha del hongo, similar a un coral grisáceo-pardo. Cuando el hongo está joven es de color gris pardo oscuro haciéndose más claro con el tiempo hasta tornarse gris – habano claro.
- **Producción:** Esta fase es la reproductiva propiamente dicha, se requiere un manejo adecuado de las condiciones ambientales como humedad relativa, concentración de CO₂, relevos de aire y cantidad de luz. Se reportan dos cosechas en un tiempo aproximado de 25 a 32 días.

En la figura 2 se muestran fotografías del cultivo de *G. frondosa* en Manizales (Colombia), desde la producción de semilla hasta el cuerpo fructífero recolectado.

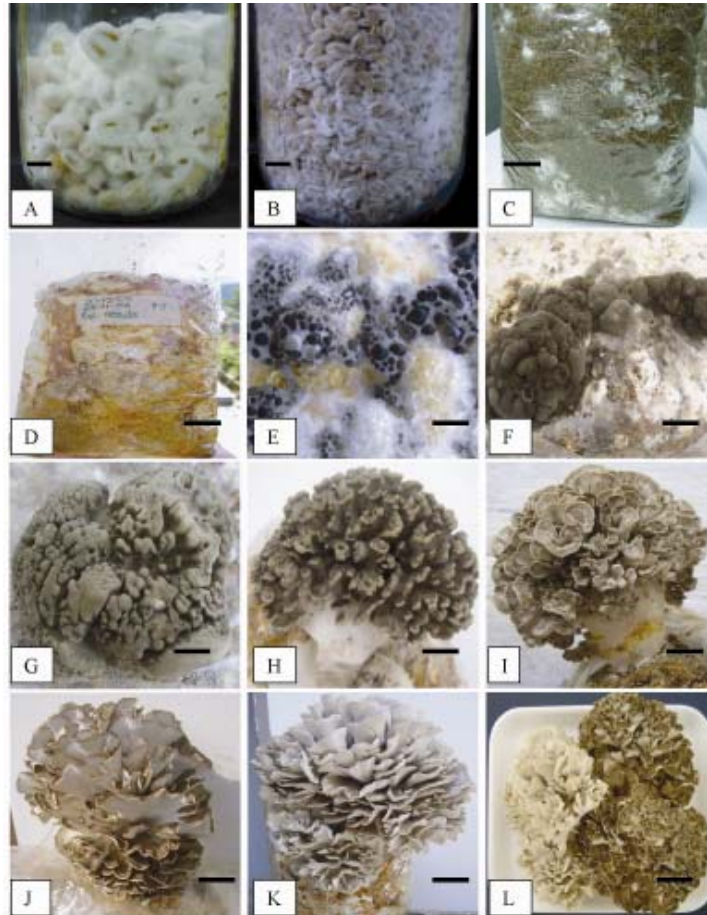


Figura 2. Etapas de cultivo del hongo *G. frondosa* (maitake) en Colombia: Semilla de maitake sobre maíz (A) y cebada (B); desarrollo de micelio en sustrato de roble y salvado de maíz: diferenciando micelio blanco(C), exudado naranja-café (D), exudado gris oscuro (E), topografía desigual en la formación del primordio (F), estado de cerebro (G), estado de post-cerebro (H), estado coliflor (I), estado de coliflor en racimo (J), hongo maduro (K), hongos recolectados: izquierda hongo viejo y derecha hongo joven (L) (Montoya *et al.*, 2007).

Según Shen (2001) y Zhou & Wasser (2004) se pueden aislar y purificar más de 20 polisacáridos antitumorales de *G. frondosa*. Polisacáridos típicamente activos con estructura básica de 1-6- β -ramificada 1-3- β -D-glucano y heteroglicano o complejo heteroglicano/proteína, como mayores componentes. Varios glucanos aislados de *G.*

frondosa han sido patentados en Japón como sustancias antitumorales, anticancerígenas, y como agentes inmunoestimuladores. Estos incluyen GF-1, Grifolan-N y Grifolan NMF-5N.

Los glucanos producidos por *G. frondosa* además de ser anticancerígenos e inmunomoduladores, ejercen otros efectos medicinales: actúan sobre la hiperplasia prostática benigna, sobre el desarrollo de la artritis y sobre el metabolismo lipídico, son antibacterianos, antivirales, antidiabéticos, antihipertensivos, antioxidantes, y se usan también con fines cosméticos (Boh & Berovic, 2007).

Los hongos de pudrición blanca son un extenso grupo de Basidiomycetes que se caracterizan por su capacidad para degradar eficientemente todos los componentes de la pared celular incluyendo la lignina. De las 1600-1700 especies de hongos que deterioran la madera en América del Norte, 94% aproximadamente, son causantes de pudrición blanca (Gilbertson, 1980). Estos hongos remueven la lignina de la madera siguiendo diferentes patrones morfológicos (Hartig, 1878; Meier, 1955; Liese, 1970 y Blanchette, 1991). Pueden causar una degradación simultánea de la lignina junto con los polisacáridos de la pared celular, dejando células perforadas o con paredes secundarias extremadamente delgadas; o una degradación selectiva de lignina. Aunque algunos hongos causantes de pudrición blanca parecen atacar la madera siempre selectiva o no selectivamente, existen numerosos ejemplos donde un mismo hongo produce ambos tipos de ataque en el mismo sustrato. Este fenómeno fue descrito por primera vez por Hartig (1878) y es frecuente en maderas atacadas por *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma tsugae*, *Heterobasidion annosum* y muchos otros hongos de pudrición blanca (Adaskaveg *et al.*, 1990). Inclusive algunos hongos degradan selectivamente lignina durante estadios incipientes de la pudrición, pero en estadios posteriores del ataque remueven la celulosa residual (Eriksson *et al.*, 1990).

3.2. Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos son muy abundantes en el planeta. Los vegetales y sus residuos, las agroindustrias y los subproductos que generan constituyen un excelente sustrato para el crecimiento fúngico. Los hongos cumplen un rol importante, ya que este tipo de materiales está compuesto principalmente de polímeros que no pueden ser degradados por la mayoría de los otros organismos presentes en los diferentes ecosistemas. Los principales constituyentes de los vegetales son el almidón (utilizado como reserva energética) y los que componen sus paredes celulares, constituidas por pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina. En las maderas las paredes celulares están altamente lignificadas y el contenido de pectina es muy bajo o nulo (Papinutti, 2003). La borra de café es un subproducto de la industria productora de café soluble y se considera de igual manera un

material lignocelulósico de preferencia, debido a que en su composición predominan esta clase de polímeros, además de taninos y fenoles.

3.2.1. Celulosa

La celulosa, que es el biopolímero de D-glucosa, es el material orgánico más abundante sobre la corteza terrestre. Las plantas sintetizan la celulosa como material estructural para soportar su peso. Las moléculas largas de celulosa llamadas microfibrillas, forman haces por los puentes de hidrógeno que se crean entre los numerosos grupos $-OH$ de los anillos de glucosa. En la celulosa las unidades de D-glucosa están unidas por enlaces glicosídicos β -1,4, disposición bastante rígida y muy estable. En la figura 3 se muestra una estructura parcial de celulosa.

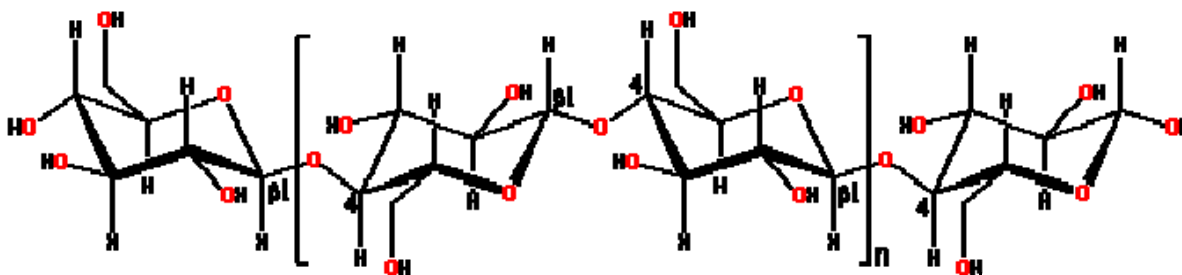


Figura 3. Estructura de la celulosa mostrando enlaces β -1,4-glicosídicos

La longitud del polímero es altamente variable y dependiente del organismo del cual la celulosa haya sido obtenida, así como de la edad y estado metabólico al momento de la extracción. Un grado de polimerización promedio de alrededor de 10000 se determinó para la celulosa de la madera (Zabel & Morrel, 1992). Cada monómero de glucosa presenta una rotación de 180° respecto de los residuos contiguos, estabilizada por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, como se observa en la figura 4. Las microfibrillas están conformadas por zonas cristalinas donde las moléculas de celulosa se hallan ordenadas y regiones paracristalinas donde se hallan desorganizadas. La estructura cristalina de la celulosa hace que la pared de la célula sea anisótropa y por consiguiente con doble refracción (birrefringente) cuando se mira con luz polarizada.

Se consideran dos tipos de celulosa: la nativa o cristalina, caracterizada por un alto grado de cristalinidad u ordenamiento y de polimerización, resultando así insoluble (ej.: avicel, fibras de algodón, papel de filtro, etc.); y la celulosa modificada, la cual resulta soluble como la celulosa amorfa, carboximetilcelulosa, celooligosacáridos, en las cuales el grado de cristalinidad y el grado de polimerización es menor (Levin, 1998).

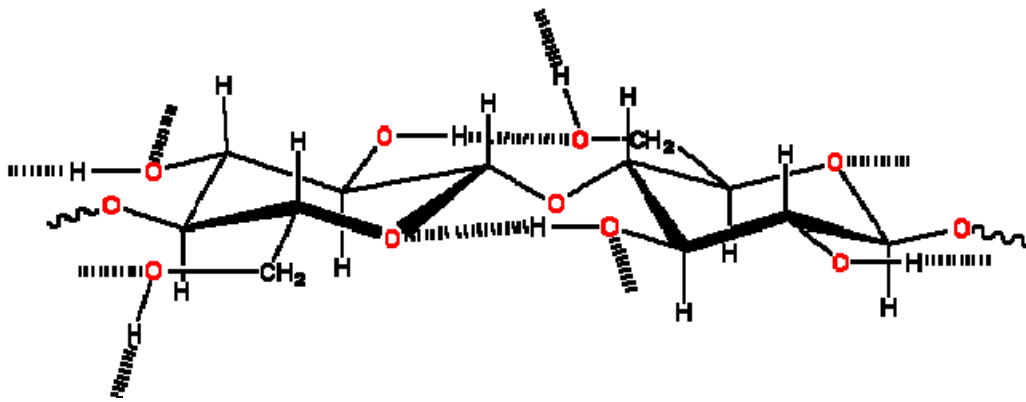


Figura 4. Sección de celulosa estabilizada por puentes de hidrógeno

3.2.2. Hemicelulosa

En contraste con la celulosa, la cual es cristalina, fuerte y resistente a la hidrólisis, las hemicelulosas son estructuras aleatorias, amorfas con pequeña solidez, fácilmente hidrolizables en ácidos o bases diluidos (Zabel & Morrel, 1992). Las hemicelulosas son polímeros de diversas hexosas y pentosas, principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, y ácido D-glucururónico, que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa. La mayoría de las hemicelulosas ocurre como heteropolisacáridos, poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces β -1,4 (de menor longitud que la de celulosa (grado de polimerización 100-200)) (ver figura 5) de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud. Se clasifican usualmente de acuerdo a los azúcares residuales presentes. Los tipos y cantidades de hemicelulosas presentes en las paredes celulares de las maderas de angiospermas y coníferas son diferentes. Estas últimas contienen menos hemicelulosas, constituidas principalmente por glucomananos y galactoglucomananos (Moore, 1998). En los glucomananos la cadena principal está formada por residuos alternos β -D-glucopiranosido y β -D-manopiranosido; en los galactoglucomananos, sustituyentes D-galactopiranosil terminales están asociados al O-6 de manosa o glucosa (Joselau & Ruel, 1994; Zabel & Morrel, 1992).

Los xilanos son las principales hemicelulosas en la madera de angiospermas (constituyen del 10 al 35% del peso seco) (Joselau & Ruel, 1994; Zabel & Morrel, 1992). Consisten de una cadena principal de unidades β -D-xilopiranosido con uniones β -1,4 y dependiendo de su origen, esta cadena puede tener diferentes sustituyentes y cadenas laterales. Se consideran tres familias principales de xilanos (Coughlan & Hazlewood, 1993):

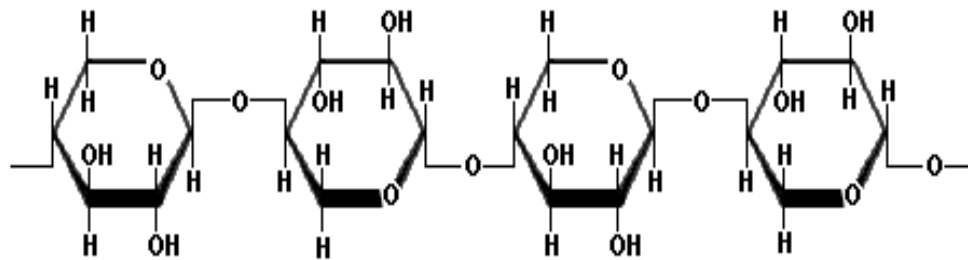


Figura 5. Segmento de estructura plana de hemicelulosa

- i) Xilano de la madera de angiospermas: Acetil-4-*O*-metilglucuronoxilano con un grado de polimerización de alrededor de 200.
- ii) De la madera de coníferas: Posee de 10 a 15% de xilano como arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano con un grado de polimerización mayor de 120.
- iii) Xilano de los pastos: Arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano pero con un grado de polimerización de 70.

Las hemicelulosas cubren y unen a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. La corta extensión de las cadenas que incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas, explicaría porqué este polímero está entre los primeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de pudrición (Zabel & Morrel, 1992).

3.2.3. Lignina

La lignina es el polímero aromático no polisacárido más abundante de la naturaleza. Es un compuesto insoluble en agua y amorfo, de alto peso molecular, tridimensional. La lignina está formada por polimerización al azar de unidades radicales de alcohol sinapílico, *p*-cumarílico y coniferílico, unidades que se pueden observar en la figura 6. La polimerización de la lignina se lleva a cabo luego de la deposición de los polisacáridos y se inicia por oxidación enzimática de los precursores a radicales fenoxi (por abstracción de un electrón). Estos radicales libres pueden reaccionar unos con otros en una gran variedad de formas y esto hace que la lignina no tenga una estructura única.

El proceso de polimerización de los monómeros se inicia con una oxidación que da semiquinonas, luego estos radicales libres reaccionan unos con otros y forman enlaces covalentes entre C-O o C-C, siendo el predominante el enlace β -O-4, mostrado en la figura 7 (Bommarius & Riebel, 2004), el cual usualmente con adición de agua da una forma más estable de β -O-4 enlace eter. Alrededor del 40-60% de todas las uniones que conforman la

lignina corresponden a enlaces tipo éter. En la figura 7 se puede observar la estructura de la lignina.

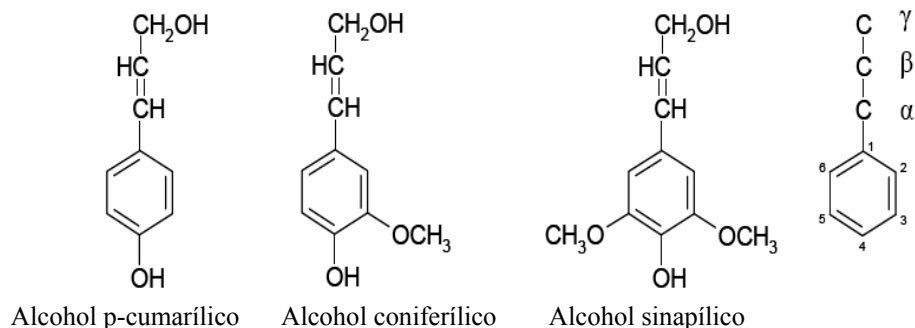


Figura 6. Monómeros precursores de la molécula de lignina. La acción de peroxidadas y lacasas generan radicales libres en estos monómeros, los cuales una vez activados se van polimerizando al azar para formar diversos tipos de uniones (Bommarius & Riebel, 2004).

Los tres precursores monoméricos están presentes en proporciones variables dependiendo de diversos factores que incluyen la especie vegetal, tipo de tejido y localización exacta de la lignina en la pared celular (Buswell & Odier, 1987). Las unidades de guayacil lignina (G) que se originan a partir del alcohol coniferílico predominan en las maderas de coníferas, en cambio las maderas de angiospermas contienen cantidades más o menos equivalentes de unidades guayacil y siringil (S-lignina, derivada del alcohol sinapílico) y la lignina de los pastos además de unidades guayacil y siringil contiene unidades *p*-hidroxifenil (que se originan del alcohol *p*-cumarílico) (Reid, 1995).

La lignina imparte resistencia a la degradación microbiana de la madera. La íntima asociación espacial existente entre los polisacáridos y la lignina dentro de las paredes celulares de la madera provee una barrera protectora que impide la degradación de la celulosa. Una vez que la lignina que rodea a las fibrillas de celulosa es removida o modificada, la celulosa resulta más accesible a las enzimas microbianas y puede ser eficientemente degradada. Así, la lignificación en muchas plantas puede ser un mecanismo de resistencia a la enfermedad y se produce como un mecanismo de defensa hacia los hongos patógenos o en respuesta a heridas (Blanchette R. A., 1995). Debido a su estructura la lignina es altamente resistente a la degradación. Hasta el momento los únicos organismos capaces de mineralizarla eficientemente llevándola a CO₂ y H₂O como productos finales son los hongos causantes de pudrición blanca (Leonowicz *et al.*, 1999). Estos hongos en su mayoría pertenecen a los ordenes Aphyllophorales y Agaricales (Pelaez *et al.*, 1995); poseen un complejo de enzimas oxidasas y peroxidadas que catalizan las primeras reacciones que rompen uniones dentro de la compleja molécula de lignina,

generando moléculas más pequeñas, estos productos de degradación se incorporan luego a los ciclos metabólicos del organismo originando como producto final CO_2 (Kirk & Farrel, 1987). Se ha demostrado que la lignina como sustrato único no es una fuente aprovechable para el crecimiento de los hongos, sino que es necesaria la presencia de un cosustrato (Kirk *et al.*, 1976).

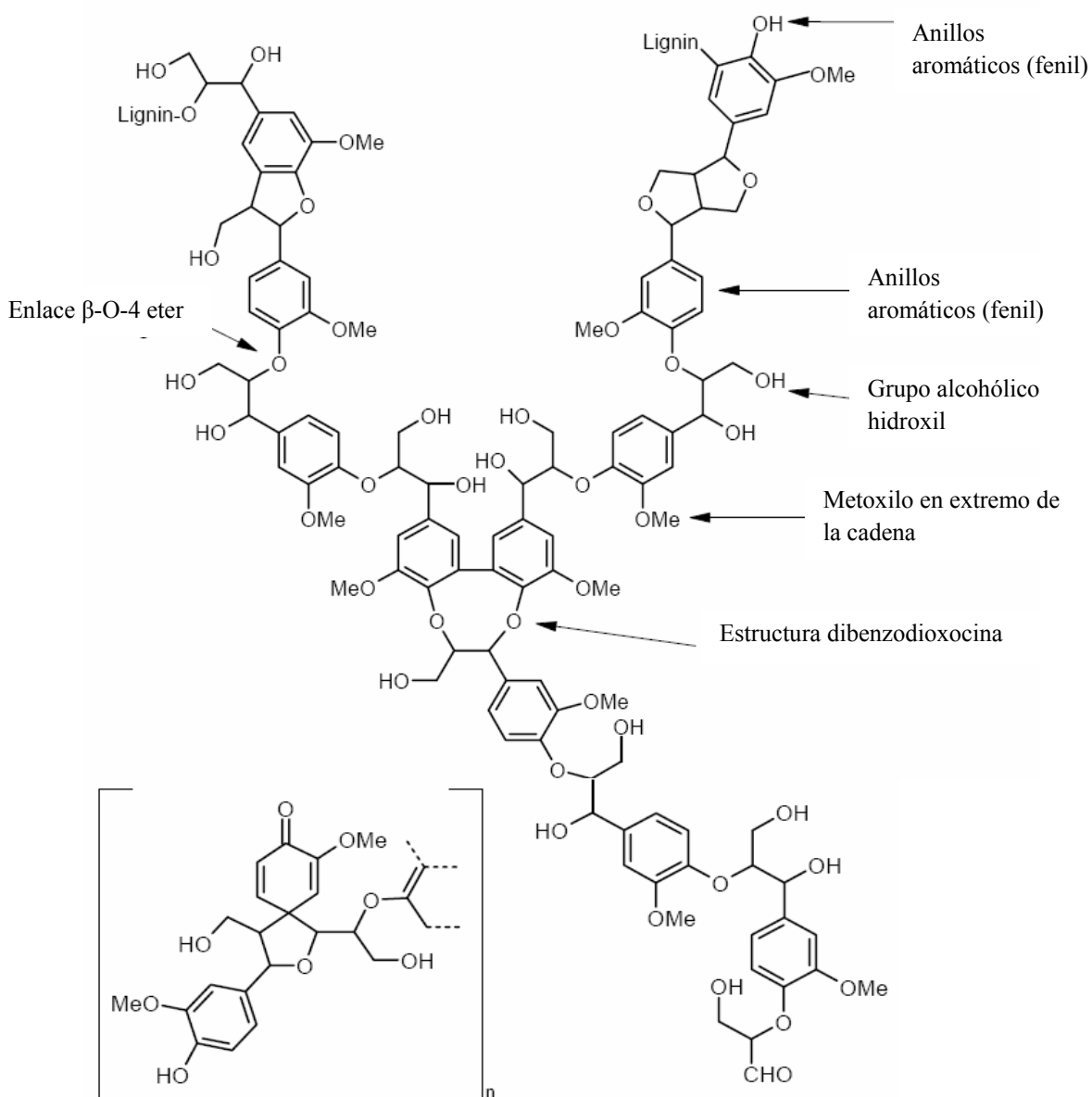


Figura 7. Estructura de lignina (Bommarius & Riebel, 2004)

3.3. Enzimas extracelulares (Mecanismo enzimático)

Los basidiomicetos ligninolíticos, causantes de pudrición blanca producen varias enzimas oxidoreductasas, como peroxidasas que contienen grupos hemo, entre las que se encuentran: la lignin-peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14); la manganeso-peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) y otras peroxidasas. Otro grupo de enzimas son las oxidasas que contienen cobre, como la lacasa (EC 1.10.3.2) que reducen el oxígeno disuelto en agua, y oxidan sustratos fenólicos y no fenólicos formando radicales catiónicos, quinonas o radicales fenoxi. Además conforman el sistema ligninolítico enzimas productoras de agua oxigenada necesaria para el funcionamiento de las peroxidasas como por ejemplo la glioxal-oxidasa (EC 1.1.3.9) que reduce oxígeno a peróxido de hidrógeno con oxidación de un alcohol a un aldehído específico (Shan & Nerud, 2002). Estos hongos también producen un sistema complejo de hidrolasas, que degradan pectinas, hemicelulosas y celulosas.

El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos tiene como propósito principal el crecimiento y transporte de nutrientes hacia el ápice hifal, siendo ésta, el área activa de secreción enzimática. No se descarta que exista una cierta actividad secretora a lo largo del resto del micelio con el fin de mantener la actividad metabólica (Papinutti, 2003).

Las enzimas para la degradación de polímeros (no necesariamente polisacáridos) pueden emplear dos estrategias de ataque. Pueden actuar sobre el polímero aleatoriamente fragmentando efectivamente la molécula polimérica en oligómeros, siendo responsables de esta forma de ataque las endoenzimas. O actuar a partir de un extremo (exoenzimas), generalmente el extremo no reductor de la molécula, liberando monómeros o dímeros de modo secuencial. Los sistemas se completan con enzimas capaces de actuar sobre oligómeros o dímeros, llevando a la completa degradación del polímero. Estos complejos de enzimas actúan de modo sinérgico (Moore, 1998).

Las enzimas extracelulares son producidas dentro de la célula, pero actúan fuera de ella. Muchas de estas enzimas tienen una estructura particular que consiste en un dominio de unión al sustrato y un dominio catalítico unidos por una zona más laxa (Aleshin *et al.*, 1992; Rouvinen *et al.*, 1990). En general las enzimas degradadoras de polisacáridos están sujetas a mecanismos de regulación de su síntesis. Es decir no se producen de modo constante, constitutivo, sino que su síntesis es inducida por el sustrato adecuado y es reprimida por azúcares fácilmente utilizables, en particular glucosa. El inductor más eficiente es el polímero-sustrato de las enzimas que serán sintetizadas, sin embargo debido a su alto peso molecular, no son compuestos que puedan penetrar en las células y ejercer su efecto. Existirían bajos niveles enzimáticos constitutivos que degradarían una pequeña

proporción del polímero y algún producto soluble de su hidrólisis sería incorporado por la célula ejerciendo su efecto en el interior de ésta.

