



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniera Agropecuaria.

Título del Proyecto de Investigación

**“OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA
Y LIGNINOLÍTICA A PARTIR DE LA COLONIZACIÓN DEL HONGO *Pleurotus
ostreatus* EN SUSTRATO DE PSEUDOTALLO DE PLÁTANO”**

Autora:

Erika Jessenia Fuentes Vera

Directora de proyecto de Investigación:

Dra. Diana Lucia Vasco Mora

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2017

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Erika Jessenia Fuentes Vera**, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

f. _____

Erika Jessenia Fuentes Vera

C.C: # 120537456-2

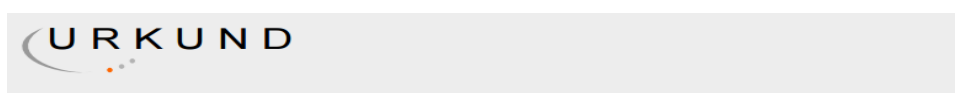
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

La suscrita, Diana Lucia Vasco Mora, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante Fuentes Vera Erika Jessenia, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado “OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y LIGNINOLÍTICA A PARTIR DE LA COLONIZACIÓN DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* EN SUSTRATO DE PSEUDOTALLO DE PLÁTANO”, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Dra. Diana Lucia Vasco Mora
DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, la suscrita Dra. Diana Vasco Mora, en calidad de Directora del Proyecto de Investigación “**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y LIGNINOLÍTICA A PARTIR DE LA COLONIZACIÓN DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* EN SUSTRATO DE PSEUDOTALLO DE PLÁTANO**” de autoría de la estudiante **FUENTES VERA ERIKA JESSENIA**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 9%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis Erika Fuentes.docx (D27831920)
Submitted: 2017-05-03 18:21:00
Submitted By: erikajver.fuentes@uteq.edu.ec
Significance: 9 %

Sources included in the report:

TESIIIIIISSSS FINAL.docx (D10106831)
BRYAN ALBERTO HERNANDEZ LEMA_2434057_assignsubmission_file_Hernandez-Bryan - Enzayo- Enzimas Digestivas.docx (D23837356)
Tesis Tanya.docx 12-09-2016.docx (D21719081)
Indigestión por insuficiencia motriz a causa de escasas de fibra bruta terminado.docx (D11219709)
Para urkund.doc (D20797496)
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2936643&info=resumen>
<http://docplayer.es/25059063-Icidca-sobre-los-derivados-de-la-cana-de-azucar-issn.html>
http://www.scielo.org/pe/scielo.php?pid=S1609-91172014000200005&script=sci_arttext

Instances where selected sources appear:

13

Atentamente

Dra. Diana Lucia Vasco Mora

DIRECTORA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
INGENIERÍA AGROPECUARIA

Título:

“OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y
LIGNINOLÍTICA A PARTIR DE LA COLONIZACIÓN DEL HONGO *Pleurotus*
ostreatus EN SUSTRATO DE PSEUDOTALLO DE PLÁTANO”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de
Ingeniera Agropecuaria.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Italo Espinoza Guerra

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Víctor Godoy Espinoza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Erick Eguez Enríquez

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2017

AGRADECIMIENTO

A Dios por derramar sus bendiciones sobre mí y llenarme de fortaleza cuando he estado a punto de rendirme, y así poder vencer todos los obstáculos desde el principio de mi vida y mantenerme de pie. A mis padres por ser mis pilares fundamentales por darme todo su amor y apoyo incondicionalmente en cada momento para poder cumplir mis objetivos y metas.

A mi director al Dr. Orly Cevallos Falquez por su apoyo incondicional, amistad y aporte en la trayectoria de mi investigación. Y a la Dra. Diana Vasco Mora.

Al laboratorio de Rumilología de la Facultad de Ciencias Pecuarias y al Ing. David Zapatier por la cooperación en la ejecución de mi investigación.

A mis hermanos, familiares y amigos que de una u otra forma estuvieron ahí aconsejándome, que supieron apoyarme sin pedir nada a cambio, quienes han creído en mí siempre dándome ejemplo de superación humildad y sacrificio.

DEDICATORIA

Estuviste a mi lado inclusive en los momentos de angustia y llanto siempre ahí dándome un consejo y alentándome, supiste confiar y apoyarme en todo momento, con todo tu esfuerzo y sacrificio corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos brindándome tu amor incondicionalmente, a quien ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, para ser quien soy, no fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo, siempre tratabas de buscar una solución.

Gracias a ti madre de mi vida Susana Vera R,

Erika.

RESUMEN

El empleo de enzimas para usos industriales o en alimentación animal, surge como un desarrollo de la biotecnología, presentando una herramienta para que a través de los microorganismos se obtengan metabolitos de interés tanto a nivel industrial como a nivel de campo. La fibra constituye uno de los componentes alimenticios de mayor importancia, así como a la vez el de mayor problemática, ya que al estar presente en la mayoría de las materias primas de los alimentos balanceados constituyen una limitante en la explotación debido a la baja tolerancia de las especies monogástricas a los niveles de fibra en la dieta. Se realizó la extracción de extractos acuosos con actividad enzimática provenientes de sustrato de pseudotallo de plátano digerido por el hongo *Pleurotus ostreatus*, para lo cual se estableció un diseño experimental completo al azar, donde se evaluaron el efecto combinado del pH de la solución tampón de extracción (4.0, 4.8, 6.0 y 7.0) y el efecto de la temperatura de extracción (40, 50 y 60°C), obteniendo así 12 tratamientos. Los resultados demostraron que los extractos enzimáticos actúan dentro de rangos de pH óptimo de reacción, por lo cual el efecto del pH de la solución tampón fue significativo a medida que este aumentaba, obteniendo como pH idóneo el buffer 7.0, lo que permitió obtener mejores características de los extractos acuosos. La temperatura de extracción afectó significativamente las características del extracto enzimático final, consiguiendo una mayor actividad enzimática dentro del rango entre 40° y 50° C. La actividad enzimática demostró que las enzimas obtenidas actúan dentro de rangos de pH y temperatura altos 7.0 y temperatura de 50°C observándose un efecto positivo en la extracción enzimática.

Palabras clave: Buffer, temperatura, subproductos, fibra

ABSTRACT

The use of enzymes for industrial or animal feed uses as a development of biotechnology, presenting a tool for microorganisms to obtain metabolites of interest at both the industrial and field level. Fiber is one of the most important food components, as well as the most problematic, since being present in most of the raw materials of the balanced feed constitutes a limitation in the exploitation due to the low tolerance of Monogastric species to fiber levels in the diet. The extraction of aqueous extracts with enzymatic activity from banana pseudotallo substrate digested by the fungus *Pleurotus ostreatus* was carried out, for which a complete randomized experimental design was established, where the combined effect of the pH of the extraction buffer solution (4.0, 4.8, 6.0 and 7.0) and the effect of the extraction temperature (40, 50 and 60 ° C), thus obtaining 12 treatments. The results showed that the enzymatic extracts act within the optimum pH reaction ranges, so that the pH effect of the buffer solution was significant as it increased, obtaining as the ideal pH the buffer 7.0, which allowed to obtain better characteristics Of the aqueous extracts. The extraction temperature significantly affected the characteristics of the final enzymatic extract, achieving a greater enzymatic activity within the range of 40 ° to 50 ° C. The enzymatic activity demonstrated that the enzymes obtained act within high pH and temperature ranges of 7.0 and temperature of 50 ° C with a positive effect on enzymatic extraction.

Keywords: Buffer, temperature, by-products, fiber

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO.....	Pág.
Portada.....	i
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	ii
Certificación de culminación del proyecto de investigación.....	iii
Certificado del reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.	iv
Agradecimiento.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido.....	x
Indice de tablas.....	xiii
Indice de figuras.....	xiii
Indice de anexos.....	xiii
Código dublin.....	xiv
Introducción.....	1
CAPÍTULO I.....	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de la investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.....	5
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1. Objetivo general.....	6
1.2.2. Objetivos específicos.....	6
1.3. Justificación.....	6
CAPÍTULO II.....	8
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	8
2.1. Marco conceptual.....	9
2.2. Marco referencial.....	10
2.2.1. Investigaciones preliminares.....	10
2.2.2. Catalizadores enzimáticos.....	11

2.2.3.	Tipos de enzimas.....	12
2.2.3.1.	Estructuras de las enzimas.....	13
2.2.3.2.	Enzimas fibrolíticas sintéticas.....	13
2.2.3.3.	Enzimas extracelulares.....	14
2.2.3.4.	Uso de enzimas en la degradabilidad de la fibra vegetal.....	14
2.2.4.	Extracción de enzimas a partir de microorganismos.....	15
2.2.4.1.	Hongos del género Pleurotus.....	16
2.2.5.	Mecanismos de hidrólisis enzimática.....	18
2.2.6.	Fermentación en estado sólido.....	18
2.2.6.1.	Sustratos.....	19
2.2.6.2.	Pseudotallo de plátano.....	19
CAPÍTULO III.....		20
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		20
3.1.	Localización.....	21
3.2.	Tipo de investigación.....	21
3.2.1.	Investigación de laboratorio.....	21
3.2.1.1.	Preparación de los sustratos.....	21
3.2.1.2.	Fermentación sólida de los sustratos.....	22
3.2.1.3.	Extracción enzimática.....	22
3.2.1.4.	Evaluación de la actividad enzimática.....	22
3.3.	Métodos de investigación.....	23
3.1.1.	Método analítico.....	23
3.1.2.	Método deductivo.....	23
3.1.3.	Método inductivo.....	23
3.4.	Fuentes de información.....	24
3.4.1.	Fuentes primarias de información.....	24
3.4.2.	Fuentes secundarias de información.....	24
3.5.	Diseño de la investigación.....	24
3.6.	Instrumentos de investigación.....	25
3.6.1.	VARIABLES A EVALUAR.....	25
3.6.1.1.	pH de los extractos obtenidos.....	25
3.6.1.2.	Determinación de la temperatura.....	26
3.6.1.3.	Determinación de la actividad celulasa.....	26
3.7.	Tratamiento de los datos.....	26

