



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

Proyecto de Investigación
previo a la obtención del título
de Ingeniero Agropecuario

Título del Proyecto de Investigación

**“OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON
ACTIVIDAD CELULÍTICA Y LIGNOLÍTICA A PARTIR DEL HONGO
Pleurotus ostreatus CULTIVADOS EN TUZA DE MAÍZ”**

Autor

Jacobo Daniel Chávez Véliz

Director de Proyecto de Investigación

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora M.Sc.

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2017

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Jacobo Daniel Chávez Véliz**, 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. _____

Jacobo Daniel Chávez Véliz

C.C: # 120446867-0

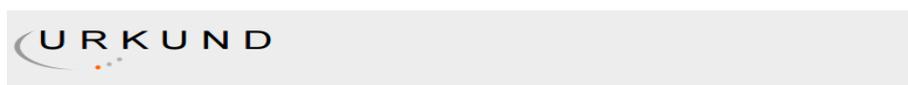
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Quintana Zamora Jorge Gustavo, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante Chávez Véliz Jacobo Daniel, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado “OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULÍTICA Y LIGNOLÍTICA A PARTIR DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* CULTIVADOS EN TUZA DE MAÍZ”, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora M. Sc.
DIRECTOR 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, el suscrito Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, en calidad de Director del Proyecto de Investigación “**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULÍTICA Y LIGNOLÍTICA A PARTIR DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* CULTIVADOS EN TUZA DE MAÍZ**” de autoría del estudiante **CHÁVEZ VÉLIZ JACOBO DANIEL**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 10%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



Urkund Analysis Result

Analysed Document: OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS
CON ACTIVIDAD CELULÍTICA Y LIGNOLÍTICA A PARTIR DEL
HONGO *Pleurotus ostreatus* CULTIVADOS EN TUZA DE MAÍZ.docx
(D27834486)
Submitted: 2017-05-03 19:23:00
Submitted By: jquintana@uteq.edu.ec
Significance: 10 %

Sources included in the report:

CAPITULO TESIS JUAN 20141.docx (D13158547)

Instances where selected sources appear:

10

Atentamente

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora M.Sc.

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
INGENIERÍA AGROPECUARIA

Título:

“OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON
ACTIVIDAD CELULÍTICA Y LIGNOLÍTICA A PARTIR DEL HONGO *Pleurotus*
ostreatus CULTIVADOS EN TUZA DE MAÍZ”

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

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Víctor Godoy Espinoza

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Italo Espinoza Guerra

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Erick Eguez Enríquez

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2017

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, de manera especial a la carrera de Ingeniería Agropecuaria y a cada uno de los docentes que nos supieron impartir sus conocimientos de la manera más oportuna formándome en mi área profesional.

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

A mi director Ing. Jorge Quintana Zamora por su valiosa ayuda en la dirección de la presente tesis.

Al Ing. Orly Cevallos por su valioso apoyo brindado, su amistad y aporte en la trayectoria para culminar con éxito mi investigación. Siendo un excelente docente y amigo.

Gracias a todas las personas que han formado parte de mi vida, padres, familiares, amigos, docentes, gracias por su apoyo, consejos, amistad y colaboración que de alguna manera aportaron para que se lleve a cabo la culminación satisfactoria de mi carrera profesional y proyecto de tesis

Gracias a todos

DEDICATORIA

A Jehová Dios por darme el privilegio de la vida, dado a que sin él no somos nada por darme las fuerzas necesarias y no rendirme jamás ante cualquier adversidad que se presentare en el camino por enriquecerme en fuerza de espíritu y voluntad, con humildad siempre viviré agradecido.

A la persona que más amo en este mundo, a ti madre querida mujer luchadora labradora de la tierra cultivadora de sueños y esperanza y eh aquí uno de tus sueños y anhelos verme graduado una esperanza que con sacrificio lo logramos porque sin ti no lo hubiese hecho realidad usted ha sido mi inspiración de superación.

*Todo lo que sé es gracias a esa enseñan que día tras día me das a ser honesto y justo con las personas, orgulloso me siento de ser quien soy porqué todo lo eh aprendido de usted de dar lo mejor de mí, gracias por todo su amor apoyo incondicional y paciencia madre de mi vida
Gracias por todo mami Gladys Azucena Véliz Zambrano.*

Daniel

RESUMEN

Las enzimas fibrolíticas están relacionadas a la alimentación, textiles, papel, así como también, son empleadas para fines de investigación en torno a mejorar la digestibilidad de la fibra proveniente de los subproductos agrícolas e industriales mediante procesos biológicos donde la adición de enzimas fibrolíticas se presenta como alternativa para el aprovechamiento de nutrientes presentes en estos productos. El objetivo de este estudio fue obtener extractos enzimáticos con actividad celulítica y lignolítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivados en tuza de maíz, para lo cual se cultivó cepas de este hongo fibrolítico en tuza de maíz hasta obtener su desarrollo y que degradara el sustrato, del cual se procedió a extraer las enzimas presentes mediante un protocolo donde se evaluó dos parametros de extracción: el pH (4.0, 4.8, 6.0 y 7.0) y la temperatura (40, 50 y 60 °C). Se empleó un diseño experimental completo al azar evaluándose 12 tratamientos resultante de la combinación de los pH de solución buffer y la temperatura de extracción. Los extractos enzimáticos obtenidos fueron evaluados para determinar su pH, temperatura y absorbancia a 470 nm mediante espectrofotometría. Para la evaluación del pH se obtuvo que los tratamientos T9 (pH 6.0 + 60°C) y T10 (pH 7.0 + 40°C) obtuvieron los mayores valores de pH con 5.35 y 5.29 respectivamente; mientras que en la temperatura de los extractos enzimáticos los tratamientos que presentaron mejores resultados fueron T2 (pH 4.0 + 50°C), T4 (4.80 + 40°C) y T6 (pH 4.8 + 60°C) con 24.8; 25.0 y 24.5 °C respectivamente, por otro lado, la mayor actividad enzimática fue obtenida con los tratamientos T9 (pH 6.0 + 60°C) y T10 (pH 7.0 + 40°C) con valores de absorbancia de 0.903 y 0.889 respectivamente. Se determinó que a mayor pH de extracción las características de las enzimas obtenidas fueron superiores, así como la actividad enzimática, no obstante la temperatura de extracción no ejerció efecto alguno.

Palabras clave: pH, Temperatura, espectrofotometría, celulasa.

ABSTRACT

Fibrolitic enzymes are related to food, textiles, paper, as well as are used for research purposes to improve the digestibility of fiber from agricultural and industrial by-products through biological processes where the addition of fibrolitic enzymes is presented As an alternative for the use of nutrients present in these products. The objective of this study was to obtain enzymatic extracts with cellulite and lignolytic activity from the *Pleurotus ostreatus* fungus cultivated in maize tui, for which strains of this fibrolitic fungus were cultivated in maize tuna until its development and that degraded the substrate, From which the enzymes were extracted by a protocol where two extraction parameters were evaluated: pH (4.0, 4.8, 6.0 and 7.0) and temperature (40, 50 and 60 ° C). A complete randomized experimental design was used to evaluate 12 treatments resulting from the combination of buffer pH and extraction temperature. The enzymatic extracts obtained were evaluated to determine their pH, temperature and absorbance at 470 nm by spectrophotometry. For pH evaluation, T9 (pH 6.0 + 60 ° C) and T10 (pH 7.0 + 40 ° C) obtained the highest pH values with 5.35 and 5.29 respectively; Whereas in the temperature of the enzymatic extracts the treatments that presented better results were T2 (pH 4.0 + 50 ° C), T4 (4.80 + 40 ° C) and T6 (pH 4.8 + 60 ° C) with 24.8; 25.0 and 24.5 ° C respectively. On the other hand, the highest enzymatic activity was obtained with T9 (pH 6.0 + 60 ° C) and T10 (pH 7.0 + 40 ° C) treatments with absorbance values of 0.903 and 0.889 respectively. It was determined that at higher extraction pH the characteristics of the enzymes obtained were higher, as well as the enzymatic activity, however the extraction temperature had no effect.

Key words: pH, Temperature, spectrophotometry, cellulase.

TABLA DE CONTENIDO

| CONTENIDO | Pág |
|---|------------|
| Portada..... | i |
| Declaración de autoría y cesión de derechos..... | ii |
| Certificación de culminación del proyecto de investigación..... | iii |
| Certificado de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico..... | iv |
| Certificado de aprobación por los miembros de tribunal de tesis..... | v |
| Agradecimiento | vi |
| Dedicatoria..... | vii |
| Resumen | viii |
| Abstract..... | ix |
| Tabla de contenido..... | x |
| Índice de tablas | xiii |
| Índice de figuras | xiii |
| Índice 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 |
| 2.1.1. Catalizador..... | 9 |

| | | |
|--------------------------------------|---|----|
| 2.1.2. | Celulosa..... | 9 |
| 2.1.3. | Espectrofotómetro..... | 9 |
| 2.1.4. | Hidrolisis..... | 9 |
| 2.1.5. | Lignina..... | 9 |
| 2.1.6. | Sinergia..... | 10 |
| 2.2. | Marco referencial..... | 10 |
| 2.2.1. | Naturaleza de las enzimas..... | 12 |
| 2.2.1.1. | Estructura de las enzimas..... | 13 |
| 2.2.2. | Enzimas fibrolíticas..... | 14 |
| 2.2.2.1. | Celulasas..... | 15 |
| 2.2.2.2. | Hemicelulasas..... | 15 |
| 2.2.2.3. | Ligninasas..... | 16 |
| 2.2.3. | Uso de las enzimas fibrolíticas en la degradación de fibra..... | 16 |
| 2.2.3.1. | Hidrólisis enzimática..... | 17 |
| 2.2.4. | Enzimas ligninolíticas..... | 19 |
| 2.2.4.1. | Hongos degradadores de fibra..... | 19 |
| 2.2.5. | Maíz..... | 21 |
| CAPÍTULO III..... | | 23 |
| METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN..... | | 23 |
| 3.1. | Localización..... | 24 |
| 3.2. | Tipo de investigación..... | 24 |
| 3.2.1. | Investigación de campo..... | 25 |
| 3.2.2. | Investigación de laboratorio..... | 25 |
| 3.3. | Métodos de investigación..... | 26 |
| 3.1.1. | Método analítico..... | 26 |
| 3.1.2. | Método deductivo..... | 26 |
| 3.1.3. | Método inductivo..... | 27 |
| 3.4. | Fuentes de información..... | 27 |
| 3.4.1. | Fuentes primarias..... | 27 |
| 3.4.2. | Fuentes secundarias..... | 27 |
| 3.5. | Diseño de la investigación..... | 27 |
| 3.6. | Instrumentos de investigación..... | 29 |
| 3.6.1. | Variables..... | 29 |
| 3.6.1.1. | pH de los extractos obtenidos..... | 29 |

| | | |
|--------------------------------------|--|----|
| 3.6.1.2. | Temperatura de los extractos obtenidos..... | 29 |
| 3.6.1.3. | Determinación de la actividad celulasa..... | 29 |
| 3.7. | Tratamiento de los datos..... | 29 |
| 3.8. | Recursos humanos y materiales..... | 30 |
| CAPÍTULO IV | | 32 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 32 |
| 4.1. | Resultados y discusión..... | 33 |
| 4.1.1. | Evaluación del pH de los extractos enzimáticos..... | 33 |
| 4.1.2. | Temperatura de los extractos enzimáticos..... | 34 |
| 4.1.3. | Evaluación de la actividad enzimática..... | 36 |
| CAPÍTULO V | | 39 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 39 |
| 5.1. | Conclusiones..... | 40 |
| 5.2. | Recomendaciones..... | 41 |
| CAPÍTULO V | | 42 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 42 |
| 5.1. | Referencias bibliográficas..... | 43 |
| CAPÍTULO VI..... | | 48 |
| ANEXOS..... | | 48 |
| 6.1. | Anexo 1. Análisis de la varianza de las variables evaluadas..... | 49 |
| 6.2. | Anexo 2. Fundamentación fotográfica de la investigación..... | 50 |