Las enzimas extracelulares del complejo celulolítico y ligninolítico existen en múltiples formas. La síntesis de isoenzimas puede deberse a productos de genes diferentes, aunque también pueden deberse a cambios postraduccionales como proteólisis, glicosilación, agregados cuaternarios. Se pueden sintetizar como consecuencia de estados fisiológicos diferentes (composición del medio de cultivo, pH, temperatura, etc.) a partir de genes regulados diferencialmente. Cabe destacar que en medios de cultivo ligeramente diferentes se sintetizan diferentes formas de una misma enzima, que a pesar de poseer características catalíticas similares, difieren notablemente en sus características fisicoquímicas. Por lo que se deduce que hay formas múltiples que coexisten en determinado momento pero también puede variar la composición de isoenzimas a lo largo del desarrollo del hongo. En la naturaleza, el hongo se encuentra con distintos sustratos, distintas condiciones ambientales, pueden entonces producirse distintas formas enzimáticas, con propiedades más adecuadas a las nuevas circunstancias que les permitan degradar al polímero de la manera más eficiente. Sin embargo también el producto de un gen puede ser modificado diferencialmente mediante glicosilaciones o digestiones proteolíticas luego de la secreción (Barr *et al.*, 1996; Blanchette, 1995; Carlile *et al.*, 2001; Joselau & Ruel, 1994).

Los estudios fisiológicos generalmente son llevados a cabo utilizando medios sintéticos con sustratos puros, mientras que en la naturaleza los hongos se encuentran sobre una amplia gama de sustratos lignocelulósicos heterogéneos, y serían estos los reguladores de la aparición de las diversas isoenzimas fúngicas. Varios investigadores, como Kubicek *et al.*, (1991), estudiaron esta regulación, correlacionando la aparición de las diferentes formas enzimáticas con los sustratos utilizados.

3.3.1. Enzimas celulolíticas

El complejo de enzimas celulolíticas de los hongos de pudrición blanca consiste de tres enzimas hidrolíticas: Endoglucanasa, exoglucanasa y celobiasa, las cuales trabajan sinérgicamente (Lemaire, 1996) y se detallan a continuación.

i) Endoglucanasas (1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas) (EC 3.2.1.4), que producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar de la cadena glucosídica, produciendo glucosa, celobiosa (disacáridos) y celotriosa (trisacáridos). Los sustratos sobre los que actúan las endoglucanasas incluyen carboximetilcelulosa, celulosa amorfa, celooligosacáridos; no atacando en forma significativa a la celulosa cristalina, como las fibras de algodón.

ii) Exoglucanasas, producen principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado y están representadas por dos grupos de enzimas: exocelobiohidrolasas o celobiohidrolasas (CBH) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas) (EC 3.2.1.91) que liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor y exoglucohidrolasas (1,4- β -D-glucan glucohidrolasas) (EC 3.2.1.74) que liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado e incluyen también actividad de las celobiohidrolasas produciendo celobiosa por ataque en el extremo no reductor del polímero. Las celobiohidrolasas son las halladas más frecuentemente (Ângelo, 2004).

iii) β -glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21), que hidrolizan celobiosa y otros β -1,4-oligoglucósidos de cadena corta, para formar glucosa. Siendo la glucosa el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa (Moore, 1998).

La celulosa es atacada inicialmente por la endoglucanasa, la cual se liga al azar sobre las microfibrillas de celulosa en regiones amorfas, produciendo hidrólisis de los enlaces β -1,4 glucosídicos, generando así múltiples sitios de ataque para las exo-1,4- β -D-glucanasas, las cuales actúan sobre los extremos no reductores de la cadena, clivando una unidad de celobiosa. Existe una cooperación continuada entre la acción de ambas enzimas y la de la β -glucosidasa, la cual actúa sobre la celobiosa o también sobre pequeños oligómeros, produciéndose así moléculas de glucosa. El resultado de la acción de estas tres actividades enzimáticas es la degradación sinérgica de la celulosa como se muestra en la figura 8.

Existen actividades complementarias entre los tres tipos de enzimas y se consideran los responsables del efecto del sinergismo (*sinergismo*: la acción de dos o más enzimas combinadas es mayor que la suma de las actividades individuales) en la degradación (Papinutti, 2003). Puede ocurrir sinergismo tanto entre, como dentro de las diferentes clases de enzimas celulolíticas. Existe sinergismo endo-exo, exo-exo o endo-endo. El sinergismo endo-exo se explica considerando que la acción de las endocelulasas crearía nuevos sitios de acción para las exocelulasas. Las exocelulasas tradicionalmente se definían como aquellas enzimas que liberaban celobiosa a partir de extremos no reductores de la celulosa, pero esta definición resulta inadecuada para explicar el sinergismo exo/exo. La existencia de CHBs con diferentes especificidades (algunas capaces de actuar sobre extremos reductores) puede proveer una explicación para el sinergismo exo/exo (Boisset *et al.*, 2000; Barr *et al.*, 1996). Aunque el sinergismo entre los distintos componentes del complejo celulasa aún no ha sido completamente elucidado, está claro que depende de diferentes factores: i) La naturaleza del sustrato, ii) La afinidad del componente celulasa por el sustrato, iii) La estereo-especificidad de dicho componente, iv) La concentración de la

enzima, y v) La proporción entre los componentes enzimáticos (Barr *et al.*, 1996; Mansfield *et al.*, 1999).

Sin embargo este modelo es una simplificación de lo que realmente acontece durante la degradación biológica de celulosa ya que no tiene en cuenta la presencia de las actividades oxidativas auxiliares. Coughlan y Ljungdahl (1988) han propuesto un modelo para la degradación fúngica de la celulosa, teniendo en cuenta la actividad de las enzimas principales y accesorias encontradas en un gran número de especies fúngicas. Los autores proponen como primer paso la amorfogénesis de la microfibrilla de celulosa, lo cual implica la ruptura de puentes de hidrógeno intermoleculares para producir la relajación de la estructura cristalina. La disgregación y subsecuente hidratación de las cadenas de celulosa fuertemente empaquetadas, es un prerequisite para el clivaje ulterior de las uniones glicosídicas, por las enzimas celulolíticas (Forchiassin & Levin, en prensa).

En adición a los tres grupos principales de enzimas, se han encontrado en distintas especies fúngicas, especialmente en hongos de pudrición blanca, un número de actividades enzimáticas oxidativas auxiliares, las cuales no son esenciales para la hidrólisis de la celulosa pero pueden asistir a la descomposición del polímero llevando a cabo conversiones muy útiles, por ejemplo oxidaciones o la remoción de productos finales que pueden provocar represión catabólica o inhibición de la actividad de los grupos principales de enzimas celulolíticas (Coughlan & Ljungdahl, 1988; Markham, 1998).

La síntesis de celulasas está sujeta a inducción por el sustrato adecuado (celulosa cristalina) y represión por una fuente hidrocarbonada fácilmente utilizable, como la glucosa. El inductor más efectivo es el sustrato natural: la celulosa cristalina, sin embargo éste, es un polímero de gran tamaño, no puede penetrar en la célula e inducir la síntesis de celulasas a nivel transcripcional. Existen sin embargo niveles basales de celulasas constitutivas que a partir de un bajo nivel de hidrólisis de la celulosa, producirían algún producto soluble capaz de penetrar en la célula induciendo la síntesis enzimática (Forchiassin & Levin, en prensa; Carle – Urioste *et al.*, 1997).

Cuando un hongo de pudrición blanca se desarrolla sobre la celulosa se producen dos celobiosa- oxidoreductasas: celobiosa-quinona oxidoreductasa (CBQ) y celobiosa-oxidasa (CBO), éstas convierten la celobiosa en δ -Lactona que puede a su vez convertirse en ácido celobiónico y entonces obtenerse glucosa y ácido glucónico. Las enzimas celobiosa-oxidoreductasas son capaces de utilizar una gran variedad de aceptores de electrones y son de gran significancia en la regulación de los niveles de celobiosa y glucosa, cuya acumulación puede inhibir la acción de la endoglucanasa. Otro rol importante de la CBQ es la degradación de las uniones entre celulosa y lignina (Moore, 1998). La celobiosa-oxidasa reduce el Fe^{+3} conjuntamente con el peróxido de hidrógeno, generando radicales hidroxilo.

Estos radicales pueden degradar tanto la celulosa como la lignina, posiblemente indicando que la celobiosa oxidasa tiene un rol central en degradación de maderas por hongos degradadores de madera (Ander, 1994).

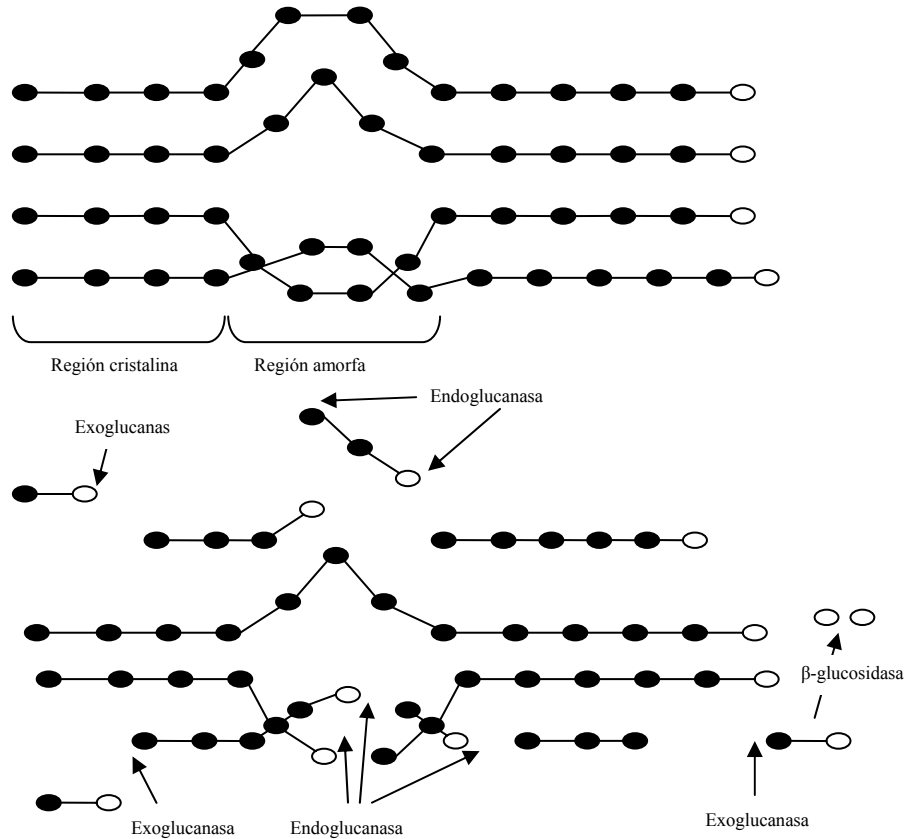


Figura 8. Representación del modo de acción de las celulasas, glucosa: ○

Los hongos de pudrición castaña utilizan un sistema celulolítico bien diferenciado del sistema hidrolítico de los hongos de pudrición blanca. Estos pueden depolimerizar celulosa rápidamente a través de un mecanismo que involucra a la endoglucanasa y a factores no proteicos, entre ellos H_2O_2 y Fe^{+2} (Coughlan & Ljungdahl, 1988; Wood & García Campayo, 1994), ya que producen endoglucanasas y β -glucosidasas, pero aparentemente no producen exoglucanasas (Gow, 1995).

Se ha demostrado que las enzimas celulolíticas presentan una multiplicidad de componentes enzimáticos (isoenzimas) (Coughlan, 1985; Wood & García Campayo, 1990; Beguin & Aubert, 1994), dependiendo el número de éstas, de la cepa y de la forma en que ha sido cultivada. Sólo algunos de estos componentes están genéticamente determinados. Otros resultan de una glicosilación diferencial de una cadena polipeptídica común (Wood &

McCrae, 1972; Gum & Brown, 1977; Coughlan & Ljungdahl, 1988), de la proteólisis parcial de las enzimas (Nakayama *et al.*, 1976; Eriksson & Petterson, 1982; Stahlberg *et al.*, 1988; Mischak *et al.*, 1989), de la agregación de distintas enzimas entre sí o con la pared celular (Sprey & Lambert, 1983) o de la manipulación de las mismas durante su purificación (Enari & Niku-Paalova, 1987). Esto hace que la elucidación de los mecanismos de acción sea extremadamente dificultosa, y por lo tanto existe una considerable discusión acerca de la especificidad de sustrato de las distintas enzimas, de su modo de acción (especialmente en el caso de las celobiohidrolasas) y de la naturaleza de la cooperación entre las distintas enzimas. En la actualidad existe bastante acuerdo acerca de que una conversión extensiva de celulosa cristalina a glucosa debe ser discutida en términos de la acción cooperativa de dos celobiohidrolasas no relacionadas inmunológicamente (llamadas CBH I y CBH II), una o más endoglucanasas y al menos una β -glucosidasa (Wood & García Campayo, 1990).

3.3.2. Enzimas xilanolíticas

Las enzimas que degradan hemicelulosa se nombran según el sustrato sobre el que actúan; por ejemplo, mananasas degradan mananos, xilanasas degradan xilanos, etc. (Moore, 1998). Dentro de las hemicelulosas, el más abundante es el xilano, por ello las xilanasas constituyen el grupo enzimático más estudiado entre las hemicelulasas. Las D-xilanasas, similares a las celulasas, se componen básicamente de dos grupos de enzimas: endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8), y 1,4- β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), las cuales en muchos casos están presentes en forma de distintas isoenzimas (Tan *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 1991).

La hidrólisis de estas moléculas complejas requiere la interacción de numerosas enzimas que corten la cadena principal y también las laterales. La endo-1,4- β -D-xilanasas actúa sobre la cadena de xilano al azar, disminuyendo el grado de polimerización con liberación de xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa. La 1,4- β -D-xilosidasa interviene luego de la endoxilanasas, actuando sobre los xilooligosacáridos (a partir de los extremos no reductores) o sobre la xilobiosa, dando como producto xilosa (Bajpai, 1997). Sin embargo un sistema xilanolítico completo requiere de las enzimas que actúan sobre sus ramificaciones α -arabinofuranosidasas (que remueven cadenas laterales de L-arabinosa), α -glucuronidasas, que liberan ácidos glucurónicos de las cadenas laterales y acetilxilano-esterasas, que remueven los grupos sustituyentes acéticos de la xilosa, como se muestra en la figura 9 (Forchiassin & Levin, en prensa).

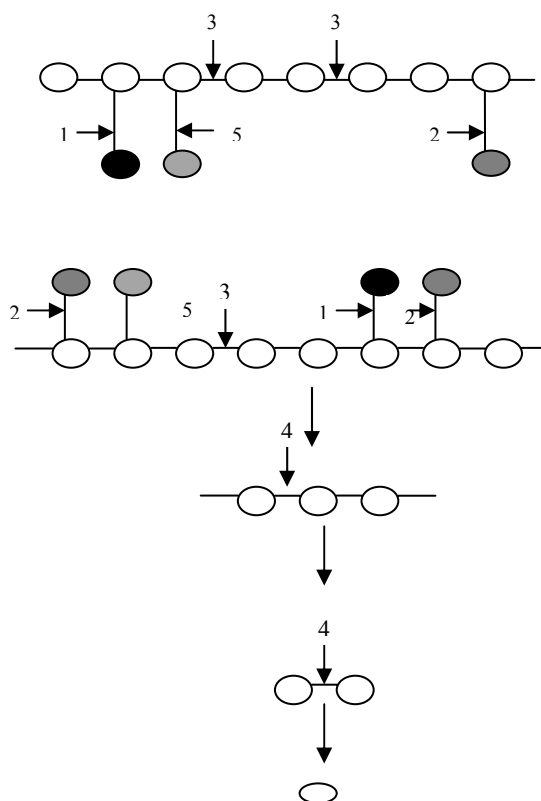


Figura 9. Estructura de xilano o de monocotiledóneas y enzimas involucradas en su degradación. Xilosa ○ ácido acético ● arabinofuranosa ● ácido glucurónico o 4-O-metilglucurónico ○ 1-acetilxilanoestearasa, 2-arabinofuranosidasa, 3-endoxilanasas, 4-β-xilosidasas, 5-α-glucuronosidasas.

3.3.3. Enzimas ligninolíticas

Dada la heterogeneidad de la molécula de lignina y su gran tamaño los sistemas enzimáticos involucrados en su degradación deben ser extracelulares y no específicos. La acción de las enzimas resulta en una despolimerización parcial, las roturas ocurren sin estereoespecificidad. Son mecanismos oxidativos que producen radicales libres, que pueden reaccionar entre sí volviendo a polimerizarse. Existe un equilibrio entre polimerización-despolimerización. Se inician reacciones no específicas que después pueden seguir cualquier camino sin subsiguiente control por parte de las enzimas, es lo que se ha llamado “combustión enzimática” (Kirk & Farrel, 1987).

Hasta el momento se han descrito tres enzimas ligninolíticas que se hayan distribuidas ampliamente entre los hongos causantes de pudrición blanca: la lignin-peroxidasa (LiP), la manganeso-peroxidasa (MnP) y la lacasa. Otras enzimas ligninolíticas como la peroxidasa

versatil (PV) o la peroxidasa manganeso-independiente se mencionan formando parte del sistema ligninolítico de algunos basidiomycetes. LiP y MnP son peroxidasas con un grupo hemo como cofactor, que emplean peróxido de hidrógeno como primer aceptor de electrones. La LiP puede oxidar directamente sustratos aromáticos fenólicos y no fenólicos siendo el más estudiado el alcohol veratrílico (3,4 dimetoxi-fenol). La MnP oxida Mn^{+2} a Mn^{+3} y este último es quelado por ácidos orgánicos sintetizados por el hongo (Pérez & Jeffries, 1992). Es decir que la MnP puede oxidar sustratos del tipo fenólico a través del Mn^{+2} (Tuor *et al.*, 1992), pero también puede hacerlo con sustratos no fenólico a través de los productos de peroxidación de ácidos grasos insaturados (Bao *et al.*, 1994). La PV oxida Mn^{+2} a Mn^{+3} , como lo realiza la MnP y también oxida compuestos no fenólicos, como la LiP; lo que significa que comparte propiedades catalíticas con ambas peroxidasas fúngicas (Martinez, 2002; Martinez *et al.*, 1996). Mientras que la lacasa es una oxidasa con cuatro átomos de cobre como cofactor y cuyo aceptor de electrones es el oxígeno dando agua como producto (Thurston, 1994). Esta enzima por ser oxidasa ataca principalmente compuestos fenólicos, pero la presencia de cooxidantes como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), el 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS) o el ácido violúrico; capacita a la enzima para atacar sustratos más difícilmente oxidables como los de tipo no fenólico (Soares *et al.*, 2001). La lacasa es la enzima ligninolítica presente más frecuentemente en los hongos de pudrición blanca.

La fisiología de producción y las propiedades físico-químicas de lacasas, MnP y LiP de hongos ligninolíticos han sido ampliamente estudiados (Rodríguez., *et al* 2004). En la figura 10 se muestra un esquema de acción de un sistema ligninolítico (Forchiassin & Levin, en prensa). A continuación se realiza una descripción más detallada sobre las enzimas encargadas de degradar la lignina:

i) **Lignin-peroxidasa (E.C.1.11.1.14) (LiP):** fue la primera enzima lignolítica identificada en 1983 (Glenn *et al.*, 1983; Tien & Kirk, 1983). Es una hemoproteína glicosilada, extracelular, dependiente de peróxido de hidrógeno, caracterizada por su potencial redox inusualmente alto y su bajo pH óptimo, que cataliza una variedad de reacciones oxidativas, actuando sobre grupos fenólicos y no fenólicos. La LiP es capaz de oxidar veratril alcohol, metabolito producido durante el crecimiento secundario junto con la enzima. El veratril alcohol oxida compuestos aromáticos. Sería un mediador de la reacción: es oxidado por LiP a veratrilaldehído y luego puede oxidar al sustrato lignina (Koduri & Tien, 1994). Se sugiere que es importante porque por su tamaño pequeño puede difundir y actuar a cierta distancia de la enzima. Por otra parte también cumple un rol protector de la enzima ya que previene su oxidación.

ii) **Manganeso Peroxidasa (E.C.1.11.1.13) (MnP):** Es una enzima ampliamente distribuida entre los hongos causantes de pudrición blanca. Es una hemoproteína glicosilada con fuerte preferencia por el Mn^{+2} como sustrato (Glen & Gold, 1985). Lo oxida a Mn^{+3} , el cual forma complejos con ácidos dicarboxílicos o con α -hidroxiácidos, estos complejos pueden difundir a cierta distancia de la enzima y oxidar a su vez a la lignina. Actúa principalmente sobre sustratos fenólicos, aunque estudios recientes han demostrado también su actividad sobre sustratos no fenólicos. La regulación de la producción está dada por la limitación de nitrógeno, en los organismos nitrógeno-regulados, del mismo modo que ocurre con LiP, pero también hay una regulación por manganeso (Buswell *et al.*, 1995).

iii) **Lacasa (E.C.1.10.3.2):** Es una polifenoloxidasa que contiene cobre en su molécula (Thurston, 1994). La adición de cobre a los medios de cultivo resulta en un incremento en su producción. Oxida modelos de lignina que contienen grupos fenólicos libres formando radicales fenoxi. Mediante la acción de mediadores del proceso puede también actuar sobre grupos no fenólicos. Se han descrito diversos mediadores artificiales y también naturales que podrían ser producidos por el mismo organismo, siempre de carácter aromático (Eggert *et al.*, 1996). Las lacasas son enzimas que no sólo están presentes en organismos lignolíticos, sino en gran variedad de hongos, cumpliendo diversas funciones a lo largo de su desarrollo (Mayer & Staples, 2002).

Se conocen otras enzimas relacionadas con la degradación de lignina, como, *celobiosa-quinona-oxidoreductasa (CBQ)* que oxida celobiosa a celobionolactona y reduce quinonas y otros radicales producidos por LiP, MnP, lacasa y protege así de la repolimerización. Existen varias enzimas capaces de producir peróxido de hidrógeno y su síntesis acompaña la síntesis de peroxidasa; entre ellas se destacan la *glucosa-oxidasa* (GOD: glucosa 1-oxidasa) que actúa específicamente sobre la glucosa mediante la incorporación de O_2 , producir gluconolactona y H_2O_2 . La *glucosa 2-oxidasa*, a diferencia de la anterior, puede actuar sobre diversos azúcares pero con preferencia por glucosa. Las anteriores enzimas son predominantemente intracelulares. En cambio la *glioxal-oxidasa* es extracelular y oxida varios sustratos: glioxal, metilglioxal (Zhao & Janse, 1996). El glioxal es un metabolito excretado por los hongos de pudrición blanca. Los azúcares necesarios para las glucosas oxidasas pueden ser producidos por la acción de celulasas o hemicelulasas sobre los polisacáridos de la madera.

Los mediadores de bajo peso molecular son de gran importancia para el proceso de degradación de la lignina ya que por su tamaño, las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar completamente en la madera (Evans *et al.*, 1994).

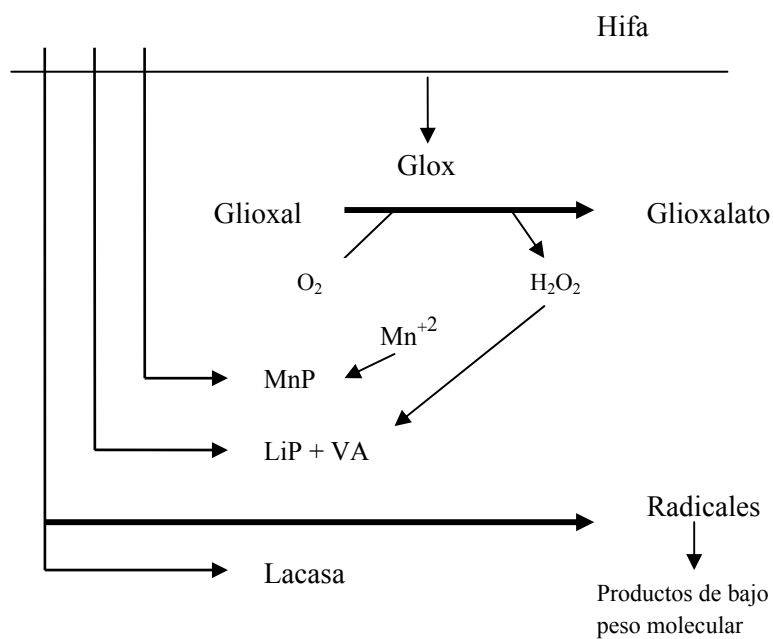


Figura 10. Esquema de acción del sistema ligninolítico. Glox: glioxal oxidasa; MnP: manganeso peroxidasa; LiP: lignin peroxidasa; VA: veratril alcohol.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación de la Investigación

La fase experimental del presente trabajo se desarrolló en los siguientes espacios de operación: el desarrollo biológico de la cepa *G. frondosa* sobre agar, producción de semilla, fermentación de las dos formulaciones de sustrato sólido y fructificación de carpóforos se desarrolló en la planta de experimentación de hongos del SENA Regional Caldas entorno al marco de un proyecto de investigación en convenio SENA Regional Caldas y Universidad de Caldas. Las medidas de las actividades enzimáticas y la cuantificación de las sustancias almidón, lignina, azúcares reductores y glucosamina se realizaron en el laboratorio de Maestría de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales y los análisis bromatológicos de los sustratos crudos y en los diferentes tiempos de fermentación se realizaron en el laboratorio de bromatología de la Universidad de Caldas.