3.8. Recursos humanos y materiales.	26
CAPÍTULO IV.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1. Resultados y discusión.	29
4.1.1. Evaluación del pH de los extractos enzimáticos obtenidos.....	29
4.1.2. Evaluación de la temperatura en los extractos enzimáticos.	30
4.1.3. Evaluación de la absorbancia de la actividad enzimática específica celulolítica.	31
CAPÍTULO V.....	34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
5.1. Conclusiones.	35
5.2. Recomendaciones.....	36
CAPÍTULO VI.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	37
5.1. Referencias bibliográficas.	38
CAPITULO VI.....	44
ANEXOS.....	44
6.1. Análisis de la varianza.....	45
6.2. Evidencia fotográfica.	46

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	Pág.
Tabla 1. Condiciones agroecológicas de la zona de estudio.....	21
Tabla 2. Tratamientos evaluados en la investigación.....	25
Tabla 3. Análisis de la varianza.....	26
Tabla 4. ADEVA para la variable pH de los extractos enzimáticos.....	45
Tabla 5. ADEVA para la variable Temperatura de los extractos enzimáticos.....	45
Tabla 6. ADEVA para la variable Absorbancia del extracto enzimático.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Pág.
Figura 1. Evaluación del pH de los extractos enzimáticos obtenidos de <i>P. ostreatus</i>	30
Figura 2. Evaluación de la temperatura de los extractos enzimáticos de <i>P. ostreatus</i>	31
Figura 3. Evaluación de la absorbancia de los extractos enzimáticos de <i>P. ostreatus</i>	32

ÍNDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	Pág.
6.1. Análisis de la varianza.....	45
6.2. Evidencia fotográfica.....	46

CÓDIGO DUBLIN

Título:	Obtención de extractos acuosos con actividad celulolítica y ligninolítica a partir de la colonización del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> en sustrato de pseudotallo de plátano.
Autor:	Fuentes Vera Erika Jessenia
Palabras clave:	Buffer, temperatura, subproductos, fibra
Fecha publicación:	03/06/2017
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2017
Resumen:	<p>Resumen.- El empleo de enzimas para usos industriales o en alimentación animal, surge como un desarrollo de la biotecnología, presentando una herramienta para que a través de los microorganismos se obtengan metabolitos de interés tanto a nivel industrial como a nivel de campo. La fibra constituye uno de los componentes alimenticios de mayor importancia, así como a la vez el de mayor problemática, ya que al estar presente en la mayoría de las materias primas de los alimentos balanceados constituyen una limitante en la explotación debido a la baja tolerancia de las especies monogástricas a los niveles de fibra en la dieta. Se realizó la extracción de extractos acuosos con actividad enzimática provenientes de sustrato de pseudotallo de plátano digerido por el hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>, para lo cual se estableció un diseño experimental completo al azar, donde se evaluaron el efecto combinado del pH de la solución tampón de extracción (4.0, 4.8, 6.0 y 7.0) y el efecto de la temperatura de extracción (40, 50 y 60°C), obteniendo así 12 tratamientos. Los resultados demostraron que los extractos enzimáticos actúan dentro de rangos de pH óptimo de reacción, por lo cual el efecto del pH de la solución tampón fue significativo a medida que este aumentaba, obteniendo como pH idóneo el buffer 7.0, lo que permitió obtener mejores características de los extractos acuosos. La temperatura de extracción afectó significativamente las características del extracto enzimático final, consiguiendo una mayor actividad enzimática dentro del rango entre 40° y 50° C. La actividad enzimática demostró que las enzimas</p>

	<p>obtenidas actúan dentro de rangos de pH y temperatura altos 7.0 y temperatura de 50°C.</p> <p>Abstract.- The use of enzymes for industrial or animal feed uses as a development of biotechnology, presenting a tool for microorganisms to obtain metabolites of interest at both the industrial and field level. Fiber is one of the most important food components, as well as the most problematic, since being present in most of the raw materials of the balanced foods constitutes a limitation in the exploitation due to the low tolerance of Monogastric species to fiber levels in the diet. The extraction of aqueous extracts with enzymatic activity from a banana pseudotalloid substrate digested by the fungus <i>Pleurotus ostreatus</i> was carried out. A randomized complete experimental design was used to evaluate the combined effect of the pH of the extraction buffer solution (4.0, 4.8, 6.0 and 7.0) and the effect of the extraction temperature (40, 50 and 60 ° C), thus obtaining 12 treatments. The results showed that the enzymatic extracts act within the optimum pH reaction ranges, so that the pH effect of the buffer solution was significant as it increased, obtaining as the ideal pH the buffer 7.0, which allowed to obtain better characteristics Of the aqueous extracts. The extraction temperature significantly affected the characteristics of the final enzymatic extract, achieving a greater enzymatic activity within the range of 40 ° to 50 ° C. The enzymatic activity demonstrated that the enzymes obtained act within high pH and temperature ranges of 7.0 and temperature of 50 ° C.</p>
Descripción:	62 hojas + CD-ROM
URI	

Introducción

La fibra juega un papel muy importante dentro de la alimentación animal, sobre todo en los rumiantes en general, debido a que es indispensable para mantener la funcionalidad ruminal, estimular el masticado y la rumia y mantener un pH ruminal adecuado que permita la buena salud y digestión. El contenido de fibra en la dieta se asocia con la composición de los productos inmediatos, como la leche, ya que por medio de su digestión se producen los principales precursores de la grasa láctea, así como la calidad y cantidad de fibra consumida afectan directamente la capacidad de consumo voluntario y la cantidad de energía que pueda aportar una ración (1).

Los efectos fisiológicos que causa la fibra contenida en los alimentos, en animales monogástricos, no fue motivo de interés para los nutricionistas e investigadores durante años, ya que se limitaban a estudiar los efectos negativos de la fibra bruta (FB) sobre la productividad en animales jóvenes haciendo énfasis en la necesidad de reducir los niveles de fibra en piensos por su impacto negativo sobre la palatabilidad, la digestibilidad de los nutrientes y la productividad; no obstante, durante los últimos 10 años, investigadores han trabajado en los aspectos fisiológicos relacionados con la fibra en relevancia sobre la productividad animal y su influencia sobre la sensación de saciedad y su relación con el bienestar animal, la incidencia de úlceras y otros procesos digestivos, la flora digestiva, la actividad de la molleja y la motilidad del tracto gastrointestinal (2).

El empleo de enzimas para usos industriales o en alimentación, surge como un desarrollo de la biotecnología, presentando una herramienta para que a través de los microorganismos se obtengan metabolitos de interés tanto industrial como ambiental (3), como las celulasas y xilanasas, que son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa y hemicelulosa, respectivamente, las cuales, incrementaron su interés debido al enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles (4).

Las actividades agropecuarias y agroindustriales dan origen a una serie muy amplia de residuos fibrosos y subproductos, muchos de los cuales impactan negativamente el medio ambiente pero que se podrían emplear de diversas maneras con el objetivo de formular alimentos para animales, sean estos suministrados directamente o tras un procesamiento

sencillo que mejore su palatabilidad y digestibilidad. Ecuador produce por año más de 8 millones de toneladas de residuos de plátano como: hojas, pseudotallo y raquis, pero estos desechos no llegan a ser manejados de manera adecuada y terminan convirtiéndose en fuentes de contaminación por la carga orgánica que representan y por la contaminación aérea provocada por la generación de gas metano (5).

Los hongos del género *Pleurotus*, son hongos de la pudrición blanca que usan lignina y celulosa como la fuente de carbono en su proceso de nutrición, por lo consiguiente, cualquier tipo de materia orgánica que contengan fibra en su composición puede usarse como sustratos para estos tipos de hongos fibrolíticos y esto incluye casi todos los residuos agrícolas (3).

La producción mundial de hongos comestibles representa actualmente cerca de tres millones de t/año, donde el crecimiento de este sector productivo es cercano al 5 % anual. Del conjunto de setas producidas a escala comercial, el género *Pleurotus* es el más prometedor, ya que ocupa el segundo lugar en la producción de setas comestibles (25 % del total de la producción mundial) y es la que más ha crecido desde sus comienzos (6).

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

La fibra constituye uno de los componentes alimenticios de mayor importancia, así como a la vez el de mayor problemática, ya que al estar presente en la mayoría de las materias primas de los alimentos balanceados constituyen una limitante en la explotación debido a la baja tolerancia de las especies monogástricas a los niveles de fibra en la dieta (2).

El mal manejo de los desechos agrícolas contribuye en la contaminación del ambiente, ya que no existe una disposición final de los subproductos que sea amigable para el medio, estos terminan quemados contribuyendo a la contaminación con CO₂ a la atmósfera, o en otros casos, descomponiéndose lentamente aportando con CH₄, contribuyendo a los gases de invernadero, responsables directos del cambio climático mundial (7).

Diagnóstico.

El problema se establece en torno a encontrar una estrategia para mejorar la disponibilidad de los alimentos para la alimentación animal, en particular de las materias primas fibrosas y sub productos de origen agroindustrial, es el uso de enzimas fibrolíticas exógenas para el tratamiento de forrajes para rumiantes o incluidas como suplemento en las raciones alimenticias de monogástricos.

Causas

- Aumento considerable de los desechos agrícolas en las explotaciones y escasos de alimento para los animales en especial durante la época seca.
- Bajo valor nutritivo de los residuos agrícolas y algunos forrajes utilizados en la alimentación animal.