INDICE DE TABLAS

| CONTENIDO | Pág |
|---|------------|
| Tabla 1. Composición química en base seca de algunos residuos agroindustriales..... | 22 |
| Tabla 2. Condiciones agroecológicas de la zona de estudio..... | 24 |
| Tabla 3. Tratamientos evaluados en la investigación. | 28 |
| Tabla 4. ADEVA. | 30 |
| Tabla 5. Análisis de la varianza para la variable pH de los extractos enzimáticos. | 49 |
| Tabla 6. Análisis de la varianza para la variable temperatura del extractos enzimáticos.... | 49 |
| Tabla 7. Análisis de la varianza para la variable Absorbancia del extracto enzimático..... | 49 |

INDICE DE FIGURAS

| CONTENIDO | Pág |
|---|------------|
| Figura 1. pH de los extractos enzimáticos obtenidos sometidos a diferentes pH de solución extractora y temperatura de incubación..... | 34 |
| Figura 2. Temperatura de los extractos enzimáticos obtenidos sometidos a diferentes pH de solución extractora y temperatura de incubación. | 36 |
| Figura 3. Absorbancia de los extractos enzimáticos obtenidos sometidos a diferentes pH de solución extractora y temperatura de incubación. | 38 |

INDICE DE ANEXOS

| CONTENIDO | Pág |
|---|------------|
| 6.1. Anexo 1. Análisis de la varianza de las variables evaluadas..... | 49 |
| 6.2. Anexo 2. Fundamentación fotográfica de la investigación. | 50 |

CÓDIGO DUBLIN

| | |
|--------------------|--|
| Título: | Obtención y evaluación de extractos enzimáticos con actividad celulítica y lignolítica a partir del hongo <i>pleurotus ostreatus</i> cultivados en tuza de maíz (<i>zea mays</i>).. |
| Autor: | Chávez Véliz Jacobo Daniel |
| Palabras clave: | pH, temperatura, espectrofotometría, celulasa |
| Fecha publicación: | 02/06/2017 |
| Editorial: | Quevedo: UTEQ, 2017 |
| Resumen: | <p>Resumen.- Las enzimas fibrolíticas están relacionadas a la alimentación, textiles, papel, así como también, son empleadas para fines de investigación en torno a mejorar la digestibilidad de la fibra proveniente de los subproductos agrícolas e industriales mediante procesos biológicos donde la adición de enzimas fibrolíticas se presenta como alternativa para el aprovechamiento de nutrientes presentes en estos productos. El objetivo de este estudio fue obtener extractos enzimáticos con actividad celulítica y lignolítica a partir del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> cultivados en tuza de maíz, para lo cual se cultivó cepas de este hongo fibrolítico en tuza de maíz hasta obtener su desarrollo y que degradara el sustrato, del cual se procedió a extraer las enzimas presentes mediante un protocolo donde se evaluó dos parametros de extracción: el pH (4.0, 4.8, 6.0 y 7.0) y la temperatura (40, 50 y 60 °C). Se empleó un diseño experimental completo al azar evaluándose 12 tratamientos resultante de la combinación de los pH de solución buffer y la temperatura de extracción. Los extractos enzimáticos obtenidos fueron evaluados para determinar su pH, temperatura y absorbancia a 470 nm mediante espectrofotometría. Para la evaluación del pH se obtuvo que los tratamientos T9 (pH 6.0 + 60°C) y T10 (pH 7.0 + 40°C) obtuvieron los mayores valores de pH con 5.35 y 5.29 respectivamente; mientras que en la temperatura de los extractos enzimáticos los tratamientos que presentaron mejores resultados fueron T2 (pH 4.0 + 50°C), T4 (4.80 + 40°C) y T6 (pH 4.8 + 60°C) con 24.8; 25.0 y 24.5 °C respectivamente, por otro lado, la mayor</p> |

actividad enzimática fue obtenida con los tratamientos T9 (pH 6.0 + 60°C) y T10 (pH 7.0 + 40°C) con valores de absorbancia de 0.903 y 0.889 respectivamente. Se determinó que a mayor pH de extracción las características de las enzimas obtenidas fueron superiores, así como la actividad enzimática, no obstante, la temperatura de extracción no ejerció efecto alguno.

Abstract.- Fibrolytic enzymes are related to food, textiles, paper, as well as are used for research purposes to improve the digestibility of fiber from agricultural and industrial by-products through biological processes where the addition of fibrolytic enzymes is presented As an alternative for the use of nutrients present in these products. The objective of this study was to obtain enzymatic extracts with cellulite and lignolytic activity from the *Pleurotus ostreatus* fungus cultivated in maize tui, for which strains of this fibrolytic fungus were cultivated in maize tuna until its development and that degraded the substrate, From which the enzymes were extracted by a protocol where two extraction parameters were evaluated: pH (4.0, 4.8, 6.0 and 7.0) and temperature (40, 50 and 60 ° C). A complete randomized experimental design was used to evaluate 12 treatments resulting from the combination of buffer pH and extraction temperature. The enzymatic extracts obtained were evaluated to determine their pH, temperature and absorbance at 470 nm by spectrophotometry. For pH evaluation, T9 (pH 6.0 + 60 ° C) and T10 (pH 7.0 + 40 ° C) obtained the highest pH values with 5.35 and 5.29 respectively; Whereas in the temperature of the enzymatic extracts the treatments that presented better results were T2 (pH 4.0 + 50 ° C), T4 (4.80 + 40 ° C) and T6 (pH 4.8 + 60 ° C) with 24.8; 25.0 and 24.5 ° C respectively. On the other hand, the highest enzymatic activity was obtained with T9 (pH 6.0 + 60 ° C) and T10 (pH 7.0 + 40 ° C) treatments with absorbance values of 0.903 and 0.889 respectively. It was determined that at higher extraction pH the characteristics of the enzymes obtained were higher, as well as the enzymatic activity, however the extraction temperature had no

| | |
|--------------|-------------------|
| | effect. |
| Descripción: | 68 hojas + CD ROM |
| URI | |

Introducción

Los residuos y subproductos de los procesos agrícolas e industriales, poseen como característica importante un alto contenido de componentes fibrosos de difícil degradabilidad, como la lignina, celulosa y hemicelulosa, por lo que son considerados lignocelulósicos, ideales para ser empleados como sustratos en la fermentación, en medio sólido, de diferentes variedades de hongos comestibles, como se presenta los hongos del género *Pleurotus*, conformados por hongos de pudrición blanca que degradan estos compuestos fibrosos (1).

La producción de enzimas extracelulares a partir de hongos filamentosos ha sido desarrollada extensivamente en el campo de la biotecnología, a través del uso de metodologías como la fermentación sumergida y fermentación en sustrato sólido, presentándose esta última como una alternativa más idónea para la producción de enzimas fibrolíticas, debido a las características fisiológicas y morfológicas propias de los hongos filamentosos (2).

Los hongos comestibles como el *Pleurotus ostreatus* son degradadores eficientes de lignina y celulosa ya que producen durante su crecimiento enzimas lignocelulolíticas. Por lo tanto, el empleo de desechos agroindustriales como sustrato sólido para el crecimiento del hongo permitiría no solamente obtener un alimento como es el hongo comestible sino también extractos enzimáticos celulolíticos y ligninolíticos del material fermentado residual, lo que daría un gran valor agregado a los desechos agroindustriales (1).

Las enzimas, también conocidas como catalizadores biológicos son macromoléculas de origen proteico que están implicadas en numerosas transformaciones químicas. Las principales características que diferencian a las enzimas de otros catalizadores son la reducción de la energía de activación necesaria para llegar hasta el final de una reacción, su especificidad y la capacidad de regular la catálisis por diversos compuestos naturales (3).

La acción de enzimas hidrolíticas sobre las paredes celulares, puede provocar una mejora en la extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, el uso de celulasas y pectinasas mejora la extracción de polifenoles, así como también se ha determinado que el

tratamiento enzimático en la extracción de aceite de semillas, afecta el contenido de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos desde la harina desgrasada residual, el que dependiendo de las condiciones de extracción puede aumentar en hasta cuatro veces en comparación con el control sin enzima (4).

La mezcla de diferentes enzimas liberadas de un extracto crudo, que contiene varios reordenamientos del material de partida y el producto en particular, hacen que la acción de la enzima se vea afectada. La purificación de la enzima asegura que un solo tipo de enzima dirige la conversión de una sustancia A a B; de esta forma, se puede aprender, cómo la enzima hace su trabajo (5).

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

Las celulasas y enzimas relacionadas se usan en industrias de alimentos, textiles, de pulpa y papel así como también, son empleadas para fines de investigación. Los trabajos sobre este campo se ven incentivados por la demanda cada vez más creciente de enzimas con actividad lignocelulósica (1).

El aumento considerable de los residuos provenientes de las actividades agrícolas e industriales de alimentos genera un problema escala mundial, debido a la inadecuada disposición de los subproductos de origen orgánico, lo que acarrea una serie de problemas de índole ambiental, pues estos residuos durante su proceso de descomposición liberan al ambiente considerables cantidades de gas metano lo que contribuye al calentamiento global.