4.2. Equipos

Los equipos utilizados en la experimentación para el desarrollo de este trabajo de investigación fueron los siguientes:

- i) Autoclave vertical de 40 litros de capacidad
- ii) Balanza analítica marca Precisa de 0,01 mg exactitud.
- iii) Cabina de flujo laminar horizontal
- iv) Centrífuga Eppendorf-5415c tubos de 2 mL por 18 tubos.
- v) Centrífuga Indulab referencia 004 Special seis tubos de 50 mL.
- vi) Colorímetro Genesys 20 rango de operación 325-11000 nm, celdas de 1 cm de paso.
- vii) Espectrofotómetro UV/VIS PERKIN ELMER Lambda 20 rango de operación 190-1100 nm, celdas de cuarzo de 1 cm de paso, capacidad 3,5 mL, accesorio sistema de control de temperatura Peltier referencia PTP Peltier system.
- viii) Incubadora de convección natural BINDER rango de operación 0-100°C.
- ix) Ultrasonido Ultrasonic LC 30 H Elma 50-b Hz.

4.3. Organismo y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de *G. frondosa* PSUMCC 922 obtenida de la Pennsylvania State University Mushroom Culture Collection, USA, y mantenida en agar papa dextrosa (PDA) a 4°C. Se realizaron cinco réplicas de micelio desde la cepa original (de F₁₁ hasta F₅₅) por tetraplicado, preparando seis cajas de petri con PDA para cada réplica, incubadas a 25°C por 21 días (hasta 90% de colonización), posteriormente se almacenaron en nevera a 4°C. De las cajas incubadas se tomaron cinco cajas por réplica para hacer el extracto enzimático necesario para la determinación de las actividades enzimáticas ligninolíticas (LiP, MnP y lacasa), celulolíticas (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa) y xilanolíticas (endoxilanas).

Sustratos y condiciones de fructificación

Las materias primas básicas para la elaboración de los sustratos fueron aserrín de roble (*Quercus* spp.) subproducto proveniente de la empresa Cubas y Barriles de Colombia S.A. (Cubacol S.A.) que construye barriles de roble para el añejamiento de licores. La borra de café es un subproducto de la empresa FOODEX S.A. productora de café soluble. Ambas empresas ubicadas en Manizales en la Zona Industrial vía al Magdalena.

Se trabajó con dos formulaciones. La primera consistió de 75% de aserrín de roble (25% humedad), 23% de salvado de maíz (15 % humedad), 1% sacarosa (2% humedad) y 1% de carbonato de calcio. La segunda se formuló con 50% de aserrín de roble, 25% de borra de café (70% humedad) y los demás insumos en las mismas proporciones que para la primera. Las formulaciones se realizaron en base seca. Los sustratos hidratados hasta 60% de humedad en promedio fueron empacados en bolsas de polipropileno biorientado de 32 cm de altura por 12 cm de diámetro y autoclavados a 121°C por una hora. Cada bolsa contenía 1 kg de sustrato. A cada bolsa se le realizó un orificio de una pulgada de lado con un filtro de interlón, en la parte superior de la bolsa para el intercambio gaseoso. Las bolsas con sustrato esterilizadas fueron inoculadas con el 3% de semilla en base húmeda referida al sustrato. La semilla de *G. frondosa* se preparó utilizando granos de cereales de maíz, sorgo rojo, cebada y arroz, hidratando éstos, en agua caliente hasta obtener humedades de 35-40%, esterilizándolos en autoclave por 30 minutos a 121°C. El sustrato húmedo y esterilizado fue inoculado posteriormente utilizando cuatro trozos de agar con micelio de hongo de aproximadamente 1 cm de lado, siendo luego incubado por 26-30 días a 25°C.

La etapa de incubación de *G. frondosa* en Colombia tiene un tiempo de 70 y 80 días (Montoya *et al.*, 2007). Los sustratos inoculados fueron incubados a 25°C por siete días, posteriormente mantenidos a 20°C por 68 días más. Durante esta etapa el micelio del hongo coloniza el sustrato en los primeros 30 días y en los 45 días siguientes se forma el abrigo micelial y se produce un exudado (metabolitos secundarios) responsable de la pigmentación naranja marrón indicadora de la inducción a fructificación. Para la

fructificación se realizó un choque térmico a 10°C por 24 horas y posterior exposición de los sustratos a semipenumbra (aproximadamente 50 luxes), 18 - 20°C, 75% H.R. en promedio y un relevo de aire (10 minutos) cada 12 horas. El tiempo de desarrollo del carpóforo fue de siete a diez días para cada sustrato hasta el punto de cosecha. En la tabla 1 se muestra los parámetros de cultivo que se requieren para el desarrollo del hongo *G. frondosa*.

Tabla 1. Parámetros de desarrollo para el cultivo de *G. frondosa* en bloques de sustrato sintético en Manizales (Colombia) (Montoya *et al.*, 2007)

Parámetros de cultivo	Incubación		Fructificación		Producción
	Subfase I (hasta completar colonización)	Subfase II (hasta formación de exudado)	Inducción	Formación de primordios	Crecimiento y producción del hongo a punto de cosecha
Temperatura (°C)	25 (primera semana), luego de 20-21	18-20	10	16-18	16-18
Humedad relativa (% H.R)	60-65	60-65	70-80	70-80	70-80
Luz (Luxes)	No requiere	No requiere	No requiere	50-100	50-100
Relevos de aire (concentración de CO ₂)	No requiere ventilación	No requiere ventilación	No requiere ventilación	Un relevo de aire de diez minutos cada doce horas	Un relevo de aire de diez minutos cada dos horas
Tiempo (días)	30-35	40-45	1	7	2- 3

4.4. Preparación de extractos enzimáticos crudos

Para preparar el extracto enzimático de *G. frondosa* incubado en agar PDA se tomaron cinco cajas de petri incubadas al 90% de colonización de cinco transferencias realizadas por tetraplicado (100 cajas en total), se retiró el micelio del agar de cada transferencia, se pesó y se mezcló con agua destilada (2,5g de micelio/20 mL agua) en un baño de ultrasonido por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó (4500 rpm) durante una hora y se filtró. Los extractos fueron almacenados en tubos de 1mL en congelación a -18°C. La humedad promedio del micelio se determinó en estufa a 70°C hasta peso constante.

De igual manera, los extractos enzimáticos de sustrato se prepararon usando muestras con diferentes días de incubación (20, 30, 45, 60 y 75 días) y muestras de sustratos posterior a la primera y segunda cosechas. Se tomaron 2,5 g de sustrato en 20 mL de agua destilada sometidos a ultrasonido por 30 minutos, centrifugados una hora a 4500 rpm y filtrados. Los extractos obtenidos fueron almacenados en tubos de 1 mL en congelación a -18°C. La

humedad de los sustratos en los diferentes tiempos de incubación se determinó a 100°C hasta peso constante.

4.5. Determinación de actividades enzimáticas

Se hicieron mediciones de tres actividades enzimáticas celulolíticas y tres ligninolíticas, además de una actividad xilanolítica con el objetivo de relacionarlas con la capacidad de degradación del sustrato por el hongo.

4.5.1. Hidrolasas que liberan azúcares

Se hallaron las actividades de tres celulasas y una xilanasas. Los procedimientos utilizados en la medida de la actividad de las celulasas fueron:

- i. Endo- β -D-1,4-glucanasa (E.C.3.2.1.4). Se usó carboximetilcelulosa (CMC) grado alimenticio como sustrato al 0,5% en buffer acetato de sodio pH 4,8 en reacción con 100 μ L de extracto enzimático por 30 minutos a 50°C. La reacción se detuvo adicionando el reactivo de Somogyi. Se continuó con la reacción de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945; Nelson, 1944) para la determinación de azúcares reductores, se leyó la absorbancia a longitud de onda 540 nm. Una unidad de actividad enzimática (UE) está definida como la producción de 1 μ mol de azúcares reductores en un minuto.
- ii. Exo- β -D-1,4-glucanasa (E.C.3.2.1.91). En este caso se usó celulosa cristalina de MERCK 1% en buffer acetato de sodio pH 4,8 como sustrato, en reacción con 100 μ L de extracto enzimático a 50°C por 60 minutos. La reacción se detuvo adicionando el reactivo de Somogyi. Se centrifugó y con el sobrenadante se continuó la reacción de Somogyi-Nelson. Se leyó la absorbancia a longitud de onda 540 nm. Una unidad de actividad enzimática (UE) está definida como la producción de 1 μ mol de azúcares reductores en un minuto.
- iii. β -glucosidasa (E.C.3.2.1.21). El sustrato utilizado fue p-nitrofenil β -D-glucopiranosido N 7006 de SIGMA 0,02% en buffer acetato de sodio pH 4,8 el cual reaccionó con 100 μ L de extracto enzimático a 50°C por 30 minutos. Se detuvo la reacción adicionando solución buffer Clark y Lubs (pH 9,8) y se leyó la absorbancia a longitud de onda 430 nm (ϵ_{430} =18,5/mM cm) (Wood & Bhat, 1988). Una unidad de actividad enzimática (UE) está definida como la producción de 1 μ mol de azúcares reductores en un minuto.

La actividad enzimática de la Endo- β -D-1,4-xilanasas (E.C.3.2.1.8) se determinó utilizando como sustrato una suspensión de Xilan X0627 de SIGMA 0,2% en buffer acetato de sodio pH 4,8, incubada a 50°C con 100 μ L de extracto enzimático por 30 minutos. La reacción se interrumpió adicionando el reactivo de Somogyi. Los azúcares reductores liberados por las reacciones de las hidrolasas sobre los sustratos indicados fueron determinados por el método de Somogyi-Nelson a 540 nm de longitud de onda. Una unidad de actividad enzimática (UE) está definida como la producción de 1 μ mol de azúcares reductores en un minuto.

Para calcular los microgramos de azúcares presentes requeridos para la determinación de las actividades enzimáticas de la endoglucanasa y exoglucanasa se realizó una curva patrón utilizando D(+)-Glucosa-monohidrato de MERCK, el factor es la inversa de la pendiente de la curva de absorbancia Vs μ g de azúcar reductor. Igualmente para la determinación de la actividad de la endoxilanasas se realizó una curva patrón con Xilosa X1500 de SIGMA.

4.5.2. Enzimas Ligninolíticas

Se determinaron tres actividades de ligninasas:

- i. Lacasa (E.C.1.10.3.2): Se utilizaron 0,5 mM de ABTS ((2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt 98%) de SIGMA A 1888 en solución 0,1M buffer acetato de sodio pH 3,6 como sustrato, según método de Paszczynski & Crawford (1991), leyendo el aumento de absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420}=36/\text{mM cm}$) luego de tres minutos de reacción a 30°C. Una unidad de actividad de lacasa (UE) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de ABTS en 1 minuto.
- ii. Manganeso-peroxidasa (E.C.1.11.1.13) (MnP): Se determinó utilizando solución 0,01% de rojo fenol (Carlo Erba) en buffer succinato de sodio 0,1 M y pH 4,5 y sulfato de manganeso (0,22 g/L) (Carlo Erba) como sustrato, con peróxido de hidrógeno 0,2 mM. La reacción fue detenida adicionando NaOH 5N después de 10 minutos de reacción para leer el incremento de absorbancia a 610 nm ($\epsilon_{610}=22/\text{mM cm}$). Una unidad de actividad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de rojo fenol en 1 minuto. (Levin *et al.*, 2004; Paszczynski *et al.*, 1988).
- iii. Lignin-peroxidasa (E.C.1.11.1.14) (LiP): Se aplicaron dos métodos de medida cuantitativa y un método cualitativo. Los métodos cuantitativos fueron el método del alcohol veratrílico (Tien & Kirk, 1988), utilizando como sustrato una solución

de 19,85 g/L de 3,4-Dimethoxyphenol 97% de ALDRICH 194468 en agua destilada. La mezcla de reacción se realizó en buffer tartrato de sodio pH 3,0 con peróxido de hidrógeno 0,4 mM como iniciador de la reacción. Se determinó el aumento de absorbancia a 310 nm ($\epsilon_{310}=9,333/\text{mM cm}$). El segundo método cuantitativo fue el del Azure B, que usa como sustrato una solución de 1,3 g/L de Azure B—certified A 4043 en agua destilada. La mezcla de reacción se hizo en buffer tartrato de sodio 50 mM pH 4,5 y se inició la reacción con peróxido de hidrógeno 100 μM . La lectura de la disminución de absorbancia se hizo a 650 nm. (Archibald, 1992). El método cualitativo consistió en la observación del halo de decoloración alrededor del inóculo en medio cultivo agar maltodextrosa (EMA) en una caja de petri con 50 μM de Azure B colorante heterocíclico de peso molecular 305,8 (Zhao *et al.*, 1996). Todas las absorbancias para actividad ligninolítica fueron medidas en un Espectrofotómetro UV/VIS PERKIN ELMER Lambda 20.

4.6. Cuantificación del contenido de quitina, almidón, azúcares reductores, biomasa útil y componentes de fibra (celulosa-hemicelulosa y lignina)

El contenido de quitina se determinó por el método de valoración de Glucosamina (N-acetilglucosamina: NAGA) (Plassard *et al.*, 1982) en las muestras de sustrato donde hubo presencia de crecimiento del hongo *G. frondosa* y muestra del mismo carpóforo; las muestras de sustrato se secaron a 100°C por 24 horas, luego se sometieron a hidrólisis ácida con HCl 6N por cuatro horas a 100°C, con posterior alcalinización y reacción del hidrolizado alcalinizado con reactivos preparados a partir de acetilacetona y p-dimetilamino benzaldehído. Se realizó una curva patrón con una solución de D-(+)-clorhidrato de glucosamina G-4875 de SIGMA. La biomasa útil del *G. frondosa* se determinó por peso de los cuerpos fructíferos obtenidos de los sustratos que fructificaron.

Para la cuantificación de los componentes de la fibra (celulosa-hemicelulosa y lignina), azúcares reductores y almidón, las muestras de sustratos inoculados a diferentes tiempos de incubación y muestras sin inocular se secaron a 100°C hasta peso constante, se maceraron en mortero de porcelana y se extrajeron los compuestos hidrosolubles por hidrólisis con agua caliente durante tres horas (Tappi Methods, 1993), posteriormente se filtró; al filtrado se le determinaron azúcares reductores por el método Somogyi-Nelson, el sólido retenido se secó a 100°C por 24 horas, el almidón se determinó por diferencia de peso. El sólido seco de la hidrólisis con agua caliente se sometió a hidrólisis ácida con ácido sulfúrico al 72% permaneciendo la lignina como resto insoluble (Tappi Methods, 1998) y solubilizándose la celulosa y hemicelulosas, las cuales fueron determinadas por diferencia de peso.

Se realizaron balances de materia a los sustratos en base seca, con el fin de determinar la capacidad de degradación del *G. frondosa* cuantificando la desaparición de sustrato referido a la cantidad presente de almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina y la cuantificación de azúcares reductores presentes en cada muestra a diferentes tiempos de incubación (20, 30, 45, 60 y 75 días) de los sustratos. Así como también la conversión de material lignocelulósico en biomasa útil, entendida como la masa de carpóforos de los sustratos que fructificaron.

4.7. Manejo estadístico de la información

Para determinar la actividad enzimática del micelio sobre agar PDA se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado a una vía, con un nivel de significancia del 95%, el factor es la generación y se efectuó a cinco niveles (F_{11} hasta F_{55}), con cuatro repeticiones cada uno para cada enzima. Se midió la actividad de tres enzimas celulolíticas (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa) y tres ligninolíticas (MnP, LiP y Lacasa) del micelio extendido en agar PDA a los 21 días de incubación (90% de colonización) por método espectrofotométrico.

Para la determinación de actividad enzimática de *G. frondosa* sobre sustratos (dos formulaciones con residuos orgánicos naturales) se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado a dos vías. El primer factor fue el sustrato a dos niveles (sustrato aserrín de roble y sustrato con la mezcla de aserrín de roble y borra), el segundo factor fue el tiempo a cuatro niveles (20, 30, 45 y 75 días de incubación), la variable de respuesta fue la actividad enzimática en (UE/min. g sustrato seco). Cada tratamiento tuvo diez repeticiones.

El tamaño de los experimentos (10 sustratos, de 10 kg cada uno, empacados en bolsas de 1 kg) para la obtención de muestras de cada una de las mediciones en laboratorio y en las diferentes etapas de desarrollo del hongo, fueron seleccionados teniendo en cuenta que el crecimiento del mismo es lento comparativamente con el desarrollo de otros organismos (tiempo total de proceso, 107 días, aproximadamente hasta obtención de segundo carpóforo), generándose restricciones adicionales por los altos costos en los que se incurre para llevar a cabo todo el proceso de producción necesario del hongo y los generados para las determinaciones de laboratorio.

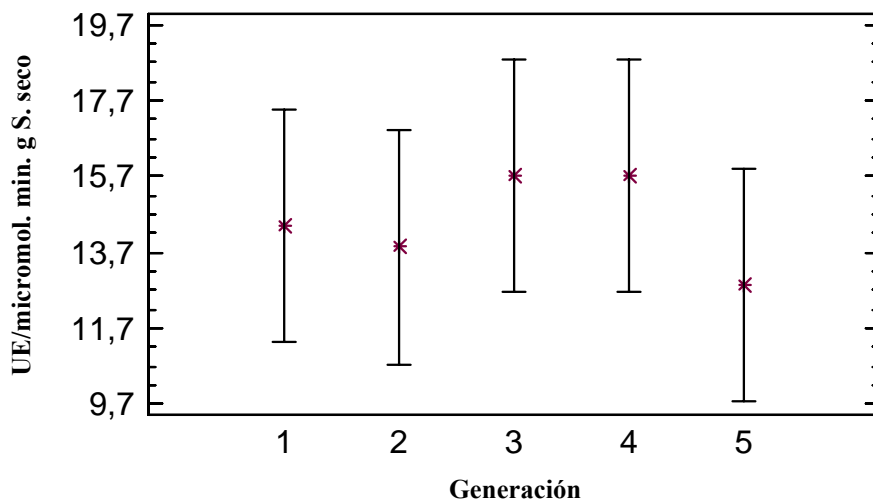
La actividad enzimática para la fase productiva del hongo no se analizó mediante diseño experimental, debido a que la fructificación del *G. frondosa* se inhibe por la presencia de borra de café en el sustrato (Montoya *et al.*, 2007), de tal forma que se obtuvieron cuerpos

fructíferos solamente del sustrato formulado con aserrín de roble. Por lo tanto, únicamente se describieron los hallazgos.

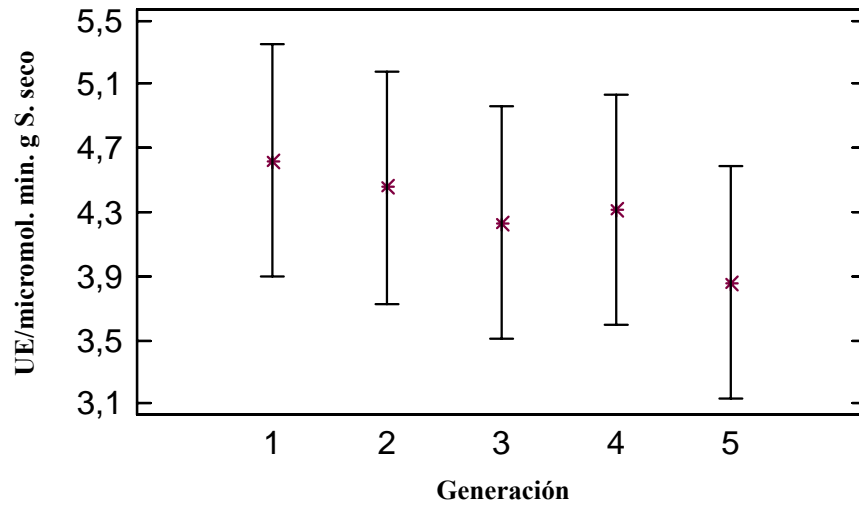
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Cuantificación de la actividad enzimática celulolítica y ligninolítica del macromiceto *G. frondosa*

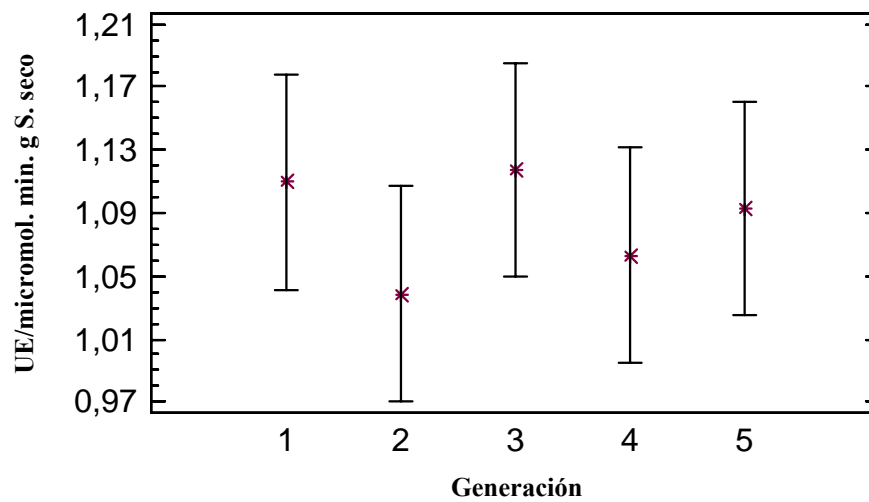
De las medidas experimentales para las enzimas endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, lacasa y MnP se encontró que no existe diferencia significativa entre los niveles del factor, es decir que la multiplicación de la cepa no afecta la actividad enzimática de la misma, al menos hasta la quinta generación, como se muestra en las Gráficas 1 a 5 en las que los intervalos de confianza se traslapan. En la tabla 2 se muestran los valores de los p-valor que indican la no existencia de diferencia significativa entre los niveles del factor y las actividades enzimáticas promedio para cada enzima, en la que puede observarse que para el micelio del hongo *G. frondosa* sobre agar PDA la enzima que presentó mayor actividad fue la endoglucanasa con 14,51 UE($\mu\text{mol/g S. seco. min}$) y la de menor actividad fue la β -glucosidasa con una actividad promedio de 1,0845 UE($\mu\text{mol/g S. seco. min}$). Además en la tabla 1 también se presenta la actividad enzimática promedio de la enzima endoxilanasasa 8,4 UE($\mu\text{mol/g S. seco. min}$), medida como prueba de que en los hongos de pudrición blanca la actividad de las xilanasas se presentan conjuntamente tanto con las enzimas celulolíticas, como con ligninolíticas.



