

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE QUITO**

**CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS PRODUCIDAS  
POR EL HONGO (*Pleurotus ostreatus*) CULTIVADO EN RESIDUOS DE CAÑA DE  
AZÚCAR.**

**AUTOR:**

**WASHINGTON DAVID CABADIANA TIPAN**

**DIRECTOR:**

**CHRISTIAN FABRICIO LARENAS URÍA**

**Quito, diciembre de 2020**

## Cesión de derechos de autor

Yo Washington David Cabadiana Tipan con documento de identificación N° 1725003048, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: *“Evaluación de la actividad de enzimas lignolíticas producidas por el hongo (Pleurotus ostreatus) cultivado en residuos de caña de azúcar”*, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, diciembre 2020



.....

Nombre: Washington David Cabadiana Tipan

Cédula: 1725003048

## Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación:  
“*Evaluación de la actividad de enzimas lignolíticas producidas por el hongo (Pleurotus ostreatus) cultivado en residuos de caña de azúcar*” realizado por Washington David Cabadiana Tipan, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, diciembre del 2020



.....  
Christian Fabricio Larenas Uría

CI: 1705586046

## **Dedicatoria**

A mis padres Gerardo Cabadiana y Rosita Tipan por ser mi inspiración y los pilares fundamentales en mi desarrollo profesional por guiar mi camino y apoyarme cada instante de mi vida, por enseñarme los mejores valores de la vida, por tener constancia, humildad, trabajo y sobre todo respeto ante todo gracias por la fortaleza y amor que me han brindado esto es para ustedes.

A mis hermanos Alexandra y Carlitos Cabadiana quienes me han motivado siempre a seguir adelante, por el apoyo incondicional y todo el cariño demostrado mil gracias.

A mis sobrinos Andresito y Eimy quienes con su carisma y alegría me daban fuerzas y energías para seguir adelante, por ser un ejemplo de superación para ellos, para que alcancen y luchen por sus sueños y así siempre poder verlos sonreír.

**David Cabadiana**

## **Agradecimiento**

A la A Dios y a la virgen de El Quinche por brindarme la sabiduría y la calma para afrontar todo este proceso de vida profesional, por guiar cada uno de mis pasos.

A la Universidad Politécnica Salesiana y a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la carrera de Biotecnología y sus colaboradores.

A la Universidad Politécnica Nacional en especial a la facultad de Ingeniería Química y Agroindustria por haberme facilitado la cepa fúngica para el presente estudio.

A mi tutor, Quim. Christian Larenas Uría, por su apoyo incondicional y sus enseñanzas impartidas durante toda la carrera y en este proyecto de titulación.

A la Ing. Wendy Quisilema MSc por su apoyo incondicional y por compartir todos sus conocimientos durante esta etapa de mi vida.

**David Cabadiana**

## Índice de contenidos

Introducción .....	1
Capítulo I .....	5
1. Marco conceptual .....	5
1.1. Hongos de pudrición blanca .....	5
1.1.1. Definición.....	5
1.1.2. Usos .....	5
1.2. Género <i>Pleurotus</i> .....	6
1.2.1. Descripción.....	6
1.2.2. Ciclo de vida de <i>Pleurotus</i> .....	6
1.2.3. Estructura de <i>P. ostreatus</i> .....	7
1.2.4. Taxonomía y cualidades de <i>P. ostreatus</i> .....	8
1.3. Cultivo del hongo <i>P. ostreatus</i> .....	8
1.3.1. Preparación de semilla .....	8
1.3.2. Preparación de sustrato .....	8
1.3.3. Inoculación .....	9
1.3.4. Incubación .....	9
1.3.5. Fructificación.....	9
1.4. Residuos lignocelulósicos.....	10
1.4.1. Descripción.....	10
1.4.2. Composición química de los residuos lignocelulósicos.....	10
1.4.3. Residuo de caña de azúcar .....	11
1.5. Actividad enzimática.....	12
1.6. Principales enzimas lignolíticas .....	12
1.6.1. Enzimas lacasas (Lac).....	13
1.6.2. Lignina peroxidasa (LiP) .....	14
1.6.3. Manganeso peroxidasa (MnP) .....	14
1.7. Determinación de la actividad enzimática.....	15
1.7.1. Actividad de Lac.....	15
1.7.2. Actividad de LiP.....	16
1.7.3. Actividad de MnP.....	16

Capítulo II.....	17
2. Metodología .....	17
2.1. Recolección de sustrato .....	17
2.2. Obtención de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	17
2.3. Preparación del sustrato.....	17
2.4. Cultivo del Hongo.....	19
2.4.1. Propagación.....	19
2.4.2. Inoculación.....	19
2.4.3. Incubación.....	19
2.5. Toma de muestras para delimitar la actividad enzimática.....	19
2.6. Obtener el extracto de las enzimas lignocelulósicas (Lac), (LiP) y (MnP).....	20
2.7. Determinación enzimática de Lacasa (Lac).....	20
2.8. Determinación enzimática de Lignina Peroxidasa (LiP).....	21
2.9. Determinación enzimática de Manganeso Peroxidasa (MnP) .....	22
Capítulo III.....	24
3. Resultados y Discusión.....	24
Conclusiones .....	32
Bibliografía .....	33
Anexos .....	43

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de <i>Pleurotus ostreatus</i> . .....	8
<b>Tabla 2.</b> Composición química del residuo lignocelulósico de la caña de azúcar. ...	12
<b>Tabla 3.</b> Acondicionamiento del sustrato la caña de azúcar. ....	18
<b>Tabla 4.</b> Análisis Kruskal-Wallis de promedios por día y por enzima.....	24
<b>Tabla 5.</b> Valores de la producción de lacasas (U/L) en días. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Valores de la producción de lignino peroxidasa (U/L) en días. ....	26
<b>Tabla 7.</b> Valores de producción de manganeso peroxidasa (U/L) en días.....	27
<b>Tabla 8.</b> Análisis Kruskal-Wallis de promedios por sustrato y por enzima.....	28
<b>Tabla 9.</b> Valores de la producción de lacasa (U/L) en tratamientos.....	29
<b>Tabla 10.</b> Valores de la producción de lignino peroxidasa (U/L) en tratamientos....	30
<b>Tabla 11.</b> Estimación de la producción de manganeso (U/L) en tratamientos. ....	31



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Partes morfológicas del <i>P. ostreatus</i> . .....	6
<b>Figura 2.</b> Partes morfológicas del <i>P. ostreatus</i> . .....	7
<b>Figura 3.</b> Composición de residuos lignocelulósicos. ....	11
<b>Figura 4.</b> Oxidación de composiciones fenólicas de lignina por acción de lacasas..	13
<b>Figura 5.</b> Reacción catalítica de la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa. ....	15
<b>Figura 6.</b> Estructura ABTS. ....	16

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Recolección del sustrato, bagazo de caña de azúcar .....	43
<b>Anexo 2.</b> Caja Petri con <i>Pleurotus ostreatus</i> facilitado por la facultad de Ingeniería Química y Agroindustria de la Universidad Politécnica Nacional.....	44
<b>Anexo 3.</b> Preparación del sustrato, lavado y cortado de bagazo de caña de azúcar. .	45
<b>Anexo 4.</b> Propagación de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio de cultivo Agar papa dextrosa.	46
<b>Anexo 5.</b> Inoculación de <i>Pleurotus ostreatus</i> en cámara de flujo laminar.....	47
<b>Anexo 6.</b> Obtención del extracto enzimático de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP).....	48
<b>Anexo 7.</b> Medición de la actividad enzimática lacasa, celdas de plástico de 10 mm	49
<b>Anexo 8.</b> Medición de la actividad enzimática lignino peroxidasa, celdas de plástico de 10 mm .....	50
<b>Anexo 9.</b> Medición de la actividad enzimática manganeso peroxidasa, celdas de plástico de 10 mm.....	51
<b>Anexo 10.</b> Formación del cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	52
<b>Anexo 11.</b> Contaminación por <i>Trichoderma</i> spp y <i>Penicillium</i> spp. color verde presente en el sustrato, <i>P. ostreatus</i> estaba haciendo un crecimiento en co-cultivo con los hongos.	52

## Resumen

En esta experimentación se evaluó la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus*, conocidos también como hongos de podredumbre blanca, estos son capaces al actuar en la degradación de lignina y otras moléculas de carácter fenólico que pueden ser potenciales agentes contaminantes.

Se utilizó como sustrato, los desechos de caña de azúcar (bagazo) para el crecimiento de *P. ostreatus* necesario para el desarrollo enzimático lignocelulósico; lacasas, lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas. Se comparó la actividad enzimática entre medios de cultivo enriquecidos con carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con un sustrato no acondicionado usado como testigo.

Para establecer la actividad enzimática se utilizó mediante espectrofotometría el método del ABTS para lacasa, para la lignina peroxidasa se utilizó el método del ABTS modificado por el autor y para manganeso peroxidasa se realizó la oxidación de  $(\text{MnSO}_4)$ , modificado por el autor. Se analizó la producción enzimática durante cinco días 7, 14, 21, 28 y 35. Los resultados denotan la mayor producción enzimática de lacasa en el día 35; para manganeso peroxidasa la máxima actividad se alcanzó en el día 7, en tanto que no se evidenció la producción de la lignina peroxidasa, con el tratamiento enriquecido durante los días de experimentación.

**Palabras clave:** actividad enzimática, degradación, lignina, *Pleurotus ostreatus*.

## Abstract

In In this experimentation the enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* was evaluated, also known as white rot fungi, these are capable of acting in the degradation of lignin and other phenolic molecules that can be potential pollutants.

Sugar cane waste (bagasse) was used as a substrate for the growth of *P. ostreatus*, necessary for lignocellulosic enzymatic development; laccases, lignin peroxidases and manganese peroxidases. Enzyme activity was compared between culture media enriched with calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) and ammonium sulfate (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with an unconditioned substrate used as a control.

To establish the enzymatic activity, the ABTS method for laccase was used by spectrophotometry, the ABTS method modified by the author was used for lignin peroxidase, and for manganese peroxidase the oxidation of (MnSO<sub>4</sub>), modified by the author, was used. Enzyme production was analyzed for five days 7, 14, 21, 28 and 35. The results denote the highest enzymatic production of laccase on day 35; for manganese peroxidase the maximum activity was reached on day 7, while the production of lignin peroxidase was not evidenced, with the enriched treatment during the experimentation days.