La problemática del tema gira en torno a mejorar la digestibilidad de la fibra proveniente de los subproductos agrícolas e industriales a través de procesos biológicos, por lo cual, la adición de enzimas fibrolíticas se presenta como alternativa para el aprovechamiento de nutrientes presentes en estos productos, ya que como resultado de su acción fibrolítica puede llegar a aumentar la digestibilidad de los subproductos (6).

Diagnóstico.

La aplicación de extractos enzimáticos en tratamientos biotecnológicos resulta factible si su producción se incrementa y los precios de obtención decrecen al obtener una metodología de extracción menos compleja, es así que, para lograr estos objetivos, la utilización de desechos lignocelulósicos se presenta como una opción que, además puede abaratar la producción, incrementar el rendimiento debido a la presencia de inductores naturales y carbohidratos solubles.

Causas

- El aumento desmesurado de los subproductos orgánicos en las explotaciones agrícolas.
- La baja degradabilidad de la fibra presentes en los alimentos.

Efectos

- Considerable aumento en la contaminación ambiental, por los gases producidos durante el proceso de descomposición de estos subproductos.
- Trastornos digestivos de los animales que provocan una baja producción.

1.1.2. Formulación del problema.

El problema central en cual se fundamenta esta investigación, se desarrolla en base a mejorar la digestibilidad de las fracciones fibrosas, componente primordial de las materias primas para la elaboración de alimentos balanceados; la cual representa una limitante al tener una degradabilidad baja por tener en sus compuestos celulosa y lignina. Para responder a este problema se plantea la siguiente interrogante:

¿Resulta posible la extracción de enzimas con actividad celulítica y lignolítica a partir del cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* en la tuza del maíz para utilizarlo en la degradación de otros materiales lignocelulósicos?

1.1.3. Sistematización del problema.

¿La variación de temperatura y pH de la solución buffer durante el proceso de extracción, modificarán el pH de los extractos obtenidos?

¿La variación de temperatura y pH de la solución buffer durante el proceso de extracción, modificarán la temperatura de los extractos obtenidos?

¿Las actividades catalíticas se verán afectadas por la variación de pH y temperatura en el proceso de extracción?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

Obtener extractos enzimáticos con actividad celulítica y lignolítica a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivados en tuza de maíz para utilizarlo en la degradación de otros materiales lignocelulósicos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el pH de los extractos enzimáticos obtenidos a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivados en tuza de maíz.
- Determinar la temperatura de los extractos enzimáticos obtenidos a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* cultivados en tuza de maíz.
- Obtener la absorbancia de los extractos enzimáticos y relacionarla con la actividad enzimática.

1.3. Justificación.

Los estudios realizados sobre la estructura de la pared celular de las plantas, ha hecho evidente que elementos propios de su carácter organizacional determinan la naturaleza de los procesos de biodegradación de dichas barreras físicas en el material vegetal, donde el más importante de estos factores lo constituye la distribución del tamaño de los polímeros individuales, que contribuyen a la estructura de la pared celular. La medición directa ha demostrado que la mayoría de estos espacios o poros tienen un diámetro de 2 a 4 nm y su composición cambia muy poco durante su degradación, por lo cual, estas dimensiones no son suficientes para permitir la difusión libre por dentro de la pared de enzimas globulares con masas mayores de 20 KDa (7).

Los desechos agroindustriales fibrosos poseen características nutricionales que pueden ser aprovechadas siempre y cuando la barrera fibrosa sea degradada, razón por la cual estos residuos son empleados como sustratos en la producción de enzimas mediante la biodegradación por parte de hongos de la pudrición blanca como el *Pleurotus ostreatus*, estas enzimas presentes en el sustrato degradado son de interés industrial y se convierte en una alternativa extremadamente atractiva debido a la presencia en estos compuestos de grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, los cuales sirven como inductores para la síntesis de enzimas hidrolíticas.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

2.1.1. Catalizador.

Un catalizador propiamente dicho es una sustancia que está presente en una reacción química en contacto físico con los reactivos, y acelera, induce o propicia dicha reacción sin actuar en la misma (8).

2.1.2. Celulosa.

La Celulosa es la principal componente de las paredes celulares de los árboles y otras plantas. Es una fibra vegetal que al ser observada en el microscopio es similar a un cabello humano, cuya longitud y espesor varía según el tipo de árbol o planta (9).

2.1.3. Espectrofotómetro.

Un espectrofotómetro es un instrumento usado en el análisis químico que sirve para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones y la concentración o reacciones químicas que se miden en una muestra. (10).

2.1.4. Hidrolisis.

Descomposición de sustancias complejas orgánicas e inorgánicas en otras más sencillas por acción del agua (11).

2.1.5. Lignina.

La lignina es un polímero de naturaleza aromática con alto peso molecular que tiene como base estructural unidades de fenil-propano y probablemente está ligada a los polisacáridos (poliosas) de la madera (12).

2.1.6. Sinergia.

Procede de un vocablo griego que significa “cooperación”. El concepto es utilizado para nombrar a la acción de dos o más causas que generan un efecto superior al que se conseguiría con la suma de los efectos individuales (13).

2.2. Marco referencial.

Se han establecido investigaciones donde se logró extraer contenido enzimático a partir de la degradación microbiana de sustratos fibrosos como el caso del olote de maíz desgranado, el cual se halla formado por un tejido esponjoso y blanco que representa la médula donde se almacenan las reservas alimenticias del cereal, está compuesto en base seca por celulosa (45 %), hemicelulosa (35 %) y lignina (15 %), de los cuales la hemicelulosa se compone mayoritariamente por xilano de olote (28-35 % base seca) uno de los heteroxilanos complejos que contiene residuos de xilosa con enlaces β -1.4. El xilano de olote de maíz se compone principalmente de xilosa (48-54 %), arabinosa (33-35 %), galactosa (5-11 %) y ácido glucurónico (3-6 %), características que le confieren al olote la posibilidad de ser empleado como sustrato en la producción de la enzima xilanasa. El empleo de técnicas amigables con el medio ambiente en los procesos de manufactura ha requerido del uso de enzimas que degraden o ayuden a degradar la hemicelulosa presente en material vegetal, tal es el caso de la industria de la pulpa y el papel, que con el empleo de xilanasas reducen el uso de sustancias cloradas, debido a las propiedades blanqueadoras de éstas enzimas, demostrando su efectividad empleando bajos volúmenes y su medición de actividad enzimática mediante un método preciso y de bajo costo, le ha conferido a la xilanasa el uso en los procesos de clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes, pigmentos, aceites de plantas y semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos, en la industria de la panificación, bioetanol, xilitol y como integradores tiempo-temperatura (14).

Otras investigaciones presentan un estudio para obtener Bioetanol de sorgo, como respuesta a la necesidad de estudiar otras materias primas para la obtención de alcohol por vía fermentativa, que no son las tradicionales, en las cuales, como principal agente en la sacarificación se emplea el sorgo UDG-110 malteado. Los experimentos se realizaron

teniendo en cuenta diferentes variables combinadas, utilizando para la etapa de sacarificación ácido, malta de sorgo, malta de cebada y enzima amilasa, demostrándose que la malta de sorgo y la malta de cebada tienen un efecto similar por lo que una puede ser sustituida por la otra. También, se aprecia como la combinación de la enzima amilasa con la malta de sorgo, aumenta los resultados en todos los parámetros de calidad medidos, pero debe estar en los niveles más bajos estudiados. El residuo del proceso después de un tratamiento sencillo, tiene las características necesarias para ser considerado como alimento animal, pues los niveles de proteínas, y minerales, están dentro de los parámetros establecidos para estos productos (15).

Sin embargo, el empleo de hongos lignocelulósicos para obtener extractos acuosos se ha vuelto una práctica muy común, puesto que existen investigaciones donde se determinaron las actividades enzimáticas de la celulasa, ligninoperoxidasa y manganeso peroxidasa en los extractos obtenidos del aserrín tropical en el que creció el hongo *Lentinus edodes* con el objetivo de determinar los períodos de mayor generación de las mismas. Los extractos presentaron mayor actividad enzimática celulolítica, mientras que, la mayor producción de actividad enzimática celulolítica se presentó en el día de la primera cosecha, la actividad manganeso peroxidásica mayor se dio en los períodos de inducción, no obstante, no se reportaron valores de actividad lignino peroxidásica representativos. Se almacenaron los extractos a temperaturas: ambiente, 3 °C y -14 °C, para determinar estabilidad, la cual se obtuvo con mayor estabilidad al someterse a congelación (16).

Hongos del género *Pleurotus* también han sido empleados durante estos procesos de extracción enzimática, lo demuestran investigaciones donde se determinaron los días de máxima generación de tres las actividades enzimáticas celulolítica, manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica en los extractos obtenidos durante la fermentación en rastrojo de maíz de las cepas 404 y 2171 del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente, obteniendo que la mayor actividad enzimática obtenida fue la celulolítica, seguida de la manganeso peroxidásica; no se obtuvo actividad lignino peroxidásica. La actividad celulolítica tuvo sus máximos valores en los días de la cosecha del hongo comestible, la actividad manganeso peroxidásica presentó sus máximos valores en el período de desarrollo del micelio. La cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 presentó mayor actividad enzimática (1).

2.2.1. Naturaleza de las enzimas.

Las enzimas son consideradas como los catalizadores de la vida, puesto que la mayoría de las reacciones del metabolismo celular requieren ser catalizadas por estas sustancias, por lo que en sistemas biológicos se les da el título de biocatalizadores, son notables dispositivos moleculares que determinan los patrones de la química de las transformaciones, también permiten mediar la transformación de una forma de energía en otra (17).

El punto más característico de las enzimas es su poder catalítico y su especialidad, debido a su composición química los aminoácidos que las forman se unen covalentemente mediante un enlace peptídico formado entre el átomo de carbono del carboxilo de un aminoácido y el átomo de nitrógeno del grupo α -amino del siguiente, puesto que, de acuerdo con la naturaleza del grupo R, los aminoácidos pueden ser polares o no polares y su distribución a lo largo de la proteína determina su comportamiento y sitio de acción, lo que en catálisis tiene lugar en un sitio determinado de la enzima llamado sitio activo (17).

Las enzimas son importantes proteínas cuya función es acelerar la velocidad de las reacciones químicas que se producen en el organismo y que son necesarias para mantener su actividad biológica, lo cual realizan al disminuir la energía de activación (18).

En la mayoría de los métodos de extracción enzimática se involucra el control del pH utilizando soluciones buffer y para la solubilización de las membranas celulares y el fraccionamiento de las proteínas, mientras que, para lograr la separación se emplean surfactantes no iónicos, ya que durante los procesos de destrucción de los tejidos vegetales la enzima puede disminuir su actividad o llegar a perderla y para evitar esto hay que diseñar estrategias de extracción con el fin de proteger la actividad como trabajar a bajas temperaturas, evitar el contacto directo del material de extracción con los dedos mediante el uso de guantes, centrifugar a bajas temperaturas el tiempo necesario y controlar las fuerzas desarrolladas por la centrifuga (5).