Efectos

- Contaminación ambiental, producida por la descomposición al ambiente de la biomasa desechada en los subproductos agroindustriales, las cuales emiten gases de efecto invernadero como el metano y CO₂.
- Bajos rendimientos productivos de los animales alimentados con residuos de cosecha y agroindustriales, debido a su baja digestibilidad y contenido nutricional.

Pronóstico.

Muchos de los residuos de la producción agrícola poseen un alto potencial nutricional que suele verse restringido al animal por medio de la fibra lignocelulósica, razón por la cual, si no se desarrollan investigaciones encaminadas al aprovechamiento de estos recursos, se continuará con los problemas de alimentación, sobre todo durante la época, cuando existe escases de alimento o su costo se ha elevado.

1.1.2. Formulación del problema.

El problema principal se enfoca en la necesidad de obtener compuestos enzimáticos que permitan solubilizar las fracciones de fibra presentes en los alimentos para volverlos más asimilables para los animales. En base al problema se ha planteado la siguiente interrogante:

¿Resulta posible la obtención de extractos acuosos con actividad celulítica y lignolítica a partir de la colonización del hongo *Pleurotus ostreatus* en residuos de plátano?

1.1.3. Sistematización del problema

¿El pH de la solución buffer de extracción enzimática afectará las características de pH y temperatura del compuesto enzimático extraído del residuo agrícola?

¿Las variaciones de temperatura de extracción influirán en las características de pH y temperatura de los extractos enzimáticos producidos?

¿Las variaciones de pH de la solución buffer extractora y la temperatura de extracción influirán en la actividad enzimática de los extractos acuosos producidos?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

Obtener extractos acuosos con actividad celulolítica y ligninolítica a partir de la colonización del hongo *Pleurotus ostreatus* en sustrato de pseudotallo de plátano.

1.2.2. Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto del pH de la solución buffer extractora sobre las características del pH y temperatura de los extractos acuosos obtenidos.
- Evaluar el efecto de la temperatura de extracción sobre las características del pH y temperatura de los extractos acuosos obtenidos.
- Determinar el efecto de las variaciones de pH de la solución buffer extractora y la temperatura de extracción sobre la actividad enzimática de los extractos acuosos extraídos.

1.3. Justificación.

La agricultura y las industrias de alimentos generan grandes cantidades de desechos lignocelulósicos que constituyen un grave problema ambiental, sin embargo, esta biomasa considerada como desecho, puede convertirse en materia prima para la generación de varios productos de interés nutricional, mediante la degradación de los componentes de la pared vegetal, lignina y celulosa. Los hongos comestibles del género *Pleurotus* son degradadores eficientes por naturaleza de los compuestos fibrosos de las paredes celulares,

debido a que producen, durante su crecimiento, enzimas lignocelulolíticas. Permitiendo el empleo de desechos agroindustriales como sustrato para el crecimiento del hongo, lo que permitiría además de obtener un alimento, como es el hongo comestible, extractos enzimáticos, con actividad catalítica.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

- **Catálisis.** - Es el proceso por el cual se aumenta la velocidad de una reacción química, debido a la participación de una sustancia llamada catalizador y las que desactivan la catálisis son denominados inhibidores. Un concepto importante es que el catalizador no se modifica durante la reacción química, lo que lo diferencia de un reactivo (8).
- **Enzimas.** - Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles, es decir, una enzima hace que una reacción química que es energéticamente posible pero que transcurre a una velocidad muy baja, sea cinéticamente favorable, es decir, transcurra a mayor velocidad que sin la presencia de la enzima. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran a unas tasas significativas. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas (9).
- **Celulosa.** - La celulosa es un biopolímero compuesto exclusivamente de moléculas de β -glucosa (desde cientos hasta varios miles de unidades), pues es un homopolisacárido. constituye la biomolécula orgánica más abundante ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre que fue descubierta en 1838 por el químico francés Anselme Payen, el cual la aisló a partir de material vegetal y determinó su fórmula química.
- ***Pleurotus ostreatus.*** – Los hongos del género *Pleurotus* comprende una amplia gama de setas saprófitas comestibles, a los que se ha logrado imitar sus hábitos ecológicos naturales, logrando así cultivarlos en una diversidad de sustratos lignocelulósicos y residuos con alto contenido de fibra para el beneficio humano de una manera sencilla y rápida (10).
- **Rastrojo.** – Se considera así al conjunto de restos de tallos y hojas que quedan en el terreno tras cortar o cosechar un determinado cultivo, en especial, gramíneas y especies de cultivo de ciclo corto.

2.2. Marco referencial.

2.2.1. Investigaciones preliminares.

Los hongos del género *Pleurotus* son ampliamente reconocidos por su capacidad de degradar la fibra de alimentos lignocelulósicos o subproductos agroindustriales, dentro de este punto existen investigaciones que evaluaron la composición química y la degradabilidad de residuos de cosecha del cultivo de maíz con el fin de poder reutilizar esta biomasa para el consumo animal, para lo cual, estos materiales fueron inoculados con dos cepas del género *Pleurotus* (*P. ostreatus* y *P. sapidus*) y sometidos a un periodo de 21 días de fermentación sólida, obteniendo como resultado que la mayor degradabilidad de materia seca y orgánica de los residuos se obtuvieron inoculando con *P. ostreatus*, observándose también que la fracción soluble fue mayor, y la potencialmente degradable y la insoluble menores (10).

En otra investigación y empleando dos cepas nativas de *P. djamor* y una cepa extranjera de *P. pulmonaris*, sobre la biodegradación del rastrojo de arroz, se estableció un procedimiento para la producción comercial de hongos, incluyendo la pasteurización del sustrato a 85°C y por 80 minutos e inoculación con las cepas, posterior incubación y cosecha, con un tiempo total del proceso de 45 días, para después los sustratos post cosecha ser sometidos a análisis químico y prueba de degradabilidad ruminal *in situ*, obteniendo que cultivo de las cepas de *Pleurotus* mejoró la degradabilidad *in situ* de la materia seca de la paja de arroz y rastrojo de maíz, sin diferencia significativa entre cepas evaluadas (11).

Las enzimas producidas por las especies de hongos de este género son empleadas de diferentes maneras para la degradación de compuestos lignocelulósicos, siendo así que en una investigación se evaluó la capacidad de tres cepas de *Pleurotus ostreatus* y una de *Agrocybe aegerita* para colonizar la biomasa producida de manera industrial por extractoras jugueras y comparar las curvas de crecimiento micelial, con el fin de degradar estos compuestos lignocelulósicos permitiendo brindar opciones para la disposición final de esta biomasa residual. *A. aegerita* evidenció menor crecimiento que *P. ostreatus* en ambos sustratos, mientras que *P. ostreatus* presentó mejor desarrollo sobre el orujo con

pretratamiento enzimático, comportamiento que podría estar relacionado con la composición química de los orujos de pera analizados (12).

2.2.2. Catalizadores enzimáticos.

Las enzimas son proteínas que se producen en el interior de los organismos vivos y que están especializadas en favorecer o hacer posibles reacciones específicas del metabolismo. Tienen como función principal acelerar ciertas reacciones bioquímicas específicas que forman parte del proceso metabólico de las células; en ausencia de enzimas las reacciones solo tendrían lugar muy lentamente o no se producirían en absoluto (13).

Las enzimas pueden definirse como macromoléculas de origen biológico que actúan como catalizadores de las reacciones químicas responsables de la funcionalidad de los seres vivos, puesto que, intervienen en diferentes procesos biológicos como la digestión de alimentos, la transmisión de impulsos nerviosos, la fecundación, entre otros, pudiendo ejercer su poder catalítico aún por fuera de los organismos vivos, el cual se puede aislar y utilizar en un medio de reacción diferente al del organismo del que provienen y bajo condiciones de reacción suave (temperatura y pH moderados), lo que ha hecho a las enzimas atractivas para el desarrollo de procesos biotecnológicos amigables con el medio ambiente (14).

Las enzimas se han utilizado durante siglos, ya sea como parte de células o extractos crudos de materiales vegetales, animales o microbianos. Su aplicación se ha extendido tanto que ha dado origen a una nueva área de estudio dentro de la biotecnología llamada ingeniería enzimática, encargada del desarrollo de fuentes de producción de enzimas para uso industrial, su método de aislamiento, purificación y diseño de reactores enzimáticos (15).

Una de las funciones más empleadas actualmente de las enzimas es la síntesis de biodiesel, puesto que, a pesar de que el biodiesel se produce por diferentes rutas, la reacción más utilizada es la de transesterificación con alcoholes de cadena corta y un catalizador, el mismo que puede ser de carácter ácido, básico o enzimas naturales (lipasas); por este motivo la reacción utilizada para la producción de biodiesel es la transesterificación del

aceite crudo de la palma africana *Elae guineensis* con etanol y catalizadores básicos, ya que son la opción de mejor rendimiento, tecnología económica y tiempos cortos de reacción. Los catalizadores ácidos, son de menor rendimiento comparado con los básicos (16).

2.2.3. Tipos de enzimas.

Las enzimas vegetales y animales se obtienen mediante trituración de los tejidos que forman una papilla en las que se extrae la enzima gracias a la adición de un solvente ya sea orgánico o inorgánico. El resultado puede ser utilizado directamente como preparado enzimático, sin embargo, es preferible que antes de su aplicación, el preparado pase por un proceso de purificación y/o aislamiento de las enzimas (15).

Las enzimas se pueden clasificar de dos maneras de acuerdo a su complejidad y actividad. Las enzimas simples están formadas por una o más cadenas polipeptídicas; mientras que las enzimas conjugadas contienen por lo menos un grupo no proteico enlazado a la cadena polipeptídica. En las enzimas conjugadas se pueden distinguir dos partes: la apoenzima que es la parte polipeptídica de la enzima, mientras que el cofactor es la parte no proteica de la enzima (17).