**Keywords:** enzymatic activity, degradation, lignin, *Pleurotus ostreatus*.

## Introducción

El Ecuador es considerado un país principalmente agrícola, siendo sus cultivos más importantes: el plátano, arroz, flores, cacao y caña de azúcar (Salgado Ortiz, 2020).

La caña de azúcar es un cultivo de mucha demanda, por lo que, dicha actividad genera una enorme cantidad de empleo. Además, es necesario nombrar que, en las áreas sembradas, el 80 % del área total de sembríos está destinada a la producción de azúcar a partir del jugo de caña y alcohol etílico, mientras que el 20 % restante se destina a la elaboración de panela (Moscoso Riofrío, 2014). La actividad agrícola vinculada a la producción de caña de azúcar genera grandes cantidades de desechos, siendo el bagazo de caña uno de los desechos agroindustriales más importantes y con más deficiente manejo. En este sentido, las personas que distribuyen este forraje queman y abandonan estos residuos en un espacio determinado para que se descomponga, con la consecuente liberación de compuestos químicos binarios y demás gases tóxicos que afectan a la población y al ambiente (Rondal Llugay, 2016). Además, es importante mencionar que otras industrias como las de papel y alimentos generan gran cantidad de desechos lignocelulósicos, estos residuos tienen como destino final los botaderos de basura lo que genera una afectación a las áreas circundantes (Vaca, Izurieta, & Espín, 2014).

Todas estas razones denotan la importancia de realizar estudios que contribuyan a dar un adecuado manejo a la biomasa de la agroindustria considerada como desecho y que es fuente de celulosa, hemicelulosa y lignina, sustratos útiles para la degradación mediante enzimas ligninolíticas (Vaca, Izurieta, & Espín, 2014).

*Pleurotus ostreatus* es un basidiomiceto con gran potencial en la degradación de lignina y otras moléculas (Fontalvo & Vera, 2017).

Estos hongos se caracterizan por generar enzimas lignolíticas con cualidad oxidativa que funciona en el ambiente extracelular contra una amplia variedad de sustancias químicas

aromáticas de difícil degradación que contaminan suelos y cuerpos de agua. Así, este potente mecanismo radica en que dichos hongos, tienen características de un sistema enzimático, asociado a un rápido desarrollo del micelio (Lemache Pérez, 2017).

Así, durante las últimas décadas las aplicaciones medioambientales de hongos y enzimas modificadoras de la lignina (lacasas, manganeso peroxidasas, lignina peroxidasas), son de gran interés para generar tecnologías alternativas para las diferentes industrias (Rojas Ramírez, 2013). Como por ejemplo la industria Biofpr la cual se dedica a la obtención de biocatalizadores con características similares a la peroxidasa con el fin de oxidar una amplia gama de sustratos orgánicos e inorgánicos (Comisión Europea CORDIS, 2020). El hongo *Pleurotus ostreatus* ha sido utilizado en la industria textil, ya que por medio de sus enzimas logra degradar los tintes en el agua que provienen de la industrialización del tejido (Kravetz, González, & Giorgi, 2016). *Pleurotus ostreatus*, conocido con el nombre común de hongo ostra, pertenece a los Himenomycetes, es un eficiente degradador de lignina y celulosa, ya que produce enzimas lignolíticas durante todo su crecimiento (Varnero, Quiroz, & Álvarez, 2010).

Cabe resaltar que *Pleurotus ostreatus*, es un hongo comestible de producción masiva en el mundo, ya sea por su gran calidad nutricional y a la vez, por los metabolitos secundarios que genera como: enzimas, polipéptidos, policétidos, ácidos grasos, terpenoides y flavonoides (Huitrón Contreras, Nava Galicia, & Bibbins Martínez, 2020). Estos metabolitos son útiles en diversos ámbitos tecnológicos e industriales (Ferrer-Romero, Mas-Diego, Beltrán-Delgado, Rodríguez-Quiala, & Morris Quevedo, 2019).

Por lo anteriormente mencionado, se formula la siguiente pregunta de investigación: ¿El basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* produce una cantidad significativa de enzimas lignocelulósicas utilizando como sustrato nutritivo el bagazo de caña de azúcar?

Existen investigaciones que se han realizado molecularmente con *Pleurotus ostreatus*, una de ellas es la manipulación de la expresión de la proteína 1 pequeña secretada (Ssp1) la cual altera los patrones de desarrollo y metabolismo en *Pleurotus ostreatus* (Feldman, Amedi, Carmeli, Yarden, & Hadar, 2019).

El manejo inadecuado de residuos o materiales peligrosos han causado un gran problema de contaminación ambiental, es por ello que en la actualidad se busca generar tecnologías innovadoras para restaurar los daños ambientales, debido a la consecuencia de altos índices de contaminantes liberados al medio ambiente producto de diferentes procesos productivos.

Existen métodos que dan soluciones parciales a los problemas, por lo que es necesario implementar estrategias que no hagan daño al ambiente.

La biotecnología desempeña un papel importante en la manipulación de sistemas biológicos para obtener transformaciones tecnológicas. La aplicación de macro y microorganismos es una técnica eficiente, y no difícil de manejarla con el fin de ser utilizados para degradar agentes contaminantes parcial o completamente. Además, estos compuestos contaminantes en su mayoría llegan a presentar problemas a la salud.

En ese sentido, se puede argumentar que, con este estudio, se implementa una alternativa de solución a este problema ambiental en el que se utilizará bagazo de caña como medio de crecimiento, para la producción de sistemas enzimáticos, los que ayudarán a la transformación, reducción o eliminación de compuestos contaminantes como: el metano, monóxido de carbono, óxido de nitrógeno que son producidos por la quema de este desecho, con lo cual se podrá reducir o eliminar el impacto ambiental.

Consiguiente, el objetivo general de esta experimentación es evaluar la actividad enzimática de enzimas lignolíticas producidas por el hongo ostra (*Pleurotus ostreatus* CP-202) cultivado en residuos lignolíticos de residuos de caña de azúcar, como objetivos específicos: se plantea la

obtención del extracto enzimático en los diferentes tiempos de incubación de *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos de caña de azúcar (bagazo), y la determinación de la actividad catalítica de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) en varios días de producción por medio de espectrofotometría.

Como hipótesis se plantearon: la hipótesis de investigación (Hi) *Pleurotus ostreatus* presenta mayor producción de enzimas lignocelulósicas en bagazo de caña de azúcar enriquecido, la hipótesis nula (Ho) sostiene que no existe mayor cantidad de enzimas lignocelulósicas usando bagazo de caña de azúcar sin enriquecimiento de nutrientes.



## **Capítulo I**

### **1. Marco conceptual**

#### **1.1. Hongos de pudrición blanca**

##### **1.1.1. Definición**

Los hongos de podredumbre blanca son aquellos que permiten el reciclaje del carbono proveniente de la lignina, estos hongos son los responsables en la modificación de sus moléculas para deshacer la biomasa lignocelulósica, ya que tienen un sistema enzimático fuera de la célula no específico, por medio del cual descomponen estructuras semejantes de distintas complejidades químicas, logrando así transformar o degradar compuestos contaminantes e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Domínguez et al. 2010).

##### **1.1.2. Usos**

La importancia de los hongos de podredumbre blanca, radica en la alteración de compuestos contaminantes y de difícil descomposición como son los plásticos, plaguicidas, metales pesados, detergentes (Paszczynski & Crawford, 1995).

Además, los hongos de pudrición blanca, también llamados hongos ligninolíticos, tienen aplicación en la fabricación de papel, en procesos de eliminación de la lignina en materia vegetal, en procesos de biorremediación de fuentes contaminadas, debido a su baja especificidad, esto les permite oxidar, también, se puede obtener una extensa diversidad de moléculas orgánicas que afectan al ambiente, entre ellas los tintes, hidrocarburos poliaromáticos y los biocidas etc (Quintero D., Feijoo C., & Lema R., 2006).

Es indispensable conocer que en los años pasados y en la actualidad, alrededor del mundo ha aumentado el incremento para el consumo de hongos, lo que ha influido en el aumento en la demanda y la producción (Baena González, 2005).

## 1.2. Género *Pleurotus*

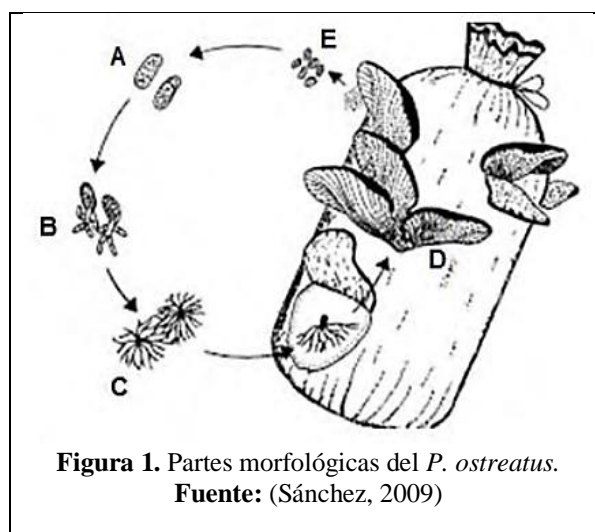
### 1.2.1. Descripción

*Pleurotus* comprende grupos que presentan características en tonalidades crema, gris, amarillento, rosado, y otras de color opaco. Estas especies pueden mostrar una forma de cono, o concha de ostra. Por otro parte, su cuerpo es longitudinalmente decurrente sobre la base de su soporte, mismo que puede ser excéntrico o puede no haberlo. Finalmente, las esporas son blancas, crema o lila pálido, y; presentan forma cilíndrica (Córdoba & Cultid, 2015).

### 1.2.2. Ciclo de vida de *Pleurotus*

De acuerdo con Díaz Godínez (2009), se describe el periodo de vida del grupo *Pleurotus*.