Entre las aplicaciones más exitosas de las enzimas se encuentran aquellas que se consiguen con sus formas inmovilizadas, esto se debe a las ventajas que confiere la inmovilización, entre las cuales están la posibilidad de recuperar la enzima del medio de reacción, la

obtención de un producto no contaminado con la enzima, y el incremento de la estabilidad operacional del biocatalizador (19).

2.2.1.1. Estructura de las enzimas.

Como toda proteína, las enzimas están formadas por una gran cantidad de aminoácidos, que cumplen funciones diferenciadas, entre éstos tenemos los no esenciales, estructurales, de unión y catalíticos.

- Los aminoácidos no esenciales pueden ser reemplazados, y en algunos casos eliminados sin una pérdida significativa en la función o conformación de una enzima.
- Los aminoácidos estructurales son vitales para la conformación de la enzima, forman su “esqueleto”.
- Los aminoácidos de unión participan en la asociación entre la enzima y el sustrato.
- Los aminoácidos catalíticos participan activamente en la transformación del sustrato.

La estructura de una enzima puede explicarse en función de los residuos de estos cuatro tipos de aminoácidos, los residuos estructurales, de unión y catalíticos pueden considerarse esenciales y cualquier modificación de éstos disminuye la actividad enzimática. Si el residuo es particularmente crucial, como en el caso de un residuo clave en la unión o cualquier residuo catalítico, resulta una pérdida total de la actividad. El sitio donde se encuentra el conjunto de aminoácidos de unión y catalíticos se denomina centro activo de la enzima, un lugar estratégico donde, por medio de uniones intermoleculares, la enzima atrae al sustrato en una orientación tal que encajan correctamente (18).

Aunque las estructuras primarias de casi todas las proteínas intracelulares están constituidas por cadenas polipeptídicas lineales, muchas proteínas extracelulares contienen enlaces cruzados covalentes -S-S- al tener dos restos de cisteína unidos por sus tioles. Esto produce, bien la formación de bucles en la cadena polipeptídica principal debido a enlaces intracatenarios o bien la unión de diferentes cadenas (20).

2.2.2. Enzimas fibrolíticas.

Algunas enzimas poseen propiedades funcionales muy interesantes que permiten su utilización práctica en diversos campos de las industrias agroquímica, farmacéutica, de detergentes y alimentaria, así como en química fina, entre las aplicaciones más importantes de estas moléculas se destacan la resolución de mezclas racémicas, obtención de compuestos ópticamente puros y la bioconversión de principios activos (19).

Ciertos tipos de hongos como *Trametes sp.* EUM1 y *P. ostreatus* IE8 producen enzimas fibrolíticas, las cuales podrían ser utilizadas como aditivos en la alimentación de los rumiantes, por ello se planteó como objetivo evaluar el efecto del sustrato, el nivel de proteína y el tiempo de contacto de la enzima con el sustrato sobre la degradación en el líquido ruminal de las enzimas producidas por estos hongos y de las presentes en un producto comercial (21).

Las enzimas celulolíticas son producidas por diferentes microorganismos, bacterias y hongos, incluyendo aerobios, anaerobios, mesófilos, termófilos y extramesófilos. Las bacterias y hongos aeróbicos producen generalmente celulasas extracelulares. Dentro de los principales hongos mesófilos aeróbicos encontramos *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *T. koningii*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* Las bacterias anaeróbicas *Clostridium thermocellum*, *C. cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *R. flavofaciens*, *Fibrobacter succinogenes* y *Acetivibrio cellulolyticus* y hongos anaeróbicos *Neocallimastic frontalis*, *N. patriciarum* y *Piromyces equi* producen celulasas en la forma de complejos multienzimáticos (7).

La hidrólisis del sustrato lignocelulósico depende de las características de las enzimas, incluyendo factores como: absorción de la enzima dentro de la biomasa previa la reacción, competitividad o no competitividad con los productos finales inhibitorios, sinergia entre los componentes de varias enzimas. Limitaciones de transferencia de masa que afecta el transporte de la enzima sobre el sustrato. La hidrólisis enzimática también depende de la composición del sustrato, como la distribución de la lignina, presencia de otros compuestos tales como hemicelulosa, proteínas y grasas, tamaño de la partícula y cristalización (7).

2.2.2.1. Celulasas.

La celulosa es un polímero lineal compuesto de cadenas largas de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces β 1-4, con un alto grado de polimerización (10,000 unidades), con regiones amorfas (no cristalinas y fácilmente hidrolizables) y altamente cristalinas que lo hacen altamente resistente a la hidrólisis y conversión a azúcares fermentables.

Las celulasas son producidas principalmente por hongos aeróbicos tales como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Fusarium solani*, etc., y bacterias mesofílicas como *Cellulomonas sp.*, *Clostridium thermocellum*, etc. Su acción implica una operación secuencial y sinérgica de un grupo de enzimas que incluye: endoglucanasas (endo- β -1,4-glucanasa (Cx), 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), exoglucanasas (celobiohidrolasas, exo- β -1,4-glucanasa (C1), 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y β -glucosidasas (celobiasa (Cb), β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21), las cuales actúan para obtener una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa.

2.2.2.2. Hemicelulasas.

Las hemicelulosas son polisacáridos que, excluyendo la celulosa, constituyen las paredes celulares de las plantas y se pueden extraer con soluciones alcalinas diluidas, formando aproximadamente una tercera parte de los carbohidratos en las partes maderosas de las plantas y su estructura química consiste en cadenas largas con una gran variedad de pentosas, hexosas, y sus correspondientes ácidos úronicos. Las hemicelulosas se encuentran en frutas, tallos de plantas, y las cáscaras de granos y aunque no son digeribles, pueden ser fermentadas por levaduras y bacterias (22).

Las enzimas que degradan hemicelulosa se nombran según el sustrato sobre el que actúan, por ejemplo, mananasas, xilanasas, etc., dentro de este contexto, el más abundante es el xilano, por ello las xilanasas constituyen el grupo enzimático más abundante y estudiado entre las hemicelulasas, debido a que la hidrólisis de estas complejas moléculas requiere la interacción de numerosas enzimas que corten la cadena principal y también las cadenas laterales dando como producto final la xilosa (23).

Dentro de cada uno de los grupos de enzimas que se requieren para la completa hidrólisis del xilano, existen formas isoenzimáticas con especificidades, que a veces se traslapan, producidas por un determinado organismo, aparentemente por la variedad de la estructura de los heteroxilanos en la naturaleza (24).

2.2.2.3. Ligninasas.

Dada la heterogeneidad de la molécula de lignina y su gran tamaño, los sistemas enzimáticos involucrados en su degradación deben ser extracelulares y no específicos, resultando en una despolimerización parcial, donde las roturas de las cadenas ocurren sin estereoespecificidad, provocándose mecanismos oxidativos que producen radicales libres que pueden reaccionar entre sí volviendo a polimerizarse. Hasta el momento se han descrito tres enzimas ligninolíticas que se hayan distribuidas ampliamente entre los hongos causantes de la pudrición blanca: la lignino-peroxidasa (LiP), manganeso-peroxidasa (MnP) y la lacasa (23).

2.2.3. Uso de las enzimas fibrolíticas en la degradación de fibra.

El uso de enzimas como una estrategia para mejorar la utilización de los alimentos y, en particular, de materiales fibrosos pueden ser utilizados para el tratamiento de forraje o incluidas como suplemento en la ración. En el rumen, las enzimas pueden ser degradadas por las proteasas microbianas, sin embargo, algunos estudios indican que las enzimas parecen ser estables en el rumen y complementar la actividad fibrolítica microbiana ruminal o incrementarla. La formación del complejo enzima-sustrato puede ser importante en la estabilidad de las enzimas, en el líquido ruminal y el contacto previo de la enzima con el sustrato aparentemente favorece el efecto benéfico de la enzima (21).

Las dietas suplementadas con celulasas pueden mejorar la utilización del forraje y el desarrollo animal por incremento en la degradación de la fibra (7). Las celulasas y xilanasas 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. El interés por las celulasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles, debido a

que la lignocelulosa es la fuente de energía renovable más abundante de la tierra y se encuentra formada por tres componentes principales que son celulosa, hemicelulosa y lignina, posee un bajo contenido en cenizas, proteínas, grasas y ceras (25).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para evaluar diferentes enzimas fibrolíticas como aditivos para mejorar el valor nutritivo de forrajes, pero la mayoría de ellos han utilizado forrajes de elevada calidad y apenas existen estudios con forrajes de baja calidad. Por otra parte, los resultados han sido muy variables, ya que la efectividad de las enzimas se ve afectada por numerosos factores, siendo el tipo de forraje y el método de aplicación de las enzimas dos de los más importantes (26).

El tratamiento de forrajes con enzimas fibrolíticas exógenas o su inclusión como suplemento de la ración se ha convertido en una estrategia para el mejoramiento de los alimentos para el ganado, siendo estas enzimas extraídas a nivel de laboratorio principalmente obtenidas de extractos de fermentación de hongos aeróbicos, como el caso de los generos *Pleurotus* y *Trametes*, los cuales tienen la habilidad de degradar fibra al producir diferentes compuestos enzimáticos lignocelulóticos (27).

2.2.3.1. Hidrólisis enzimática.

Las enzimas fibrolíticas que han sido aisladas de cultivos de hongos y bacterias y han mostrado efectos positivos al adicionarse durante el proceso de ensilaje de algunos forrajes, puesto que, estas enzimas aplicadas a los forrajes antes de una incubación *in vitro* mejoraron la digestión de la materia seca y la fibra detergente neutra, sugiriendo que la adición directa de éstas al alimento puede mejorar la utilización del mismo, además, una mezcla de enzimas puede ser más efectiva que una enzima trabajando por sí sola (28).

Las moléculas de lignocelulosa son altamente resistentes a la hidrólisis enzimática, debido a que la celulosa, hemicelulosa y lignina, principales componentes de la fibra vegetal, están unidos entre sí por enlaces covalentes, puentes intermoleculares y fuerzas de Van der Waals, lo que confiere resistencia e insolubilidad a la celulosa cristalina, disminuyendo la adsorción de las celulasas en el sustrato, mientras que para que sea eficaz la hidrólisis enzimática, se requiere realizar un pretratamiento que desintegre la matriz lignocelulósica, reduzca la cristalinidad de la celulosa y aumente la proporción de celulosa amorfa (29).