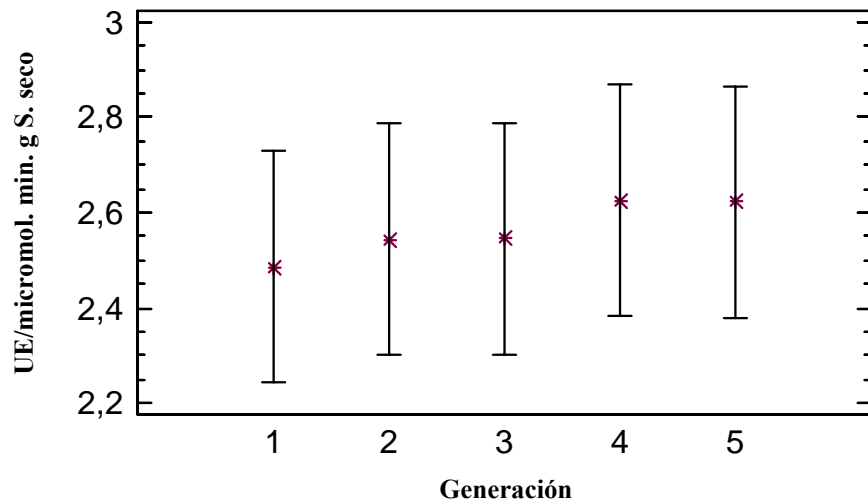
Gráfica 1. Fluctuación de la actividad enzimática endoglucanasa en cinco generaciones de *G. frondosa* sobre agar PDA (90% de colonización)



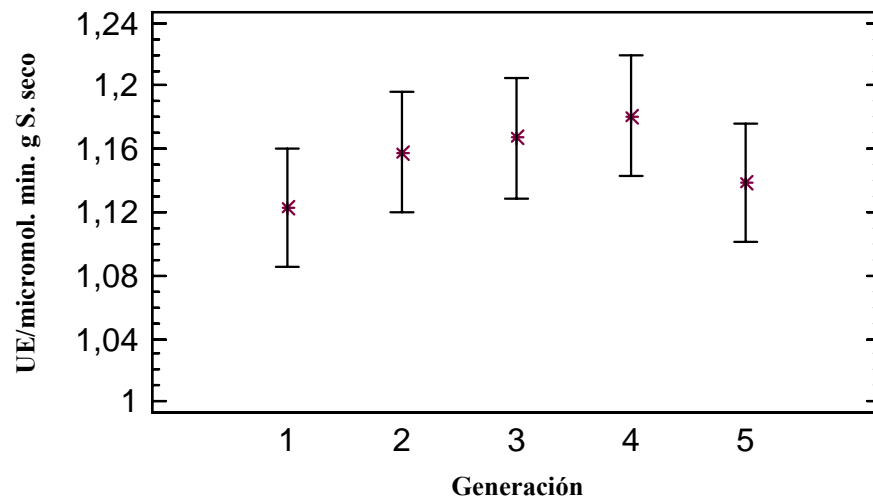
Gráfica 2. Fluctuación de la actividad enzimática exoglucanasa en cinco generaciones de *G. frondosa* sobre agar PDA (90% de colonización)



Gráfica 3. Fluctuación de la actividad enzimática β -glucosidasa en cinco generaciones de *G. frondosa* sobre agar PDA (90% de colonización)



Gráfica 4. Fluctuación de la actividad enzimática lacasa en cinco generaciones de *G. frondosa* sobre agar PDA (90% de colonización)



Gráfica 5. Fluctuación de la actividad enzimática de la Manganese-peroxidasa en cinco generaciones de *G. frondosa* sobre agar PDA (90% de colonización)

Tabla 2. Variación de la actividad enzimática promedio del micelio de *G. frondosa* sobre agar PDA (90% de colonización)

Enzima	p-valor	Actividad enzimática promedio UE(μ mol/g S. seco. min)
Endoglucanasa	0,8269	14,5100
Exoglucanasa	0,8361	4,2960
B-Glucosidasa	0,7150	1,0845
MnP	0,5249	1,1535
Lacasa	0,9657	2,5649
Endoxilanasas	-	8,4000

La lignin-peroxidasa (LiP) no presentó actividad enzimática en este estado (micelio sobre agar PDA) del hongo *G. frondosa*. La LiP es una enzima peroxidasa producto del metabolismo secundario de los hongos de pudrición blanca y su producción suele requerir de la presencia de inductores tales como compuestos aromáticos, entre ellos el alcohol veratrílico (p-dimetoxifenol, el cual a su vez es un metabolito secundario de estos hongos (Schoemaker & Piontek, 1996)). Las preparaciones que contienen lignina también se mencionan como eficientes inductoras de ligninasas. La LiP probablemente no manifiesta actividad enzimática en la fase micelial sobre agar PDA, debido a que en ese medio no están presentes sustancias como lignina (componente del aserrín de madera) y/u otras, que inducen a la producción de esta enzima.

Debido a que el resultado arrojado por el análisis de varianza a una sola vía realizado anteriormente, mostró que no hubo diferencia significativa en ninguna actividad enzimática para las cinco generaciones estudiadas. Se decidió comparar la actividad entre las enzimas, considerando los 20 datos de actividad medidos para cada una de ellas (cuatro por generación). Reuniendo para cada una de ellas todas las generaciones. Al utilizar este procedimiento comparativo de actividades entre enzimas se encontró que no existía normalidad en los datos (p-valor = 0), ni homocedasticidad (p-valor = 0), lo que invalidó el procedimiento paramétrico. Por tal razón y ante la dificultad de transformar los datos, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, encontrando diferencia significativa es decir, p-valor < 0,05 entre las actividades enzimáticas medias para las diferentes enzimas. Posteriormente para comprobar cuál de las enzimas de estudio presentó la mayor y menor actividad enzimática en medio de agar PDA, se realizó la prueba de comparación por pares utilizando los rangos de Dunn (Díaz, 1999) encontrando que, para el hongo *G. frondosa*, las enzimas de mayor actividad en medio de agar PDA fueron la endoglucanasa y la endoglucanasa, mientras que la que presentó menor actividad enzimática fue la β -glucosidasa.

5.2. Evaluación de la capacidad de degradación del macromiceto *G. frondosa* sobre dos residuos sólidos seleccionados.

La concentración de las enzimas, reactantes y productos varían en el medio y se ve afectada no solamente por la composición química, sino por las características físicas de los materiales; las cuales inciden directamente en el contacto íntimo de la hifa con el sustrato necesarios para que inicie la degradación (Blanchette, 1995 y Carlile *et al.*, 2001).

La capacidad de degradación del macromiceto *G. frondosa* fue determinada por la acción del hongo sobre los dos tipos de sustratos formulados descritos anteriormente a diferentes tiempos de incubación. A los sustratos incubados se les midió la actividad enzimática y la

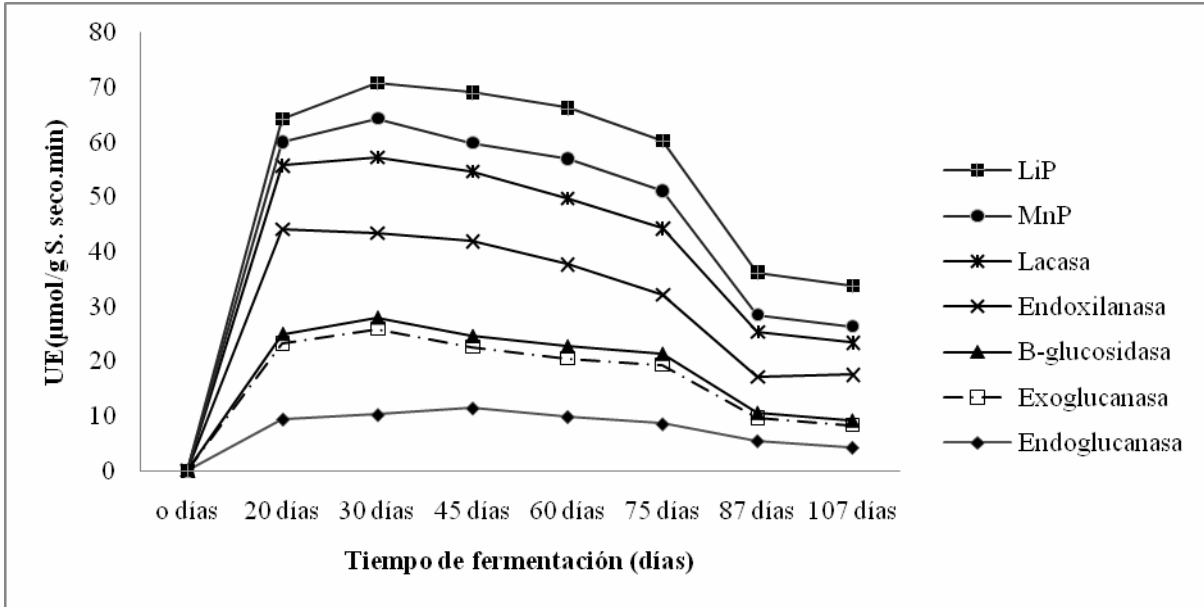
variación en la composición de las sustancias hidrocarbonadas como azúcares reductores, almidones, sacarosa y los componentes diferenciados de la fibra como celulosa, hemicelulosa y lignina. Todas estas determinaciones se realizaron en cinco tiempos de incubación, 20, 30, 45, 60 y 75 días. Para las actividades enzimáticas se realizó un diseño experimental completamente aleatorio a dos vías, el primer factor fue el sustrato a dos niveles (sustrato de aserrín de roble y sustrato de aserrín de roble y borra), el segundo factor fue el tiempo a cinco niveles (20, 30, 45, 60 y 75 días de incubación), y la actividad enzimática en UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) como variable de respuesta. Se encontró que la actividad de las tres enzimas celulolíticas, tres ligninolíticas y la endoxilanasas presentan diferencia significativa de cada uno de los factores, ya que los p-valores fueron menores a 0,05 para todos los casos, indicando que los factores sustrato y tiempo de incubación tienen efecto significativo sobre la actividad enzimática con un nivel de significancia de 95%.

5.2.1. Actividad enzimática de *G. frondosa* en dos formulaciones de sustratos

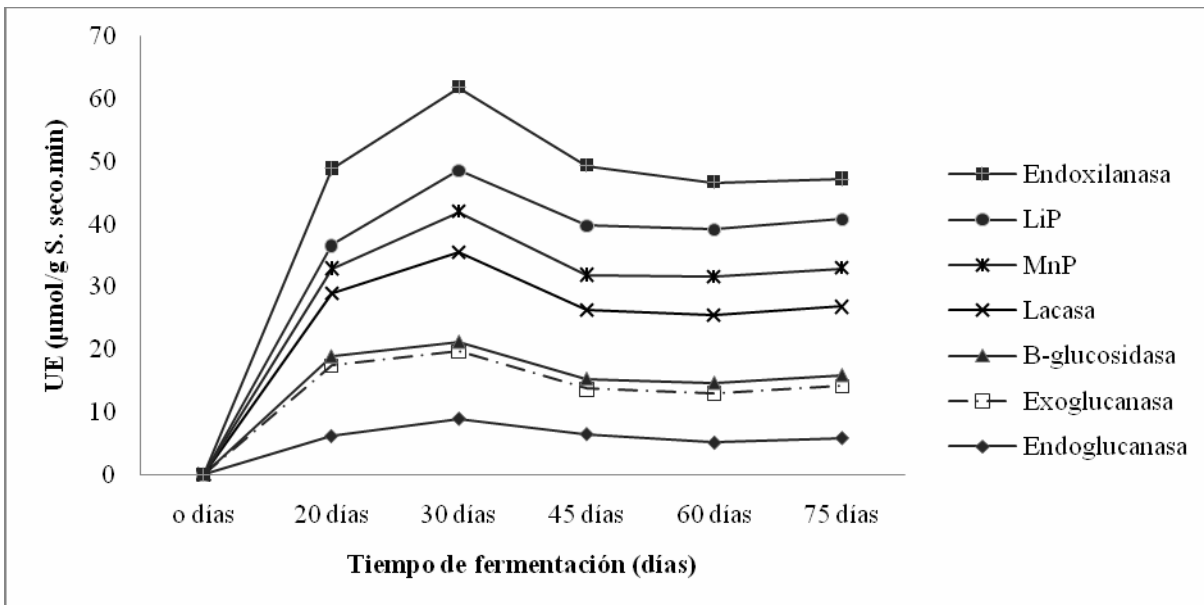
La actividad enzimática medida en el tiempo total de fermentación para las dos formulaciones de sustrato seleccionadas fue medida para el sustrato de aserrín de roble hasta el día 107, que correspondió al final del período de la segunda cosecha del carpóforo, mientras que para los sustratos que contenían borra de café en la formulación se determinó la actividad enzimática hasta el día 75 de la fermentación, correspondiente al tiempo de inducción de primordios, puesto que esta formulación no forma basidiomas. En las gráficas 6 y 7 se muestran todas las actividades enzimáticas para cada una de las formulaciones de sustratos de estudio. En ambas gráficas se observa una evolución temporal similar de las actividades de las enzimas estudiadas. Es así como la actividad de estas enzimas crece sostenida y rápidamente hasta el día 30; a partir de allí hay una disminución lenta de las actividades. En el caso del primer sustrato (Gráfica 6) esta disminución de actividad se acentúa a partir del día 75. Para el segundo sustrato la mengua de las actividades enzimáticas después del día 30 se da hasta un momento situado entre el período 45-50 días; a partir de allí cada actividad enzimática parece estabilizarse hasta el día 75.

Puesto que la actividad enzimática está asociada a los requerimientos nutricionales del hongo para su desarrollo, se cree que la disminución acentuada sobre el sustrato rico en aserrín de roble corresponde a un cambio metabólico relacionado con la fase de fructificación del hongo *G. frondosa* en ese medio. El hecho de que en el sustrato suplementado con borra de café (Gráfica 7) no se dio esta fase, la escasa disminución de la actividad de las enzimas detectada en el periodo de estudio parece corroborar esta hipótesis.

Por último la actividad enzimática que se observa (gráficas 5 y 6) en todos los tiempos de fermentación del *G. frondosa* sobre las dos formulaciones de sustratos demuestra la especialización de los hongos de pudrición blanca para degradar celulosa y lignina.



Gráfica 6. Progreso de la actividad enzimática del hongo *G. frondosa* en el tiempo total de fermentación para los sustratos de formulación de aserrín de roble.



Gráfica 7. Progreso de la actividad enzimática del hongo *G. frondosa* en el tiempo total de fermentación para los sustratos de formulación de aserrín de roble y borra de café.

5.2.1.1. Actividad de enzimas celulolíticas y endoxilanasas

Las tres actividades del complejo celulolítico (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa) y la endoxilanasas, presentan un comportamiento relacionado probablemente porque el hongo dentro de sus requerimientos nutricionales prefiere la celulosa y hemicelulosa como fuentes de energía. Los basidiomicetos sintetizan celulasas y xilanasas en presencia de celulosa, lo que da como consecuencia que en el medio se encuentre permanentemente celulasas y endoxilanasas.

La producción de endoglucanasa, exoglucanasa y endoxilanasas es menor en el medio con aserrín de roble y borra de café, lo que podría atribuirse a un efecto inhibitorio en la síntesis enzimática por algún compuesto presente en la borra del café, que sin embargo no afecta la síntesis de las otras enzimas, ya que los títulos medidos de las enzimas ligninolíticas y de la β -glucosidasa son semejantes en ambos medios.

i) Actividad de enzima endoglucanasa

La variación de actividad de la enzima endoglucanasa en las dos diferentes formulaciones de sustratos en los cuatro tiempos de incubación se muestran en la Gráfica 8, evidenciándose la mayor actividad del hongo *G. frondosa* sobre el sustrato de aserrín de roble, con un máximo promedio de actividad en el día 45 de incubación de 11,454 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min); por el contrario la actividad promedio mínima se encontró para el sustrato de aserrín de roble y borra de café a los 75 días de incubación con un valor promedio de 5,788 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min). El hongo muestra actividades máximas de endoglucanasa a diferentes tiempos de incubación para las dos formulaciones de sustratos, mientras que para el sustrato de aserrín de roble la actividad máxima promedio fue a los 45 días, para la formulación de aserrín de roble y borra de café fue a los 30 días. La cinética de producción enzimática pudo verse afectada por la composición del sustrato. La mínima actividad enzimática promedio se registró a los 75 días de incubación para ambas formulaciones.

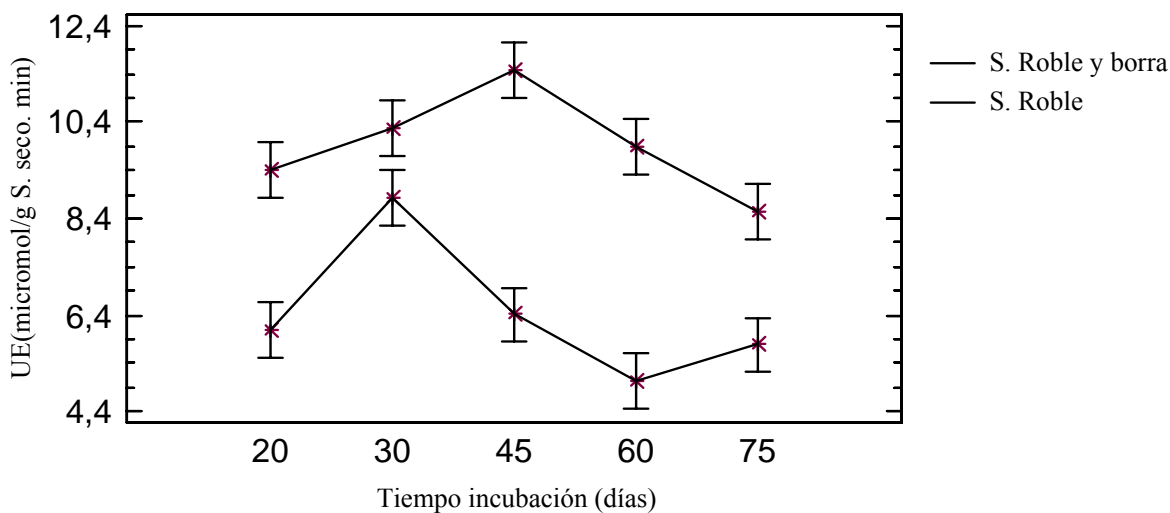
En la tabla 3 se muestran los intervalos de actividad enzimática de la endoglucanasa para cada uno de los sustratos en los cinco tiempos de incubación. Por ejemplo para el sustrato de aserrín de roble y borra de café y 20 días de incubación la actividad enzimática estará entre 5,28983 y 6,90277 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) con un intervalo de confianza del 95%.

Los datos obtenidos de actividad de endoglucanasa son coherentes con el modo de acción de la misma; puesto que ésta produce una disminución sobre el grado de polimerización de

la celulosa especialmente en la sección amorfa (zonas internas de la estructura polimérica), y el análisis demuestra una mayor actividad en la primera parte del período de incubación (aproximadamente hasta el día 45). Finalmente la enzima presentó una caída en la actividad (para ambas formulaciones de sustrato) posterior a los 45 días de incubación, coincidiendo con el período de formación del abrigo micelial y la cercanía al final de la fase vegetativa y el momento para la inducción de primordios.

Tabla 3. Actividad máxima y mínima de la endoglucanasa UE($\mu\text{mol}/\text{min. g sustrato seco}$) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)

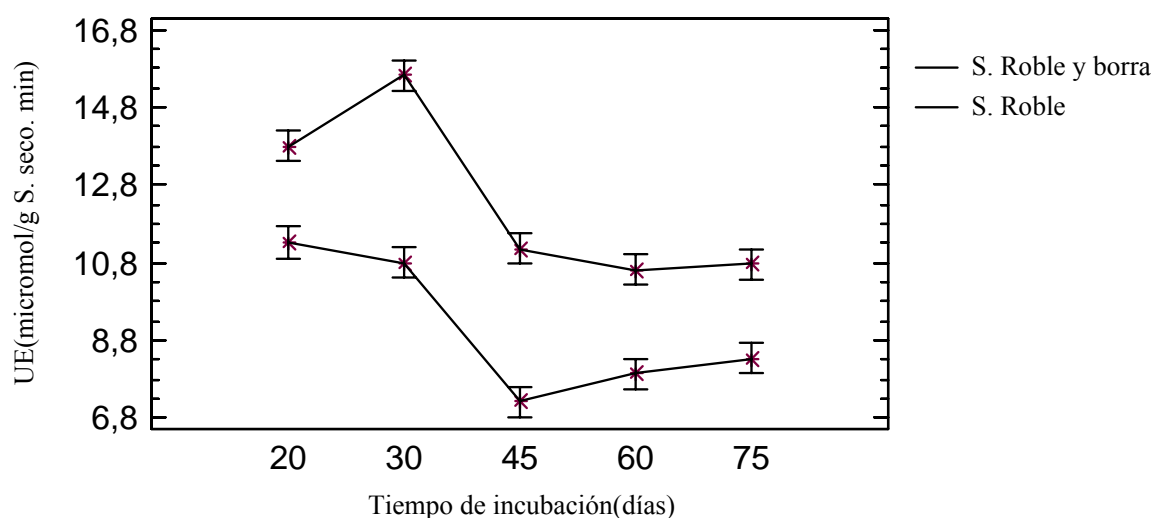
Sustrato	Tiempo de incubación	Límite inferior actividad de endoglucanasa	Límite superior actividad de endoglucanasa
Aserrín de roble	20	8,61873	10,2317
Aserrín de roble	30	9,45083	11,0638
Aserrín de roble	45	10,6474	12,2604
Aserrín de roble	60	9,08443	10,6974
Aserrín de roble	75	7,75133	9,36427
Aserrín de roble y borra de café	20	5,28983	6,90277
Aserrín de roble y borra de café	30	8,04263	9,65557
Aserrín de roble y borra de café	45	5,60483	7,21777
Aserrín de roble y borra de café	60	4,24403	5,85697
Aserrín de roble y borra de café	75	4,98133	6,59427



Gráfica 8. Variación de la actividad de la enzima endoglucanasa en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato (sustrato con aserrín de roble y sustrato con aserrín de roble y borra de café)

ii) Actividad de exoglucanasa

La actividad de la enzima exoglucanasa en el tiempo total de incubación para las dos formulaciones de sustrato presenta la misma tendencia con respecto al tiempo. Hacia los 30 días de incubación ambas formulaciones de sustrato presentan un máximo en la actividad como se observa en la gráfica 9. En la que también se reflejan los puntos mínimos de actividad sobre el día 45 de incubación, con un leve incremento cuando se acerca al día 75 de incubación. De nuevo, el hongo *G. frondosa* presenta mayor actividad de exoglucanasa sobre los sustratos de aserrín de roble con un promedio de 12, 8352 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min), mientras que para el sustrato de aserrín de roble y borra de café se presenta una actividad promedio de 9,42755 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) para todo el período de incubación.



Gráfica 9. Variación de la actividad de la enzima exoglucanasa en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato (sustrato con aserrín de roble y sustrato con aserrín de roble y borra de café)

Los intervalos de actividad enzimática de la exoglucanasa para cada uno de los sustratos en los cinco tiempos de incubación se muestran en la tabla 4. Indicando por ejemplo que para el sustrato de aserrín de roble y 30 días de incubación con una confianza del 95% la actividad enzimática estará entre 15,0825 y 16,1889 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min).

En la fase experimental los datos obtenidos de actividad de exoglucanasa están relacionados con el modo de acción de la misma; ya que ésta genera principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado. Produciendo unidades de glucosa y celobiosa. El comportamiento de esta enzima

demuestra una mayor actividad en los primeros 30 días de incubación, período correspondiente a la colonización total del sustrato por el micelio del hongo (Montoya *et al.*, 2007), donde probablemente se requiere la mayor cantidad disponible de nutrientes.

Tabla 4. Actividad máxima y mínima de la Exoglucanasa UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)

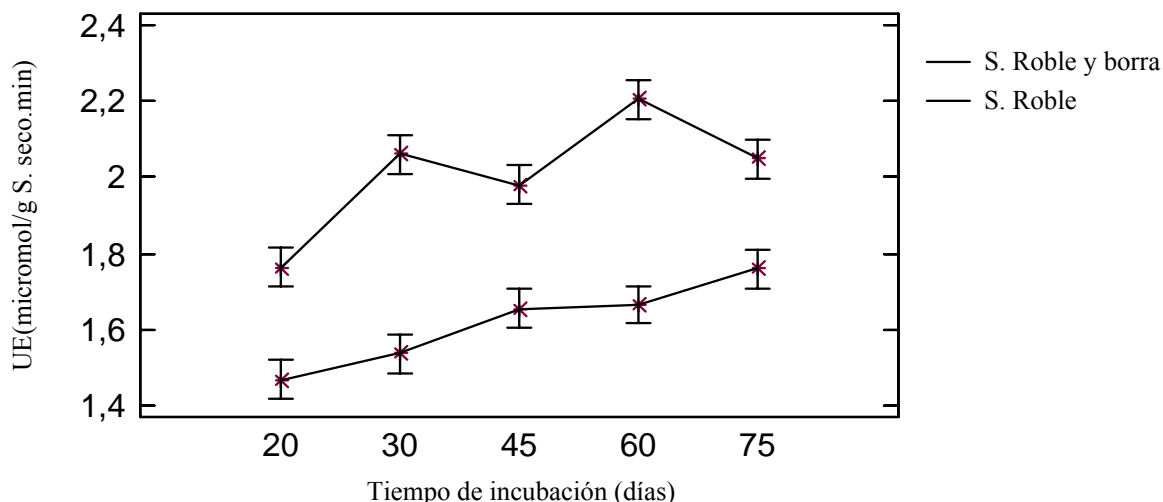
Sustrato	Tiempo de incubación	Límite inferior actividad de exoglucanasa	Límite superior actividad de exoglucanasa
Aserrín de roble	20	13,2402	14,3466
Aserrín de roble	30	15,0825	16,1889
Aserrín de roble	45	10,5911	11,6975
Aserrín de roble	60	10,0702	11,1766
Aserrín de roble	75	10,2141	11,3205
Aserrín de roble y borra de café	20	10,2535	11,3599
Aserrín de roble y borra de café	30	10,1953	11,4181
Aserrín de roble y borra de café	45	6,68232	7,78868
Aserrín de roble y borra de café	60	7,37852	8,48488
Aserrín de roble y borra de café	75	7,79412	8,90048

iii) Actividad de β -glucosidasa

La enzima β -glucosidasa durante todo el período de incubación en las dos formulaciones de sustrato presenta el mismo comportamiento que las dos enzimas anteriores, es decir que la actividad de *G. frondosa* sobre la formulación de aserrín de roble fue siempre superior, con una actividad promedio de 1,97169 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min), mientras que la actividad promedio para la formulación de aserrín de roble y borra de café fue de 1,60624 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) como puede observarse en la gráfica 10. Sin embargo las tendencias de la actividad en las dos formulaciones de sustrato son diferentes; El sustrato de aserrín de roble presenta un pico máximo sobre el día 30 de incubación, mientras que para la formulación de aserrín de roble y borra de café la tendencia de la actividad enzimática es ascendente hasta la culminación del período de incubación (75 días). Este comportamiento se ajusta al modo de acción de la enzima; ya que ésta hidroliza celobiosa y otros β -1,4-oligoglucósidos de cadena corta, para formar glucosa (Moore, 1998). No obstante con el transcurso del tiempo al continuar las endoglucanasa y exoglucanasa actuando sobre el polímero de celulosa, probablemente se incremente la cantidad de celobiosa y otros β -1,4-oligoglucósidos presentes en el medio y esto se manifieste en un incremento de su actividad.