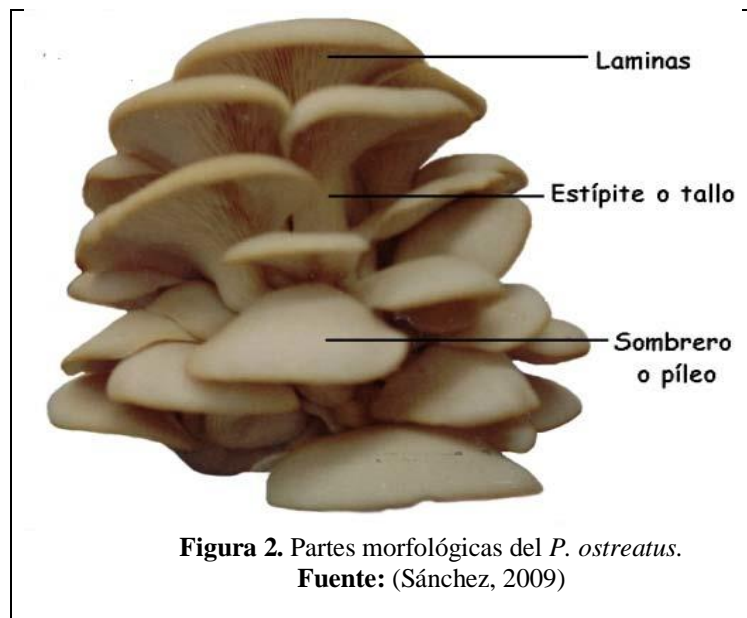
- A. **Micelio primario monocariótico:** las basidiosporas germinan con un núcleo;
- B. **Plasmogamia:** Existe un intercambio nucleico, en el que se fusionan los dos micelios primarios;
- C. En esta etapa, se forma el micelio secundario dicariótico;
- D. **Cariogamia:** esta fusión nuclear pasa en los basidios, mismos que están en el cuerpo fructífero;
- E. **Meiosis:** se da origen a las células haploides, las cuales se expulsan al ambiente



### 1.2.3. Estructura de *P. ostreatus*

*P. ostreatus* está principalmente estructurado de: sombrero, láminas (himenio), pie reducido y micelio. (Figura 2).

- **Sombrero:** mide alrededor de 5 a 20cm en su diámetro, es lo que cubre al pie, puede manifestarse de diferentes colores, tiene forma de un paraguas y presenta varios diseños (López Rodríguez, Hernández Corredor, Suárez-Franco, & Borrero, 2008).
- **Láminas:** se extienden desde el pie hasta llegar al sombrero, dispuestas como las varillas de un paraguas, espaciadas unas de otras donde se producen esporas para la multiplicación del hongo (Córdoba & Cultid, 2015).
- **Pie:** totalmente lateral a veces se presenta oblicuo, mantiene el color de sus laminillas (Córdoba & Cultid, 2015).
- **Micelio:** también denominado hifas, filamentos a partir de los cuales empieza la formación del hongo.



**Figura 2.** Partes morfológicas del *P. ostreatus*.  
**Fuente:** (Sánchez, 2009)

#### 1.2.4. Taxonomía y cualidades de *P. ostreatus*

Proviene del griego “*pleuro*”, dando el significado a una forma lateral en relación a la posición donde se encuentra el pie; y “*ostreatus*” que en latín significa ostra debido a su forma que adopta, haciendo referencia a su color y a su cuerpo fructífero (Robalino Velasco, 2017).

**Tabla 1.**

Taxonomía de *Pleurotus ostreatus*.

Nombre científico	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Nombre Común	Hongo ostra, setas
Reino	Fungi
Subreino	Fungi superior
Clase	<i>Himenomycetes</i>
Orden	Agaricales
Familia	<i>Tricholomataceae</i>
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>Ostreatus</i>

**Fuente:** (Alexopoulos, Mims, & Blackwell, 1996)

**Elaborado por:** El Autor, 2020.

#### 1.3. Cultivo del hongo *P. ostreatus*

Dentro del proceso del cultivo existe consumo de nutrientes y la degradación de materia muerta, dado así, la producción de setas o cuerpos fructíferos (Robalino Velasco, 2017).

##### 1.3.1. Preparación de semilla

La semilla es el medio por el cual se va a desarrollar el hongo, aquí se va a expandir la masa del micelio y así poder crecer en el sustrato de producción.

##### 1.3.2. Preparación de sustrato

De acuerdo con Córdoba & Cultid (2015), la preparación del sustrato es de la siguiente manera:

- **Lavado:** Se debe realizar diferentes lavados para eliminar la cantidad de azúcar.
- **Picado:** Los valores que más se mencionan en investigaciones van de 1,5 a 5 cm.

- **Humectación:** La humedad debe ser del 70 al 80 %.
- **Pasteurización:** Primero se debe someter a calor al medio de cultivo, ya que de esta manera se disminuye la flora microbiana nociva y se evita que compitan por espacio y por nutrientes los microorganismos con el *P. ostreatus*.
- **Siembra:** Un proceso de mucha importancia, ya que de esta manera nos aseguramos del crecimiento del hongo. Así, el sustrato esterilizado debe estar a una temperatura ambiente con una humedad de 70 %, permitiendo el intercambio gaseoso necesario para el crecimiento.

### **1.3.3. Inoculación**

Es la primera etapa de cultivo, en el que se adiciona la semilla del hongo al sustrato preparado anteriormente, mismo que debe estar estéril. Este proceso se realiza en un lugar cerrado y una superficie desinfectada, para evitar la contaminación en el establecimiento micelial (Paucara Fernández, 2014).

### **1.3.4. Incubación**

Es la segunda etapa de cultivo, en la que el conjunto de hifas se prolifera en el sustrato mediante sus condiciones ambientales óptimas. Es preciso que la temperatura de incubación en la cámara, sea alrededor de 20-28 °C, una humedad relativa de 70-80 % y poca iluminación (Paucara Fernández, 2014).

### **1.3.5. Fructificación**

Es la tercera etapa de cultivo, conocida como fase de fructificación, en la que el micelio del hongo invade al sustrato y se observan primordios, mismos que forman el cuerpo fructífero. En dicha fase para que se formen los hongos, es necesario modificar las condiciones de la cámara de manera que se aumente la humedad relativa y las condiciones de luminosidad (Paucara Fernández, 2014).

## **1.4. Residuos lignocelulósicos**

### **1.4.1. Descripción**

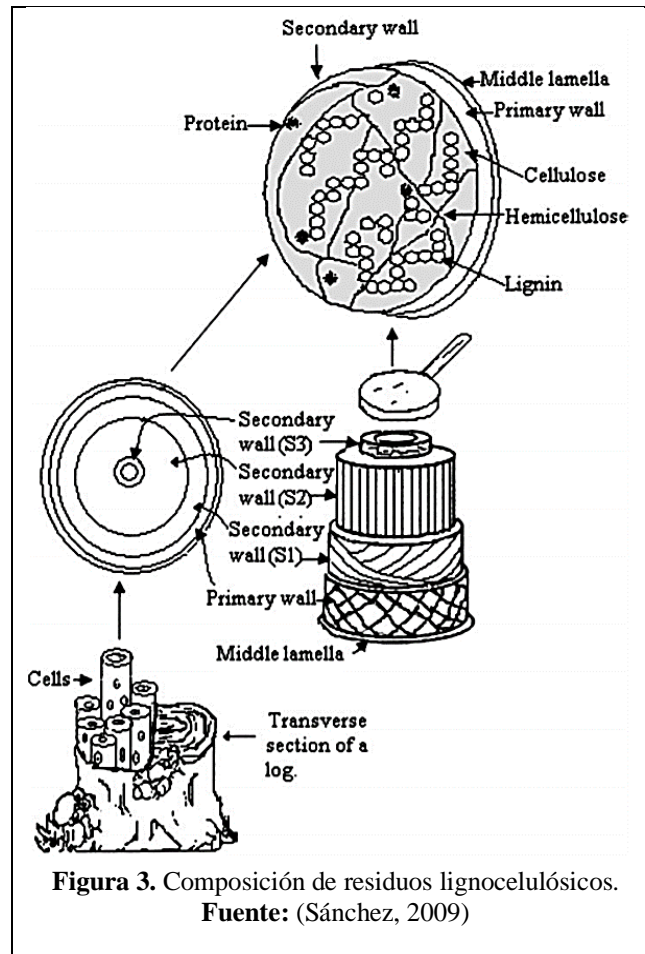
La lignocelulosa procedente de la formación de residuos vegetales, formando la biomasa producida por la fotosíntesis (denominada fotomasa) y representa el más abundante recurso orgánico en el suelo (Sánchez, 2009).

Este tipo de biomasa lignocelulósica se presenta en cantidades abundantes en la naturaleza y no se descomponen de manera simple o por organismos presentes en el ecosistema (Medina Morales et al. 2018).

### **1.4.2. Composición química de los residuos lignocelulósicos**

De acuerdo con Medina et al. (2018), los residuos lignocelulósicos tienen como principales componentes la celulosa, la hemicelulosa enlazados mediante la lignina (Figura 3). Así, estos residuos están conformados por celulosa (40-50 %), heteropolisacáridos (20-35 %) y lignina (10-15 %). (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009; Deutschmann & Dekker, 2012; Ormsby, Kastner, & Miller, 2012; Wang, Xiong, Wang, Din, & Chen, 2017).

La celulosa y la hemicelulosa son moléculas no ramificadas formada por azúcares; la lignina se manifiesta como el polímero más abundante en la naturaleza sintetizado a partir de fenilpropanoides (Sánchez, 2009).



### 1.4.3. Residuo de caña de azúcar

El residuo de la caña de azúcar se genera por la actividad comercial y por grandes azucareras existentes en el mundo (Medina Morales et al. 2018). Así, este residuo es aprovechado para la transformación y generación de nuevos productos ya sean químicos, de biocombustibles, de alimento, de papel, etc. (Vohra, Manwar, Manmode, Padgilwar, & Patil, 2014). Pero, en algunas industrias azucareras se mantiene la combustión de material lignocelulósico como un tipo de combustible, dicha combustión es ineficiente y produce daños ambientales, por lo que se busca nuevas maneras para la utilización de este desecho lignocelulósico (Monteiro et al. 2016).

Por otro lado, en cuanto a la composición de la caña de azúcar, se menciona lo siguiente: celulosa (43 %), hemicelulosa (25 %) y lignina (21 %). No solo de la celulosa y la hemicelulosa

se puede aprovechar la producción de azúcares, también se puede aprovechar de la lignina ya que contiene ácido p-cumárico y ácido ferúlico (Vallejos et al. 2016).