En fisicoquímica, las fuerzas de Van der Waals o interacciones de Van der Waals, son las fuerzas atractivas o repulsivas entre moléculas (o entre partes de una misma molécula) distintas a aquellas debidas a un enlace intramolecular (enlace iónico, metálico y covalente de tipo reticular) o a la interacción electrostática de iones con otros o con moléculas neutras (30). Este término incluye:

- Fuerza entre dos dipolos permanentes si las interacciones son entre moléculas que están polarizadas de manera permanente (por ejemplo, las moléculas de agua que atraen otras moléculas de agua u otras moléculas polares), se conocen como fuerzas de Keesom.
- Fuerza entre un dipolo permanente y un dipolo inducido cuando un dipolo inducido (esto es, un dipolo que se induce en un átomo o una molécula que de otra manera sería no polar) interactúa con una molécula que tiene un momento dipolar permanente, esta interacción se conoce como fuerza de Debye, como por ejemplo de esta interacción serían las fuerzas entre las moléculas de agua y las de tetracloruro de carbono.
- Fuerza entre dos dipolos inducidos instantáneamente. Si las interacciones son entre dos dipolos que están inducidos en los átomos o moléculas, se conocen como fuerzas de London (por ejemplo, el tetracloruro de carbono).

Otro fin es el de eliminar o remover lignina con el objetivo de tener mayor acceso a las moléculas a hidrolizar y aumentar así el rendimiento de azúcares fermentables, ya que actualmente el pretratamiento y la hidrólisis de celulosa se realizan con catalizadores químicos y biológicos, ya que para aumentar la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis, los catalizadores químicos (ácidos, bases u oxidativos) se combinan con métodos térmicos en condiciones fuertes de reacción por lo que se consume gran cantidad de energía y frecuentemente se forman compuestos tóxicos que pueden inhibir la fermentación subsecuente, por lo que son poco viables económicamente y de alto impacto ambiental (29).

2.2.4. Enzimas ligninolíticas.

Las enzimas ligninolíticas, al ser extracelulares, no hidrolíticas y con una especificidad de sustrato baja, son capaces de degradar la lignina y otros compuestos recalcitrantes con estructuras similares a la de este biopolímero, puesto que, al ser la lignina la segunda fuente más abundante de carbono en el planeta se encuentra depositada, junto con la celulosa y la hemicelulosa, en las paredes celulares de las plantas vasculares como un polímero heterogéneo, amorfo y altamente ramificado, con enlaces covalentes aril-éter, aril-aril y carbono-carbono y cuyo peso molecular está entre 600 y 1 000 kDa (31).

La lignocelulosa es uno de los recursos bioenergéticos renovables más abundantes en la naturaleza, el cual se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina, sin embargo, su utilización como fuente de energía se ve limitada en el presente porque la lignina es difícil de degradar y transformar a glucosa, teniendo en cuenta que el porcentaje en peso de los residuos agroindustriales puede estar entre un 35% a 40%, el cual es una cantidad considerable de residuos durante el procesamiento (32).

Las enzimas ligninolíticas han sido encontradas en plantas y animales; sin embargo, las principales fuentes productoras son los microorganismos, los mismos que han sido empleados en la producción de enzimas debido a la relativa facilidad para controlar su micro y macro ambiente y la posibilidad de una manipulación genética si fuera necesario, además, debido a la naturaleza aromática y a la estructura tridimensional compleja de la lignina, esta no puede ser oxidada por oxidoreductasas de bajo potencial redox, entonces, existen algunos microorganismos que, con el fin de destruir a este biopolímero, secretan enzimas especializadas, quienes adicionalmente, han creado mecanismos que facilitan la acción enzimática mediante la presencia de residuos catalíticos en la superficie de las enzimas y el uso de mediadores redox (31).

2.2.4.1. Hongos degradadores de fibra.

Dentro de las alternativas para el aprovechamiento de alimentos fibrosos, está su uso como sustrato en el cultivo de los hongos basidiomicetos, el mismo que ofrece ventajas, específicamente las especies del género *Pleurotus*, el cual destaca la posibilidad de

cultivarlo en zonas tropicales y de utilizar una amplia gama de sustratos, pero debido a esta diversidad de sustratos, la selección de cepas que se adapten a dichos sustratos proporciona información acerca de la adaptabilidad saprófita de los hongos a ellos, donde la capacidad de invadir diferentes sustratos se debe en gran medida a la producción de enzimas peroxidasas (33).

La producción de hongos comestibles moviliza cientos de millones de dólares y miles de puestos de trabajo en toda América, por lo cual, existe mucho por investigar y trabajar en este campo, ya que su variedad de climas permite la aclimatación de las múltiples especies de setas comestibles conocidas, puesto que, los principales factores que contribuyen a la pérdida de calidad después de la recolección de los hongos comestibles son la decoloración, el desarrollo del carpóforo, la pérdida de peso y los cambios de textura y sabor, estos parámetros establecen los requerimientos de manejo poscosecha y las técnicas necesarias para su conservación, la cual puede ser mantenida pero no mejorada (34).

La biodegradación de la fibra por parte de hongos basidiomicetos se considera un proceso no específico, oxidativo, el cual se lleva a cabo principalmente por la acción de tres tipos diferentes de enzimas: manganeso peroxidasas (MnPs), lignino peroxidasas (LiPs), y lacasa, conjunto de enzimas con alto poder degradativo (33).

Pleurotus ostreatus es un hongo de la pudrición blanca capaz de degradar muchos compuestos xenobióticos y recalcitrantes debido a su capacidad para producir un sistema de enzima no específica capaz de catalizar la oxidación de muchos tipos de compuestos orgánicos que incluyen colorantes textiles. Investigaciones han determinado el perfil de expresión de cinco genes de lacasa extraída de *P. ostreatus* desarrollado en medios con un pH diferente en fermentación sumergida, lo que permite indicar que el pH inicial del medio de crecimiento es un factor importante para la regulación de la expresión de genes de lacasa que tienen un efecto sobre la actividad y sobre la cantidad de lacasa isoenzimas producidas por *P. ostreatus*, expresión que está condicionada a diversos factores de transcripción dependientes de fuente de carbono, fuente de nitrógeno y pH (35).

Una cuarta parte de todos los residuos de cereales desechados cada año se podría utilizar para producir hongos comestibles frescos, suficiente para el suministro diario de 250 g hasta más de cuatro millones de personas, por lo que hay un aumento muy significativo de

setas y trufas de producción en todo el mundo que, de acuerdo con análisis realizados, la producción mundial de alimentos rica en proteínas y nutrientes se han elevado exponencialmente desde 1961, en este punto, *Pleurotus ostreatus*, también conocido como el hongo ostra, es una de las setas más ampliamente cultivadas, ya sea en climas cálidos o calientes, sin embargo, las técnicas de cultivo de hongos son en su mayoría empíricas (36).

2.2.5. Maíz.

El maíz es la planta más domesticada y evolucionada del reino vegetal, debido a que ha sido y continúa siendo parte básica y fundamental de la alimentación de grandes sectores de la población, sobre todo de la mayoría de países latinoamericanos, no obstante, su origen y evolución sigue siendo un misterio ya que ha llegado a tiempos actuales altamente evolucionado sin conocerse formas intermedias (37).

El maíz es una fuente importante de carbohidratos, el cual representa el 80% del peso íntegro del grano, estos polisacáridos son de tipo estructural y de reserva, siendo los primeros los que forman parte de las paredes del grano y la tuza, estos son la pectina, hemicelulosa, celulosa y lignina (38).

Cada año se genera una gran cantidad de residuos, provenientes de las cosechas de productos utilizados en la alimentación humana, como el arroz, maíz, trigo, café, frijol de soya, azúcar y algodón, que se estiman en 3736.05 millones de toneladas métricas (TM); de las cuales 698.10 millones de TM, corresponden a residuos de la cosecha de arroz y 1729.92 millones de TM, a los residuos de la cosecha del maíz, residuos que representan una materia prima apta para el cultivo de hongos para la alimentación o para el aprovechamiento de sus subproductos como son las enzimas empleadas en la degradación de los sustratos (39).

La industria de alimentos para humanos y animales genera una gran cantidad de subproductos agroindustriales cuyo contenido de nutrientes los convierte en una opción para elaborar alimentos para especies pecuarias. Entre los subproductos agroindustriales están los residuos y pajas de algodón, cacahuate, arroz, caña de azúcar, cítricos, yuca, maíz

y sorgo, sin embargo, los residuos lignocelulolíticos, producidos en grandes volúmenes, presentan un bajo contenido de proteína y uno alto de fibra (40).

Tabla 1. *Composición química en base seca de algunos residuos agroindustriales.*

| Residuo | Proteína | Celulosa | Hemicelulosa | Lignina |
|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------|
| Paja de arroz | 4.5 | 36.5 | 17.4 | 5.6 |
| Rastrojo de maíz | 6.4 | 31.8 | 21.7 | 7.9 |
| Tuza de maíz | 2.1 | 40.7 | 40.7 | 6.3 |
| Rastrojo de sorgo | 7.8 | 21.4 | 24.9 | 5.5 |
| Rastrojo de soya | 9.2 | 35.5 | 18.4 | 17.9 |
| Bagazo de caña | 1.7 | 46.0 | 24.0 | 20.0 |

Fuente: (40).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

La investigación se realizó en toda su fase de campo 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. Los análisis bromatológicos se realizaron en el laboratorio de Rumiología, Metabolismo y Nutrición animal ubicado en el mismo campus. En tabla 1 podemos observar las condiciones agroecológicas de la zona de estudio.

Tabla 2. *Condiciones agroecológicas de la zona de estudio.*

| Parámetros | Promedios |
|--------------------------|-------------------------------|
| Temperatura promedio °C | 21.90 |
| 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: (41).

3.2. Tipo de investigación.

El presente ensayo se desenvuelve bajo la línea de investigación de la UTEQ, Desarrollo de tecnología para la transformación de la materia prima agroindustrial. La investigación se estructura de una investigación de campo que consiste en la propagación del hongo fibrolítico a nivel *in vitro* y posteriormente en fundas de polietileno sobre sustratos compuesto de tuza de maíz, el mismo que en fase de laboratorio se procedió a extraer las enzimas contenidas en el sustrato que fueron producidos por el hongo para su degradación.

3.2.1. Investigación de campo.

La investigación de campo inició con una fase previa en laboratorio donde se aisló y propagó en cajas Petri cepas del hongo *Pleurotus ostreatus*, mientras se acondicionó el sustrato tuza de maíz lavado, cortado y deshidratado en un secador con flujo de aire a 60°C, para posteriormente ser almacenado en un lugar fresco y ventilado para ser inoculado una vez que se obtenga la semilla del hongo, la cual consiste en semilla de trigo previamente colonizada por las esporas del hongo (1).