Para los diferentes tiempos de incubación, la enzima β -glucosidasa presenta los límites de actividad sobre las dos formulaciones estudiadas. En la tabla 5 se muestran dichos límites. Por ejemplo para el sustrato de aserrín de roble y borra de café con 45 días de incubación la

actividad enzimática estará entre 1,5859 y 1,7273 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) con una confianza del 95%.



Gráfica 10. Variación de la actividad de la enzima β -glucosidasa en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato (sustrato con aserrín de roble y sustrato con aserrín de roble y borra de café)

Tabla 5. Actividad máxima y mínima de la β -glucosidasa UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)

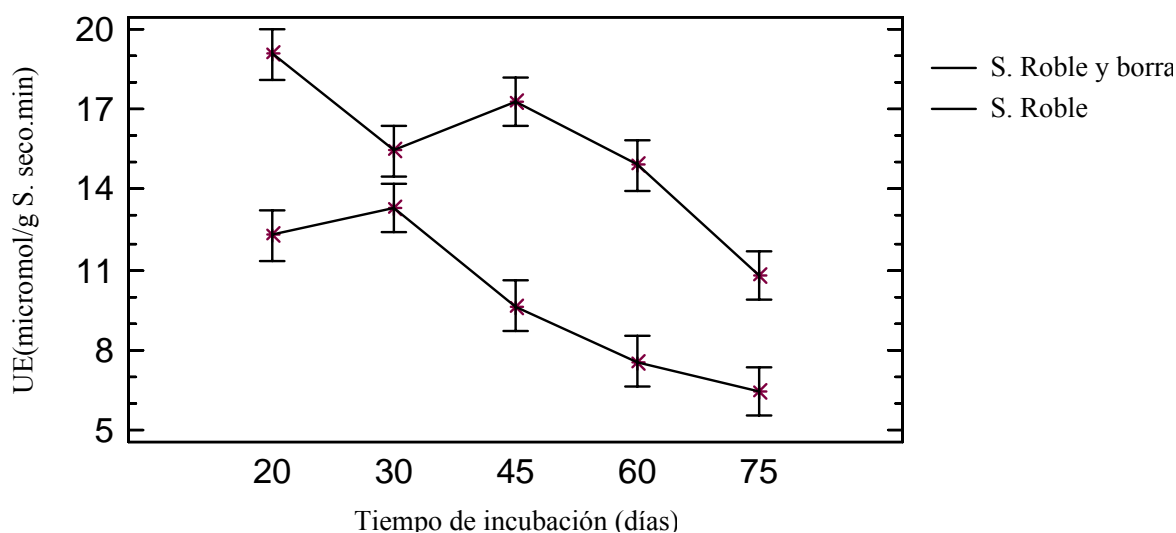
Sustrato	Tiempo de incubación	Límite inferior actividad de β -glucosidasa	Límite superior actividad de β -glucosidasa
Aserrín de roble	20	1,69395	1,83535
Aserrín de roble	30	1,98984	2,13124
Aserrín de roble	45	1,90883	2,05023
Aserrín de roble	60	2,13418	2,27558
Aserrín de roble	75	1,97686	2,11826
Aserrín de roble y borra de café	20	1,39922	1,54062
Aserrín de roble y borra de café	30	1,4673	1,6087
Aserrín de roble y borra de café	45	1,5859	1,7273
Aserrín de roble y borra de café	60	1,59528	1,73668
Aserrín de roble y borra de café	75	1,68975	1,83115

iv) *Actividad de endoxilanas*

La enzima endoxilanas, al igual que las tres enzimas celulolíticas analizadas anteriormente, presenta comportamiento similar durante todo el período de incubación en las dos formulaciones de sustrato, es decir que la actividad de *G. frondosa* sobre la formulación de aserrín de roble fue siempre superior, con una actividad enzimática promedio de 15,4832 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min), mientras que la actividad enzimática

promedio para la formulación de aserrín de roble y borra de café fue de 9,864 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) como se observa en la gráfica 11. La máxima actividad enzimática de la endoxilanasas se refleja hacia el día 20 de incubación para el sustrato de aserrín de roble, comportamiento coherente con el hecho de que las hemicelulosas son la principal fuente inicial de nutrientes en el proceso de degradación fúngica (mas que la celulosa, de mas difícil acceso y estructura mas compleja). Mientras que la menor actividad fue encontrada en el día 75 de incubación para el sustrato de aserrín de roble y borra de café.

El comportamiento de la endoxilanasas se ajusta al modo de operación de los hongos filamentosos; ya que las hemicelulosas cubren y unen a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. La corta extensión de las cadenas que incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas, explicaría porqué este polímero está entre los primeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de pudrición (Zabel & Morrel, 1992).



Gráfica 11. Variación de la actividad de la enzima Endoxilanasas en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato (sustrato con aserrín de roble y sustrato con aserrín de roble y borra de café)

En la tabla 6 se presentan los valores máximos y mínimos de actividades enzimáticas de endoxilanasas para los diferentes tiempos de incubación y las dos formulaciones de sustrato analizadas con un grado de confiabilidad del 95%. Por ejemplo para el sustrato de aserrín de roble y borra de café con 60 días de incubación la actividad enzimática estará entre 6,28647 y 8,89553 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min).

Tabla 6. Actividad máxima y mínima de la Endoxilanasas UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)

Sustrato	Tiempo de incubación	Límite inferior actividad de Endoxilanasas	Límite superior actividad de Endoxilanasas
Aserrín de roble	20	17,7275	20,3365
Aserrín de roble	30	14,1425	16,7515
Aserrín de roble	45	15,9525	18,5615
Aserrín de roble	60	13,5905	16,1995
Aserrín de roble	75	9,48047	12,0895
Aserrín de roble y borra de café	20	10,9835	13,5925
Aserrín de roble y borra de café	30	12,0145	14,6235
Aserrín de roble y borra de café	45	8,34047	10,9495
Aserrín de roble y borra de café	60	6,28647	8,89553
Aserrín de roble y borra de café	75	5,17247	7,78153

5.2.1.2 Actividad de enzimas Ligninolíticas

Los hongos de pudrición blanca degradan celulosa y lignina, aclarando los medios de cultivo sobre los que se desarrollan y esto es lo que se observó durante la colonización del sustrato por *G. frondosa*, como se observa en la figura 11. Hay algunos hongos que atacan primero la lignina y luego la celulosa, lo que es denominado delignificación selectiva (Carlile *et al.*, 2001); sin embargo no parece ser el caso de *G. frondosa*, debido a que los resultados de actividad enzimática obtenidos en el tiempo de incubación muestran una alta actividad de las enzimas celulolíticas desde el inicio de la incubación, junto a las actividades de las enzimas ligninolíticas.



Figura 11. Sección de sustrato de aserrín de roble con 75 días de incubación

En el sustrato, la pared celular lignificada es progresivamente degradada del interior al exterior. En este proceso la hifa se desarrolla dentro de las células de la madera, produciendo enzimas (celulolíticas, xilanolíticas y ligninolíticas) y también desarrollando

durante la lignólisis una funda mucilaginoso extracelular, asociada al contacto íntimo de la hifa con el sustrato (Schoemaker & Piontek, 1996). La reacción oxidativa provocada por las enzimas LiP y MnP requiere de la presencia de peróxido de hidrógeno, las cuales actúan liberando radicales libres; es decir el sustrato es bombardeado por estos radicales. Se considera que el peróxido de hidrógeno es producido por la oxidación de glioxalato, glucosa o alcohol a través del sistema enzimático del hongo. Esta explicación para el ruptura de ambos polímeros, celulosa y lignina es importante, porque explica el contacto entre la hifa y el sustrato. Los sustratos hidrocarbonados son requeridos para el desarrollo adecuado de los hongos, sin embargo el agotamiento del nitrógeno induce la lignólisis (Berovic, 2007, Carlile *et al.*, 2001, Eriksson *et al.*, 1990 y Leonowicz *et al.*, 1999).

En esta investigación las formulaciones de los sustratos de aserrín de roble y de aserrín de roble y borra de café se realizaron con cantidades muy bajas de nitrógeno 0,23% y 0,7% respectivamente. En las gráficas 12 a 14 se muestran las actividades de las enzimas ligninolíticas lacasa, LiP y MnP.

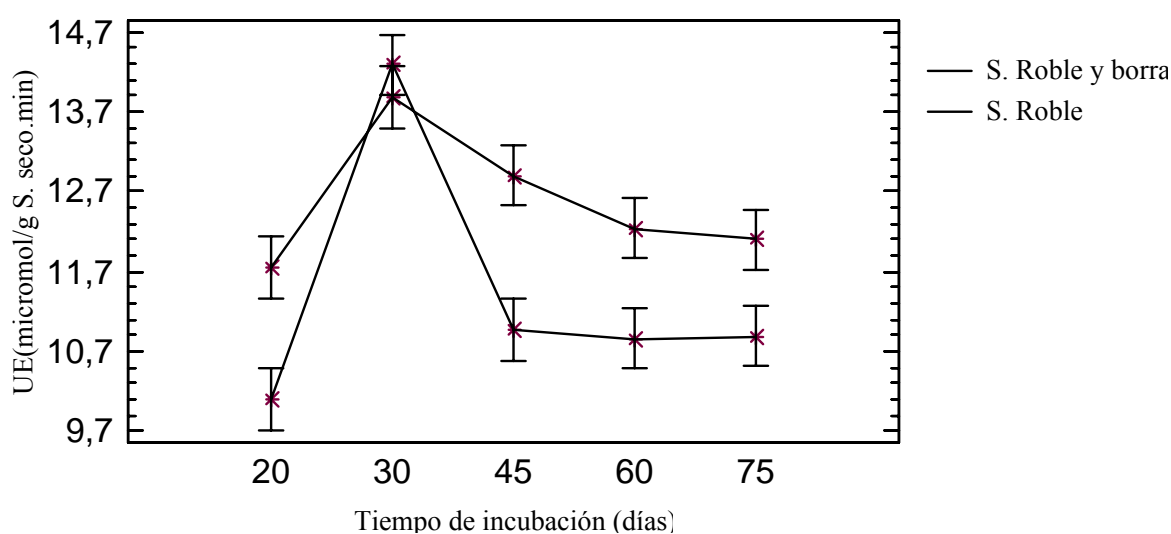
Para este trabajo en particular se refleja en los datos experimentales que la degradación de lignina es ligeramente mayor en el sustrato con aserrín de roble y podría relacionarse con una producción ligeramente mayor de las ligninasas evaluadas, o incluso de otras enzimas no valoradas. Podría asociarse también con un mayor crecimiento producto de la degradación más eficiente de celulosas y hemicelulosas, ya que los títulos de endo, exoglucanasa y endoxilanasas producidos son mayores en el medio sin borra de café y también es mayor la biomasa fúngica.

i) Actividad de la Lacasa

La actividad ligninolítica en hongos causantes de pudrición blanca suele estar ligada a la etapa de crecimiento secundario o idiofase, cuando por agotamiento de nutrientes cesa la etapa de crecimiento activo de estos hongos (trofofase). En particular la síntesis de lignin peroxidasa y Mn-peroxidasa se asocia a la idiofase. La enzima lacasa puede presentarse en la trofofase, pero su producción se incrementa notablemente en la etapa de crecimiento secundario (Levin & Fochiassin, en prensa). En la gráfica 12 se observa un incremento en la actividad de la lacasa en el día 30 de incubación, tiempo en el que aún no culmina la etapa de incubación y en la que el hongo tiene requerimientos energéticos altos. En cambio como puede observarse en la gráfica 14 la actividad lignin peroxidasa aumenta hacia el final del período de cultivo.

La enzima lacasa en ambas formulaciones de sustrato presentó una tendencia similar, ya que la enzima manifestó un pico máximo de actividad en el día 30 de incubación, empero,

contrariamente al comportamiento observado de las enzimas celulolíticas, no se cumplió que durante todo el período de incubación la actividad fuera mayor para la formulación de aserrín de roble, ya que en el día 30 de incubación la actividad fue superior para la formulación de aserrín de roble y borra de café como se puede observar en la gráfica 12. Sin embargo la actividad promedio de la lacasa fue mayor para los sustratos de aserrín de roble, con una actividad promedio de 12,571 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min), frente a un promedio de actividad para los sustratos de aserrín de roble y borra de café de 11,4227 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min).



Gráfica 12. Variación de la actividad de la enzima Lacasa en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato (sustrato con aserrín de roble y sustrato con aserrín de roble y borra de café)

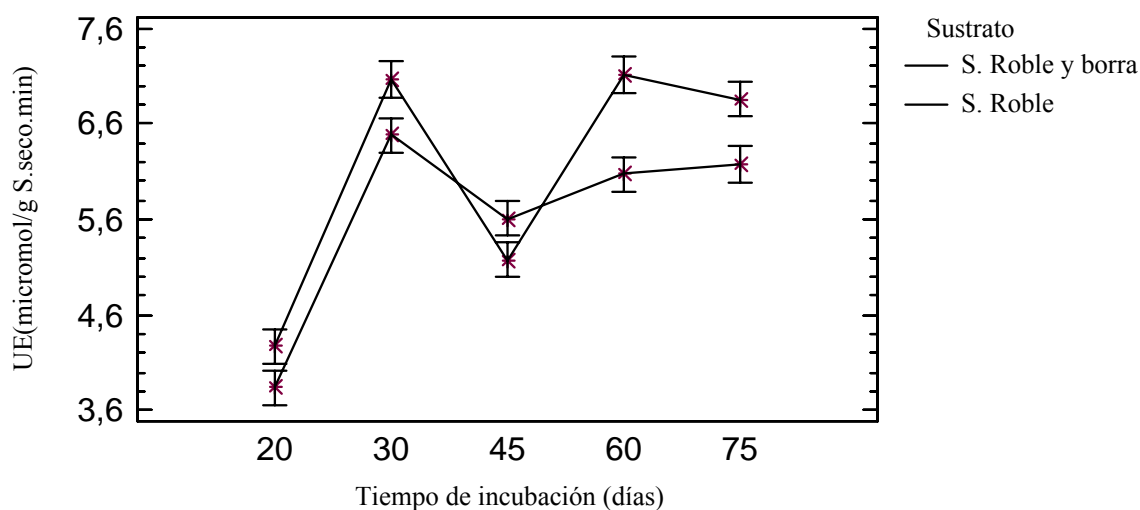
Tabla 7. Actividad máxima y mínima de la Lacasa UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)

Sustrato	Tiempo de incubación	Límite inferior actividad de Lacasa	Límite superior actividad de Lacasa
Aserrín de roble	20	11,1941	12,2855
Aserrín de roble	30	13,3273	14,4187
Aserrín de roble	45	12,3563	13,4477
Aserrín de roble	60	11,6963	12,7877
Aserrín de roble	75	11,5523	12,6437
Aserrín de roble y borra de café	20	9,56065	10,6521
Aserrín de roble y borra de café	30	13,7403	14,8317
Aserrín de roble y borra de café	45	10,4183	11,5097
Aserrín de roble y borra de café	60	10,3163	11,4077
Aserrín de roble y borra de café	75	10,3493	11,4407

Los límites de actividad de la lacasa encontrados para cada formulación de sustrato y tiempo de incubación se presentan en la tabla 7. En la que, por ejemplo, para sustratos de aserrín de roble con 75 días de incubación, dicha actividad se encuentra entre 11,5523 y 12,6437 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) con una confiabilidad del 95%.

ii) *Actividad de Manganese peroxidasa*

De igual forma que para las enzimas arriba evaluadas, la actividad de la MnP presentó la misma tendencia para las dos formulaciones de sustratos estudiadas; mostrando además, los máximos en los mismos días de incubación. La menor actividad se dio en el día 20 y la máxima coincidió aproximadamente en los días 30 y 60 de incubación para la formulación de aserrín de roble, como puede observarse en la gráfica 13. La presencia de dos máximos de actividad MnP puede deberse a la producción de dos variantes isoenzimáticas. El promedio de actividad de la MnP fue levemente superior para los sustratos de aserrín de roble con 6,09616 UE ($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min), mientras que para los sustratos de aserrín de roble y borra de café fue de 5,63632 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min).



Gráfica 13. Variación de la actividad de la enzima Manganese peroxidasa (MnP) en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato (sustrato con aserrín de roble y sustrato con aserrín de roble y borra de café)

Los límites de actividad de la MnP para cada formulación de sustrato y tiempo de incubación se presentan en la tabla 8. En la que se presentan los límites de la actividad en el tiempo de incubación con una confianza del 95%, por ejemplo, para sustratos de aserrín de roble y borra de café con 60 días de incubación, los límites superior e inferior

espectivamente de actividad encontrados fueron 5,181135 y 6,33565 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min).

Tabla 8. Actividad máxima y mínima de la manganeso peroxidasa UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)

Sustrato	Tiempo de incubación	Límite inferior actividad de MnP	Límite superior actividad de MnP
Aserrín de roble	20	4,01145	4,53575
Aserrín de roble	30	6,79905	7,32335
Aserrín de roble	45	4,91785	5,44215
Aserrín de roble	60	6,84665	7,37095
Aserrín de roble	75	6,59505	7,11935
Aserrín de roble y borra de café	20	3,58005	4,10435
Aserrín de roble y borra de café	30	6,21515	6,73945
Aserrín de roble y borra de café	45	5,34705	5,87135
Aserrín de roble y borra de café	60	5,81135	6,33565
Aserrín de roble y borra de café	75	5,91725	6,44155

iii) Actividad de la Lignin-peroxidasa (LiP)

La LiP es una enzima singular, en cuanto que no es de fácil detección en los diferentes materiales biológicos. En esta investigación se midió la actividad de la LiP al micelio extendido en agar en cinco generaciones y como ya se mencionó antes, no fue detectada actividad enzimática, utilizando el método del alcohol veratrílico (4-dimetoxifenol). Sin embargo la condición de la enzima es la de actuar durante la fase de metabolismo secundario preferiblemente, lo que requirió realizar pruebas adicionales que verificaran realmente si *G. frondosa* produce la enzima LiP. Una prueba cualitativa que de preferencia es utilizada para determinar la presencia o ausencia de la LiP en hongos de pudrición blanca es la decoloración del azure B cuando se inocula micelio del hongo sobre un agar con azure B, en la figura 12 se muestra la prueba cualitativa positiva para LiP de *G. frondosa* después de 22 días de incubación a 25 °C, confirmando así la presencia de la LiP en el hongo de estudio.

Se encontró actividad de LiP en el *G. frondosa* inoculado sobre los sustratos que contenían lignina (proveniente especialmente del aserrín de madera) y no en la fase vegetativa del hongo sobre agar PDA, utilizando el método de alcohol veratrílico. Se evidenció además, una alta actividad al final de la etapa de incubación (ver figura 14), donde la cantidad de nitrógeno disponible es mucho menor que al inicio, confirmandose su manifestación en la fase de metabolismo secundario del hongo.

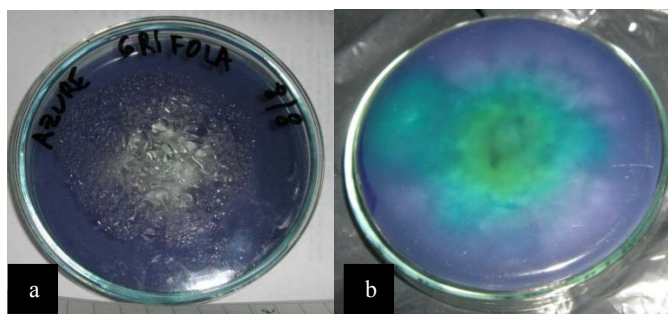
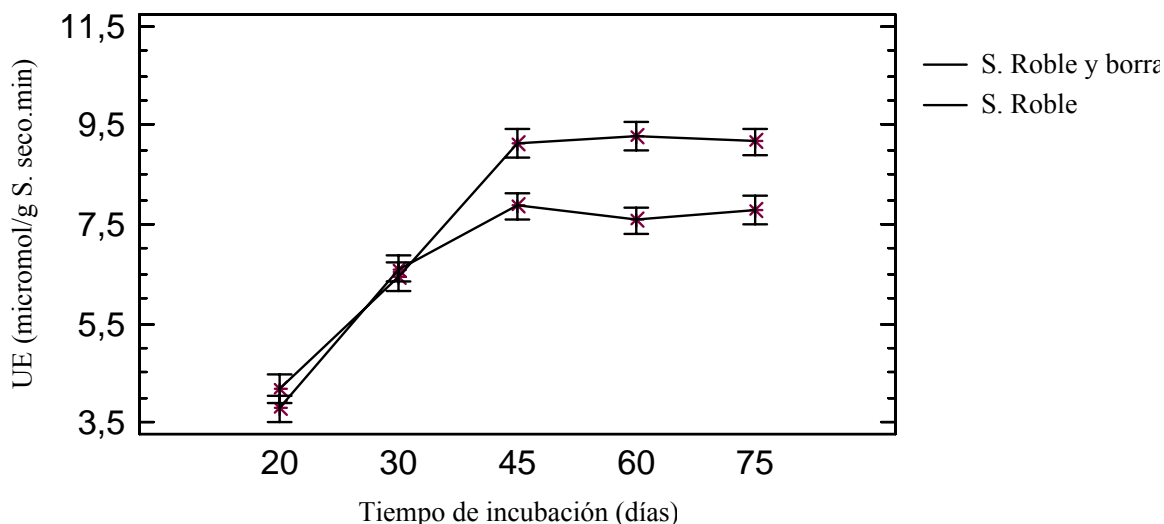


Figura 12. Hongo *G. frondosa* inoculado en agar PDA y azure B: (a) Micelio con ocho días de incubación. (b) Micelio con 22 días de incubación y halo de decoloración del azure B.

Para este trabajo también se encontraron los límites superiores e inferiores de la LiP en cada uno de los tiempos de incubación relacionados y para cada una de las formulaciones de sustratos con una confiabilidad del 95%, los cuales se consignan en la tabla 9. En la que puede observarse, por ejemplo que para sustratos de aserrín de roble con 45 días de incubación, los límites superior e inferior respectivamente de actividad encontrados fueron 8,75062 y 9,51738 UE($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min).

Tabla 9. Actividad máxima y mínima de la Lignin-peroxidasa UE ($\mu\text{mol/g}$ sustrato seco. min) para cada factor (sustrato y tiempo de incubación)

Sustrato	Tiempo de incubación	Límite inferior actividad de LiP	Límite superior actividad de LiP
Aserrín de roble	20	3,80862	4,57538
Aserrín de roble	30	6,06162	6,82838
Aserrín de roble	45	8,75062	9,51738
Aserrín de roble	60	8,89162	9,65838
Aserrín de roble	75	8,77762	9,54438
Aserrín de roble y borra de café	20	3,39762	4,16438
Aserrín de roble y borra de café	30	6,21862	6,98538
Aserrín de roble y borra de café	45	7,48962	8,25638
Aserrín de roble y borra de café	60	7,19562	7,96238
Aserrín de roble y borra de café	75	7,40762	8,17438



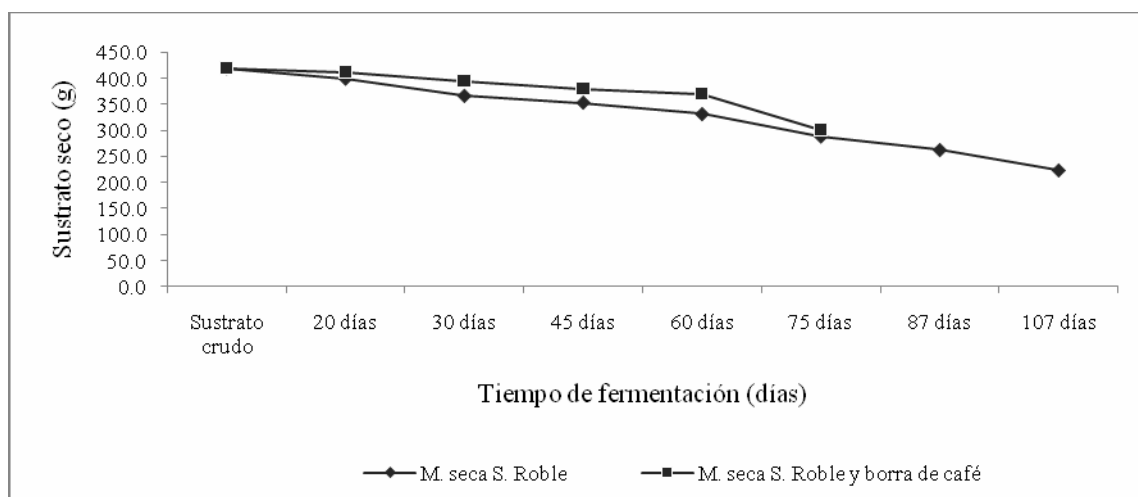
Gráfica 14. Variación de la actividad de la enzima Lignin-peroxidasa (LiP) en cinco tiempos de incubación sobre dos formulaciones de sustrato (sustrato con aserrín de roble y sustrato con aserrín de roble y borra de café)

5.2.2. Capacidad de degradación de *G. frondosa*

La capacidad de degradación del hongo *G. frondosa* fue determinada por la medida de la variación de las sustancias hidrocarbonadas durante la fase total de fermentación. Teniendo en cuenta que para los sustratos de aserrín de roble el tiempo total fue de 107 días y para los sustratos suplementados con borra de café el tiempo para las determinaciones fue de 75 días.