**Tabla 2.**

Composición química del residuo lignocelulósico de la caña de azúcar.

<b>Componentes del residuo lignocelulósico</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Celulosa	43
Hemicelulosa	25
Lignina	21

**Fuente:** (Jain, Wei, & Tietje, 2016)

**Elaborado por:** El Autor, 2020

**1.5. Actividad enzimática**

El grupo de enzimas lignolíticas tiene poca especificidad, ya que las peroxidasas y oxidasas cuando ejercen sobre la molécula de lignina, esta genera radicales libres no estables con tendencia, por lo que tiene polimerizaciones (Díaz Godínez, 2009).

La producción de enzimas de *P. ostreatus* es de vital importancia para una amplia aplicación en la biotecnología como en biorremediación, la preparación de biorreactores, la industria del papel, ect (Chaparro, Rosas, & Varela, 2009).

**1.6. Principales enzimas lignolíticas**

Los hongos de pudrición blanca a través de mecanismos oxidativos, generan cambios en la lignina (Díaz Godínez, 2009).

Las enzimas lignocelulósicas que se manifiestan de manera recta u opuesta en la lignina son las lacasas (Lac), lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa, las cuales están ampliamente distribuidas entre los basidiomicetos (Córdoba & Cultid, 2015).



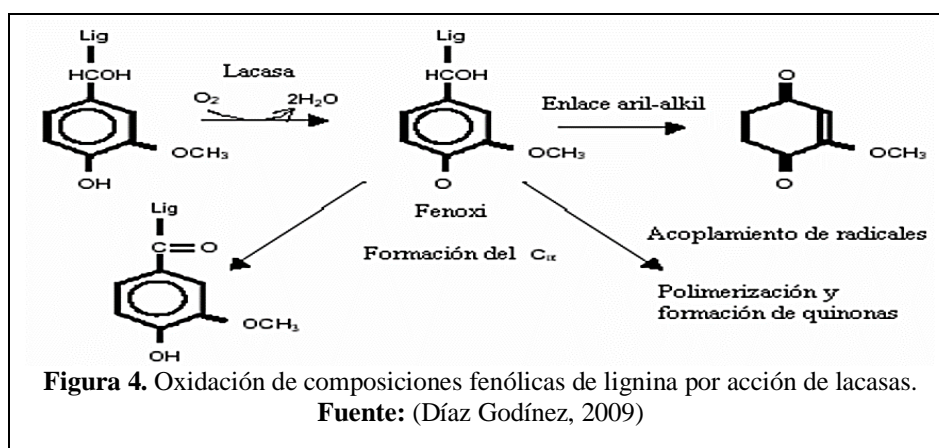
### 1.6.1. Enzimas lacasas (Lac)

De acuerdo con Díaz Godínez (2009), las enzimas lacasas se clasifican en el grupo de enzimas llamadas azul cobre oxidadas; son glicoproteínas, en el que su punto isoeléctrico y pH óptimo son ácidos. Estas enzimas pueden variar de 3 a 7 en su pH, pero su punto estable es a 4,5 a una temperatura de 37 °C (Córdoba & Cultid, 2015).

A partir de enzimas aisladas de las setas (hongos) se ha establecido la estructura molecular de las lacasas. Dichas enzimas pertenecen a las ligninolíticas que están presentes en basidiomicetos para así desintegrar a la lignina y sus enzimas adquieren distintas formas dependiendo de la especie protista (Giardina et al. 1999).

Las lacasas para la oxidación de este grupo de fenoles y no fenoles requieren cobre y oxígeno, a través de la donación de un electrón dando como resultado los radicales libres, lo que permite la polimerización de los fenoles (Claus, 2003).

Por lo tanto, en la oxidación se presenta una reacción de un electrón que genera moléculas muy reactivas, así por medio de la oxidación del electrón, este es acoplado y se produce una disminución de 4 electrones de  $O_2$ . Pero, la molécula principal podría tener una segunda oxidación o una polimerización. Finalmente, lacasa ejerce acción para obtener la ruptura del enlace de lignina, incorporando la formación del  $C_{\alpha}$ , y por último la separación del  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  y del enlace aril-alkil (Díaz Godínez, 2009). (Figura 4).



### **1.6.2. Lignina peroxidasa (LiP)**

Según Córdoba & Cultid (2015), la lignina peroxidasa es una glicoproteína de tipo oligomanosa, misma que estimula la descomposición de polímeros a través de la oxidación de la lignina, si no existe peróxido de hidrógeno, esta reacción no se puede realizar.

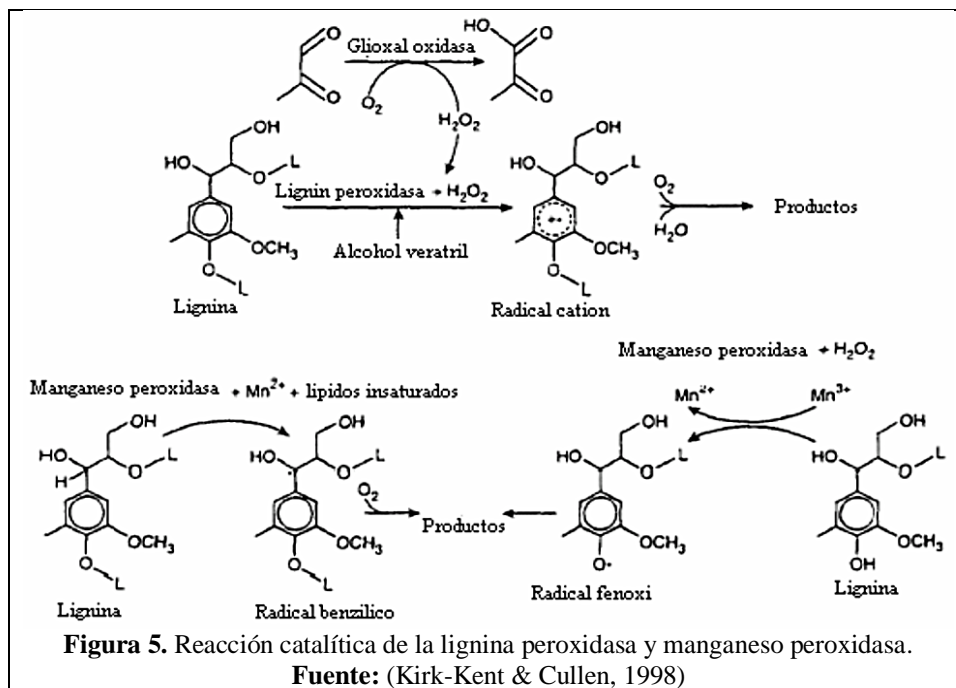
La LiP no ingresa por los poros de la pared celular, sino actúa sobre el polímero de la lignina. Este tipo de degradación se llama pudrición simultánea, así cuando los hongos ya han degradado suficientemente la lignina, luego de haberla removida del interior de la pared celular, las enzimas ya pueden penetrar (Díaz Godínez, 2009).

La oxidación de la LiP a fenoles, comienza con la atracción de un electrón de la formación del aromático con el sustrato que entrega la lignina, el que resulta a un catión radical aril que responde como radical y catión, obteniendo muchos fragmentos degradados (Kirk-Kent & Cullen, 1998). (Figura 5).

### **1.6.3. Manganeso peroxidasa (MnP)**

La MnP cataliza la oxidación de la lignina y provee de oxidantes de bajo peso molecular. Este tipo de enzimas está presente en muchos hongos de pudrición blanca, misma que actúa sobre unidades fenólicas de lignina, y las transforma a radicales fenólicos produciendo una depolimerización extensa. Así, de acuerdo con Díaz Godínez (2009), es importante mencionar que los hongos de pudrición blanca que no tiene lignina peroxidasa, pero presentan manganeso peroxidasa, van a degradar estructuras fenólicas de lignina. La MnP fue encontrada en un principio en la biomasa lignocelulósica de *P. chrysosporium*, pero luego fue detectada en algunos basidiomicetos: *Phlebia radiata*, *Panus tigrinus*, *P. ostreatus* (Niladevi, 2009). En cuanto a la oxidación del manganeso peroxidasa, se puede mencionar que la MnP y el sistema

de peroxidación de lípidos, sufre una baja en su peso molecular de los polímeros fenólicos y de los fenoles metilados en la lignina (Kirk-Kent & Cullen, 1998) (Figura 5).

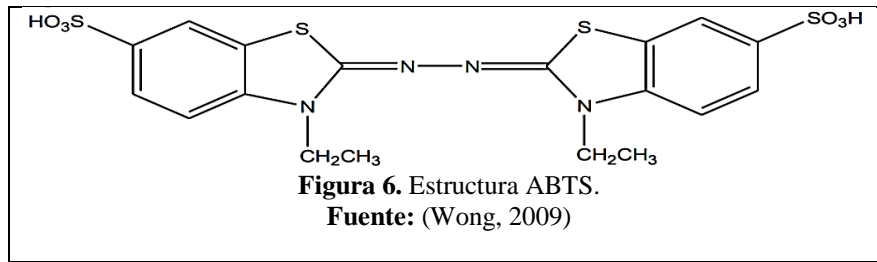


## 1.7. Determinación de la actividad enzimática

### 1.7.1. Actividad de Lac

La producción de la actividad enzimática de lacasa se determinará por el método propuesto por Córdoba & Cultid (2015), a través de la oxidación de al catión radical ABTS<sup>+</sup> por espectroscopia UV-visible.

En la presente investigación se utilizó la oxidación mediante ABTS, por lo que se debe mencionar que, el intermediario comúnmente estudiado es el ABTS que sirve para la cinética de reacciones enzimáticas, aplicando ciertas sustancias nitrogenadas. El ABTS es reducido por la enzima y éste oxida las estructuras de la lignina. Es importante mencionar que puede ingresar a la pared celular, ya que su tamaño es reducido y permite el accionar dentro de los grupos fenólicos y no fenólicos (Córdoba & Cultid, 2015). (Figura 6).



### 1.7.2. Actividad de LiP

El producto enzimático en lignina peroxidasa se determinará por el método propuesto por Córdoba & Cultid (2015), mediante la Oxidación del ABTS, modificado por el autor, por espectroscopia UV-visible. y para manganeso peroxidasa se utilizó el método de oxidación de (MnSO<sub>4</sub>), modificado por el autor. alcohol veratrílico a aldehído veratrílico por espectroscopia UV-visible.