El sustrato tuza de maíz fue esterilizado por un periodo de 1 hora en autoclave y se llenó en fundas plásticas de 17.78 x 25.40 cm (7 x 10 Pulgadas), llenándose con el sustrato respectivo adicionado el inoculo en una relación del 10%. Se colocaron estas fundas en cámara oscura para su fermentación controlando la aireación y humidificación de la cámara para mantener las condiciones necesarias para una correcta fermentación (humedad relativa de 80% y entre 16 y 20°C) permaneciendo en la cámara hasta el desarrollo completo del micelio, una vez colonizadas se trasladaron a una cámara de luz tenue para promover el apareamiento de los cuerpos fructíferos (1).

3.2.2. Investigación de laboratorio.

La fase de laboratorio consistió en la extracción y evaluación de la actividad enzimática de los compuestos enzimáticos presentes en el sustrato colonizado por el hongo, para lo cual se tomó muestras de sustrato digerido y se homogenizaron licuando el sustrato con la solución tampón y filtrando el extracto en gasa estéril. La solución tampón se elaboró a partir de acetato de sodio al 0.1 M, el cual se regulo de acuerdo a los factores de estudio (pH 4.0, 4.8, 6.0 y 7.0) los cuales se regularon mediante el empleo de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio. La solución tampón y el extracto se agitaron en un matraz por 30 minutos, posteriormente este compuesto se precipitó en una centrifuga a 6000 rpm para separar el sobrenadante o extracto enzimático. Estos extractos enzimáticos se sometieron a baño maría a diferentes temperaturas (40°, 50° y 60° C) (1).

La evaluación de la actividad celulítica se empleará 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 ensayo se agregará 0,5 mL de extracto enzimático, 0,5 mL de la solución sustrato y se tomara alícuotas de 1 mL y se envasaran en tubos eppendorf para su posterior medición de la absorbancia a 470 nm empleando un espectrofotómetro (1).

3.3. Métodos de investigación.

Se emplearon los métodos de observación, el registro y tabulación de los datos obtenidos mediante el método analítico y el método deductivo que permita realizar las conclusiones pertinentes basadas en la información recopilada durante el desarrollo del ensayo.

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 enzimático 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.

Las fuentes de información primaria corresponden al conjunto de datos que se tomaron directamente de los procesos investigativos, su ordenamiento y posterior análisis para establecer conclusiones preliminares.

3.4.2. Fuentes secundarias.

Las fuentes secundarias son los antecedentes informativos obtenidos de trabajos de investigación, revistas científicas, tesis, libros, y toda fuente que permita resaltar la importancia científica de la investigación.

3.5. Diseño de la investigación.

Para la presente investigación se estableció un diseño experimental completamente al azar, donde los tratamientos corresponden a la evaluación de combinaciones de niveles de pH y temperatura (°C) en la respuesta de las características fisicoquímicas de los extractos enzimáticos obtenidos. El esquema de los tratamientos evaluados se muestra en la siguiente tabla (Tabla 3).

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

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

Donde:

γ_{ijk} Variable de respuesta

μ Media general

t_i Efecto del i-ésimo Tratamiento

ϵ_{ijk} Error experimental

Tabla 3. *Tratamientos evaluados en la investigación.*

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

Elaboración: Autor.

3.6. Instrumentos de investigación.

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

3.6.1. Variables.

3.6.1.1. pH de los extractos obtenidos.

Se obtuvo el pH de los extractos enzimáticos mediante el empleo de un pH metro, esta variable se evaluó de acuerdo a los tratamientos establecidos.

3.6.1.2. Temperatura de los extractos obtenidos.

Se evaluó la temperatura de los extractos enzimáticos obtenidos mediante el empleo de un termómetro digital, esta variable se evaluó de acuerdo a los tratamientos establecidos.

3.6.1.3. Determinación de la actividad celulasa.

Se realizó la medición de la absorbancia de los compuestos enzimáticos a 470 nm permitiendo la obtención de una medida de absorbancia, la misma que tiene relación directa sobre la concentración y actividad enzimática.

3.7. Tratamiento de los datos.

Para el análisis de los datos se empleó un análisis de varianza (ADEVA) para el tratamiento de los datos, mientras que para la comparación entre medias de los tratamientos se utilizará el test de rangos múltiples de Tukey, a una probabilidad del 5% ($p \leq 0.05$). Los análisis estadísticos de los datos se realizarán mediante el empleo del programa estadístico libre Infostat versión 2016 (42). El esquema del análisis de varianza se presenta a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. ADEVA.

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

Elaboración: Autor.

3.8. Recursos humanos y materiales.

La presente investigación empleó el talento humano del Ing. Jorge Quintana Zamora en calidad de docente tutor del proyecto de investigación, además del recurso humano de Jacobo Daniel Chávez Véliz como autor material e intelectual de la presente investigación.

Materiales:

Sustrato (tuza de maíz) y semilla para germinar el hongo (semillas de trigo)

Material de estudio (cepa del hongo *Pleurotus ostreatus*)

Matraz

Vaso de precipitación

Agitador magnético

Papel filtro

Licuada industrial

Potenciómetro

Recipientes de vidrio

Micro Pipeta

Cajas Petri

Tubo Vacutainer 10ml

Tubo de ensayo

Puntas de 1 microlitro

Equipos:

Baño maría

pH metro

Autoclave

Cámara de flujo

Centrifuga

Balanza gramera-analitica

Espectrofotometro

Reactivos

Solución tampón

Soluciones

Ácido sulfúrico

Hidróxido de sodio

Peróxido de hidrógeno

Celulosa

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión.

Los extractos enzimáticos obtenidos por fermentación sólida de sustratos de tuza de maíz fueron sometidos a diferentes temperaturas y soluciones buffer de extracción con el fin de determinar el método que permita obtener la mayor cantidad de enzima posible. Se evaluó el pH de los extractos obtenidos, la temperatura y la actividad enzimática mediante evaluación indirecta de la absorbancia a través de espectrofotometría.

4.1.1. Evaluación del pH de los extractos enzimáticos.

Se muestran los resultados de los tratamientos evaluados sobre el pH de los extractos enzimáticos obtenidos (Figura 1), estos valores permiten determinar que existieron diferencias significativas ($p < .0001$) entre los tratamientos, los valores de pH obtenidos por los T9 y T10 fueron estadísticamente superiores, obteniendo los mayores valores de pH, estos tratamientos concuerdan con los máximos valores de pH de la solución buffer lo que comprueba su influencia sobre el resultado. El coeficiente de variación obtenido fue de 5.07.

El pH de extracción influye sobre las características físico químicas de los extractos enzimáticos finales, se logra alcanzar el pH idóneo de reacción conforme se aumenta el pH de la solución buffer de extracción. Montiel *et al.*, 2005 (45), demostró en su investigación que conforme aumenta el pH de extracción la actividad enzimática se ve incrementada al llegar a una media de temperatura de 40° C, para este caso se evaluaron los buffer pH de 6.5, 8.5 y 10.0 respectivamente, además se observó que conforme aumenta el pH fuera del rango evaluado en la presente investigación disminuye considerablemente las características de los extractos enzimáticos.

Vásquez *et al.*, 2008 (42), en su investigación evaluaron dos condiciones de pH (2,0 y 3,0) durante 60 minutos a 85°C, obteniendo que la pectina obtenida a pH 3,0 posee características mucho más competitivas dentro de su tipo, así como mayor aceptación en la evaluación sensorial.

Fredes, Loyola y Muñoz, 2009 (43) en su investigación evaluó el efecto de dos niveles de madurez de la uva (16.6 y 22° °Brix, tres niveles de pH (2, 2.5 y 3) y dos tiempos de cocción a 90°C (45 y 60 min) sobre la extracción de pectinas y su grado de metoxilación, demostrando que a mayor ph se obtiene una mayor calidad de enzimas y que su interacción con otros factores de extracción no es significativa.

Se presenta la figura 1, donde se aprecia el efecto de los tratamientos sobre el pH de los extractos enzimáticos obtenidos por fermentación solida del hongo *Pleurotus ostreatus* en tuza de maíz. Los promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey ($p>0.05$).

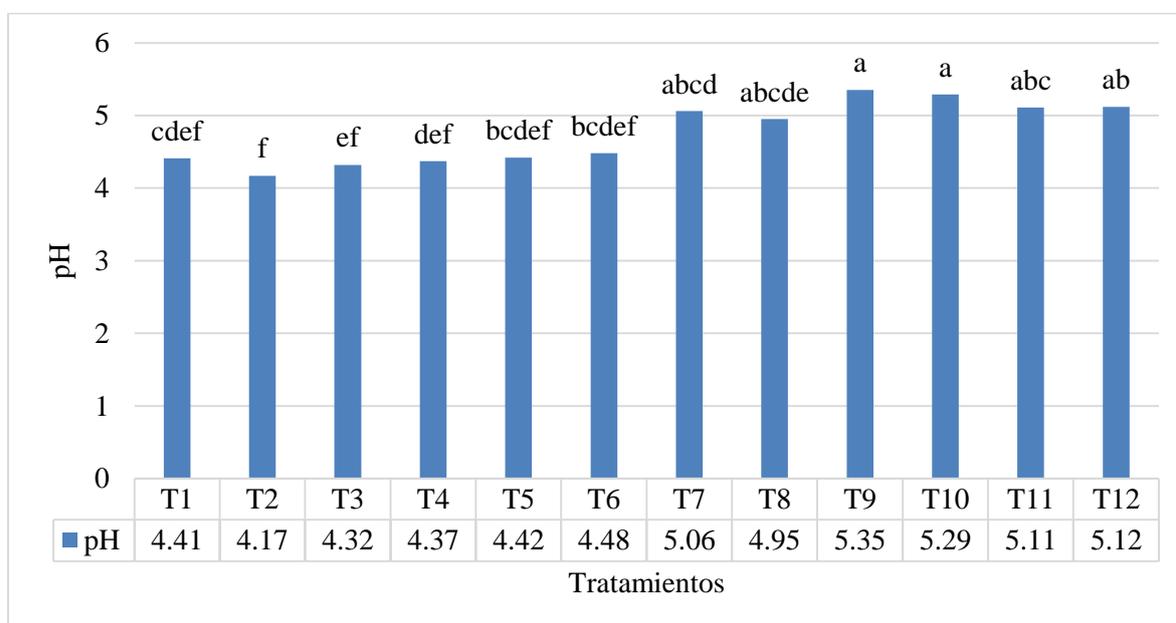


Figura 1. pH de los extractos enzimáticos obtenidos sometidos a diferentes pH de solución extractora y temperatura de incubación.

Elaboración: Autor.