Para la degradación biocatalítica, existe un gran espectro de enzimas degradadoras de polisacáridos que actúan en forma compleja (pectinasas, celulasas, oxidoreductasas y hemicelulasas). La acción de una enzima es restringida por la accesibilidad al sustrato. En el caso de las celulasas, disminuyen su acción sobre la celulosa por la presencia de otros polisacáridos. También, es conocido que la combinación de enzimas degradadoras de polisacáridos actúa sinérgicamente en la degradación de la matriz de la pared celular. La velocidad y extensión de la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos se ve influenciada no solamente por la eficiencia de las enzimas, sino también por las características fisicoquímicas y morfológicas, expresada en la heterogeneidad de los sustratos lignocelulósicos (18).

La hidrólisis enzimática puede ser una mejor alternativa que la hidrólisis ácida y tiene un potencial para el desarrollo y mejoras de tecnologías para la producción etanol a partir de biomasa que puede ser competitivo con respecto otros combustibles, ya que, de los componentes de la pared celular, la lignina es el compuesto más recalcitrante sintetizado por las plantas y que contribuye a dar firmeza y fortaleza a las plantas. Un complejo enzimático compuesto por enzimas extracelulares, tales como lacasas y peroxidases, tienen la capacidad de degradar la lignina y otros compuestos tales como moléculas aromáticas simples (18).

2.2.3.1. Estructuras de las enzimas.

La caracterización de las enzimas de celulosa plantea problemas especiales a la ingeniería enzimática, ya que se presenta con una situación en la que están los estudios cinéticos difíciles ya que el sustrato natural es un tanto insoluble y estructuralmente variables, y por lo tanto, relativamente indefinida con respecto a la concentración y la forma química; donde a menudo una multitud de endo- y exo glucanasas actúan en sinergia y de una manera compleja y donde una variedad de productos finales y de las especies de transglicosilación se forman con frecuencia, diversos mecanismos de control de realimentación (19).

2.2.3.2. Enzimas fibrolíticas sintéticas.

Las enzimas fibrolíticas se usan para mejorar la digestibilidad de la pared celular, permitiendo incrementar la disponibilidad de la materia seca y la energía, sin embargo, los efectos de las enzimas fibrolíticas comerciales no son siempre constantes, por ello se han realizado evaluaciones a nuevas alternativas potenciales para extraer enzimas, a partir de la actividad de los microorganismos utilizados en la producción de biocombustible, como el caso de *Cellulomonas flavigena*, la cual es una bacteria que cultivada en fermentación líquida produce un extracto enzimático con una gran variedad de xilanasas y celulasas (20).

Recientemente, estas enzimas de características exógenas se están usando para mejorar la degradabilidad ruminal de la fibra dietaria y del almidón presente en los alimentos utilizados en la alimentación de rumiantes, representando una alternativa real para incrementar la productividad y reducir los costos por alimentación (21).

2.2.3.3. Enzimas extracelulares.

Las enzimas extracelulares o endógenas son diversos metabolitos secundarios bioactivos de considerable interés en biotecnología debido a que poseen actividad antimicrobiana, antitumoral, inmunoestimulante, antiparasitaria, entre otras cualidades. Algunos microorganismos tienen la capacidad de desarrollarse sobre material lignocelulósico, debido a su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) y oxidativas (ligninolíticas), que catalizan reacciones de óxido-reducción para degradar los componentes poliméricos en moléculas de bajo peso molecular, que pueden ser asimiladas como nutrientes por el microorganismo. Entre las enzimas oxidativas que participan directa o indirectamente en la degradación de la lignina se encuentran las familias de lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (22) (23).

2.2.3.4. Uso de enzimas en la degradabilidad de la fibra vegetal

Entre las enzimas que han cobrado relevancia figuran las lacasas, obtenidas a partir diversos seres vivos como los hongos; entre ellos los hongos del género *Pleurotus*, ya que esta familia de enzimas oxidoreductasas posee, en líneas generales, una tendencia probada a degradar compuestos fenólicos (24).

Los microorganismos que degradan celulosa y hemicelulosa, utilizan los complejos multienzimáticos de alto peso molecular localizados en su superficie, conocidos como celulosomas. Este complejo reúne alrededor de 14 polipéptidos distintos, con varias celulasas y xilanasas y al menos una β -glucosidasa, que se encuentran unidos a una proteína sin actividad enzimática, pero que participa en el reconocimiento de fibras de celulosa (15).

En la hidrólisis enzimática de la celulosa, recientemente se ha venido hablando de los celulosomas. Estos son complejos enzimáticos que actúan sinérgicamente para catalizar la hidrólisis de este polisacárido. Estos complejos están formados esencialmente por varios tipos de celulasas que están soportadas en una unidad de estructuración constituida por múltiples cadenas de polipéptidos, cuyo número varía de un microorganismo a otro e incluso difiere entre cepas, con dominios catalíticos muy parecidos a las células libres degradadoras de material lignocelulósico (18).

El uso de enzimas fibrolíticas para dietas de rumiantes tiene un atractivo interés, debido a las respuestas positivas en digestibilidad del forraje y la respuesta animal, puesto que la aplicación de enzimas en forrajes previamente a la incubación *in vitro* mejora la digestión de materia seca y fibra, lo que sugiere que la aplicación de enzimas fibrolíticas momentos antes de la alimentación del ganado puede incrementar la digestión del forraje, sin embargo, el uso de estas enzimas en dietas de rumiantes ha tenido resultados contradictorios puesto que algunos estudios demuestran un incremento en la producción láctea en el bovino, mientras que en otros no se producen tales incrementos; asimismo, estudios de digestibilidad muestran tanto un efecto positivo de este parámetro como nulo (25).

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa (Cx) (1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), la exo- β -1,4-glucanasa (C1) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y la β -1,4- glucosidasa (celobiasa) (Cb) (β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21) (26).

2.2.4. Extracción de enzimas a partir de microorganismos.

Dentro del campo de la extracción de enzimas se han realizado diversas investigaciones con el propósito de evaluar la actividad de una enzima específica con la ayuda de la caracterización de hongos entomopatógenos, puesto que actualmente se conoce que enzimas como las amilasas, proteasas, quitinasas y lipasas participan en el mecanismo de infección durante la invasión del hongo al hospedero. Hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* inician su proceso de infección cuando la conidia germina y penetra a través de la cutícula del insecto gracias a la acción de las enzimas involucradas en este proceso, que ahora ya pueden ser producidas *in vitro*; mediante el uso de sustratos específicos (27).

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Las bacterias celulolíticas más abundantes y conocidas son las aerobias, entre ellas encontramos los géneros *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Cytophaga*. *Acetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *Butirivibrio sp. Clostridium thermocellum*, además destacan entre las anerobias *Streptomyces drozdowiczii*, *S. cellulolyticus*, *Thermomonospora curvata*, *T. chromogena*, *T. alba* y *Thermomobifida fusca*, entre los Estreptomycetos *Bacillus* es reconocido industrialmente atractivo por sus altas tasas de crecimiento, gran capacidad para la secreción de enzimas extracelulares, así como su desarrollo bajo condiciones ambientales extremas. Se sabe que naturalmente metaboliza una amplia variedad de azúcares incluyendo xilosa, arabinosa, celulosa, sacarosa, celobiosa y glucosa; sin embargo, a pesar del extenso conocimiento genético y bioquímico del género, existe poca información de aspectos bioenergéticos, metabólicos, de crecimiento y de formación de productos en condiciones aeróbicas para la utilización de carboximetildelulosa (28).

2.2.4.1. Hongos del género Pleurotus.

Los hongos son organismos cosmopolitas, es decir, que son capaces de habitar en casi todos los hábitats del planeta, sin embargo, existen especies endémicas de regiones específicas; son organismos heterótrofos que necesitan de materia orgánica pre estructurada para usarla como fuente de alimento, aunque la compleja estructura de su pared celular les impide digerir su alimento por lo que debe absorber nutrientes simples y solubles que obtienen a través de la biodegradación de biopolímeros como la celulosa, hemicelulosa y lignina gracias a la acción de un complejo sistema de enzimas hidrolíticas (29).

Las especies de este género son saprófitas degradadoras de fibra, se han reportado degradabilidad de hasta del 80% de lignina, celulosa y hemicelulosa, mediante el empleo de enzimas externas como la lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa producidas por estas cepas. Sustratos lignocelulósicos como la paja de arroz (*Oryza sativa*), paja de trigo (*Triticum aestivum*), paja de cebada (*Hordeum vulgare*), rastrojo de maíz (*Zea mays*), rastrojo de tomate (*Solanum lycopersicum*) y pasturas como el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), entre otros, han sido evaluados con el fin de degradar la fibra presente, sin embargo, los resultados obtenidos indican efectos variables sobre el

sustrato, lo que parece depender de su composición, duración del tiempo de incubación de la cepa y la especie (11).

Los hongos del genero *Pleurotus* son hongos comestibles que pueden ser cultivado en un sistema de bioconversión ecológica, debido a la transformación que realizan estos hongos a los desechos agrícolas como pajas, bagazos, cascarillas y pulpas, a alimentos proteínicos. Las setas en general poseen un alto contenido de humedad, entre 87 y 93% según las condiciones de manejo al momento de la cosecha, puesto que la mayoría de los hongos frescos contienen de 2 a 4% de proteína en base húmeda y de 10.5 a un 30.5 % de su peso, con la presencia de nueve aminoácidos esenciales como Leucina y Lisina, que son ausentes en la mayoría de los cereales (30).

Las setas frescas llegan a presentar un contenido de grasa neta desde menos de 1 hasta 15%, carbohidratos entre el 3 y el 28% y de 3 a 32% de fibra cruda en base seca, con valores mínimos de compuestos anti-nutricionales y significando una fuente característica de vitaminas como la Tiamina (4.8 mg), Riboflavina (4.7 mg), Niacina (108.7 mg) y de Ácido Ascórbico (144 mg) por cada 100 g de materia seca, además de minerales como Calcio (33 mg), Hierro (15 mg), Fósforo (1.38 mg) y Sodio (837 mg) (30).