### 1.7.3. Actividad de MnP

La producción de la actividad enzimática de manganeso peroxidasa se determinará por el método propuesto por Córdoba & Cultid (2015), modificado por el autor, por espectroscopia UV-visible.

## Capítulo II

### 2. Metodología

#### 2.1. Recolección de sustrato

El sustrato bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) se obtuvo en un puesto de comercialización en el mercado que se encuentra en la parroquia El Quinche, perteneciente al cantón Quito, provincia de Pichincha. Posteriormente, se seleccionó las muestras más frescas y estas se mezclaron entre sí para la obtención del sustrato (Anexo 1).

#### 2.2. Obtención de *Pleurotus ostreatus*

El hongo de podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus* se obtuvo a través de la facultad de Ingeniería Química y Agroindustria de la Universidad Politécnica Nacional, quienes fueron los encargados de aislar dicho hongo (Anexo 2). En este aislamiento se utilizó carpóforos, a los cuales se aplicó un protocolo de desinfección utilizando hipoclorito de sodio al 2 % por 1 minuto y agua jabonosa al 10 % por 10 minutos. Por último, se lavaron con agua estéril y, con un bisturí se realizaron cortes aproximadamente de 1 cm del cuerpo fructífero, mismos que se colocaron en cajas petri con medio sólido de Agar Papa Dextrosa (PDA).

#### 2.3. Preparación del sustrato

En este estudio, se utilizó como sustrato el bagazo de caña de azúcar, para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* (Anexo 3).

Las muestras del sustrato se transportaron en sacos, hacia el lugar en el cual se va a realizar el correspondiente pretratamiento. Todo el sustrato se sumergió en agua (H<sub>2</sub>O) para eliminar todos los residuos sólidos de mayor tamaño, tierra y cualquier microorganismo. Además, a este sustrato se le realizó varios lavados con agua (H<sub>2</sub>O) caliente, cuyo fin fue eliminar el jugo presente en la caña de azúcar, ya que este podría actuar como fungicida y así inhibir el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* (Córdoba & Cultid, 2015).

Posteriormente, el sustrato se escurrió y se dejó secar al ambiente por cinco (5) días, luego, se cortó el bagazo de caña de 2 a 4 cm de longitud. Este proceso fue realizado con una amoladora dewalt pequeña (Varnero, Quiroz, & Álvarez, 2010).

El sustrato para este cultivo de *Pleurotus ostreatus* fue acondicionado con carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) al 2 % en peso y, con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 1 % en peso. Además, se obtuvo un testigo el cual no fue acondicionado con ninguna sustancia. De esta manera, se tendría como variables independientes a los sustratos y días de crecimiento, mientras que la variable dependiente es lo que se genere de la producción de la obtención de estas enzimas lignocelulósicas.

Por último, se incorporó agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) hasta obtener el 70 % de humedad (López-Rodríguez, Hernández-Corredor, Suárez-Franco, & Borrero, 2008).

### Tabla 3.

Acondicionamiento del sustrato la caña de azúcar.

Tratamiento	Sustrato acondicionado	Bagazo de caña de azúcar % en peso de sustrato
T1	( $\text{H}_2\text{O}$ ) destilada	70
T2	Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ )	1
T3	Carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ )	2

Elaborado por: El Autor, 2020.

El sustrato se empacó en fundas de polifán y con una punta desinfectada se hizo agujeros en las bolsas para tener una buena aireación. Por cada bolsa se pesó 500 g de sustrato. Después se envolvieron cada una de las bolsas con papel craft y se procedió a esterilizar en la autoclave Tuttnauer 3870 HGS D-line durante una hora a 121 °C y, por último, una vez frías se inocularon.

## **2.4. Cultivo del Hongo**

### **2.4.1. Propagación**

El micelio de *Pleurotus ostreatus* se propagó en placas Petri, por lo que se colocó 1 g de micelio en 5 mL de agar papa dextrosa y, posteriormente se dejó en la incubadora a 25 °C por 7 días (Varnero, Quiroz, & Álvarez, 2010). (Anexo 4).

### **2.4.2. Inoculación**

Los residuos de caña (bagazo) se dispusieron en una cámara de flujo, para sembrar el micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* (CP-202). Después se sembró todo el hongo que creció en una caja petri para una funda de polifán. (Anexo 5).

### **2.4.3. Incubación**

Este proceso se realizó en un lugar libre de contaminantes, un lugar cerrado en el que las fundas de polifán con el hongo inoculado, se almacenaron en un lugar con ventilación. Así, el ambiente estuvo aireado y se controló la humedad de los sustratos, evitando que no pierdan humedad por lo que se regaba agua para mantener una humedad entre 60 % a un 80 %. Se recalca que, todos los días se inspeccionaba las fundas para observar si había crecimiento de micelio y así evitar la aparición de posibles contaminantes.

## **2.5. Toma de muestras para delimitar la actividad enzimática**

Se determinó en 3 tratamientos (T1 a T3), por triplicado (R1 a R3), teniendo 9 unidades experimentales. La producción de enzimas lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa se analizaron en diferentes días 7, 14, 21, 28 y 35. Durante estos días ocurrió la formación y crecimiento de *Pleurotus ostreatus*.

Por otro lado, y siguiendo con el cumplimiento a cada uno de los objetivos de este estudio, el proceso subsiguiente fue:

- Obtención del extracto enzimático de las enzimas lignocelulósicas.
- Medición de la producción enzimática de las enzimas lignocelulósicas.

## 2.6. Obtener el extracto de las enzimas lignocelulósicas (Lac), (LiP) y (MnP)

Se siguió el método empleado por Córdoba & Cultid (2015):

- En tubos FALCON para centrifuga se pesó 7500 g de bagazo de caña de azúcar que contiene el hongo *P. ostreatus* y se adiciono 15 mL de buffer de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) 1M y con un pH de 5,0;
- Después los tubos se colocaron en un agitador a 200 rev/min durante 10 minutos, para posteriormente ser centrifugadas en HERMLE Z400 a 3500 rpm por 30 minutos;
- Se filtró el sobrenadante, sobre papel filtro y,
- Finalmente, el extracto se almacenó a 4 °C. (Anexo 6).

## 2.7. Determinación enzimática de Lacasa (Lac)

Se determinó la actividad de lacasa por medio de la oxidación del ABTS al catión radical ABTS<sup>+</sup>. A continuación, se adiciono por medio de una micropipeta, 1050 µL de buffer de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) 1 M pH 5,00, 2100 µL de extracto enzimático y 350 µL de ABTS, generando un volumen de 3,50 mL, todo esto se adiciono a una celda de plástico de 10 mm. En consecuencia, se observó un cambio de coloración por la oxidación del ABTS (Anexo 7).

La absorbancia se analizó a una longitud de 420 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (JASCO V -730) ( $\epsilon_{420\text{nm}} = 3600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El blanco se preparó adicionando 105 µL de buffer de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) 1 M pH 5,00, 2100 µL de extracto enzimático y el ABTS fue reemplazado por 350 µL de agua destilada, obteniendo un volumen de 3,50 mL.

La unidad de una lacasa, es igual a µmol que se produce en un minuto (U= µmol/min) (Córdoba & Cultid, 2015).



Es este sentido se comprende que, las unidades de lacasas (U/L) se cuantifica mediante la siguiente ecuación (Córdoba & Cultid, 2015).

$$Lac \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * L} \right) = \frac{\Delta ABS * Vr * fd}{t * \epsilon * L * Vm} \quad (1)$$

Donde,  $\Delta ABS$  hace referencia a la lectura de la absorbancia final menos la absorbancia inicial; Vr: es el volumen total de la reacción (mL); fd: factor de dilución,  $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar; L: longitud de la celda (cm) y Vm: volumen de la muestra (mL) (Córdoba & Cultid, 2015).

## 2.8. Determinación enzimática de Lignina Peroxidasa (LiP)

Se determinó la actividad de lignina peroxidasa por medio de la oxidación del ABTS al catión radical  $ABTS^+$ . A continuación, se incrementó por medio de una micropipeta, 600  $\mu\text{L}$  de buffer de tartrato de sodio y potasio ( $KNaC_4H_4O_6H_2O$ ) 0,25 M pH 4,5, 2250  $\mu\text{L}$  de la sustancia enzimática y 30  $\mu\text{L}$  de agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) 4 mM, obteniendo un volumen de 3,0 mL. Todos estos reactivos se adicionaron a una celda de plástico de 10 mm. Luego, se analizó la medición de la absorbancia a un periodo espacial de 310 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (JASCO V -730) ( $\epsilon_{310nm} = 9,3 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Debe señalarse que, la solución constante denominada blanco se realizó con la adición de 600  $\mu\text{L}$  de buffer de tartrato de sodio ( $KNaC_4H_4O_6H_2O$ ) 0,25 M pH 4,5, 120  $\mu\text{L}$  de ABTS (Ácido 2,2-azino bis (3-etilbencen-tiazolina- 6-sulfónico), 2250  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 30  $\mu\text{L}$  de agua destilada, este fue reemplazado por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Córdoba & Cultid, 2015). Es conveniente recalcar que se debe mantener los tubos a baño maría a 30 °C por 1 hora, enfriar en agua y leer la absorbancia. (Anexo 8).

La unidad de una lignina peroxidasa, es igual a  $\mu\text{mol}$  que se produce en un minuto (U=  $\mu\text{mol}/\text{min}$ )

Es este sentido de acuerdo con Córdoba & Cultid (2015), se comprende que, las unidades enzimáticas (U/L) de LiP se calculan con la siguiente fórmula.

$$LiP \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * L} \right) = \frac{\Delta ABS * Vr * fd}{t * \epsilon * L * Vm} \quad (2)$$

Donde,  $\Delta ABS$  hace referencia a la lectura de la absorbancia final menos la absorbancia inicial;  $Vr$ : es el volumen total de la reacción (mL);  $fd$ : factor de dilución,  $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar;  $L$ : longitud de la celda (cm) y  $Vm$ : volumen de la muestra (mL) (Córdoba & Cultid, 2015).