4.1.2. Temperatura de los extractos enzimáticos.

Se muestran los resultados de los tratamientos sobre la temperatura de los extractos enzimáticos (Figura 2), en el cual se muestra que existieron diferencias estadísticas significativas ($p<.0001$), donde los tratamientos T2, T4 y T6 obtuvieron las mayores temperaturas, valores que responden al efecto de bajos niveles de pH y bajas temperatura de extracción. El coeficiente de variación fue de 1.12.

Henao, Franco y Marín, 2006 (44), en su investigación evaluaron 6 metodologías para la extracción y conservación de extractos acuosos de hongos filamentosos con actividad enzimática amilolítica amiloglucosidasa, obteniendo que el rango óptimo de actividad del extracto enzimático está en valores de pH que van desde 3.0 hasta 5.0 y 60°C de temperatura.

Gasull y Becerra, 2006 (46), en su investigación estudiaron las características de la polifenoloxidasa extraída de peras y manzanas, donde el pH y temperatura óptimas fueron 6.5 - 25° C y 7.0 – 30° C para pera y manzana respectivamente, datos que concuerdan con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Castro, Baquero y Narváez, 2006 (47), en su investigación extrajeron las enzimas catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasa (PFO) de la corteza de frutos de pitajaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) donde para CAT se halló que su actividad fue máxima a pH entre 6.8 y 7.5 y temperatura entre 30° a 50° C; para POD se encontró un pH de máxima actividad entre 5.0 a 5.5, temperatura de máxima actividad entre 20 a 25 °C, mientras que para PFO las actividades máximas se obtuvieron a pH 7.0 y a temperaturas entre 30° a 40° C.

Tena y Jorin, 2010 (48), en su investigación establece que la velocidad de una reacción enzimática varía al aumentar la temperatura, no obstante, refleja que existe una temperatura óptima para alcanzar una mayor actividad enzimática dentro del rango entre los 40° y 50° C, valores similares a los obtenidos en la presente investigación.

Se presenta la figura 2, donde se aprecia el efecto de los tratamientos sobre la temperatura de los extractos enzimáticos obtenidos por fermentación sólida del hongo *Pleurotus ostreatus* en tuza de maíz. Los promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey ($p > 0.05$). Se puede observar que las temperaturas de los extractos se mantienen más estables al ser obtenidos de los extractos sometidos a bajas temperaturas de incubación, razón por la cual los mejores resultados se obtienen a bajos niveles de temperatura de incubación y pH.

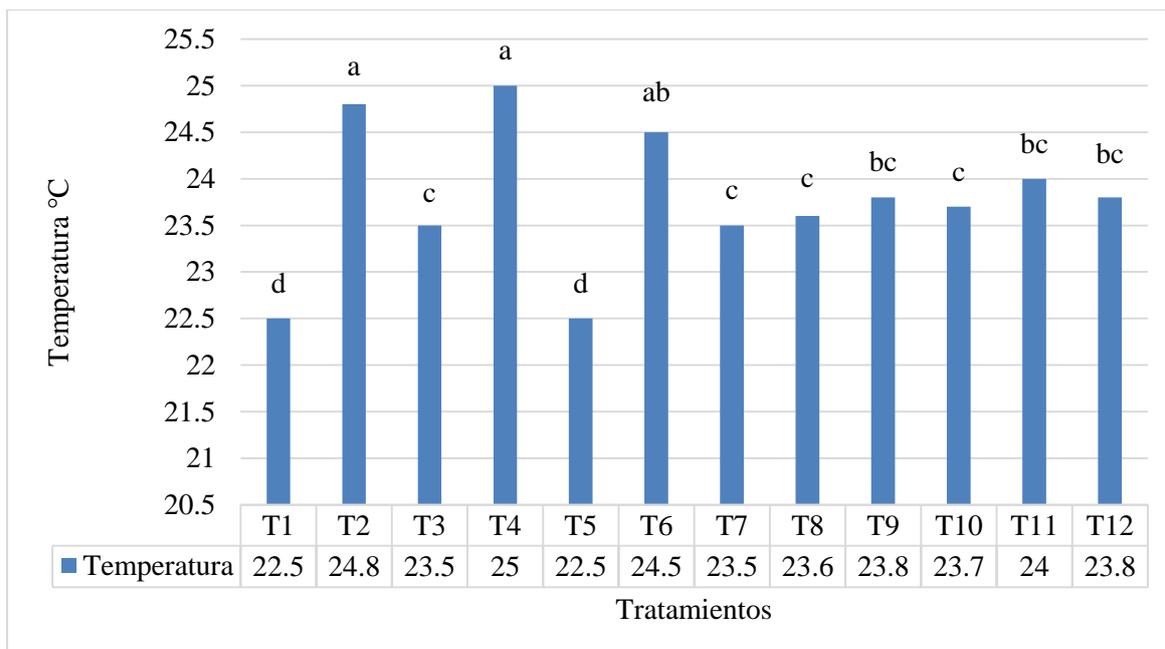


Figura 2. Temperatura de los extractos enzimáticos obtenidos sometidos a diferentes pH de solución extractora y temperatura de incubación.

Elaboración: Autor.

4.1.3. Evaluación de la actividad enzimática.

Al analizar los parámetros combinados de extracción como el pH y temperatura sobre la absorbancia registrada a una longitud de onda 470 nm, los cuales demostraron significancia estadística ($p < .0001$), además se puede observar (Figura 3), que el tratamiento T9 y T10 alcanzaron los mayores valores de absorbancia. Estos valores de absorbancia tienen una relación directa con la concentración enzimática y la actividad enzimática específica celulolítica, lo cual permite determinar que a mayor absorbancia mayor es la concentración y la actividad enzimática. El coeficiente de variación obtenido fue de 5.73.

Los datos obtenidos en el presente ensayo demuestran que modificaciones en las condiciones de extracción (pH del buffer de extracción y temperatura) afectan significativamente la actividad catalítica de los compuestos enzimáticos obtenidos. Bravo *et al.*, 2011 (49), en su investigación demuestra que modificaciones en el pH, concentración, composición del buffer de extracción y su precipitación proteica, afectaron

significativamente la actividad catalítica de la polifenoloxidasasa (PPO) extraída de la uchuva.

Montiel *et al.*, 2005 (45), en sus investigaciones concluyen que una adecuada combinación de los parámetros: pH, temperatura y tiempo, bajo una adecuada concentración de sales de buffer, permiten acortamiento del tiempo requerido para la extracción de la enzimas como la lactasa extraída de cepas de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554 permeabilizadas con tolueno, reflejándose un tiempo óptimo de extracción para una máxima actividad enzimática, este razonamiento concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación demostrando que las propiedades de la solución buffer permiten obtener una mayor calidad de los extractos enzimáticos.

Tena y Jorin, 2010 (50), en su investigación demuestra que la relación entre el pH y la actividad enzimática depende del comportamiento ácido-base del enzima y del propio sustrato, puesto que tanto sustrato y enzima (centro activo) pueden contener grupos funcionales ácidos y básicos, siendo su grado de disociación dependiente del pH, lo que determinará, entre otros aspectos, la conformación de la proteína, la capacidad de unión del sustrato al centro activo del enzima (K_m) y la capacidad de transformación del sustrato (k_{cat}).

Rodríguez, Narváez y Restrepo, 2006 (51), establecen en su investigación que en la determinación de la actividad enzimática específica poligalacturonasa extraída de la corteza de pitahaya amarilla los factores de extracción que mejor respondieron fueron el buffer fosfato de sodio 20mM pH 7.0 a una temperatura de 40°C.

Grevechova y Prieto, 2006 (52), obtuvieron en su investigación una mayor actividad enzimática de enzimas pectolíticas de las cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* al emplear una solución buffer pH 4.5 y 30°C de temperatura de extracción.

Se presenta la figura 3, donde se aprecia el efecto de los tratamientos sobre la absorbancia de los extractos enzimáticos registrada por espectrofotometría a una longitud de onda de 470 nm, extractos obtenidos por fermentación solida del hongo *Pleurotus ostreatus* en tuza de maíz. Los promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey ($p > 0.05$).

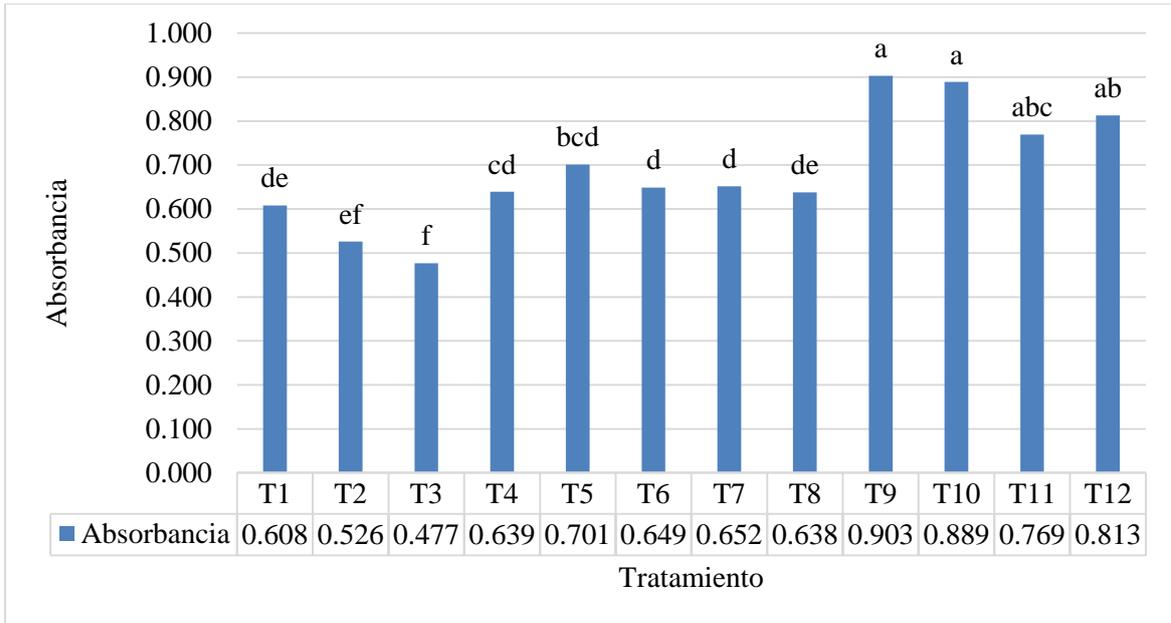


Figura 3. Absorbancia de los extractos enzimáticos obtenidos sometidos a diferentes pH de solución extractora y temperatura de incubación.