Las sustancias hidrocarbonadas, en especial los carbohidratos son el factor nutricional determinante para suplir las necesidades energéticas en el desarrollo microbiano (Mitchell *et al.*, 2004 y Weng & Sun, 2006). En los macromicetos no es diferente, los carbohidratos son consumidos en cantidades importantes durante toda la etapa de fermentación, la cual cubre todo el desarrollo y cambios durante la fase de incubación, los requerimientos energéticos para fructificación y posterior crecimiento de los cuerpos fructíferos. Dando como resultado una disminución en la materia seca, tal como se refleja en la gráfica 15, en la que se puede observar como disminuye ésta, en el tiempo de fermentación para ambas formulaciones de sustrato. Sin embargo se manifiesta un mayor decrecimiento de la masa seca para la formulación de sustrato con aserrín de roble, que para los sustratos suplementados con borra de café. Hecho concordante con las actividades enzimáticas medidas durante los diferentes tiempos de fermentación para las dos formulaciones (ver gráficas 6 y 7), donde se ha planteado la inhibición de la acción enzimática del hongo *G. frondosa* posiblemente por la presencia de sustancias tóxicas o por cantidades muy altas de

Zn en la borra de café (estas hipótesis son explicadas más ampliamente en la sección 5.3.2. que corresponde a la producción de carpóforos). En las gráficas 16 a 20 se muestra la variación de estas sustancias hidrocarbonadas: almidón y sacarosa, azúcares reductores, celulosa y hemicelulosa, lignina y fibra bruta respectivamente. En las tablas A1-A4 se encuentran las fracciones másicas de almidón y sacarosa, celulosa y hemicelulosa, lignina y fibra bruta en los diferentes tiempos de fermentación.

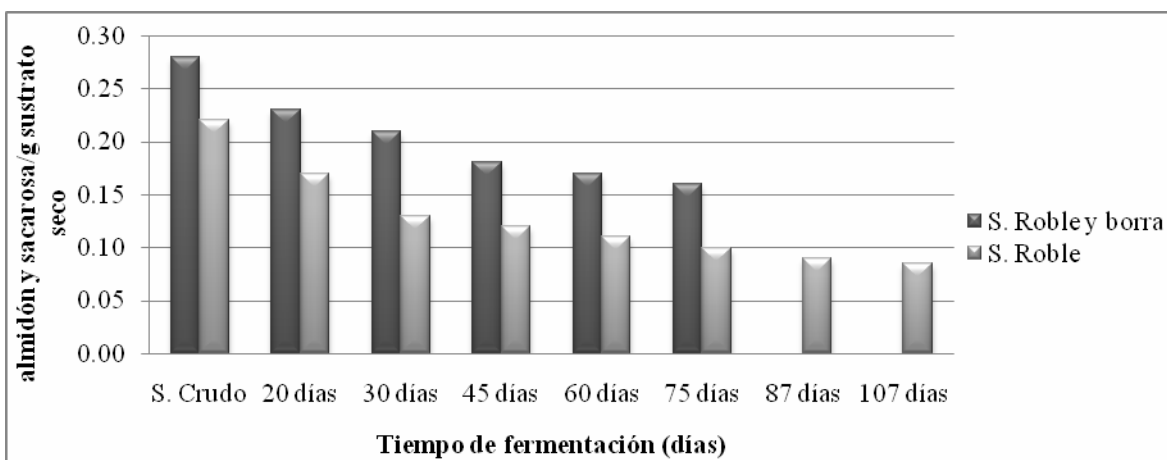


Gráfica 15. Variación de la masa seca en el progreso de la fermentación en estado sólido del hongo *G. frondosa* sobre las dos formulaciones de sustrato propuestas.

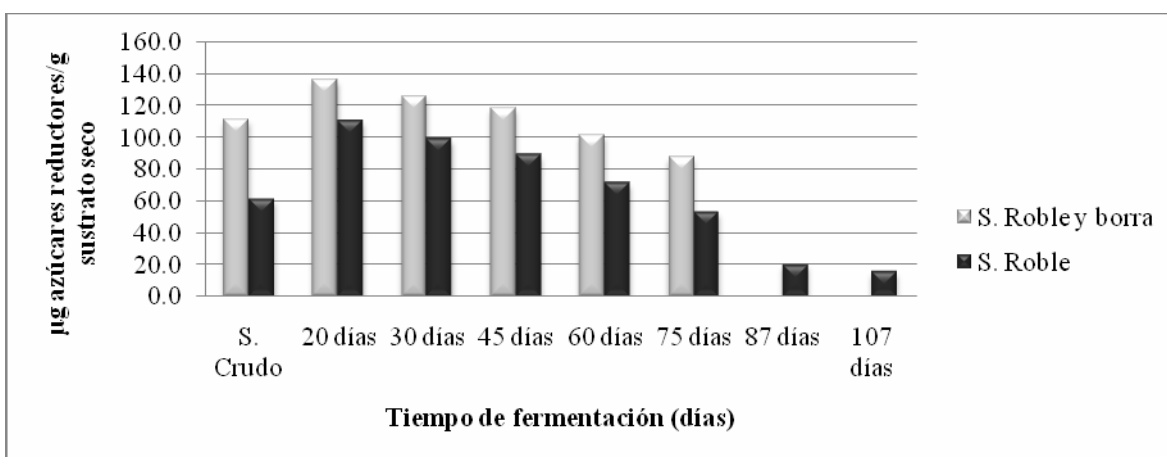
La cantidad de almidón durante el progreso de la incubación disminuye como se muestra en la gráfica 16, debido probablemente a la acción de las enzimas amilolíticas. No se investigó la producción de amilasas en este trabajo, pero su presencia se refleja en la disminución de la cantidad de almidón. Se resalta que la degradación del almidón es muy similar para ambos sustratos hasta los 75 días (fracciones másicas de almidón ver tabla B1). Posteriormente el sustrato de aserrín de madera presenta una disminución importante luego a las dos fructificaciones, quizá por los requerimientos de nutrientes adicionales que requiere el hongo para inducir la fructificación y el desarrollo del mismo carpóforo.

En la gráfica 17 se muestra como cambió la cantidad de azúcares reductores en toda la fase de incubación para ambos sustratos, durante la cual se mantuvo aproximadamente constante la variación para los primeros 45 días de incubación, manifestando una disminución hacia el día 75, tiempo en el que los sustratos están dispuestos para la fructificación. Además pueden observarse las cantidades de azúcares reductores para los sustratos de aserrín de roble posterior a la primera y segunda cosecha. Las cantidades de azúcares reductores presentes en esta fase fueron las esperadas, ya que estos deben ser producto de la actividad

de celulasas, xilanasas y amilasas fúngicas, quién utilizará estos azúcares para su desarrollo.

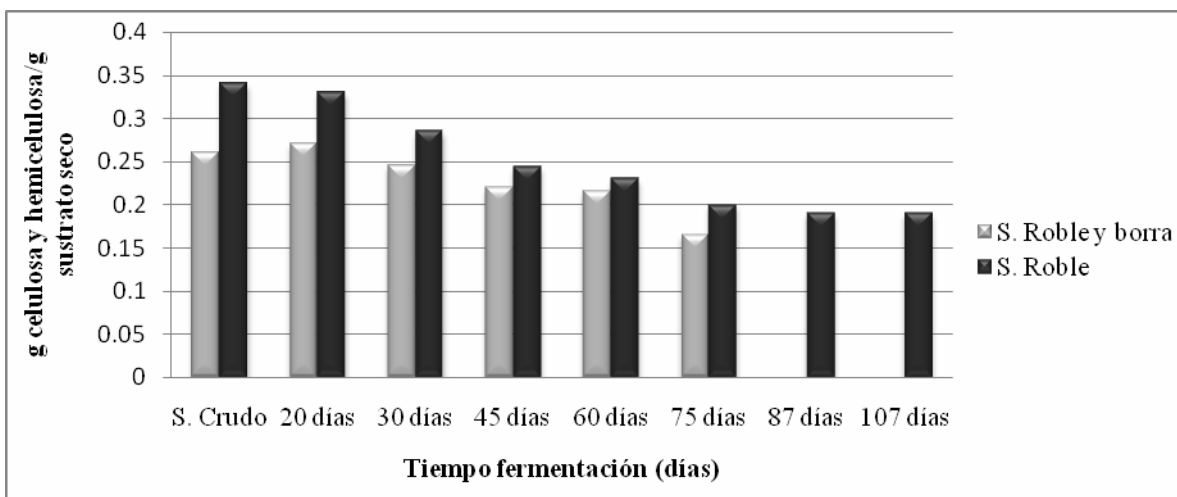


Gráfica 16. Variación en la cantidad de almidón y sacarosa sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble



Gráfica 17. Variación en la cantidad de azúcares reductores sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble

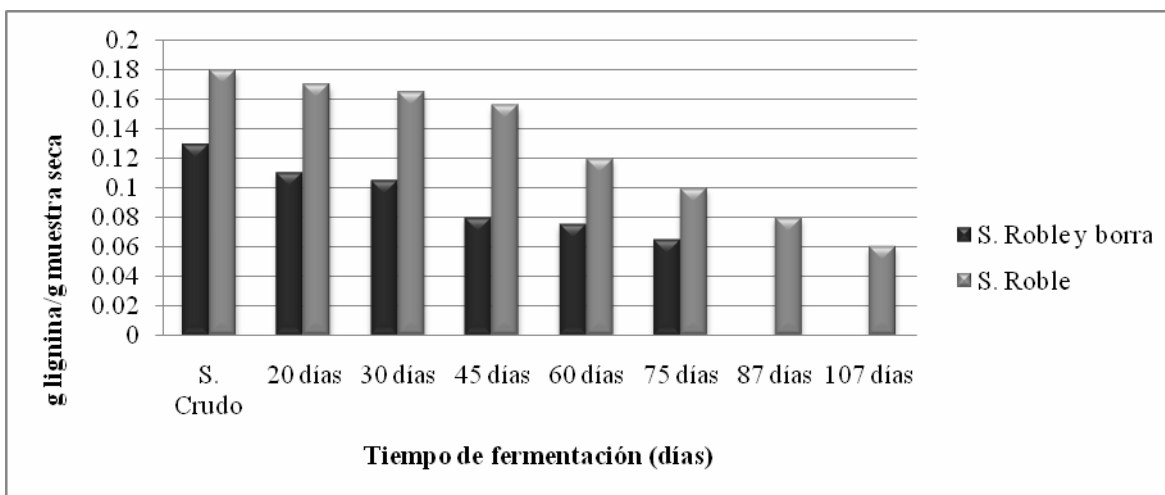
En la gráfica 18 se muestra la variación del contenido celulosa y hemicelulosa en el tiempo de fermentación para ambos sustratos hasta el tiempo de incubación (75 días) y para el sustrato de aserrín de roble hasta después de obtener la segunda cosecha (107 días). Puede observarse que ambos componentes del sustrato son progresivamente degradados por la acción de celulasas y xilanasas fúngicas. En la tabla A2 se muestran las concentraciones másicas de celulosa y hemicelulosa en los dos sustratos durante el tiempo de fermentación.



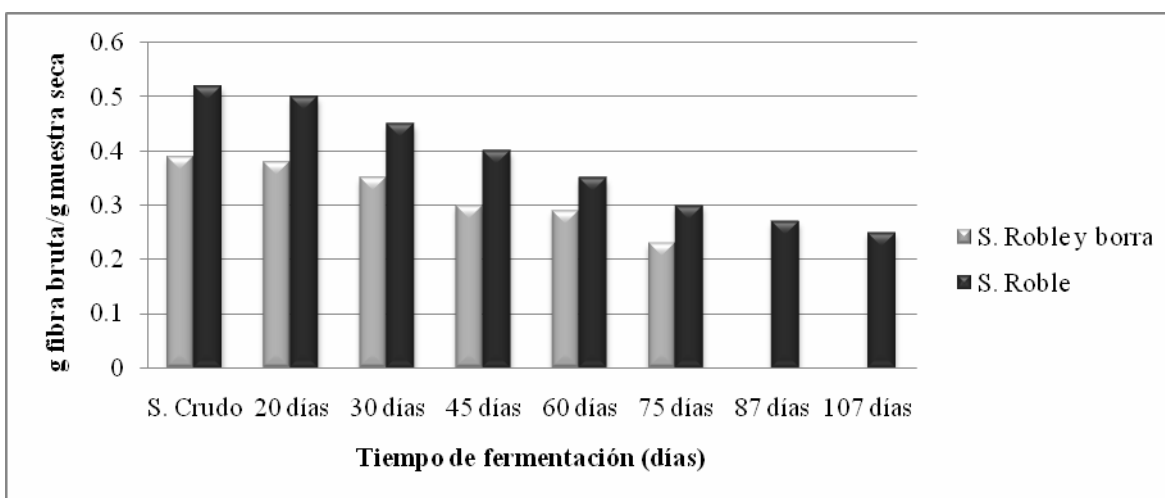
Gráfica 18. Variación en la cantidad de Celulosa y hemicelulosa sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble

El cambio en la cantidad de lignina durante la fase de incubación para ambos sustratos aparentemente no presentó la misma tendencia de variación, debido a que para el sustrato de aserrín de roble fue muy evidente la desaparición de lignina del medio de cultivo; mientras que para los sustratos de aserrín de roble y borra de café la disminución de lignina fue menor como se muestra en la gráfica 19 (en tala A3 se encuentran las fracciones másicas de lignina). Coincidentemente, la producción de ligninasas en este último sustrato fue menor. Entre otras causas, la concentración inicial de N de ambos sustratos (0.23% de nitrógeno total en el sustrato roble, 0.7% en aserrín de roble y borra de café) o la toxicidad de la borra del café podría haber afectado la producción de ligninasas. De todos modos la disminución de lignina durante la fase de incubación es coherente con la actividad enzimática obtenida para las muestras de sustratos a los mismos tiempos de incubación y en la que se evidencia claramente que hubo manifestación de la actividad ligninolítica.

La fibra bruta que contiene la celulosa, hemicelulosa y lignina, se muestra en la gráfica 20. (tabla A4 contiene las fracciones másicas de fibra bruta de ambos sustratos). Este análisis fue importante, porque es el más frecuente para este tipo de materiales y de procesos que involucran materiales lignocelulósicos. Con la cantidad de fibra bruta no fue posible evidenciar de forma clara y contundente que estaba ocurriendo realmente con el proceso de degradación enzimática sobre los dos sustratos, ya que su tendencia fue a permanecer constante durante toda la fase de incubación, manifestando cambio importante después a la primera fructificación.



Gráfica 19. Variación en la cantidad de lignina sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble



Gráfica 20. Variación en la fibra bruta sobre los dos sustratos en el tiempo de incubación y posterior a las dos cosechas en sustrato de aserrín de roble

5.3. Cuantificación de la producción de biomasa útil en función de la aparición de cuerpos fructíferos y el consumo de sustrato

En este trabajo se llevó a cabo un proceso de fermentación en estado sólido el cual se define como el desarrollo de un microorganismo u organismo sobre un material sólido, semisólido o nutricionalmente inerte en ausencia o con muy poca cantidad de agua libre (Pandey *et al.*, 2001). El organismo fue el hongo *G. frondosa* para las dos formulaciones de sustrato propuestas en un tiempo de 75 días de fermentación correspondiente a la fase de incubación, mientras que para los sustratos de aserrín de roble el tiempo total de

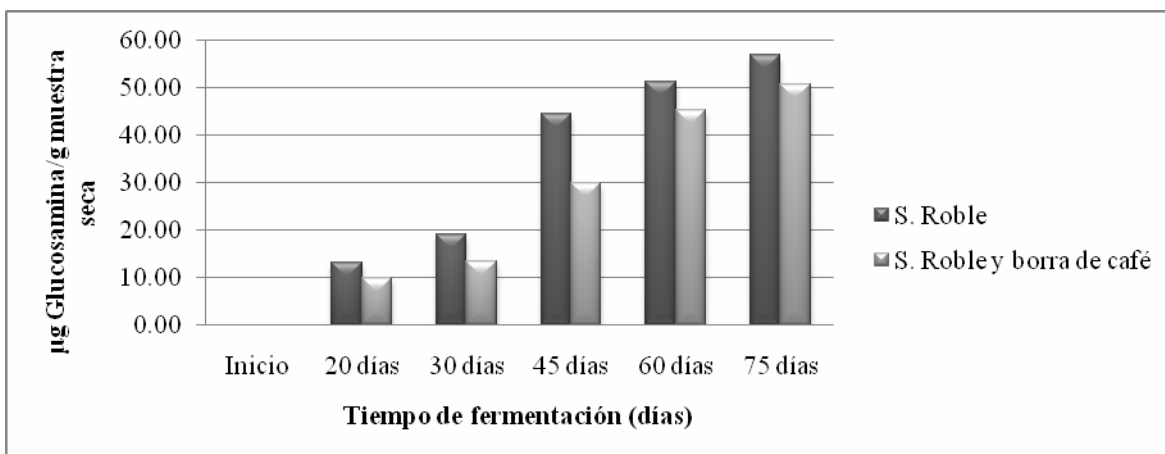
fermentación fue de 107 días, ya que éste incluyó además del tiempo que demora la fase de incubación, las fases de fructificación y posterior producción de carpóforos.

Los procesos de fermentación en estado sólido presentan grandes ventajas sobre la fermentación líquida o sumergida, entre las que se destacan los bajos costos de producción y el incremento en los rendimientos de producto (Pandey *et al.*, 2001). Los factores principales que deben tenerse en cuenta para una fermentación en estado sólido por su efecto en el desarrollo del organismo, son los pretratamientos a los sustratos, el tamaño de partícula, el contenido de agua del sustrato, la humedad relativa, el tipo y tamaño del inóculo, el control de temperatura de todo el proceso de fermentación (remoción del calor metabólico), concentraciones de bióxido de carbono y oxígeno en cada etapa y tiempo total del proceso, entre otros (Van de Lagemaat & Pyle, 2005; Pandey *et al.*, 2001 y Montoya *et al.*, 2007).

Entre las mayores dificultades que se presentan en las fermentaciones en estado sólido se encuentra la estimación de la biomasa, la cual es esencial para los estudios cinéticos. Esto se debe a la fuerte integración entre partes del organismo y el sustrato, que no hace posible separarlos, hecho aún más complejo para el caso de hongos filamentosos, ya que las hifas penetran las partículas del material en todas las direcciones. Se ha sugerido para estos casos hacer una estimación indirecta del crecimiento o desarrollo del organismo sobre el sustrato monitoreando un producto o sustancia que se diferencie de todas las demás que puedan encontrarse en el medio y que por supuesto pueda ser medida (Mitchell *et al.*, 2004).

Como ya se mencionó los hongos, a semejanza de algunos insectos y crustáceos, producen quitina, que es un biopolímero de la N-acetil-D-glucosamina. La presencia de quitina, o de glucosamina en una mezcla sustrato-hongo es una evidencia de la existencia del organismo en el sistema sustrato-hongo. Por ello para este trabajo en particular y para el desarrollo de este objetivo, se seleccionó la medida de la concentración de glucosamina de *G. frondosa* en los diferentes tiempos de fermentación en el sustrato de aserrín de roble, incluyendo la medida de esta sustancia al carpóforo. Como el sustrato de aserrín de roble está compuesto de una gran variedad de sustancias, se determinó correlacionar la producción de glucosamina con la cantidad de azúcares reductores presentes en el material como sustrato. También se determinó la cantidad de glucosamina presente en los sustratos de aserrín de roble y borra de café, con el fin de establecer la comparación en las dos formulaciones en la etapa de incubación (hasta 75 días de fermentación). Por último se cuantificó la producción de hongos (carpóforos) de los sustratos de aserrín de roble.

En la gráfica 21 se muestra la variación del contenido de glucosamina sobre las dos formulaciones de sustrato seleccionados, en la que se observa claramente que hubo mayor formación de esta sustancia sobre la de aserrín de roble, que para la que contiene borra de café. Esto podría atribuirse a que probablemente existe un efecto inhibitorio en la síntesis enzimática por algún compuesto presente en la borra de café, que sin embargo no afecta del todo el desarrollo del micelio, pero que disminuye la velocidad de crecimiento y que no permite la formación del carpóforo en los sustratos.



Gráfica 21. Producción de glucosamina sobre los sustratos sólidos seleccionados en el tiempo de fermentación correspondiente a la fase de incubación de *G. frondosa*.

5.3.1. Modelo matemático para la formación de Glucosamina

Los parámetros que son necesarios para el diseño y control de procesos de fermentación en estado sólido, tales como la velocidad específica de desarrollo, los coeficientes de producción y de mantenimiento, pueden ser estimados utilizando expresiones matemáticas que describan el desarrollo de la biomasa, el consumo de sustrato y la producción de CO₂ durante la experimentación (Ooijkaas *et al.*, 2000 y Larelo *et al.*, 2006). Comúnmente la fermentación en estado sólido involucra crecimiento de hongos filamentosos sobre sustratos sólidos naturales, en los cuales la fuente de carbono constituye parte de su estructura. En la mayoría de los casos para realizar el seguimiento de lo que ocurre en los procesos de fermentaciones en estado sólido se deben utilizar submodelos empíricos, resultando de todos modos submodelos complejos por la heterogeneidad de los procesos (Mitchell *et al.*, 2002 y (Mitchell *et al.*, 1999).

Varios perfiles cinéticos han sido reportados para describir los procesos de fermentación en estado sólido, entre los que se incluyen el modelo lineal, logístico y de fase de aceleración y desaceleración o de dos fases (Sangsurasak *et al.*, 1996). Algunas de las ecuaciones empíricas asociadas a estos modelos se muestran en la tabla 10 (ecuaciones (1)-(8)), estos modelos no incluyen el efecto de la concentración de nutrientes sobre el desarrollo. Las ecuaciones lineal, exponencial y logística han sido ampliamente utilizadas, mientras que la ecuación de dos fases es más reciente y describe una fase de aceleración y una de desaceleración (Ikasari & Mitchell, 2000). En este modelo la fase exponencial es seguida por la fase de desaceleración, cuya expresión está representada por la ecuación (4b), la cual está afectada por un decrecimiento, que se debe probablemente a dos factores. Primero a que el instante en el que inicia la fase de desaceleración es el tiempo t_a , con el parámetro L representado como la relación entre las velocidades específicas de desarrollo de las fases de desaceleración y de aceleración respectivamente. Segundo la desaceleración se describe por un decaimiento exponencial reflejado en la velocidad específica de

desarrollo. Con una constante de velocidad de primer orden k (ecuación (4b)). Una dificultad para aplicar este modelo es que el período exponencial es típicamente corto, pero ha sido indicado para cuando se requieren ajustes de procesos con pocos datos experimentales (Mitchell *et al.*, 2004 y Van de Lagemaat & Pyle, 2005).

Tabla 10. Formas diferenciadas e integradas de las ecuaciones empíricas que son aplicadas en sistemas de fermentación en estado sólido*.