## **2.9. Determinación enzimática de Manganeso Peroxidasa (MnP)**

El análisis para manganeso se realizó mediante un ensayo modificado por el autor en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana, en el que, en un tubo de ensayo de 10 mL con una micropipeta se adicionó 1750  $\mu\text{L}$  de buffer de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0,1 M pH 4,5, 175  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) 2 Mm, 1575  $\mu\text{L}$  de la sustancia enzimática extraída, finalmente se incorporó 105  $\mu\text{L}$  de Agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Posteriormente, los 105  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogeno, se añade en un buffer de fosfato de sodio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) 2 M a un pH 8,00. Así pues, se deja que la reacción ocurra en un baño maría a 30 °C por 10 minutos, como último paso se adiciona 0,04 mL de Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 2 N. (Anexo 9).

La absorbancia se evidencia en un periodo espacial de 468 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (JASCO V -730) ( $\epsilon_{468\text{nm}} = 10 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Así mismo, la solución constante llamada blanco se hizo con la adición de 1750  $\mu\text{L}$  de buffer de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0,1 M pH 4,5, 175  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) 2 mM, 1575  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, por último, el agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se sustituyó por 105  $\mu\text{L}$  de agua destilada (Córdoba & Cultid, 2015).

Es este sentido de acuerdo con Córdoba & Cultid (2015), se plantea que, las unidades de la obtención enzimática (U/L) de MnP se obtienen con la siguiente ecuación.

$$MnP \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * L} \right) = \frac{\Delta ABS * Vr * fd}{t * \epsilon * L * Vm} \quad (3)$$

Donde,  $\Delta ABS$  hace referencia a la lectura de la absorbancia final menos la absorbancia inicial; Vr: es el volumen total de la reacción (mL); fd: factor de dilución;  $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar; L: longitud de la celda (cm) y Vm: volumen de la muestra (mL) (Córdoba & Cultid, 2015).

Para los análisis se empleó el test de Kruskal-Wallis.

## Capítulo III

### 3. Resultados y Discusión

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar el efecto del tiempo de cultivo y el tipo de sustrato sobre la actividad enzimática de lacasas, lignino peroxidasas y manganeso peroxidasas producidas por *Pleurotus ostreatus*.

#### Efecto del tiempo sobre la actividad enzimática

El análisis estadístico permite concluir que la actividad enzimática de lignino peroxidasas y lacasas, permanece constante durante el tiempo de experimentación. En tanto que existe una diferencia en el día 5 donde existe un incremento de manganeso peroxidasa.

#### Tabla 4.

Análisis Kruskal-Wallis de promedios por día y por enzima.

	Lacasas	Lignino peroxidasa	Manganeso peroxidasa
Chi-squared	7,3018	2,1288	9,6667
Df	4	4	4
p-value	0,1208	0,7121	0,04643

Elaborado por: El Autor, 2020.

A continuación, se muestra los valores promedio para lacasas en función del tiempo.

**Tabla 5.**

Valores de la producción de lacasas (U/L) en días.

Días	Medias
D2	0,16
D3	0,19
D4	0,23
D1	0,27
D5	0,35

**Elaborado por:** El Autor, 2020.

En la experimentación realizada por Córdoba & Cultid (2015), la productividad de lacasas generada por *P. ostreatus* muestra que su actividad no es constante y varía dependiendo de los días de cultivo, este oscila entre los 7 y 42 días, lo que concuerda con este trabajo de investigación, ya que la actividad enzimática tuvo una oscilación entre los 7 y 35 días, además se puede constatar que los valores que se producen en la actividad enzimática no son constantes, por lo que, existe un aumento y disminución del mismo.

Aguinaga Bósquez (2012), menciona que llegó a un nivel alto de lacasa en el día 34, evaluando diferentes sustratos para el rendimiento de *Pleurotus ostreatus*.

Por otro lado, cuando baja la actividad enzimática según Manjarrés, Castro, & Rodríguez Sandoval (2010), se debe a al incremento de hifas, la enzima no se produce en mayor cantidad y empieza el desarrollo de los primordios para la formación del cuerpo fructífero.

Para el caso de la lignina peroxidasa, se obtuvieron los siguientes valores promedio.

**Tabla 6.**

Valores de la producción de lignino peroxidasa (U/L) en días.

<b>Días</b>	<b>Medias</b>
D2	0,06
D5	0,07
D4	0,09
D3	0,09
D1	0,10

**Elaborado por:** El Autor, 2020.

En estudios realizados los valores de medidas de absorbancia son cero y valores cercanos a cero, lo que indica que *P. ostreatus* no presenta una actividad lignina peroxidasa significativa. No se observa una tendencia de incremento durante los días de desarrollo, lo cual corroboran algunos autores y designan que *P. ostreatus* no es buen generador de lignina peroxidasa (Vaca Proaño, 2011).

Según lo que estipula Guillén-Navarro, Márquez-Rocha, & Sanchez-Vázquez (1998), en su estudio trataron de obtener extractos enzimáticos con actividad ligninolítica en sustrato líquido y sustrato sólido con paja para obtener *P. ostreatus*, pero no obtuvieron buenos resultados, ya que no se detectaron actividad enzimática lignino peroxidasa en ninguna de las dos condiciones. Además, en trabajos realizados, para la obtención de extractos enzimáticos en rastrojo de maíz, Vaca, Izurieta, & Espín (2014) mencionan que la actividad enzimática de lignino peroxidasa prácticamente es nula.

Los valores que se obtienen se comparan con otros autores los cuales también mencionan que la actividad enzimática de lignino peroxidasa durante los días de crecimientos tienden a cero,

sin embargo, se puede mencionar que al día 7 y día 21 alcanzan su máxima actividad enzimática con un valor de (0,10 U/L), dicho valor es cercano al que reporta Córdoba & Cultid (2015).

Para el caso de manganeso peroxidasa, los valores promedio son los siguientes:

**Tabla 7.**

Valores de producción de manganeso peroxidasa (U/L) en días.

Días	Medias
D4	0,14
D1	0,19
D2	0,19
D3	0,23
D5	0,27

**Elaborado por:** El Autor, 2020.

Se observa que desde el día 7 ya existe un incremento de manganeso peroxidasa, su máximo de actividad enzimática es en el día 35, pero, como se puede observar los valores son muy variables, por lo que no se puede seguir un patrón de incremento, pese a esto *P. ostreatus*, muestra una productividad de manganeso peroxidasa notoriamente.

Córdoba & Cultid (2015), realizaron un estudio del rastrojo de maíz en donde se evidencia los días de mejor producción de *P. ostreatus*. En el rastrojo de maíz la producción de manganeso peroxidasa, mostro un mayor incremento para los días 32 a 46, teniendo una mayor concentración en el día 39. Por lo que se debe recalcar que, en este trabajo experimental se obtuvieron resultados similares.

### Efecto del tipo de sustrato sobre la actividad enzimática

El análisis estadístico de los datos permite establecer que hay un cambio significativo ( $p < 0,05$ ) en la actividad enzimática de lignino peroxidasas utilizando el tratamiento T1 en comparación con los tratamientos con sustratos enriquecidos. Según Córdoba & Cultid (2015) en su estudio de la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* cultivados en residuos lignocelulósicos, presentaron mayor actividad enzimática de lignino peroxidasa en el bagazo de fique sin ser enriquecido con carbonato de calcio y sulfato de magnesio, estadísticamente sus medias aritméticas muestran un valor mayor en el tratamiento no enriquecido. No existen diferencias significativas en la actividad enzimática de lacasas y manganeso peroxidasas al enriquecer el sustrato con fuentes de calcio o nitrógeno.

#### Tabla 8.

Análisis Kruskal-Wallis de promedios por sustrato y por enzima.

	Lacasas	Lignino peroxidasa	Manganeso peroxidasa
Chi-squared	1,5800	8,6605	1,5800
Df	2	2	2
p-value	0,4538	0,01316	0,4538

Elaborado por: El Autor, 2020.

En la siguiente tabla para el caso de lacasa, se muestra los valores promedio de lacasa en función del tratamiento.



**Tabla 9.**

Valores de la producción de lacasa (U/L) en tratamientos.

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>
Carbonato de Calcio	0,21
Agua destilada	0,23
Carbonato de Calcio + Sulfato de amonio	0,28

**Elaborado por:** El Autor, 2020.

Se puede observar que el tratamiento enriquecido con bagazo de caña + sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), genera una mayor cantidad de lacasas, sin embargo, no es un aumento significativo. Se reporta que las sales y los carbonatos, son excelente suplementos para el crecimiento de *P. ostreatus*, ya que contienen fosfatos y algunos minerales que permiten lograr grandes producciones de biomasa (Pineda-Insuasti, Ramos-Sánchez, & Soto-Arroyave, 2014). Como ya se ha referenciado en distintas investigaciones, la actividad de lacasa varía dependiendo de sus días de crecimiento, es por ello, que se obtiene una mayor producción en los días 7 y 35.

En el mismo orden de ideas, el sustrato de bagazo de caña de azúcar en el día 14, se evidencio la presencia de un ligero polvo de color verde (Anexo 11), por lo que se hizo una observación y bibliográficamente se dedujo que según Córdoba & Cultid (2015), el *P. ostreatus* estaba haciendo un crecimiento en conjunto con *Trichoderma* spp y *Penicillium* spp. Esta polución, se presentó más con el sustrato que no fue enriquecido con sulfato de amonio y carbonato de calcio, es decir el bagazo de caña con agua. La razón de haber obtenido sustratos contaminadas con *Trichoderma* spp y *Penicillium* spp, se debe a esporas de mohos contaminantes durante la siembra.

Por lo tanto, se puede mencionar que el sustrato acondicionado con los dos suplementos sulfato de amonio y carbonato de calcio desfavorece el crecimiento de microorganismos para evitar contaminar el cultivo.

A continuación, puede observar el aumento y disminución de la actividad enzimática de lignino peroxidasa empleada en el sustrato, estos enriquecidos de diferente manera, bagazo de caña + agua destilada (H<sub>2</sub>O), bagazo de caña + Sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) al 2 % en peso y bagazo de caña + carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) al 1 % peso.

Para el caso de lignino peroxidasa, se muestra los valores estadísticos de las medias aritméticas en donde se puede apreciar la diferencia entre ellos, de esta manera se conoce en qué tratamiento se produce mayor cantidad de enzimas lignocelulósicas.