Existen aproximadamente unas 2000 especies de hongos comestibles, 80 de ellas han sido cultivadas experimentalmente y sólo 5 o 6 se producen a escala industrial, entre las que se encuentran las del género *Pleurotus*, los cuales tienen un lugar importante entre los basidiomicetos empleados comercialmente, debido a sus propiedades gastronómicas, nutritivas y medicinales, siendo fáciles de cultivar en un amplio rango de sustratos fibrosos (31).

Pleurotus ostreatus es una de las especies más estudiadas, consumidas y cotizadas durante los últimos años por la relativa facilidad de su cultivo, sus características organolépticas y composición nutricional equilibrada, esta especie es principalmente conocida con el nombre de “Hongo ostra” y cultivada desde hace varias décadas en Europa, Asia y Norteamérica. Los hongos comestibles del género *Pleurotus* ocupan la tercera posición en su producción, después de los géneros *Agaricus* y *Lentinula* y es previsible que su producción continúe incrementándose en todo el mundo, especialmente en los países hispanohablantes (32).

2.2.5. Mecanismos de hidrólisis enzimática.

Se ha propuesto el mecanismo para la degradación de la celulosa, el cual se resume en tres etapas (26).

- Primero la endo β -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de C1.
- En la segunda etapa actúa la exo β -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis.
- Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa Cb, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa.

2.2.6. Fermentación en estado sólido.

La fermentación en estado sólido es un método mediante el cual los microorganismos crecen en condiciones limitadas de humedad y tienen un acceso al oxígeno atmosférico, mediante el cual se pretende simular las condiciones naturales mediante las cuales se desarrolla normalmente un organismo degradador lignocelulósico (33).

Se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos, o semisólidos, en ausencia de agua libre. Las fermentaciones con estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está ni disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua (34).

2.2.6.1. Sustratos.

Los desechos agroindustriales poseen características físicas y químicas idóneas para ser empleados como sustratos en los procesos de fermentación sólida, ya que en su composición química existe la presencia de polisacáridos como la celulosa y hemicelulosa, fuente importante de carbono para los organismos vivientes, no obstante, la presencia de otro compuesto como la lignina representa una limitante para la disponibilidad de estos polisacáridos para la actividad microbiana, ya que debe tenerse en cuenta que un sustrato ideal para la fermentación en estado sólido es aquel que provea de todos los nutrientes necesarios para el metabolismo microbiano (35).

2.2.6.2. Pseudotallo de plátano.

Los plátanos y bananos (*Musa spp.*) son frutas tropicales que suelen cultivarse con fines comerciales o de autoconsumo humano en muchas partes del mundo, sin embargo, estos cultivos, suelen generar un volumen importante de residuos y sobrantes de frutas no aptas para el consumo humano, ya que una planta al momento de su cosecha por lo general posee un peso promedio de 100 Kg los cuales están repartidos en 15 Kg de hojas, 50 Kg de pseudotallo, 33 Kg de fruta y 2 Kg de raquis, demostrando que más del 75% del volumen total de producción de biomasa lo constituyen lo que no aprovecha el hombre sistemáticamente como fuente de alimentos tradicionales y pudiera emplearse en la alimentación animal (36).

Las hojas y los pseudotallos contienen niveles importantes de ligninocelulosa, mientras que los restos de fruto presentan en su composición gran cantidad de micronutrientes, propiedades que los convierte en sustratos eficientes para la producción de algunos hongos basidiomicetos, especialmente hongos de la podredumbre blanca, los cuales producen enzimas ligninolíticas capaces de degradar completamente la lignina, polímero conformado por p-hidroxí-cinnamil alcohol, y metabolizar los monómeros fenólicos en compuestos aromáticos de interés tales como vainilla, ácido ferúlico y eugenol (37).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

La presente investigación se realizó en el Campus Experimental “La María”, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), la cual está ubicada en el cantón Mocache, a la altura del Km 7 de la vía Quevedo – El Empalme, provincia de Los Ríos, entre las coordenadas geográficas 01° 6’ 20’’ de latitud Sur y de 79° 29’ 23’’ de longitud Oeste, a una altura de 75 msnm. En la Tabla 1 se observan las condiciones agroecológicas de la zona de estudio.

Tabla 1. *Condiciones agroecológicas de la zona de estudio.*

Parámetros	Promedios
Temperatura promedio (°C)	25.30
Humedad relativa (%)	82.00
Heliofanía (horas luz/año)	1041.1
Precipitación (mm/año)	3229.3
Zona ecológica	Bosque Húmedo Tropical (bh-T)
Topografía	Ligeramente ondulada

Fuente: (38).

3.2. Tipo de investigación.

La investigación desarrollada es de tipo exploratoria, enmarcada en la línea de investigación de la UTEQ, Desarrollo de tecnología para la transformación de la materia prima agroindustrial.

3.2.1. Investigación de laboratorio.

3.2.1.1. Preparación de los sustratos.

El sustrato de pseudotallo de plátano se acondicionó previo al inicio de la investigación, se lavó, cortó y deshidrató en un secador con flujo de aire a 60°C, posteriormente se almacenó en un lugar fresco y ventilado para ser utilizados durante el proceso investigativo (39).

3.2.1.2. Fermentación sólida de los sustratos.

La cepa del hongo *Pleurotus ostreatus* se aisló y propagó en cajas Petri para obtener la semilla del hongo, la cual consiste en semilla de trigo previamente colonizada por las esporas del hongo extraídas de las cajas Petri. Se esterilizó el sustrato de pseudotallo de plátano por un período de 1 hora en autoclave para posteriormente realizar el llenado en fundas plásticas de 17,78 x 25,40 cm (7 x 10 pulgadas), del sustrato y el inóculo en una relación del 10% del peso total contenido en la funda (39).

Las fundas fueron colocadas en cámara oscura para su fermentación. Se controló la aireación y humidificación de la cámara para mantener una humedad relativa superior al 80% y una temperatura entre 16 y 20 °C. Las fundas permanecieron en la cámara oscura hasta el desarrollo completo del micelio. Una vez que las fundas fueron colonizadas completamente por el micelio del hongo, se trasladaron a otra cámara, para promover el apareamiento de los cuerpos fructíferos mediante la presencia de luz tenue (39).

3.2.1.3. Extracción enzimática.

Se tomaron muestras del sustrato de pseudotallo de plátano degradado por el hongo una vez que este alcanzó a producir los cuerpos fructíferos, luego estas muestras se homogenizaron mediante su licuación y se colocaron en un matraz de 250 ml de capacidad la cantidad de 45 g de muestra y se adicionó 75 ml de las soluciones buffer preparadas de acuerdo a los niveles de pH (4.0; 4.8; 6.0; y 7.0) a partir de acetato de sodio al 0.1 M (pH 5.8), el mismo que se ajustó mediante el empleo de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio. Se agitó durante 30 min en un agitador magnético, para seguidamente filtrar y el volumen obtenido se distribuyó en tubos vacutainer y sometidos a baño maría a diferentes temperaturas (40, 50 y 60° C) por 30 minutos para su estabilización final, luego se los centrifugó por 50 min a 4500 rpm para separar el sobrenadante o extracto enzimático (39).

3.2.1.4. Evaluación de la actividad enzimática.

La evaluación de la actividad celulítica se empleó como sustrato una solución de previamente elaborada de la mezcla de una solución de carboxi-metil-celulosa al 2% en solución tampón de Acetato de sodio 0,01 M (pH 5,8).

En un tubo de eppendorf se agregó 0,5 mL de extracto enzimático, 0,5 mL de la solución sustrato y se procedió a medir la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de a 470 nm.

3.3. Métodos de investigación.

Los métodos aplicados en la presente investigación, corresponde a los métodos de observación directa de los acontecimientos durante la etapa de trabajo de campo, su posterior registro de los datos obtenidos y su respectivo análisis, empleando el método analítico. Para las conclusiones se empleó el método deductivo.

3.1.1. Método analítico.

El método de análisis se estableció en la identificación del problema de la investigación directamente en la zona de influencia, mediante la relación entre el pH de la solución buffer extractora y la temperatura de extracción con la actividad enzimática de los extractos obtenidos, datos que mediante la observación directa de los acontecimientos relacionados al tema de la investigación y posterior análisis estadístico, determinando así si existen algún efecto relacionado con los factores descritos.

3.1.2. Método deductivo.

Este método permitió estructurar las conclusiones de la investigación partiendo de los acontecimientos observados durante la fase experimental, para así obtener una explicación sobre el fenómeno evaluado, comparando estas experiencias con la información, leyes y principios de validez universal expuestos sobre procesos de extracción enzimática y la evaluación de su actividad.

3.1.3. Método inductivo.

Se empleó este método mediante el razonamiento lógico para asimilar la información generada, a partir de eventos similares observados en otros ensayos para llegar a formular enunciados propios acerca del tema investigativo.

3.4. Fuentes de información.

3.4.1. Fuentes primarias de información.

Las fuentes de información primarias consistieron en la recolección de datos del presente proyecto de investigación en la fase experimental, lo cual implicó la determinación de azúcares reductores del extracto enzimático obtenido, determinación de la temperatura y pH óptimo de las enzimas celulasas obtenidas.

3.4.2. Fuentes secundarias de información.

La investigación bibliográfica corresponde a las fuentes secundarias de información, donde se revisaron trabajos de investigación tecnológica en tesis de grado, revistas científicas, folletos, boletines de prensa, etc.; para respaldar con datos bibliográficos y resaltar la importancia tecnológica del estudio.