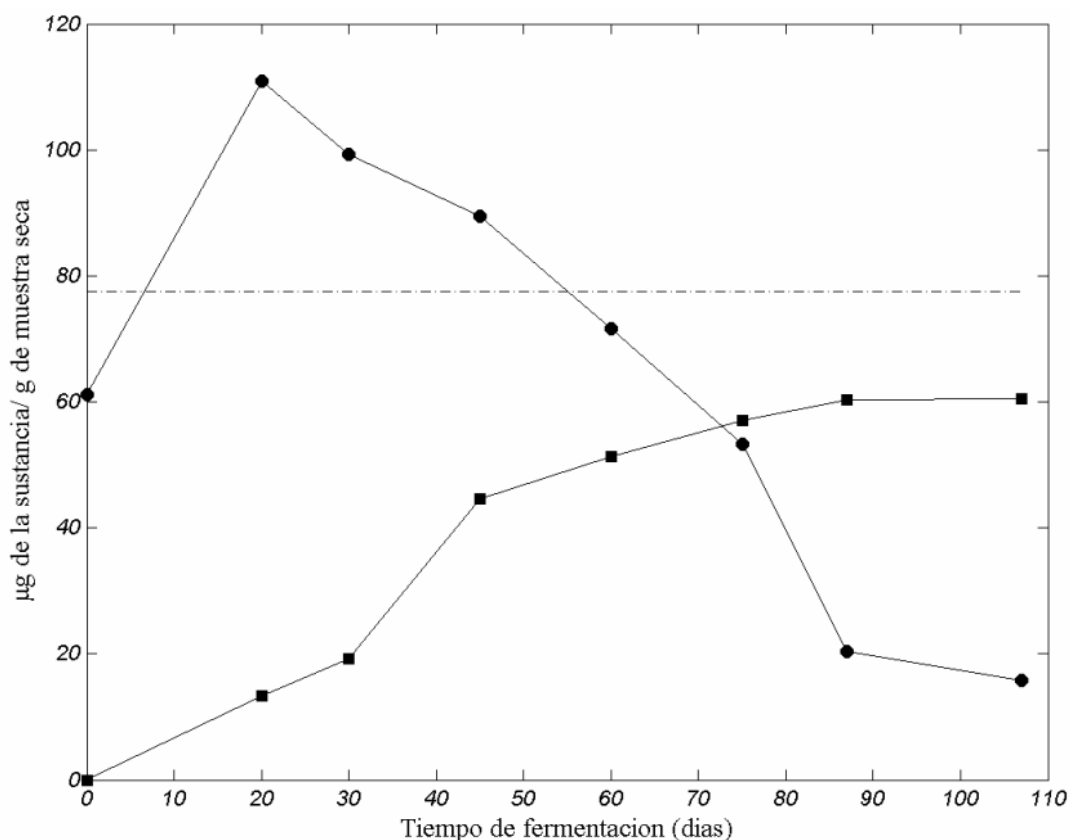
	Forma diferencial		Forma integrada	
Lineal	$\frac{dX}{dt} = k$	(1)	$X = kt + X_0$	(5)
Exponencial	$\frac{dX}{dt} = \mu X$	(2)	$X = X_0 e^{\mu t}$	(6)
Logística	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$	(3)	$X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - 1\right) e^{-\mu t}}$	(7)
Dos fases	$\frac{dX}{dt} = \mu X, \quad t < t_a$	(4a)	$X = X_0 e^{\mu t}, \quad t < t_a$	(8a)
	$\frac{dX}{dt} = [\mu L e^{-k(t-t_a)} - \mu] X, \quad t \geq t_a$	(4b)	$X = X_A \exp\left[\frac{\mu L}{k} (1 - e^{-k(t-t_a)})\right], \quad t \geq t_a$	(8b)

*X es biomasa microbiana, t es tiempo, K es la constante de velocidad de desarrollo lineal, μ es la velocidad específica de desarrollo constante, X_0 es la biomasa inicial, X_m es la máxima cantidad de biomasa posible, t_a , L y k son parámetros para la expresión de dos fase que son explicadas en el texto.

Como se indicó para este trabajo se correlacionó la producción de glucosamina, utilizando los azúcares reductores como sustrato. Debido a que en la ruta de síntesis de quitina se presenta como precursor la glucosa (Carlile *et al.*, 2001).

En la gráfica 22 se relacionan los datos experimentales de azúcares reductores y glucosamina en el tiempo total de fermentación (fases de incubación y producción) del hongo *G. frondosa* sobre el sustrato de aserrín de roble. En el primer segmento de fermentación, hacia el día 20 de incubación se observa un máximo en la cantidad de azúcares reductores, valor superior a la inicial de los mismos en el sustrato crudo. Este hecho se atribuye a la formación de azúcares simples producto de la actividad enzimática del hongo sobre almidones, celulosa y hemicelulosa, sustancias que el hongo usa para obtener los nutrientes y la energía necesarios para su desarrollo. Esta gráfica también corrobora que el sustrato crudo no contiene glucosamina y que en el día 20 de incubación ya hay formación de la sustancia, lo que evidencia que el hongo se encuentra en desarrollo (en fase vegetativa). En la gráfica 22 también se indica con la línea a trazos la concentración máxima de glucosamina que es la que se encuentra presente en el carpóforo de *G. frondosa*.

El comportamiento mostrado por los datos obtenidos para la formación de glucosamina en el tiempo de fermentación no se ajusta a los modelos lineal y exponencial de la tabla 10 (las ecuaciones (1) y (2)), debido a que la tendencia que muestran estos modelos es siempre creciente. Mientras que los modelos logístico y de dos fases (ecuaciones (3) y (4)) describen una tendencia con un crecimiento finito, que en este caso se ajustan a los datos experimentales, que muestran un crecimiento hasta un límite superior representado en la concentración de glucosamina en el hongo (77,5 μg glucosamina/g muestra seca). Una expresión adicional que complementa estos modelos es la variación de la concentración del sustrato (azúcares reductores) en el tiempo está representada por la ecuación (9) (Weng & Sun, 2006).



Gráfica 22. Tendencia de los datos experimentales obtenidos de la relación de azúcares reductores como sustrato (■) y glucosamina como producto (●) en el tiempo total de fermentación de *G. frondosa* sobre sustrato de aserrín de roble y la línea a trazos indica la cantidad de glucosamina presente en el carpóforo del hongo.

$$\frac{dS}{dt} = -\alpha \frac{dX}{dt} \quad (9)$$

Dado que los modelos seleccionados solo incluyen el descenso de la cantidad de sustrato, se tomó como tiempo cero para esta correlación los valores experimentales obtenidos en el

día 20 de fermentación ($G_0=13,33 \mu\text{g}$ glucosamina/g muestra seca y $S_0=110,85 \mu\text{g}$ azúcares reductores/g muestra seca). Las ecuaciones para el ajuste de este trabajo fueron:

Modelo I

$$\frac{dG}{dt} = \vartheta G \left(1 - \frac{G}{G_m}\right) \quad (10)$$

$$G = \frac{G_m}{1 + \left(\left(\frac{G_m}{G_0} - 1\right)e^{-\vartheta t}\right)} \quad (11)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\alpha \frac{dG}{dt} \quad (12)$$

Donde G es la concentración de glucosamina (μg glucosamina/g muestra seca), S la concentración de sustrato (μg azúcares reductores/g muestra seca), t es el tiempo de fermentación (día), ϑ es la velocidad específica de producción de glucosamina en (día^{-1}). Para este modelo se utilizan como parámetros de ajuste las constantes α y ϑ y para la concentración máxima de glucosamina G_m , se tomó el valor obtenido experimentalmente para el carpóforo ($G_m=77,5 \mu\text{g}$ glucosamina/g muestra seca).

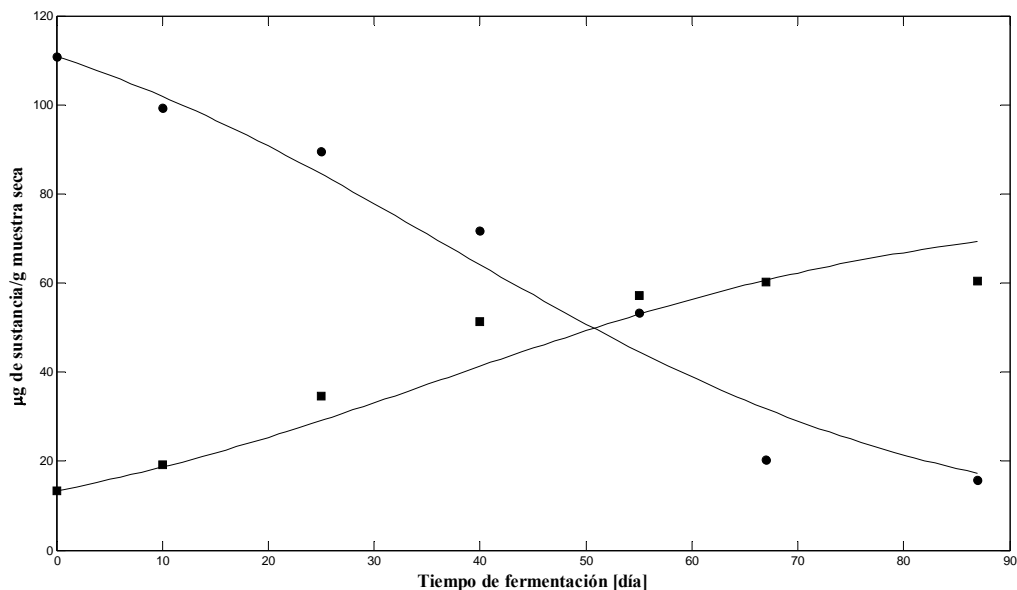
Modelo II

$$\frac{dG}{dt} = \begin{cases} \vartheta_1 G & t < t_a \\ \vartheta_2 e^{-k(t-t_a)} G & t \geq t_a \end{cases} \quad (13)$$

$$\frac{dS}{dt} = \begin{cases} \alpha \vartheta_1 G & t < t_a \\ -\alpha \vartheta_2 e^{-k(t-t_a)} G & t \geq t_a \end{cases} \quad (14)$$

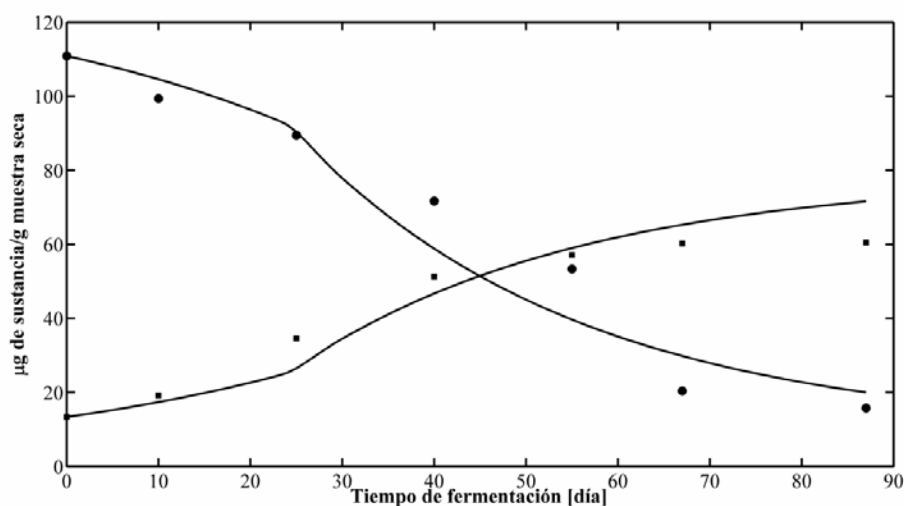
Para el modelo II se utilizan como parámetros de ajuste α , ϑ_1 , ϑ_2 y k, siendo α la relación entre la variación del sustrato con respecto a la variación del producto (glucosamina), ϑ_1 , ϑ_2 son las velocidades específicas de producción de glucosamina en el tiempo de aceleración y desaceleración respectivamente y k la constante de velocidad de la reacción de primer

orden. El tiempo de cambio de pendiente se fijó para este trabajo en 45 días de fermentación, indicando el inicio de la etapa de desaceleración de la fermentación ($t_a=25$ días).



Gráfica 23. Ajuste de datos experimentales al Modelo I (modelo logístico), donde (•) representan los datos de sustrato experimentales (consumo de azúcares reductores) en el tiempo, y (▪) representa los datos experimentales de producción de glucosamina en el tiempo de fermentación. Las líneas continuas representan los datos del modelo, la línea descendente corresponde a los datos de desaparición de sustrato (azúcares reductores) y la ascendente a los datos de producción de glucosamina.

El ajuste de los datos experimentales de los dos modelos se realizó con ayuda del software Matlab ® mediante una minimización de la suma de los cuadrados de la diferencia entre los datos experimentales y los datos predichos por los modelos. En la tabla 11 se muestran los parámetros ajustados para los dos modelos, de lo que se puede decir que los α son muy similares para ambos modelos y que la velocidad específica para el modelo I es similar a la v_1 ajustada para el modelo II. En las gráficas 23 y 24 se muestra la representación de los datos experimentales frente a los datos predichos por los dos modelos. Encontrándose un grado de ajuste similar en ambos. Esto representa una ventaja para el modelo logístico (modelo I) frente al modelo de dos fases (modelo II), debido a que el primero requiere solo dos parámetros, mientras que el segundo requiere cuatro parámetros para el ajuste.



Gráfica 24. Ajuste de datos experimentales al Modelo II (modelo de dos fases), donde (•) representan los datos de sustrato experimentales (consumo de azúcares reductores) en el tiempo, y (▪) representa los datos experimentales de producción de glucosamina en el tiempo de fermentación. Las líneas continuas representan los datos del modelo, la línea descendente corresponde a los datos de desaparición de sustrato (azúcares reductores) y la ascendente a los datos de producción de glucosamina, además se refleja el cambio de pendiente para el día 25 de la fermentación como inicio de la fase de desaceleración del proceso.

Tabla 11. Parámetros de ajuste de los modelos I (logístico) y II (de dos fases) con los datos experimentales del trabajo

Modelo I (logístico)	Modelo II (de dos fases)
$\alpha = 1,6715 \text{ } \mu\text{g azúcares reductores}/\mu\text{g glucosamina formada}$ $\beta = 0,0426 \text{ dia}^{-1}$	$\alpha = 1,5596 \text{ } \mu\text{g azúcares reductores}/\mu\text{g glucosamina formada}$ $\beta_1 = 0,0264 \text{ dia}^{-1}$ $\beta_2 = 1,6921 \text{ dia}^{-1}$ $k = 0,0327$

Debido a que no se mostró gran variación en el ajuste de los dos modelos seleccionados, se realizó inferencia estadística para determinar cuál de los dos se aproxima mejor a los datos experimentales del trabajo. En la tabla 12 se presentan los datos de inferencia estadística de los parámetros para ambos modelos, representados como los intervalos de confianza de cada parámetro. Para el modelo logístico los intervalos de confianza de cada uno de los

parámetros son significativos, ya que éstos no pasan por cero. Mientras que para el modelo de dos fases los parámetros θ_2 y k no son significativos. Estadísticamente parámetros no significativos en un modelo representan inconvenientes en la descripción de los datos experimentales y por consiguiente es recomendable retirarlos del mismo. Con esto se concluye que para el seguimiento del proceso de fermentación en estado sólido del hongo *G. frondosa* el modelo de dos fases se reduce al modelo logístico.

Tabla 12. Inferencia estadística sobre los parámetros de los modelos para realizar la selección que mejor ajusta los datos experimentales del proceso de fermentación en estado sólido.

Modelo	Parámetro	Valor	Intervalo de confianza	Interpretación
Modelo I (logístico)	α	1,6715 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	$1,3951 < \alpha < 1,9479$	Como el intervalo de confianza no pasa por cero, el parámetro es significativo
	θ	0,0426 dia^{-1}	$0,0351 < \theta < 0,0501$	Como el intervalo de confianza no pasa por cero, el parámetro es significativo
Modelo II (de dos fases)	α	1,5596 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	$1,3084 < \alpha < 2,0298$	Como el intervalo de confianza no pasa por cero, el parámetro es significativo
	θ_1	0,0264 dia^{-1}	$0,0178 < \theta_1 < 0,0414$	Como el intervalo de confianza no pasa por cero, el parámetro es significativo
	θ_2	1,6921 dia^{-1}	$-1,6564 < \theta_2 < 1,7186$	Como el intervalo de confianza pasa por cero, el parámetro no es significativo
	k	0,0327	$-0,0131 < k < 0,0448$	Como el intervalo de confianza pasa por cero, el parámetro no es significativo

5.3.2. Producción de carpóforos de *G. frondosa*

Para este trabajo se propusieron dos formulaciones de sustratos sólidos basados en materiales orgánicos naturales como ya se ha mencionado antes. La primera formulación con 75% de aserrín de roble, 23% de salvado de maíz, 1% de sacarosa y 1% de carbonato de calcio en base seca y en la segunda formulación el 75% de aserrín de roble fue reemplazado por 25% de borra de café y 50% de aserrín de roble. Obteniéndose carpóforos de *G. frondosa* únicamente de los sustratos formulados con aserrín de roble, mientras que los sustratos suplementados con borra de café no fructificaron, probablemente por alguna sustancia inhibitoria aportada por éste material; ya que la borra de café contiene sustancias de naturaleza tóxica como cafeína, taninos y polifenoles (Fan *et al.*, 2001). Otra hipótesis que fue considerada, estuvo relacionada con la presencia de altos niveles de Zn en los sustratos que contenían borra de café. En los análisis realizados a las dos formulaciones de

sustratos crudos, el contenido de Zn para el sustrato de aserrín de roble fue de 17.3 ppm y 290.25 ppm para el sustrato suplementado con borra de café (Montoya *et al.*, 2007) (ver anexo C). A pesar de que los hongos de pudrición blanca requieren trazas de metales pesados como Cd, Mn o Zn para su desarrollo, éstos cuando se presentan en exceso pueden causar inhibición en el desarrollo de los hongos, cambios morfológicos y fisiológicos y/o afectar la reproducción (en este caso el desarrollo de los carpóforos) (Baldrian, 2003).

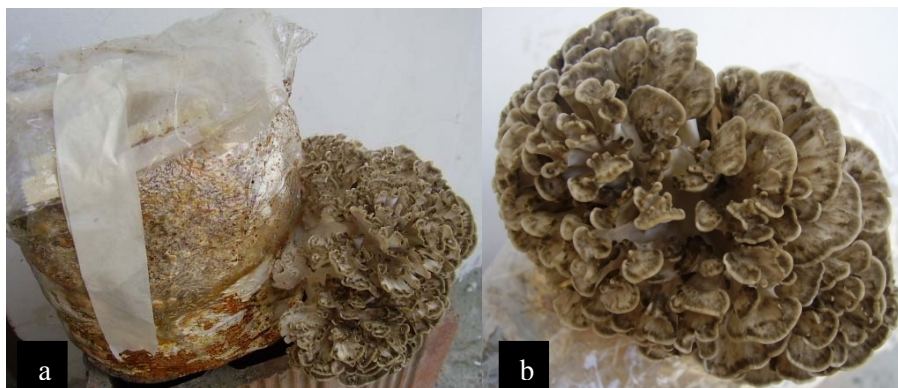


Figura 13. Fotografías de carpóforos de *G. frondosa* de calidad 1: (a) Vista frontal del carpóforo antes de cosecha, (b) vista superior del carpóforo antes de cosecha.

El tipo de suplemento nutricional, afecta la producción de carpóforos en los macromicetos, tanto los ciclos de producción como la calidad de los basidiomas (Shen & Royse, 2001 y Montoya *et al.*, 2007). Shen & Royse (2002) establecieron una escala para valorar la calidad de los basidiocarpos de *G. frondosa*: en una escala cualitativa estimada de 1-4, uno es la calidad más alta: basidiomas de color gris oscuro, uniformes y con píleos bien formados. En este trabajo los carpóforos obtenidos se enmarcaron dentro del rango de mayor calidad, es decir cumplieron las características de la escala 1 (ver figura 13). La eficiencia biológica (EB), definida como el porcentaje de la relación entre la masa de hongos frescos y la masa de sustrato seco al momento de la inoculación (Stames, 1993) obtenida fue de 35%, resultado favorable al momento de comparar con EB obtenidas por otros investigadores como 10% a 29% (Stames, 1993), 25 a 32,5% (Mayuzumi & Mizuno, 1997), y la más alta reportada hasta el momento de 35,8 a 39,5% (Shen & Royse, 2001). Las EB se reportan en la tabla D para 14 sustratos de formulación con aserrín de roble.

6. CONCLUSIONES

Las sucesivas réplicas del inóculo de *G. frondosa* sobre agar PDA evaluadas en este trabajo no parecen afectar la producción de las enzimas endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, endoxilanasas, lacasa y manganeso peroxidasa (MnP) por lo menos, hasta la quinta generación. Sin embargo no se encontró manifestación alguna de la actividad de la enzima lignin peroxidasa (LiP) en ninguna de las cinco réplicas evaluadas. Probablemente los niveles enzimáticos producidos en dicho medio son demasiado bajos y no pueden ser detectados por el método de valoración aplicado o su producción requiere de la presencia de inductores como sustratos lignocelulósicos o alcoholes aromáticos (tales como el veratril alcohol).

En la fase vegetativa del hongo *G. frondosa* sobre agar PDA, las enzimas que presentaron mayor actividad enzimática fueron la endoglucanasa y la lacasa, mientras que la que presentó menor actividad fue la enzima β -glucosidasa, luego de haber encontrado diferencia significativa entre las enzimas realizando la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y posterior comparación aplicando la prueba de rangos de Dunn.

Se demostró estadísticamente que los factores formulación de sustrato y tiempo de fermentación (fase incubación) tienen efecto significativo sobre la actividad de las enzimas celulolíticas, ligninolíticas y la endoxilanasas evaluadas con una confiabilidad del 95%.

Se comprobó la presencia de la enzima lignin peroxidasa (LiP) en *G. frondosa* con la prueba cualitativa de Azure B para hongos de pudrición blanca, realizada inoculando micelio sobre agar PDA con 50 μ M de Azure B, la cual marcó positiva formando un halo de decoloración a los 21 días de incubación a 25°C. Posteriormente se midió de dicha actividad en el sustrato de material orgánico natural (que incluía un sustrato lignocelulósico) inoculado con el hongo en los diferentes tiempos de fermentación, lo que indicó que para la manifestación de esta enzima, seguramente es necesaria la existencia de una sustancia inductora en el medio de cultivo.

G. frondosa produce las seis enzimas evaluadas: tres celulolíticas, tres ligninolíticas y una xilanolítica en todas las condiciones ensayadas sobre las dos formulaciones de sustratos propuestas, encontrándose siempre una mayor actividad para los sustratos formulados con aserrín de roble que para los sustratos formulados con aserrín de roble y borra de café. Esto

podría atribuirse a un efecto inhibitorio en la síntesis enzimática causado por algún compuesto presente

Las actividades enzimáticas evaluadas, pero en especial las celulolíticas y la endoxilanasas resultaron menores para la formulación de sustrato con aserrín de roble hacia el día 75 de fermentación, tiempo que coincide con el momento de la inducción de primordios. El hongo ya se ha desarrollado completamente en su fase vegetativa, pasando por la colonización, formación de abrigo micelial y formación de metabolitos útiles para el cambio de fase, hacia la fase reproductiva. Para posteriormente, luego de las dos fructificaciones (87 y 107 días), darse una caída drástica en la actividad de estas enzimas, reflejando una disminución en las sustancias disponibles del sustrato.

La actividad de endoglucanasa de *G. frondosa* evaluada en este trabajo muestra que ésta produce una disminución sobre el grado de polimerización de la celulosa especialmente en la sección amorfa (zonas internas de la estructura polimérica), y el análisis demuestra una mayor actividad en la primera parte del período de incubación (aproximadamente hasta el día 45).

En la fase experimental los datos obtenidos de actividad de exoglucanasa están relacionados con el modo de acción de la misma; ya que ésta genera principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado. Produciendo unidades de glucosa y celobiosa. El comportamiento de esta enzima demuestra una mayor actividad en los primeros 30 días de incubación, período correspondiente a la colonización total del sustrato por el micelio del hongo (Montoya *et al.*, 2007), donde probablemente se requiere la mayor cantidad disponible de nutrientes.

La degradación de lignina es mayor en el medio con roble y podría relacionarse con una producción ligeramente mayor de las ligninasas evaluadas, o incluso de otras enzimas no valoradas. Podría asociarse también con un mayor crecimiento producto de la degradación más eficiente de celulosas y hemicelulosas, ya que los títulos de endo, exoglucanasa y endoxilanasas producidos son mayores en el medio sin borra de café y también es mayor la biomasa fúngica.

Para el desarrollo de los macromicetos los carbohidratos son consumidos en cantidades importantes durante toda la etapa de fermentación, la cual cubre todo el desarrollo y cambios durante la fase de incubación, los requerimientos energéticos para fructificación y posterior crecimiento de los cuerpos fructíferos. Dando como resultado una disminución en la materia seca. En este trabajo se encontró una mayor disminución de la masa seca para la formulación de sustrato con aserrín de roble. Hecho concordante con las actividades enzimáticas medidas durante los diferentes tiempos de fermentación para las dos formulaciones, donde se ha planteado la inhibición de la acción enzimática del hongo *G.*

frondosa sobre los sustratos suplementados con borra de café, posiblemente por la presencia de sustancias tóxicas o por cantidades muy altas de Zn en este subproducto.

La medida de las sustancias hidrocarbonadas como almidones y los componentes de la fibra en el tiempo de fermentación representaron una prueba de la capacidad de degradación del *G. frondosa* sobre los diferentes medios de cultivo, debido a que se demostró la desaparición de cada una de esas sustancias poliméricas, que para ser consumidas por el hongo deben ser previamente degradadas por la acción de sus enzimas.

Los azúcares reductores medidos como glucosa por el método de Somogyi-Nelson presentaron un incremento hacia el día 20 de la fermentación, en comparación con la cantidad presente en el sustrato de aserrín de roble crudo. Lo que puede atribuirse al estado de colonización plena de *G. frondosa*. Las enzimas celulolíticas, xilanolíticas y otras como pectinolíticas y amilolíticas, que a pesar de no haberse medido, probablemente estén presentes y actúen sinérgicamente para transformar en sustancias asimilables por el hongo todas aquellas moléculas grandes no absorbibles directamente.

La variación del contenido de quitina (N-acetilglucosamina) sobre las dos formulaciones de sustrato seleccionados, dio como resultado, que hubo mayor formación de esta sustancia sobre la formulación de aserrín de roble, que para la que contiene borra de café, lo cual podría atribuirse a que existe un efecto inhibitorio en la síntesis enzimática por algún compuesto presente en la borra de café, que sin embargo no afecta del todo el desarrollo del micelio, pero que disminuye la velocidad de crecimiento del hongo en términos de formación de glucosamina y que no permite la formación del carpóforo en este sustrato.