**Tabla 10.**

Valores de la producción de lignino peroxidasa (U/L) en tratamientos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Medias</b>
Carbonato de Calcio	0,05
Carbonato de Calcio + Sulfato de Magnesio	0,07
Agua destilada	0,13

**Elaborado por:** El Autor, 2020.

En cuanto a los sustratos se puede observar que, T1 acondicionado con bagazo de caña + Agua destilada sigue siendo el mejor ya que se puede evidenciar una mejor producción de lignina peroxidasa.

A continuación, se realiza un análisis de manganeso peroxidasa en donde se muestra los valores estadísticos de las medias aritméticas en donde se puede apreciar el tratamiento con la media más alta, sin embargo, estas no muestran mayor diferencia.

**Tabla 11.**

Estimación de la producción de manganeso (U/L) en tratamientos.

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>
Agua destilada	0,18
Carbonato de Calcio	0,21
Carbonato de Calcio + Sulfato de amonio	0,22

**Elaborado por:** El Autor, 2020.

Es conveniente recordar que *Pleurotus ostreatus*, es un hongo que consume celulosa y lignina, el cual puede aprovechar los desechos sólidos generados por industrias para su crecimiento y generación de extractos enzimáticos, experimentalmente se conoce los días que este hongo produce mayor cantidad de enzimas lignolíticas y de esta manera ser aplicable cuando haya mayor producción y así poder acelerar las reacciones bioquímicas, para dar soluciones a contaminantes que ocurren entorno a procesos cíclicos que involucra a toda la diversidad biológica. Además de ser fuente para la industrial de alimentación, textiles y papel (Guillén-Navarro, Márquez-Rocha, & Sanchez-Vázquez, 1998).

## Conclusiones

La producción de la actividad de lacasas no es constante, sin embargo muestra un incremento en el día 35 con un valor de 0,35 (U/L); lignino peroxidasa tiene una tendencia a cero con su mayor incremento en el día 7 y día 21 con un valor de 0,10 (U/L), mientras que manganeso peroxidasa alcanzó su mayor producción en el día 35 con 0,27 (U/L). Todo esto concuerda con los estudios citados en esta experimentación, ya que, el aumento de la producción enzimática se encuentra dentro del tiempo que mencionan dichos autores.

El sustrato bagazo de caña de azúcar enriquecido con Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y Carbonato de calcio  $(\text{CaCO}_3)$  demuestra no tener efecto significativo sobre lacasas y manganeso peroxidasa, pero afecta la producción de lignino peroxidasa.

La enzima lignino peroxidasa presentó un cambio significativo en cuanto a la actividad enzimática utilizando el tratamiento T1 (agua destilada). Los tratamientos enriquecidos con fuentes de calcio y nitrógeno no mostraron diferencia significativa.

El bagazo de caña de azúcar al ser una fuente de grandes cantidades de lignina y celulosa demuestra ser un sustrato útil en el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* con el consecuente desarrollo de enzimas lignolíticas.

Así, a partir de los estudios de esta experimentación, se pueden derivar investigaciones futuras relacionadas con procesos biotecnológicos para la producción de enzimas lignocelulósicas siendo una alternativa para el beneficio del ambiente.

## Bibliografía

- Aguinaga Bósquez, P. N. (2012). *Evaluación de cuatro sustratos para la producción del hongo ostra (Pleurotus ostreatus) en tres ciclos de producción en la zona de Tambillo, provincia de Pichincha*. Quito: (Tesis de Grado). Escuela Politécnica Nacional. Recuperado el 21 de Octubre de 2020, de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4663/1/CD-4295.pdf>
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology* (Cuarta ed.). New York: John Wiley and Sons. Recuperado el 10 de Octubre de 2020, de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19971700582>
- Baena González, A. (2005). *Aprovechamiento del Bagazo del Maguey Verde (Agave Salmiana) de la Agroindustria del Mezcal en San Luis Potosí para la Producción de Hongo Ostra (Pleurotus ostreatus)*. San Luis Potosí: (Tesis de Posgrado). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Recuperado el 7 de Octubre de 2020, de <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/bitstream/handle/11627/65/BaenaGonzalez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chaparro, D. F., Rosas, D. C., & Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 238-243. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.do/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140609000114>
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of microbiology*, 179(3), 145-150. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.do/https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-002-0510-7>

- Comisión Europea CORDIS. (2020). *Enzimas fúngicas para aplicaciones industriales*. Recuperado el 23 de Noviembre de 2020, de <https://cordis.europa.eu/article/id/90593-fungal-enzymes-for-industrial-applications/es>
- Córdoba, R., & Cultid, G. (2015). *Estudio comparativo de la actividad enzimática de lacasa (lac), lignina peroxidasa (lip) y manganeso peroxidasa (mnp) de "pleurotus ostreatus" cultivado en residuos lignocelulósicos de raquis de palma de aceite, bagazo de fique y pulpa de café*. (Tesis de pregrado). Universidad de Nariño, San Juan de Pasto. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/90895.pdf>
- Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de [https://www.researchgate.net/profile/Jorge\\_Folch-Mallol/publication/266610846\\_Lignocelulosa\\_Como\\_Fuente\\_de\\_Azucars\\_Produccion\\_de\\_Etanol/links/54451eba0cf2f14fb80e9651/Lignocelulosa-Como-Fuente-de-Azucars-Para-la-Produccion-de-Etanol.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Folch-Mallol/publication/266610846_Lignocelulosa_Como_Fuente_de_Azucars_Produccion_de_Etanol/links/54451eba0cf2f14fb80e9651/Lignocelulosa-Como-Fuente-de-Azucars-Para-la-Produccion-de-Etanol.pdf)
- Deutschmann, R., & Dekker, R. F. (2012). From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1627-1640. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.st/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975012001085>
- Díaz Godínez, R. (2009). *Efecto de ph inicial de desarrollo de Pleurotus ostreatus en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas*. Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala: (Tesis de Posgrado). Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-IPN Tlaxcala. Recuperado el 5 de Octubre de 2020, de

<https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/6937/1/TESIS%20RUBEN%20DIAZ%20GODINEZ.pdf>

- Domínguez, O., Ramos-Leal, M., Manzano, A. M., Sánchez, M. I., Sánchez, A., Torres, G., . . . Guerra, G. (2010). Biodegradación de DDT por dos cepas nativas de hongos de la podredumbre blanca. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, *41*, 1-12. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509039.pdf>
- Feldman, D., Amedi, N., Carmeli, S., Yarden, O., & Hadar, Y. (2019). Manipulating the Expression of Small Secreted Protein 1 (Ssp1) Alters Patterns of Development and Metabolism in the White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(15), 1-16. Recuperado el 12 de Octubre de 2020, de <https://aem.asm.org/content/aem/85/15/e00761-19.full.pdf>
- Ferrer-Romero, J. C., Mas-Diego, S. M., Beltrán-Delgado, Y., Rodríguez-Quiala, Y., & Morris Quevedo, H. J. (2019). Optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa y compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* en fase sumergida utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Tecnología Química*, *39*(1), 1-16. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v39n1/2224-6185-rtq-39-01-1.pdf>
- Fontalvo, J. L., & Vera, S. (2017). Biodegradación de toxafeno por hongos de la pudrición blanca. *Suelos Ecuatoriales*, *47*(1), 77-82. Recuperado el 7 de Junio de 2019, de [http://www.unicauca.edu.co/revistas/index.php/suelos\\_ecuatoriales/article/view/79/68](http://www.unicauca.edu.co/revistas/index.php/suelos_ecuatoriales/article/view/79/68)
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., & Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*, *341*(3), 655-663. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/341/3/655/36497>

- Guillén-Navarro, G. K., Márquez-Rocha, F. J., & Sanchez-Vázquez, J. E. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana Micología*, 15, 302-306. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de [https://www.researchgate.net/publication/255636630\\_Produccion\\_de\\_biomasa\\_y\\_enzimas\\_ligninoliticass\\_por\\_Pleurotus\\_ostreatus\\_en\\_cultivo\\_sumergido](https://www.researchgate.net/publication/255636630_Produccion_de_biomasa_y_enzimas_ligninoliticass_por_Pleurotus_ostreatus_en_cultivo_sumergido)
- Huitrón Contreras, Y., Nava Galicia, S. B., & Bibbins Martínez, M. (2020). Las bondades de un hongo basidiomiceto llamado *Pleurotus Ostreatus*. *Frontera Biotecnológica*, 18-22. Recuperado el 24 de Noviembre de 2020, de <https://www.revistafronterabiotecnologica.cibatlaxcala.ipn.mx/volumen/vol16/pdf/vol-16-3.pdf>
- Jain, A., Wei, Y., & Tietje, A. (2016). Biochemical conversion of sugarcane bagasse into bioproducts. *Biomass and Bioenergy*, 93, 227-242. Recuperado el 25 de Julio de 2020, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953416302501>
- Kirk-Kent, T., & Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. En R. A. Young, & M. Akhtar, *Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry* (págs. 273-308). New York: JOHN WILEY & SONS, INC. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=\\_H\\_f12RuG98C&oi=fnd&pg=PA273&dq=Enzymology+and+molecular+genetic+of+wood+degradation+by+white-rot+fungi&ots=rCtx4Xb-IV&sig=DRmUV3xD8pT\\_PZFDBQ8Hi1P71No#v=onepage&q=Enzymology%20and%20molecular%20genetic%20of%20woo](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=_H_f12RuG98C&oi=fnd&pg=PA273&dq=Enzymology+and+molecular+genetic+of+wood+degradation+by+white-rot+fungi&ots=rCtx4Xb-IV&sig=DRmUV3xD8pT_PZFDBQ8Hi1P71No#v=onepage&q=Enzymology%20and%20molecular%20genetic%20of%20woo)
- Kravetz, S., González, B., & Giorgi, A. D. (2016). Evaluación de una matriz para decolorar efluentes textiles utilizando *Pleurotus ostreatus*. *Gestión y Ambiente*, 19(2), 252-263.