3.5. Diseño de la investigación.

Para la presente investigación se empleó un diseño experimental completamente al azar evaluándose la combinación de diferentes grados de temperatura (40, 50 y 60° C) y niveles de pH (4; 4,8; 6 y 7) dando un total de 12 tratamientos de los cuales se dispuso de 3 repeticiones. En la Tabla 2 se muestran los tratamientos a evaluar.

El modelo matemático al que corresponde el presente diseño experimental se muestra a continuación.

(Ecuación 1)

$$\gamma_{ijk} = \mu + t_i + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

γ_{ijk} Variable de respuesta

μ	Media general
t_i	Efecto del n-ésimo tratamiento
ϵ_{ijk}	Error experimental

Tabla 2. *Tratamientos evaluados en la investigación.*

Tratamiento	Descripción	Repeticiones	U.E.
T1	Buffer (pH 4.0) x 40°C de incubación	3	3
T2	Buffer (pH 4.0) x 50°C de incubación	3	3
T3	Buffer (pH 4.0) x 60°C de incubación	3	3
T4	Buffer (pH 4.8) x 40°C de incubación	3	3
T5	Buffer (pH 4.8) x 50°C de incubación	3	3
T6	Buffer (pH 4.8) x 60°C de incubación	3	3
T7	Buffer (pH 6.0) x 40°C de incubación	3	3
T8	Buffer (pH 6.0) x 50°C de incubación	3	3
T9	Buffer (pH 6.0) x 60°C de incubación	3	3
T10	Buffer (pH 7.0) x 40°C de incubación	3	3
T11	Buffer (pH 7.0) x 50°C de incubación	3	3
T12	Buffer (pH 7.0) x 60°C de incubación	3	3
Total unidades experimentales			36

Elaboración: Autora.

3.6. Instrumentos de investigación.

3.6.1. Variables a evaluar.

Durante el desarrollo de la investigación, se evaluaron las siguientes variables:

3.6.1.1. pH de los extractos obtenidos.

Una vez obtenidos los extractos enzimáticos se procedió a evaluar su pH, con el fin de establecer el pH idóneo para la actividad enzimática.

3.6.1.2. Determinación de la temperatura.

La temperatura de los extractos se midió con un termómetro y se registró con el fin de determinar la influencia de los factores evaluados.

3.6.1.3. Determinación de la actividad celulasa.

La actividad enzimática se evaluó mediante la medición de la absorbancia de los compuestos enzimáticos a 470 nm permitiendo la obtención de una medida relacionada directamente con la actividad enzimática.

3.7. Tratamiento de los datos.

Para el tratamiento de los datos se empleó un análisis de varianza (ADEVA), mientras que para la comparación entre medias de los tratamientos se utilizó la prueba de comparaciones de Tukey, a una probabilidad del 5% ($p \leq 0.05$), los datos se analizaron mediante el empleo del software estadístico Infostat versión estudiantil. En la Tabla 3 se observa el esquema del análisis de varianza.

Tabla 3. *Análisis de la varianza*

Fuente de variación		Grados de libertad
Tratamiento	t-1	11
Error	t(r-1)	24
Total	(t*r)-1	35

Elaboración: Autora.

3.8. Recursos humanos y materiales.

La presente investigación empleó el talento humano de la Dra. Diana Vasco Mora y el Ing. Orly Cevallos Falquez en calidad de docentes tutores del proyecto de investigación, además del recurso humano de Erika Fuentes Vera como autora material e intelectual de la presente investigación.

Equipos:

Baño maría

pH metro

Autoclave

Cámara de flujo

Centrifuga

Balanza gramera-analitica

Espectrofotometro

Reactivos

Solución buffer

Soluciones

Ácido sulfúrico

Hidróxido de sodio

Peróxido de hidrógeno

Celulosa

Materiales:

Sustrato de pseudotallo de plátano y semillas de trigo

Material de estudio (extracto enzimático del hongo *Pleurotus ostreatus*)

Matraz Elermeyer

Vaso de precipitación

Agitador magnético

Papel filtro

Licuada industrial

Potenciómetro

Recipientes de vidrio

Micro Pipeta

Puntas de 1microlitro

Tubo de ensayo

Tubo vacutainer 10ml

Cajas Petri

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión.

4.1.1. Evaluación del pH de los extractos enzimáticos obtenidos.

Se determinó en la figura 1, que el pH de la solución buffer fue significativo ($p < .0001$), puesto que se demostró que el pH de extracción mantiene una relación directa con el pH de los extractos enzimáticos obtenidos, los tratamientos T9 y T12 obtuvieron los mayores valores de pH de los extractos con 5.66 y 5.7 respectivamente, los cuales concuerdan con los mayores valores de pH de extracción evaluados. La temperatura de extracción también afectó significativamente la respuesta en cuanto al pH de los extractos obtenidos, demostrando que los extractos enzimáticos alcanzan un mayor pH al llegar a los 60° C durante el proceso de extracción. El coeficiente de variación obtenido fue de 4.92.

Las enzimas actúan dentro de límites estrechos de pH (denominado pH óptimo de la reacción), el cual es específico para la enzima por lo cual el pH de extracción se presenta como una manera de regular el pH del extracto enzimático final y obtener una mayor actividad enzimática. Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que el pH y la temperatura de extracción afectan significativamente el pH de las enzimas obtenidas, datos que difieren a los obtenidos por Montiel *et al.*, (40) quienes investigaron la manera de optimizar el proceso de extracción de lactasa a partir de cepas de *Kluyveromyces marxianus* ATTC 8554, mediante la combinación de los parámetros fisicoquímicos: temperaturas 30, 37 y 42°C; pH 6.5, 8.5 y 10 y tiempo 5, 10 y 20 horas con el método de extracción con tolueno al 2% en buffer fosfato 0.1 M, obteniendo un acortamiento significativo ($P < 0,01$) en el tiempo necesario para la extracción de la lactasa, siendo la mejor combinación: 37°C, pH 6.5 y 5 horas.

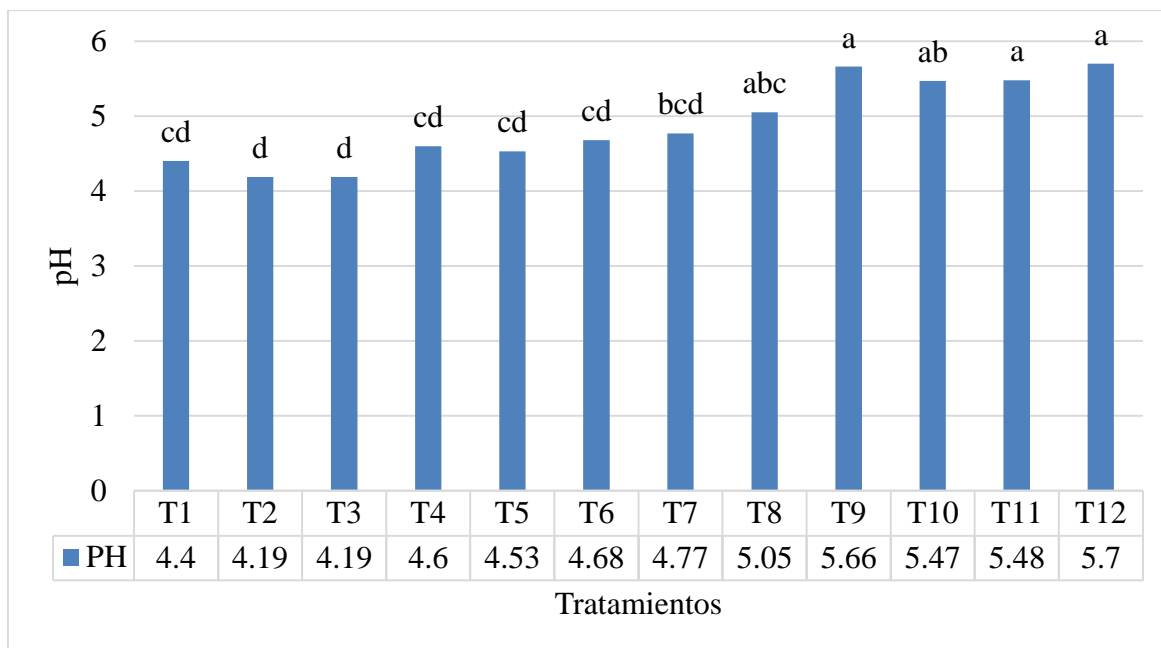


Figura 1. Evaluación del pH de los extractos enzimáticos obtenidos de *P. ostreatus*.

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey ($P < 0.05$).

Elaboración: Autora

4.1.2. Evaluación de la temperatura en los extractos enzimáticos.

La figura 2, demuestra que el pH de extracción y la temperatura sobre la temperatura de los extractos acuosos obtenidos a partir de sustrato de pseudotallo de plátano colonizado por *P. ostreatus*, donde se puede observar que existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados donde los tratamientos T10, T11 y T12 obtuvieron los mayores valores de temperatura con 24.55, 24.67 y 24.65 respectivamente; estos valores se relaciona con el pH 7.0 de la solución buffer de extracción; mientras que la temperatura de extracción no influyó en la respuesta en cuanto a la temperatura de los extractos. El coeficiente de variación fue de 0.93.

Estos valores fluctúan en comparación con el pH de los extractos, donde a mayor pH de extracción mayor el pH de los extractos, este efecto se debe a que la temperatura no incide de manera significativa en la temperatura de los extractos y que la temperatura final de los extractos es proporcional a la temperatura de incubación.

Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Cuervo *et al.*, (41), quienes realizaron la extracción y purificación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa a partir de la bacteria carboxidótrofa *Oligotropha carboxidovorans* y determinaron que la temperatura idónea de extracción fue de 40°C en un periodo de incubación de 12 horas con un buffer de extracción de KH₂PO₄ 50mM con pH 7.0.