Para describir el proceso de fermentación en estado sólido propuesto de este trabajo se compararon dos modelos empíricos que han sido utilizados, el modelo logístico y el de dos fases, utilizando la cantidad de azúcares reductores presentes en el medio como sustrato y la cantidad de glucosamina producida en el tiempo como producto. Estos dos modelos fueron seleccionados, debido a que los datos experimentales obtenidos describen una tendencia con crecimiento finito, acotando la máxima producción de glucosamina a la contenida por el carpóforo.

El resultado del ajuste para los dos modelos es de calidad similar. Esto representó una ventaja en la utilización del modelo logístico (modelo I) frente al modelo de dos fases (modelo II), debido a que el primero requiere solo dos parámetros, mientras que el segundo requiere cuatro parámetros para el ajuste. Lo que se corroboró realizando el análisis de inferencia estadística, mediante el cual se calculó el coeficiente de variación para cada uno de los modelos, obteniéndose como resultado que el modelo logístico presenta mayores ventajas porque es el más simple.

El medio más adecuado para fructificación del hongo *G. frondosa* entre las dos formulaciones evaluadas es el que contiene aserrín de roble con salvado de maíz, sacarosa y

carbonato de calcio, ya que se obtienen carpóforos de buena calidad y la EB es bastante competitiva en referencia a las obtenidas en otros trabajos. El agregado de borra de café inhibe la fructificación, probablemente por contener sustancias como cafeína, polifenoles y taninos o por los elevados niveles de Zn (290,25 ppm).

El hongo *G. frondosa* podría ser utilizado en la degradación de residuos sólidos orgánicos ricos en materiales lignocelulósicos, debido a que posee un sistema enzimático capaz de degradar en tiempos cortos cantidades importantes de polímeros naturales de difícil degradación. Una ventaja adicional es que a través de la producción de carpóforos convierte directamente a la lignocelulosa en alimento de consumo humano.

7. RECOMENDACIONES

En estudios posteriores puede determinarse la actividad enzimática de un grupo mayor de enzimas que contiene *G. frondosa* sobre las dos formulaciones de sustrato propuestas en este estudio; para determinar más exactamente el mecanismo de acción del hongo sobre los diferentes polímeros naturales que se encuentran en estas mezclas de sustratos.

Sería importante realizar determinaciones de actividad enzimática del hongo *G. frondosa* en tiempos de fermentación más cercanos, que permita conocer con precisión la tendencia del comportamiento de las enzimas celulolíticas y ligninolíticas del macromiceto sobre las formulaciones de sustrato de aserrín de roble y aserrín de roble y borra de café.

Para la formulación de aserrín de roble y borra de café sería de mucha utilidad realizar un estudio determinando una o varias de las sustancias que se presume pueden estar generando la toxicidad o inhibición en el desarrollo miceliano, así como el impedimento para la fructificación del hongo *G. frondosa*.

En futuros estudios podría modificarse la relación de borra de café en los sustratos por encima y por debajo de la cantidad utilizada en este trabajo, así como también realizar una prueba utilizando como sustrato únicamente borra de café, para evaluar el comportamiento del *G. frondosa* y la producción de enzimas y las cantidades en las que podrían obtenerse fructificaciones o no de carpóforos.

La cuantificación de azúcares reductores en los sustratos, podría ser medida en tiempos más cortos de fermentación para apreciar con mayor certeza como se da su incremento y desaparición en el medio y lograr un mejor ajuste a los modelos matemáticos existentes para procesos de fermentación en estado sólido.

En otros estudios que involucren *G. frondosa* en procesos de fermentación en estado sólido podría determinarse la cantidad de biomasa midiendo la cantidad de ergosterol, ya que esta sustancia se encuentra en basidiomicetos, ascomicetos y hongos mitosporicos, pero no en plantas. La ventaja de medir ergosterol como medida de biomasa miceliana es que este componente de la membrana celular solamente se encuentra en el micelio vivo.

Se recomienda tomar una mayor cantidad de datos en el tiempo de fermentación de *G. frondosa* sobre los diferentes medios de cultivo, tanto de la sustancia seleccionada como

medida del crecimiento miceliano, como de la sustancia que se consume durante el proceso. Con el propósito, no solo de obtener mayor precisión en el ajuste de datos, sino de buscar como premisa el ajuste verdadero a un modelo matemático empírico existente o al desarrollo de uno, que se ajuste y muestre con mayor precisión la tendencia de los datos experimentales.

Se podrían adelantar en otros trabajos de investigación estudios sobre la utilización de los sustratos de aserrín de roble residuales de *G. frondosa* para ser utilizados como suplemento alimenticio para rumiantes, como regenerador de suelos infértiles o como fuente de inóculo para realizar pruebas en biorremediación de aguas residuales coloreadas o no y suelos contaminados, ya que estos materiales ricos en micelio de hongo, a pesar de no poder producir más cantidad de carpóforos porque ya no existen las condiciones para que ocurra, si permanecen con actividad para ser utilizados en otros fines.

En futuros estudios se podrían realizar determinaciones de las sustancias producidas durante el proceso de fermentación en estado sólido de *G. frondosa*, por ejemplo las sustancias presentes en el exudado que se forma a los 75 días de la fase de incubación, en la que se presume podrían coexistir muchos metabolitos primarios y secundarios.

Podría evaluarse la producción de polisacáridos como los β -1,6 y β -1,3 glucanes y otros de *G. frondosa* con fines medicinales en ambas formulaciones de sustratos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adaskaveg, J., Gilbertson, R., & Blanchette, R. (1990). Comparative study of delignification caused by *Ganoderma* species. *Appl. Environ. Microbiol.* , 56, 1932-1943.
- Aleshin, A., Glubev, A., Firson, L. M., & Honzatk, R. B. (1992). Crystal structure of glucoamylase from *Aspergillus awamorii* var. X100 to 2.2-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* , 267, 19291-19298.
- Ander, P. (1994). The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CBO as related to lignin and cellulose degradation - a review. *FEMS Microbiology Reviews* , 13, 297-312.
- Ângelo, A. S. (2004). Enzimas hidrolíticas. En Esposito, & J. I. Azevedo, *Fungos: Uma Introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia* (págs. 263-285). Universidade. de Caxias do Sul.
- Archibald, F. S. (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Appl. Environ. Microbiol.* , 58, 3110-3116.
- Bajpai, P. (1997). Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Advances in Applied Microbiology* , 43, 141-194.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Technol* , 32, 78-91.
- Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K., Moen, M., & Hammel, K. (1994). Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett* , 354, 297-300.
- Barr, B. K., Hsieh, Y. L., Ganem, B., & Wilson, D. B. (1996). Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry* , 35, 586-592.
- Beguin, P., & Aubert, J. P. (1994). The Biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* , 13, 25-58.

- Berovic, B. B. (2007). *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Maitake Mushroom): Medicinal Properties, Active Compounds, and Biotechnological Cultivation. *International Journal of Medicinal Mushrooms* , 9, 000-000.
- Blanchette, R. A. (1995). Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany* , 73, S999-S1010.
- Blanchette, R. A. (1991). Delignification by wood decay fungi. *Annu. Rev. Phytopathol* , 29, 381-398.
- Boh, B., & Berovic, M. (2007). *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray (Maitake Mushroom): Medicinal properties, Active Compounds, and Biotechnological Cultivation. *International Journal Medicinal Mushrooms* , 9, 1-20.
- Boisset, C., Fraschini, C., Schülein, M., & Henriss, B. (2000). Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel 7A. *Environ. Microbiol.* , 66, 1444-1452.
- Bommarius, A. S., & Riebel, B. (2004). *Biocatalysis*. Atlanta, USA: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Buswell, J. A., & Odier, E. (1987). Lignin biodegradation. *Rev. Biotechnol* , 6, 1-59.
- Buswell, J. A., Cai, Y., & Chang, S. T. (1995). Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters* , 128.
- Campbell, M. K., & Farrell, S. O. (2004). *Bioquímica* (Cuarta ed.). Mexico: International Thomson Editores.
- Carle - Urioste, J. C., Escobar - Vera, J., & El-Gogary, S. (1997). Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *Journal of Biological Chemistry* , 272, 10169-10174.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The fungi* (Second edition ed.). London: Academic Press.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms Cultivation, Nutritional value, Medicinal effect, and Enviromental Impact*. (Second edition ed.). United States of America: CRC Press.

- Collins, P., Dobson, A., & Field, J. A. (1998). Reduction of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of manganese. *Applied and Environment. Microbiol.*, *64*, 2026-20031.
- Corner, E. J. (1989). *Ad Polyporaceas V*. Berlin: J. CRAMER.
- Coughlan, M. P., & Hazlewood, G. P. (1993). -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry* , *17*, 259-289.
- Coughlan, M. P., & Ljungdahl, L. G. (1988). Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems, in J.P. Aubert; P. Beguin & J. Millet (Eds), FEMS Symposium N° 43. *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation* . Academic Press.
- Díaz, A. (1999). *Diseño estadístico de experimentos* (primera ed.). Medellín: Universidad de Antioquia.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F., & Eriksson, K. L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* , *391*, 144-148.
- Eriksson, K. E., Habu, N., & Samejima, M. (1993). Recent advances in fungal cellobiose oxidoreductases - review. *Enzyme and Microbial Technology* , *15*, 1002-1008.
- Eriksson, K., Blanchette, R., & Ander, P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. . *Springer-Verlag, New York* .
- Evans, C. S., Dutton, M. V., Guillen, F., & Veness, R. G. (1994). Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Letters* , *13*, 235-240.
- Fan, L., Pandey, A., & Soccol, C. (2001). Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. *Brazilian Arch Biol Technol* , *44*, 205–212.
- Forchiassin, F., & Levin, L. (en prensa). Enzimas Extracelulares Degradación de polímeros vegetales. En E. V. Albertó (Ed.), *Introducción al reino de los hongos y los grupos afines* (En prensa ed.). Buenos Aires: Editorial L.O.L.A (Literature for Latin America).
- Ghose, T. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* , *59*, 257-268.
- Gilbertson, R. L. (1980). Wood-rotting fungi in North America. *Mycologia* , *72*, 1-49.

- Glen, J. K., & Gold, M. H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 242, 329-341.
- Glen, J., Morgan, M., Mayfield, M., & Kuwaha, G. (1983). An extracellular H₂O₂ - requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 114, 1077-1083.
- Gow, N. A. (1995). *The growing Fungus*. (C. & Hall, Ed.) London: N.A.R Gow & G. M. Gadd.
- Hartig, R. (1878). Die Zersetzungserscheinungen des Holzes der Nadelholzbaume und der Eiche. . *En: Forslicher, botanischer and chemischer Richtung. Springer, Berlin*.
- Hess, J., Leitner, C., & Galhaup, C. (2002). Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* , 98, 229-241.
- Hofrichter, M. (2002). Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiology and Technology* , 30, 454-466.
- Ikasari, L., & Mitchell, D. (2000). Two-phase model of the kinetics of growth of *Rhizopus oligosporus* in membrana culture. *Biotechnol. Bioeng.* , 68, 619-627.
- Joselau, J. P., & Ruel, K. (1994). *Wood polysaccharides and their degradation by fungi*, in O. Petrini & G.B. Ouellette (Eds), *Host Wall Alterations by Parasitic Fungi*. Minnesota St. Paul: APS Press.
- Kirk, T. K., & Farrel, R. L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews of Microbiology* , 41, 465-505.
- Kirk, T. K., Connors, W., & Zeikus, J. (1976). Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Appl. Environ Microbiol* , 32, 192-194.
- Kirt, T. K. (1983). Degardation and conversion of lignocelluloses. En J. E. Smith, D. R. Berry, & P. (. Kristiansen, *The filamentous fungi* (Vol. 4, págs. 266-295). London.
- Koduri, R., & Tien, M. (1994). Kinetic analysis of lignin peroxidase-explanation for the mediation phenomen by veratryl alcohol. *Biochemistry* , 33, 4225-4230.

- Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., & Mach, R. L. (1993). The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology* , 15, 90-99.
- Larelo, C., Sposito, A., Bossio, A., & Volpe, D. (2006). characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme and microbial Technology* , 38, 391-399.
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J., y otros. (2003). Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete grifola frondosa. *Enzyme Microbial Technol.* , 32, 574-581.
- Lemaire, M. (1996). The Cellulosome - an exocellular multiprotein complex specialised in cellulose degradation. *Critical Reviews and Biochemistry & Molecular Biology* , 31, 201-236.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-wasilewska, M., Cho, N. S., y otros. (1999). Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* , 27, 175-185.
- Levin, L. (1998). *Biodegradación de materiales lignocelulósicos por Trametes trogii (Aphylllophorales, Basidiomycetes)*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires Argentina.
- Levin, L., Papinutti, L., & Forchiassin, F. (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzyme and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* , 94, 169-176.
- Liese, W. (1970). Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *Annu. Rev. Phytopathol* , 8, 231-257.
- Mansfield, S. D., Mooney, C., & Sanddler, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnological progress* , 15, 804-816.
- Markham, P. (1998). Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycological Research* , 98, 1089-1106.
- Martinez, A. (2002). Molecular Biology and structure-function of lignin-degradin heme peroxidases. *Enzyme Microb Technol.* , 30, 425-444.
- Martinez, M., Ruiz-Dueñas, F., Guillen, F., & Martinez, A. (1996). Purifacation and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur J. Biochem.* , 237, 424-432.

- Mau, J. L., Lin, H. C., Ma, J. T., & Song, S. F. (2001). Non-Volatile taste components of several speciality mushrooms. *Food Chem.* , 73, 461-466.
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* , 60, 551-565.
- Mayuzumi, Y., & Mizuno, T. (1997). Cultivation methods of maitake (*Grifola frondosa*). *Food Rev Int.* , 13, 357–364.
- Meier, H. (1955). Decomposition of the cell wall by wood-destroying fungi and the submicroscopic structure of tracheids of spruce and wood fibers of birch (translation N° 92: Department of the Secretary of State of Canada, February 1956) *Holz. Roh-Werkst.* 13, 323-338.
- Miles, P., & Chang, S. T. (2001). *Biología de las Setas*. Bogotá: Agora Editores Ltda.
- Mitchell, D. A., Von meien, O. F., Krieger, N., & Dalsenter, F. D. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* , 17, 15-26.
- Mitchell, D., Stuart, D., & Tanner, R. (1999). Solid-state fermentation - Microbial growth kinetics. En M. Flickinger, & S. Drew, *The encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and bioseparation* (págs. 2407-2429 pp). New York: Wiley.
- Mitchell, D., von Meien, O., & krieger, N. (2002). Recent developments in modeling of solid-state feremntation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem Eng. J.* , 13, 137-147.
- Montoya, B. S., Varon, L. M., & Levin, L. (2007). Effect of culture parameter on the production of the edible mushroom *grifola frondosa* (maitake) in tropical weathers. *World J Microbiol Biotechnol* .
- Moore, D. (1998). *Fungal Morphogenesis*. New York, United States of America: Cambrige University Press.
- Nelson, N. J. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the detrmination of glucose. *J. Biochem* , 153, 375-380.
- Ooijkaas, L., Buitelaar, R., Tramper, J., & Rizema, A. (2000). Growth and sporulation stoichiometry and kinetics of *Coniothrium minitans* on agar media. *Biotechnol Bioeng* , 69, 292-300.

Pandey, A., Soccol, C., Rodriguez-Leon, J., & Nigam, P. (2001). *Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications* (First Edition ed.). new Delhi: Asiatech Publishers.

Papinutti, L. (2003). *Enzimas Ligninolíticas en Fomes sclerodermeus*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires Argentina.

Papinutti, V. L., Dorio, L. A., & Forchiassin, F. (2003). Degradación de madera de álamo por Fomes sclerodermeus: Producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Rev. Iberoamericana de Micol.* , 20, 16-20.

Paszczynski, A., Crawford, R., & Huyn, V. (1988). Manganese peroxidase of Phanerochaete chrysosporium purification. *Methods enzymol* , 161, 264-270.

Paszczynski, A., & Crawford, R. L. (1991). Degradation of azo compounds by ligninases from Phanerochaete chrysosporium. Involment of veratryl alcohol. *Biochem. Biophys. res. comm.* , 178, 1056-1063.

Pelaez, F., Martinez, M. J., & Martinez, A. T. (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol Res* , 99, 37-42.

Pelczar, M. J., Reid, R. D., & Chan, E. C. (1996). *Microbiología* (Cuarta ed.). Mexico: McGraw-Hill.

Pérez, J., & Jeffries, T. W. (1992). Roles of Manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by Phanerochaete chrysosporium. *App Environl Microbiol* , 58, 2402-2409.

Plassard, C., Mousain, D., & Salsac, L. (1982). Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. *Phytochemistry* , 21, 345-348.

Rabinovich, M. L., Bolobova, A. V. & Vasilchenko, L. G. (2004). Fungal descomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40 (1), 1-17.

Reid, I. (1995). Biodegradation of lignin. *Canadian Journal of Botany* , 73, S1011-S1018.

Rodriguez, E., Nuero, O., Guillen, F., Martinez, A. T., & Martinez, M. J. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four Pleurotus species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Bichemistry* , 36, 909-916.

Rouvinen, J., Bergfors, T., & Teer, T. (1990). Three dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249 , 380-386.

- Ruíz Herrera, J. (2001). El asombroso reino de los hongos. *Avance y perspectiva* , 20, 275-281.
- Sangsurasak, P., Nopharatana, M., & Mitchell, D. (1996). Mathematical modeling of the growth of filamentous fungi in solid-state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* , 55, 333-342.
- Schoemaker, H. E., & Piontek, K. (1996). On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure & Appl. Chem.* , 68 (11), 2089-2096.
- Shan, V., & Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal Microbiology* , 48, 848-870.
- Shen, Q. (2001). *Molecular phylogenetic analysis of Grifola frondosa (Maitake) and related species and the influence of selected nutrient supplements of mushroom yield*. PhD. Thesis, Pennsylvania.
- Shen, Q., & Royse, D. (2002). Effects of genotypes of maitake (*Grifola frondosa*) on biological efficiency, quality and crop cycle time. *Appl Microbiol Biotechnol* , 58, 178–182.
- Shen, Q., & Royse, D. (2001). Effects of nutrient supplements on biological efficiency, quality and crop cycle time of maitake (*Grifola frondosa*). *Appl Microbiol Biotechnol* , 57, 74–78.
- Soares, G., De Amorin, M., & Costa-Ferreira, M. (2001). Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J. Biotechnol* , 89, 123-129.
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol Chem.* , 160, 61-73.
- Stames, P. (1993). *Growing gourmet and medicinal fungi* . Hong Kong: Ten Speed Press and Mycomedica.
- Stamets, P. (2000). Maitake of Hen-of-the-Woods *Grifola frondosa* (Dicks:Fr.) S.F. Gray. En P. Stamets, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms* (3rd ed. ed., págs. 367-376). Berkeley: Ten Speed Press.
- Takama, F., Ninomiya, S., & Yoda, R. (1981). Parenchyma cells chemical components of maitake mushroom (*Grifola frondosa* S.F. Gray) cultured artificially, and their changes by storage and boiling. *Mushroom Sci* , 11, 767-779.
- Tappi Methods. (1998). Acid-insoluble lignin in wood and pulp. T222 om-98.
- Tappi Methods. (1993). Water solubility of wood and pulp T 207 om-93.

- Thurston, C. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK* , 140, 19-26.
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycetes *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* , 221, 661-663.
- Tien, M., & Kirk, T. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol* , 161, 238-248.
- Tuor, U., Wariishi, H., Schoemaker, H., & Gold, M. (1992). Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model compound. *Biochemistry* , 31, 4986-4995.
- Van de Lagemaat, J., & Pyle, D. L. (2005). Modelling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid-containing solid-state fermentation for tannase production. *Process Biochemistry* , 40, 1773-1782.
- Weng, X.-Y., & Sun, J.-Y. (2006). Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* , 32, 226-232.
- Wood, T. M., & García Campayo, V. (1994). *Enzymes and mechanisms involved in microbial cellulolysis*. Netherlands: Kluwer Academic publishers.
- Wood, T., & Bhat, K. (1988). Methods for measuring cellulose activities. *Methods Enzymol*, 160, 87-112.
- Zabel, R., & Morrel, J. (1992). *Decay and its Prevention*. San Diego, California: Academic Press.
- Zhao, J., & Janse, B. J. (1996). Comparison of H₂O₂-producing enzymes in selected white rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 139, 215-221.
- Zhao, J., Koker, T., & Janse, B. J. (1996). Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiol. Lett.*, 143, 393-399.
- Zhou, C., & Wasser, S. P. (2004). Medicinal value of culinary-medicinal maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Aphylllophomycetidae). Review. *Int. J. Med. Mushr.*, 6, 287-313.

Referencias Web

Chen, A. (01 de agosto de 2001). <http://www.mushworld.com/>. Recuperado el 14 de noviembre de 2007.

ANEXOS

Anexo A: Composiciones de sustrato en el tiempo de fermentación

Tabla A1. Fracciones másicas de almidón en sustratos durante el transcurso de la fermentación para formulación de aserrín de roble y borra de café y aserrín de roble

	Sustrato de aserrín de roble y borra de café	Sustrato de aserrín de roble
Sustrato crudo (sin inóculo)	0,28	0,22
20 días	0,23	0,17
30 días	0,21	0,13
45 días	0,18	0,12
60 días	0,17	0,11
75 días	0,16	0,10
87 días	nd*	0,09
107 días	nd*	0,09

nd* no determinado

Tabla A2. Fracciones másicas de celulosa y hemicelulosa en sustratos durante el transcurso de la fermentación para formulación de aserrín de roble y borra de café y aserrín de roble

	Sustrato de aserrín de roble y borra de café	Sustrato de aserrín de roble
Sustrato crudo (sin inóculo)	0,261	0,340
20 días	0,270	0,330
30 días	0,245	0,285
45 días	0,220	0,244
60 días	0,215	0,230
75 días	0,165	0,200
87 días	nm*	0,190
107 días	nm*	0,190

nm* no determinado

Tabla A3. Fracciones másicas de lignina en sustratos durante el transcurso de la fermentación para formulación de aserrín de roble y borra de café y aserrín de roble

	Sustrato de aserrín de roble y borra de café	Sustrato de aserrín de roble
Sustrato crudo (sin inóculo)	0,129	0,180
20 días	0,110	0,170
30 días	0,105	0,165
45 días	0,080	0,156
60 días	0,075	0,120
75 días	0,065	0,100
87 días	nm*	0,080
107 días	nm*	0,060

nm* no determinado

Tabla A4. Fracciones másicas de fibra bruta en sustratos durante el transcurso de la fermentación para formulación de aserrín de roble y borra de café y aserrín de roble

	Sustrato de aserrín de roble y borra de café	Sustrato de aserrín de roble
Sustrato crudo (sin inóculo)	0,39	0,52
20 días	0,38	0,50
30 días	0,35	0,45
45 días	0,30	0,40
60 días	0,29	0,35
75 días	0,23	0,30
87 días	nm*	0,27
107 días	nm*	0,25

nm* no determinado

Anexo B: Contenido de azúcares reductores y Glucosamina en sustrato de aserrín de roble durante el transcurso de la fermentación en estado sólido.

	Azúcares reductores ($\mu\text{g/g S. seco}$)	Glucosamina ($\mu\text{g/g S. seco}$)
Sustrato crudo (sin inóculo)	61,21	0,00
20 días	110,85	13,33
30 días	99,36	19,17
45 días	89,42	34,58
60 días	71,69	51,25
75 días	53,34	57,08
87 días	20,39	60,25
107 días	15,76	60,50

Anexo C. Análisis bromatológicos de los sustratos de aserrín de roble y aserrín de roble y borra de café crudos

Componentes	Sustrato de aserrín de roble crudo	Sustrato de aserrín de roble y borra de café crudo
Humedad %*	52,79	52,87
Materia seca %	45,21	47,13
Nitrógeno total %	0,23	0,70
Proteína total %	1,44	4,37
Grasa total %	0,45	1,18
Fibra bruta %	52,21	38,69
Cenizas totales %	2,40	4,05
P %	0,14	0,03
Ca %	0,40	0,37
Mg %	0,10	0,03
K %	0,28	0,14
Na %	0,01	0,02
Fe p.p.m	145,47	136,72
Mn p.p.m	29,90	26,25
Zn p.p.m	17,30	290,25
Cu p.p.m	2,10	3,17

* Porcentajes en bases seca

Anexo D. Eficiencia biológica (EB) de *G. frondosa* para 14 sustratos de aserrín de roble, como parámetro de eficiencia en producción de carpóforos

Sustrato	Masa sustrato seco a la siembra (g)	Masa total de hongo fresco	Rendimiento
1	420,0	125,0	29,8
2	420,0	133,0	31,7
3	418,5	130,0	31,1
4	418,0	123,0	29,4
5	419,0	135,0	32,2
6	415,0	257,0	61,9
7	419,0	257,0	61,3
8	420,0	127,0	30,2
9	420,0	128,5	30,6
10	423,0	129,0	30,5
11	415,0	133,0	32,0
12	413,0	125,0	30,3
13	421,0	131,2	31,2
14	420,0	135,0	32,1
Promedio	5861,5	2068,7	35,3