Recuperado el 23 de Noviembre de 2020|, de [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/102874/CONICET\\_Digital\\_Nro.202b6270-ecd5-483b-b812-46eeb52c7a75\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/102874/CONICET_Digital_Nro.202b6270-ecd5-483b-b812-46eeb52c7a75_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Lemache Pérez, E. B. (2017). *Determinación de la capacidad de remoción de cadmio y plomo por hongos de la podredumbre blanca Pleurotus ostreatus en suelos de la Zona el Timbre Cantón Quinindé*. (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Recuperado el 15 de Julio de 2019, de <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/8540/1/236T0320.pdf>

López Rodríguez, C. L., Hernández Corredor, R. A., Suárez-Franco, C., & Borrero, M. (2008). Evaluación de crecimiento y producción de *pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas Scientiarum*, 13(2), 128-137. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v13n2/v13n2a04.pdf>

López-Rodríguez, C., Hernández-Corredor, R., Suárez-Franco, C., & Borrero, M. (2008). Evaluation of growth and production of *Pleurotus ostreatus* on different agroindustrials wastes of Cundinamarca. *Universitas Scientiarum*, 13(2), 128-137. Recuperado el 20 de Octubre de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v13n2/v13n2a04.pdf>

Manjarrés, K., Castro, A., & Rodríguez Sandoval, E. (2010). Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*, 7(2), 9-15. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v7n2/v7n2a02.pdf>

Medina Morales, J. U., Sánchez Herrera, M. L., Hidalgo Millán, A., Jiménez Ruíz, E. I., Ruiz Sánchez, T., Espinosa Rodríguez, M. Á., & Delgado Delgado, R. (2018). Un estudio sobre el potencial del uso de residuos lignocelulósicos. *Revista MICA*, 1(1), 6-23.

- Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://core.ac.uk/download/pdf/268579727.pdf>
- Monteiro, S. N., Candido, V. S., Braga, F. O., Bolzan, L. T., Weber, R. P., & Drelich, J. W. (2016). Sugarcane bagasse waste in composites for multilayered armor. *European Polymer Journal*, 78, 173-185. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.st/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014305716301367>
- Moscoso Riofrío, V. C. (2014). *Experimentación con el bagazo para generar elementos constitutivos para el espacio interior*. Cuenca: (Tesis de Grado). Universidad del Azuay. Recuperado el 9 de Junio de 2020, de <https://docplayer.es/86188004-Interior-elementos-diseno-de-interiores-para-generar-constitutivos-para-el-espacio-autora-con-el-bagazo-vanessa-cuenca-ecuador-2014-experimentacion.html>
- Niladevi, K. N. (2009). Ligninolytic Enzymes. En P. Singh nee' Nigam, & A. Pandey, *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (págs. 397-414). Springer. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de [https://sci-hub.do/https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-9942-7\\_22](https://sci-hub.do/https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-9942-7_22)
- Ormsby, R., Kastner, J. R., & Miller, J. (2012). Hemicellulose hydrolysis using solid acid catalysts generated from biochar. *Catalysis Today*, 190(1), 89-97. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.st/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0920586112001411>
- Paéz Llerena, M. G. (2012). *Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil*. Sangolquí: (Tesis de Grado). Escuela Politécnica del Ejército. Recuperado el 21 de Octubre de 2020, de

<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/5261/T-ESPE-033267.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Paszczynski, A., & Crawford, R. L. (1995). Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Progress*, 11(4), 368-379. doi:10.1021/bp00034a002
- Paucara Fernández, L. (2014). *Evaluación de la Producción del Hongo Pleurotus ostreatus sobre Cinco Tipos de Sustratos (Tamo de Trigo, Tamo de Cebada, Tamo de Vicia, Tamo de Avena y Paja de Páramo); Enriquecidos con Tuza Molida, Afrencho de Cebada y Carbonato de Calcio*. Carmen Pampa La Paz: (Tesis de pregrado). Universidad Católica Boliviana San Pablo.
- Pineda-Insuasti, J. A., Ramos-Sánchez, L. B., & Soto-Arroyave, C. P. (2014). Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 48(2), 13-23. Recuperado el 20 de Octubre de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223131465002.pdf>
- Quintero D., J. C., Feijoo C., G., & Lema R., J. M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, 13(2), 61-67. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169813258008.pdf>
- Robalino Velasco, V. G. (2017). *Aprovechamiento integral de residuos frutales del cantón Patate mediante fermentación sólida para cultivo de Pleurotus Ostreatus*. Riobamba, Ecuador: (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <http://dspace.espe.edu.ec/bitstream/123456789/7913/1/236T0312.PDF>

- Rojas Ramírez, L. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoriosa con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, 17(1), 49-55. Recuperado el 14 de Julio de 2019, de <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/36>
- Rondal Llugay, R. E. (2016). *El bagazo de caña de azúcar y su incidencia en la contaminación ambiental en la parroquia Fátima cantón Pastaza en el año 2015*. Ambato: (Tesis de Posgrado). Universidad Tecnológica Indoamérica. Recuperado el 10 de Octubre de 2020, de <http://repositorio.uti.edu.ec/bitstream/123456789/309/1/Trabajo%2050%20Rondal%20Llugay%20Ruth%20Elizabeth.pdf>
- Salgado Ortiz, G. S. (2020). *Valorización energética de residuos agrícolas: cáscara de plátano, cascarilla de arroz y bagazo de caña mediante procesos de biodigestión y combustión*. Quito: (Tesis de Pregrado). Escuela Politécnica Nacional. Recuperado el 7 de Junio de 2020, de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/20707/1/CD%2010215.pdf>
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185-194. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.st/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975008001092>
- Vaca Proaño, M. C. (2011). *Estudio cinético de la obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica a partir del hongo Pleurotus ostreatus 404 y 2171 en rastrojo de maíz*. Quito: (Tesis de Grado). Escuela Politécnica Nacional. Recuperado el 17 de Octubre de 2020, de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4319/1/CD-3927.pdf>
- Vaca, M., Izurieta, B., & Espín, N. (2014). Obtención de Extractos Enzimáticos con Actividad Celulolítica y Ligninolítica a Partir del Hongo *Pleurotus Ostreatus* 404 y 2171 en

- rastrojo de Maíz. *Revista EPN*, 33(2), 1-7. Recuperado el 30 de Junio de 2019, de [https://revistapolitecnica.epn.edu.ec/ojs2/index.php/revista\\_politecnica2/article/view/121/pdf](https://revistapolitecnica.epn.edu.ec/ojs2/index.php/revista_politecnica2/article/view/121/pdf)
- Vallejos, M. E., Chade, M., Mereles, E. B., Bengoechea, D. I., Brizuela, J. G., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2016). Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 91, 161-169. Recuperado el 10 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.do/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016304411>
- Varnero, M. T., Quiroz, M. S., & Álvarez, C. H. (2010). Utilización de Residuos Forestales Lignocelulósicos para Producción del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*). *Información Tecnológica*, 21(2), 13-20. Recuperado el 20 de Octubre de 2020, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v21n2/art03.pdf>
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573-584. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.st/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343713002054>
- Wang, Y., Xiong, H., Wang, Z., Din, Z.-u., & Chen, L. (2017). Effects of different durations of acid hydrolysis on the properties of starch-based wood adhesive. *International journal of biological macromolecules*, 103, 819-828. Recuperado el 15 de Octubre de 2020, de <https://sci-hub.st/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813017306384>
- Wong, D. W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157(2), 174-209. Recuperado el 21 de Octubre de

2020, de <https://sci-hub.do/https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-008-8279->

z

## **Anexos**

### **Anexo 1. Recolección del sustrato, bagazo de caña de azúcar**



**Elaborado por: El Autor, 2020.**

**Anexo 2.** Caja Petri con *Pleurotus ostreatus* facilitado por la facultad de Ingeniería Química y Agroindustria de la Universidad Politécnica Nacional.



**Elaborado por:** El Autor, 2020.

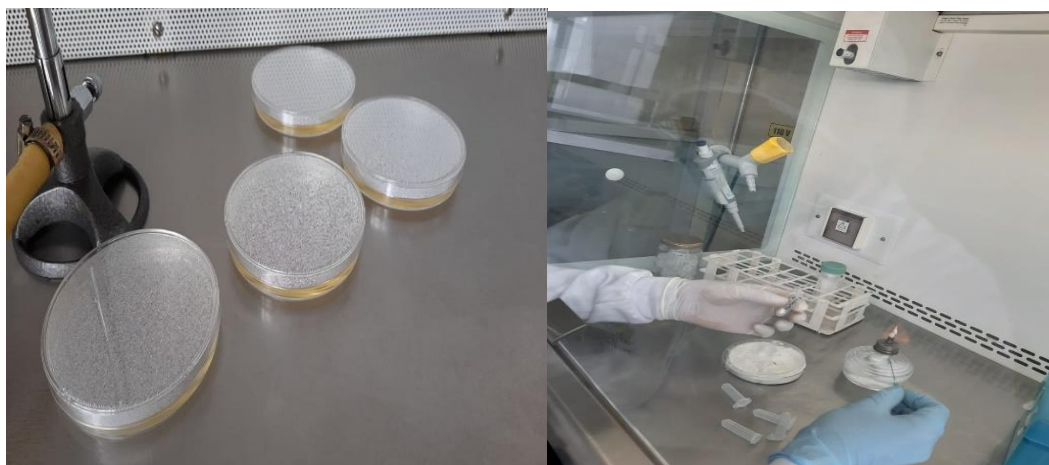


**Anexo 3.** Preparación del sustrato, lavado y cortado de bagazo de caña de azúcar.



**Elaborado por:** El Autor, 2020.

**Anexo 4.** Propagación de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo Agar papa dextrosa.



**Elaborado por:** El Autor, 2020.

**Anexo 5.** Inoculación de *Pleurotus ostreatus* en cámara de flujo laminar



**Elaborado por:** El Autor, 2020.

**Anexo 6.** Obtención del extracto enzimático de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP)



**Elaborado por:** El Autor, 2020.

**Anexo 7.** Medición de la actividad enzimática lacasa, celdas de plástico de 10 mm



**Elaborado por:** El Autor, 2020.

**Anexo 8.** Medición de la actividad enzimática lignino peroxidasa, celdas de plástico de 10 mm



**Elaborado por:** El Autor, 2020.

**Anexo 9.** Medición de la actividad enzimática manganeso peroxidasa, celdas de plástico de 10 mm



**Elaborado por:** El Autor, 2020.



**Anexo 10.** Formación del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*



**Elaborado por:** El Autor, 2020.

**Anexo 11.** Contaminación por *Trichoderma* spp y *Penicillium* spp. color verde presente en el sustrato, *P. ostreatus* estaba haciendo un crecimiento en co-cultivo con los hongos.





**Elaborado por:** El Autor, 2020.