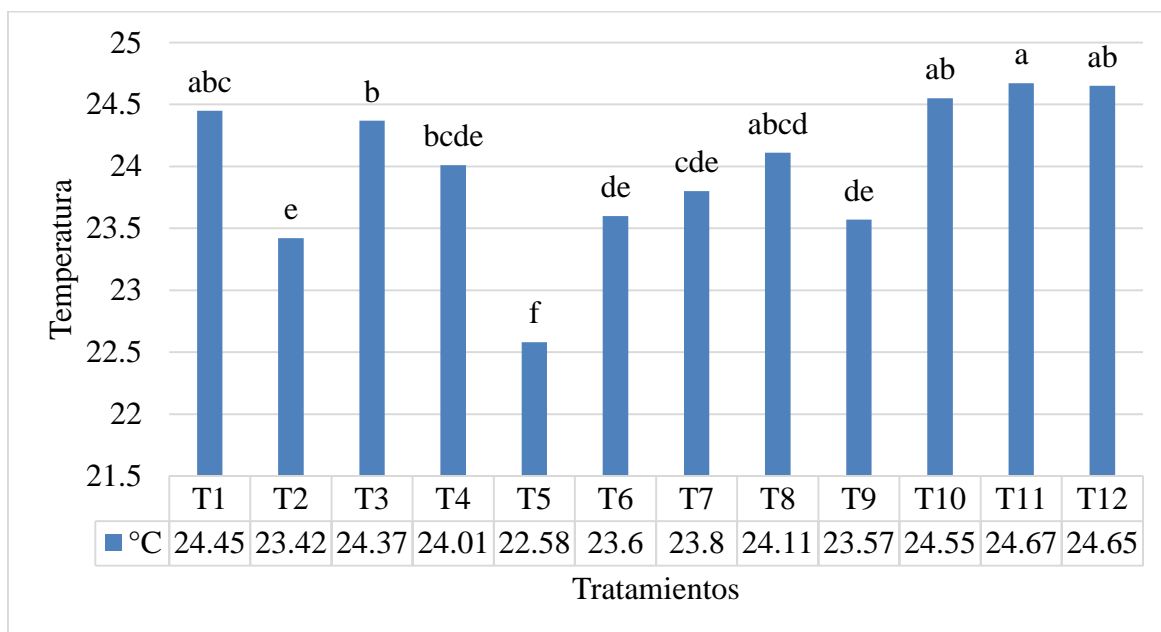


Figura 2. Evaluación de la temperatura de los extractos enzimáticos de *P. ostreatus*.

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey ($P < 0.05$).

Elaboración: Autora

4.1.3. Evaluación de la absorbancia de la actividad enzimática específica celulolítica.

Los extractos enzimáticos fueron sometidos a espectrofotometría con el fin de establecer la absorbancia a 470 nm y determinar de manera indirecta la cantidad de enzimas presentes en la muestra. La absorbancia obtenida bajo el efecto de los tratamientos obtuvo diferencias significativas, donde los tratamientos T7 y T11 obtuvieron una mayor absorbancia con 1.143 y 1.170 respectivamente, estos valores obtenidos se pueden observar en la figura 3. El coeficiente de variación obtenido fue de 4.35.

La temperatura de extracción influyó sobre la absorbancia de los extractos enzimáticos obtenidos, en la cual se observa que los mayores valores se obtuvieron dentro del rango de 40° - 50° C de temperatura de extracción, mientras que para el pH de extracción se obtuvo

con un pH de 7.0. Los resultados obtenidos en la evaluación de los extractos enzimáticos concuerdan con los datos obtenidos por Carabalí, Narváez y Restrepo (42), quienes evaluaron la extracción y medida de la actividad pectin metil estearasa procedente de la pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) enzima relacionada con el ablandamiento, la cual demostró una mejor actividad enzimática al ser sometida a rangos de temperatura de 40-45°C y una solución buffer fosfato de extracción pH 7.0.

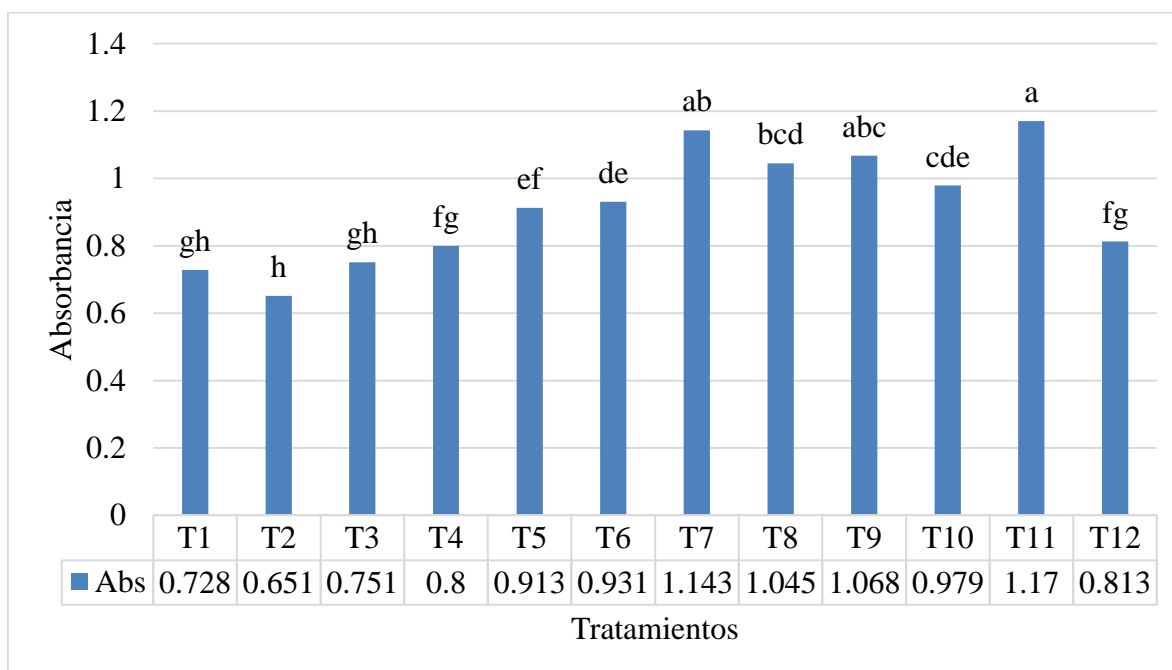


Tabla 12. Evaluación de la absorbancia de los extractos enzimáticos de *P. ostreatus*.

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey ($P < 0.05$).

Elaboración: Autora

Castro, *et al.*, 2006 (47), extrajeron las enzimas catalasa, peroxidasa y polifenoloxidas a partir de la corteza de frutos de pitajaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), demostrando que para la actividad catalasa se halló que su pico de actividad máxima se obtuvo dentro de un pH entre 6.8 y 7.5 y temperatura entre 30° a 50° C; mientras que para la actividad peroxidasa se encontró un pico de actividad máxima dentro de un pH entre 5.0 a 5.5, temperatura de máxima actividad entre 20 a 25 °C, mientras que para la actividad polifenoloxidas las actividades máximas se obtuvieron a pH 7.0 y a temperaturas entre 30° a 40° C.

Montiel *et al.*, 2005 (44), presentaron resultados que concuerdan con los datos obtenidos en el presente ensayo, ya que demostraron que conforme aumenta la temperatura y el pH de extracción la actividad enzimática se ve incrementada dentro de un rango de temperatura de 40° C evaluando los buffer con pH de 6.5, 8.5 y 10.0 respectivamente, se observó además que conforme aumenta el pH fuera del rango evaluado en la presente investigación disminuye considerablemente las características de los extractos enzimáticos.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

Los extractos enzimáticos actúan dentro de límites estrechos de pH, denominado rango de pH óptimo de la reacción, el cual es específico para la enzima por lo cual el pH de extracción se presenta como una manera de regular el pH del extracto enzimático final, por lo cual el efecto del pH de la solución buffer fue significativo a medida que este aumentaba, obteniendo como pH idóneo el buffer 7.0, lo que permitió obtener mejores características de los extractos acuosos.

La temperatura de los extractos se vio significativamente influenciada por la temperatura de extracción, obteniendo las mayores características dentro de un rango de temperatura de incubación de 40° - 50° C.

La actividad enzimática está estrechamente ligada a la absorbancia registrada de los extractos enzimáticos, se demostró que las enzimas obtenidas actúan dentro de rangos de pH de 7.0 y temperatura media a 50° C.

5.2. Recomendaciones.

Se recomienda evaluar la actividad enzimática de estos extractos acuosos en otras condiciones de temperatura y pH de extracción.

Se recomienda, además, evaluar los periodos de reacción para determinar su efecto dentro de la respuesta final de la actividad enzimática.

Se recomienda estudiar la absorbancia de otros extractos más diluidos a una mayor longitud de onda, de manera que se pueda determinar el alcance de las enzimas obtenidas.

Se recomienda identificar las enzimas que se encuentra dentro del extracto enzimático.

Se recomienda evaluar el extracto enzimático en alimentos para comprobar su degradabilidad.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

5.1. Referencias bibliográficas.

1. Cruz M, Sanchez J. La fibra en la alimentación del ganado lechero. *Nutrición animal tropical*. 2000; 6(1): p. 39-75.
2. Albetis M. El uso de dietas alta en fibras (6%) en aves de postura en la etapa de recría (10 a 16 semanas de edad). *Tecnico. XXIV Congreso Latinoamericano de Avicultura*; 2010 Septiembre. Report No.: 14.
3. Paredes D. Obtención de enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*). Primera ed. Ambato: Universidad Tecnica de Ambato; 2010.
4. Paredes D, Alvarez M, Silva M. Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica ESPOL*. 2010 Diciembre; 23(1): p. 81 - 88.
5. Llanes D. Desarrollo tecnico-economicamente viable de harinas forrageras predigeridas y enriquecidas proteicamente a partir del bagazo de la caña de azucar. Primera ed. Altamira: Instituto Politecnico Nacional; 2012.
6. Jaramillo I. Evaluacion de tres residuos agroindustriales lignocelulósicos provenientes de cebada (*Hordeum vulgare* L.), arroz (*Oriza sativa*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) para el cultivo de dos cepas de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus* J.) bajo invernadero. Primera ed. Riobamba: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo; 2013.
7. Marquez A, Mendoza G, Gonzáles S, Buntinx S, Meneses M, Loreal O. Degradacion de las enzimas fibroliticas de *Trametes* sp., EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y de FIBROZYME. *Arch. Zootec*. 2010 Octubre; 59(225): p. 145-148.

8. Rujano E. Transcripción de catalizadores biológicos. [Online].; 2015 [cited 2016 febrero 10. Available from: <https://prezi.com/lubvnb6zcd4c/catalizadores-biologicos/>.
9. Cammack R, Atwood T, Campbell P, Parish H, Smith A, Vella F, et al. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Segunda Edición ed. Londres: Oxford University Press; 2006.
10. Peña M. Composición química y degradabilidad in situ de residuos agrícolas de maíz inoculados con dos cepas del género *Pleurotus*. Finca La María. Primera ed. Quevedo: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2013.
11. Ruiloba M, Vega A, Franco H, Solís C, García R. Efecto de la bio-degradación con cepas nativas de *Pleurotus djamor*, RN81 Y RN82, sobre parámetros químicos Y DEGRADABILIDAD in situ de sustratos lignocelulósicos. Revista Científica, FCV-LUZ. 2014; 24(5): p. 443-453.
12. Martínez D, Buglione M, Filippi M, Reynoso L, Rodríguez G. Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera. Anales de Biología. 2015; 37(1): p. 1-10.
13. Granda V. Formulación de una dieta óptima para pollos broiler en fase de engorde, basada en la bioconversión de la pasta residual del piñón (*Jatropha curcas*) con enzimas fibrolíticas Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército; 2012.
14. Escorcía A. Modelado molecular de reacciones enzimáticas. Innovaciencia. 2015; 3(1): p. 5-10.
15. Eras E. Estudio de la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica obtenidos durante la producción de los hongos *Pleurotus ostreatus* 202 y 896 en rastrojo de maíz. Primera ed. Quito: Escuela Politécnica Nacional; 2012.

16. Fontalvo M, Vecino R, Barrios A. El aceite de palma africana *elae guineensis*: Alternativa de recurso energético para la producción de biodiesel en Colombia y su impacto ambiental. *Prospect*. 2014 Enero-Junio; 12(1): p. 90-98.
17. Castillo K. Evaluación de la inclusión de nopal (*Opuntia ficus indica*) en combinación de enzima celulasa sobre la respuesta productiva en ovinos. 1st ed. Buena Vista: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2013.
18. Salcedo J, Lopez J, Florez L. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna*. 2011 Octubre; 78(169): p. 182-190.
19. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem*. 1987 Enero; 59(2): p. 257-268.
20. Torres N. Efecto del extracto enzimático fibrolítico de *Cellulomonas flavigena* en la respuesta productiva, digestibilidad y variables ruminales en corderos. *Journal of Animal Feed Science*. 2012 Octubre; p. 30-42.
21. Rojo R, Mendoza GD, Montañez O, Rebollar S, Cardoso D, Hernandez J, et al. Enzimas amilolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes. *Universidad y Ciencia*. 2007; 23(2): p. 173-182.
22. Leon J, Aponte JJ, Cuadra L, Galindo N, Jaramillo L, Vallejo M, et al. Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2016 Abril; 51(1): p. 69-80.
23. Cabrera R, Valenzuela M, Reyes Y, Esqueda M, Asaff A. Caracterización de los extractos metanólicos de poda de vid y paja de trigo y su oxidación por enzimas extracelulares de *Lentinula edodes*. *Revista Mexicana de Micología*. 2013; 37(1): p. 61-67.

24. Melendez J, Castillo S, Peña Y, Yopez T. Degradación de compuestos fenólicos en efluentes simulados por acción de la enzima lacasa obtenida a partir del hongo *pleurotus ostreatus*. 2015 Marzo.
25. Delgado J, Olazábal J, Carcelen F, Arbiaza T, Ara M, Bardales K, et al. Evaluación de dos complejos enzimáticos fibrolíticos comerciales sobre la digestibilidad y la cinética de digestión del cogollo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). *Rev Inv Vet Perú*. 2014; 25(2): p. 182-189.
26. Ovando S, Waliszewski K. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 2005 Diciembre; 21(42): p. 111-120.
27. Pichén L, Flores M, Obeso C, Arellano J. Efecto de la variación del pH en un medio de cultivo a base de salvado de trigo para la producción de amilasa por *Paecilomyces lilacinus*. *Sciéndo*. 2011; 14(1-2): p. 46-55.
28. Rodríguez L, Llenque L. Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. *Rebiol*. 2016 Enero-Junio; 36(1): p. 19-28.
29. Maldonado Y. Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus spp.*, por apareamiento de neohaplontes compatibles. Primera ed. Mexico: Instituto Politecnico Nacional; 2007.
30. García P, Rodríguez W, Chalarca E, Andrade A. Estudio microbiológico y fisicoquímico de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) frescos y deshidratados. *Ingenierías y Amazonía*. 2014 Junio; 7(1): p. 41-47.
31. Pineda J, Ramos L, Soto C. Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. 2014 Mayo-Agosto; 48(2): p. 13-23.

32. Hurtado K, Huamán M, Bravo N, Silva A, Silva R. Evaluación del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.* 2016 Julio; 19(1): p. 63-75.
33. Larrea A. Optimización de un medio de cultivo para la producción de enzimas oxidorreductasas tipo Lacasas de *Pleurotus ostreatus* para su posterior inmovilización enzimática en Alginato de Calcio. Primera ed.: Universidad de las Américas; 2016.
34. Medina A, Ferrer J, Brieva J. Evaluación del producto obtenido a partir de la fermentación en estado sólido de desechos de uvas blancas para ser utilizado como abono orgánico. *Revista Estudiantil URU.* 2015 Enero-Junio; 1(1): p. 33-42.
35. Ferrer J, Machado JL, Brieva J. Fermentación en estado sólido: Una alternativa biotecnológica para el aprovechamiento de los desechos agroindustriales. *Revista Tecnocientífica URU.* 2014 Julio-Diciembre; 1(7): p. 11-22.
36. Mazzeo M, León L, Mejía LF, Guerrero L, Botero JD. Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha de plátano en el departamento de Caldas. *Educación en Ingeniería.* 2010 Junio; 1(9): p. 128-139.
37. Granda D, Mejía A, Jiménez G. Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación sólida con el hongo *Lentinus crinitus*. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 2005 Diciembre; 12(2): p. 13-20.
38. INAMHI. Anuario Meteorológico. 522012th ed. Quito: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología; 2015.
39. Vaca M, Izurieta B, Espín N. Obtención de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica a partir del hongo *pleurotus ostreatus* 404 y 2171 en rastrojo de maíz. *Revista ENP.* 2014 Enero; 33(2).

40. Montiel X, Carruyo I, Marcano L, Mavárez M. Optimización del proceso de extracción de la lactasa dE *Kluyveromyces marxianus* ATTC 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2005; 15(5): p. 476-482.

41. Cuervo R, Hurtado C, Bravo E, Benitez N, Torres W, Larmat F. Extracción y purificación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa a partir de la bacteria carboxidótrofa *Oligotropha carboxidovorans*. *Revista Científica Guillermo de Ockham*. 2005 Julio-Diciembre; 3(2): p. 107-116.

42. Carabalí I, Narváez C, Restrepo L. Extracción y medida de actividad pectin metil estearasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) enzima relacionada con el ablandamiento. *Acta biológica colombiana*. 2009; 14(2): p. 73-82.

CAPITULO VI
ANEXOS

6.1. Análisis de la varianza.

Tabla 4. ADEVA para la variable pH de los extractos enzimáticos.

Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado de media	F-Valor	P > F
Tratamiento	11	10.35696389	0.94154217	16.21	<.0001
Error	24	1.39386667	0.16338056		
Total	35	11.75083056			

Tabla 5. ADEVA para la variable Temperatura de los extractos enzimáticos.

Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado de media	F-Valor	P > F
Tratamiento	11	13.98589722	1.27144520	25.30	<.0001
Error	24	1.20626667	0.05026111		
Total	35	15.19216389			

Tabla 6. ADEVA para la variable Absorbancia del extracto enzimático.

Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado de media	F-Valor	P > F
Tratamiento	11	0.95055600	0.08641418	54.36	<.0001
Error	24	0.03815000	0.00158958		
Total	35	0.98870600			

6.2. Evidencia fotográfica.



Secado del sustrato de pseudotallo de plátano



Acondicionamiento del sustrato en fundas



Colocación de las bolsas en cámara oscura en condiciones controladas



Riego de los sustratos colonizados



Cuerpos fructíferos



Licudo del sustrato colonizado



Preparación de las soluciones
buffer de extracción



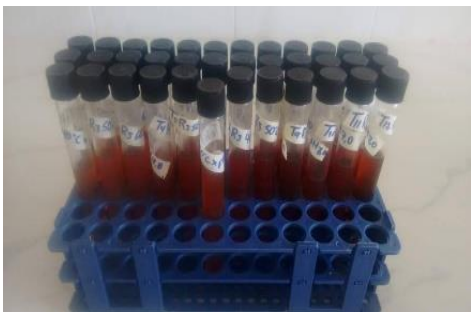
Extracción del sustrato digerido



Incubación de los extractos en baño maría



Separación del extracto acuoso



Extractos acuosos



Medición de pH y Temperatura



Evaluación de la espectrofotometría de los extractos acuosos