Elaboración: Autor.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

Finalizada la investigación se llega a las siguientes conclusiones:

- El pH de la solución buffer de extracción afecto significativamente el pH de los extractos enzimáticos obtenidos a partir del hongo *Pleurotus ostreatus*, determinándose que el pH idóneo para la extracción enzimática se encontró entre 6.0 y 7.0.
- La temperatura de extracción influyo significativamente en la temperatura de los extractos enzimáticos obtenidos a partir del hongo *Pleurotus ostreatus*, temperaturas bajas de incubación como los 40°C evaluados en la presente investigación permiten alcanzar las mejores temperaturas de los extractos.
- El parámetro de las condiciones de extracción enzimática como el pH de la solución buffer extractora y la temperatura de extracción alteran la actividad enzimática obtenida, demostrándose que el pH más alto 7.0 y la temperatura más baja 40°C permiten obtener una mayor actividad enzimática.

5.2. Recomendaciones.

Se recomienda evaluar otros periodos de incubación con el fin de determinar su influencia como otro factor limitante en la producción enzimática.

Se recomienda determinar la actividad enzimática de estos extractos en otros compuestos fibrosos con el fin de determinar su alcance y futuro empleabilidad en la industria o alimentación.

Se recomienda evaluar el uso del sustrato colonizado con el hongo en alimentación animal.

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

CAPÍTULO V
BIBLIOGRAFÍA

5.1. Referencias bibliográficas.

1. 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).
2. García A, Torres R. Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Revista Colombiana De Biotecnología*. 2003 Julio; 5(1): p. 56-64.
3. Vinueza JC. *Imobilização Multipontual das Peroxidasas da Casca da Soja e Chuchu em Suportes Alternativos de Pó de Sabugo de Milho e Celulose Bacteriana*. 1st ed. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2012.
4. Collao C, Curotto E, Zuñiga M. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de semilla de onagra, *Oenothera biennis*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites*. 2007 Enero-Marzo; 58(1): p. 10-14.
5. Guerrero C. *Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (Cavendish valery) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico*. Primera ed. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2009.
6. Vazques I. *Produccion de enzimas fibrolíticas por A. niger GS1 mediante fermentacion en estado sólido de rastrojo de maiz y su evaluacion en la digetibilidad in vitro de un subproducto agroindustrial*. 1st ed. QUERÉTARO: Universidad Autónoma de Querétaro; 2010.
7. Palma F, Landi HG. Enzimas fibrolíticas: Una alternativa para incrementar la utilizacion de pared celular por rumiantes. *Revista FAVE*. 2012 Julio; 11(1): p. 71-82.
8. ICMA. *Catalizadores*. [Online].; 2010 [cited 2016 Febrero 11. Available from: http://www.unizar.es/icma/divulgacion/pdf/catalizadores_web.pdf.
9. Escuela de Ingenierías Industriales. *Celulosa*. [Online].; 2010 [cited 2016 Febrero 25. Available from: <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso08-09/pls/celulosa.htm>.
10. Villamil J. *Manual de mantenimiento para equipos de laboratorio Washintong, D. C.:* Organizacion Panamericana de la Salud; 2005.
11. Vasquez E. *Hidrolisis de los polisacaridos*. [Online].; 2003 [cited 2016 Febrero 11. Available from: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.html>.

12. Gonzales M. Lignina – La química de la madera. [Online].; 2011 [cited 2016 Febrero 24. Available from: <http://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos/lignina-la-quimica-de-la-madera>.
13. Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. [Online].; 2016 [cited 2016 Febrero 11. Available from: <http://dle.rae.es/?id=XyAjW9o>.
14. Robledo A, Noé C, Montañez JC. Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas. *Acta Quimica Mexicana*. 2012 Enero-Junio; 4(7): p. 1-6.
15. Gallardo I, Rodríguez L, Boffill Y, Alemán L, Perez M. Produccion de bioetanol empleando las enzimas generadas del sorgo malteado. *Afinidad*. 2011 Abril; 68(552): p. 144-149.
16. Molina C, Espin N. Obtención de extractos enzimáticos con actividad lignolítica y celulolítica a partir del crecimiento del hongo *Lentinus edodes* en aserrin tropical. *Revista EPN*. 2014 Enero; 33(2).
17. Martinez M. Lipasas contenidas en semillas de *Ricinus communis* utilizadas como biocatalizador en la transesterificación de triacilglicéridos. Primera ed. Veracruz: Universidad Veracruzana; 2013.
18. TPLaboratories. Enzimas. [Online].; 2016 [cited 2016 Febrero 24. Available from: <https://www.tplaboratorioquimico.com/quimica-general/quimica-de-los-seres-vivos/que-son-las-enzimas.html>.
19. Gonzales J, Rodríguez J, del Monte A. Las Lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 2010 Julio; 12(1): p. 124-140.
20. Fersht A. Estructura y mecanismo de las enzimas. En Español ed. Cuchillo C, editor. Barcelona: Reverte S.A.; 1980.
21. Araque M, Martínez M, Gonzales S, Buntix D, Meneses M, Lorea C. Degradación de las enzimas fibrolíticas de *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y de Fibrozyme®. *Arch. zootec*. 2010 Marzo; 59(225): p. 145-148.
22. Gil A, Sánchez de Medina F. Tratado de Nutrición. Segunda ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana; 2010.

23. Montoya S. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos, orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifolia frondosa*. Primera ed. Manizales: Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales; 2008.
24. Loera O. Las xilanasas microbianas y sus aplicaciones. *BioTecnología*. 2002; 7(2): p. 25-37.
25. 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.
26. Diaz A, Ranilla MJ, Saro C, Giraldo L, Carro MD. Utilización de enzimas fibrolíticas para mejorar la digestión de forrajes tropicales. i. influencia del método de aplicación en la producción de gas in vitro y la composición química. *AIDA*. 2013; 15(1): p. 270-272.
27. Marquez A, Mendoza G, Gonzales S, Buntinx S, Loera O. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96 en fermentación sólida. *Interciencia Caracas*. 2007 Noviembre; 32(11): p. 780-786.
28. Yescas R, Bárcena R, Mendoza G, Gonzáles S, Cobos M, Ortega M. Digestibilidad in situ de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas. *Agrociencia*. 2004 Enero-Febrero; 38(1): p. 23-31.
29. Sánchez J, Martínez JL, Segura E, Contreras JC, Medina MA, Noé C, et al. Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Quim. Nova*. 2014 Febrero; 37(3): p. 504-512.
30. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*. Versión en línea (Inglés) ed. Londres: Van der Waals forces; 1994.
31. Cabezas K. Obtención de un extracto enzimático con actividad lacásica por fermentación líquida del hongo *Pleurotus ostreatus* en un medio con bagazo de maíz a escala laboratorio para decoloración de colorantes textiles Quito: Escuela Politecnica Nacional; 2014.
32. Manjarres K, Castro A, Rodríguez E. Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*. 2011 Enero-Junio; 7(2): p. 9-15.

33. Motato K, Mejía A, León A. Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustrato para el cultivo de hongo *Pleurotus djamor*. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 2006 Marzo; 13(1): p. 24-29.
34. Campo Y, Gelvez V. Efecto de la termosonicación sobre las propiedades fisicoquímicas del hongo comestible (*Pleurotus ostreatus*) fresco empacado al vacío. *Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 2011; 9(2): p. 55-63.
35. Diaz R, Sánchez C, Días G. Laccase gene expression of *Pleurotus ostreatus* grown at different pH of the liquid culture medium. In Singh M, editor. *Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)*; 2014; New Delhi. p. 238-242.
36. Pineda J, Soto C, Beltran L. Ecuación estequiométrica para describir el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* cepa ceba-gliie-po-010606. *Bioteología Aplicada*. 2014 Enero-Marzo; 31(1): p. 48-52.
37. Agama E, Astrid M, Farhat I, Paredes O, Ortiz J, Bello LA. Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz. *Interciencia*. 2004 Noviembre; 29(11): p. 643-649.
38. Castañeda A. Propiedades nutricionales y antioxidantes del maíz azul (*Zea mays L.*). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2011; 5(2): p. 75-83.
39. Vega A, Franco H. Productividad y calidad de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* RN2 y *P. djamor* RN81 y RN82 cultivados sobre sustratos lignocelulósicos. *Información tecnológica*. 2013; 24(1): p. 69-78.
40. 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.
41. INAMHI. Anuario Meteorológico. 522012th ed. Quito: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología; 2015.
42. Vásquez R, Ruesga L, D'addosio R, Páez G, Marín M. Extracción de pectina a partir de la cáscara de plátano (*Musa AAB*, subgrupo plátano) clon Hartón. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2008; 25(2): p. 318-333.
43. Fredes C, Loyola N, Muñoz JC. Extracción de pectinas de *Vitis labrusca* cv., Concord para producir jalea. *Idesia*. 2009 Septiembre-Diciembre; 27(3): p. 9-14.

44. Henao I, Franco M, Marin G. Evaluacion de metodos de conservacion para *Aspergillus niger* con actividad enzimatica amilolítica. *Universitas Scientiarum*. 2006 Julio-Diciembre; 11(2): p. 51-60.
45. 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.
46. Gasull E, Becerra D. Caracterización de Polifenoloxidasa Extraída de Pera (cv. Packam's Triumph) y Manzana (cv. Red Delicious). *Información Tecnológica*. 2006; 17(6): p. 69-74.
47. Castro JA, Baquero L, Narvaez C. Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa de pitahaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). *Rev.Colomb.Quim*. 2006 Junio; 35(1): p. 91-101.
48. Tena M, Jorin J. Extraccion y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. *Bioquímica y Biología Molecular*. 2010; 32(1): p. 1-14.
49. Bravo K, Muñoz K, Calderón J, Osorio E. Desarrollo de un método para la extracción de polifenoloxidasa de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y aislamiento por sistemas bifásicos acuosos. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica VITAE*. 2011; 18(2): p. 124-132.
50. Tena M, Jorin J. Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería. *Bioquímica y Biología Molecular*. 2010; 32(1): p. 1-14.
51. Rodríguez J, Narvárez C, Restrepo L. Estudio de la actividad enzimatica de poligalacturonasa en la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). *Facultad de Ciencias Químicas*. 2007 Enero; 10(2): p. 10.
52. Grebechova R, Prieto L. Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para aplicacion en industria de alimentos. *Revista de investigación Universidad La Salle*. 2006 Julio-Diciembre; 6(2): p. 153-162.

CAPÍTULO VI
ANEXOS

6.1. Anexo 1. Análisis de la varianza de las variables evaluadas.

Tabla 5. Análisis de la varianza 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 | 6.05522222 | 0.55047475 | 9.48 | <.0001 |
| Error | 24 | 1.39386667 | 0.05807778 | | |
| Total | 35 | 7.44908889 | | | |

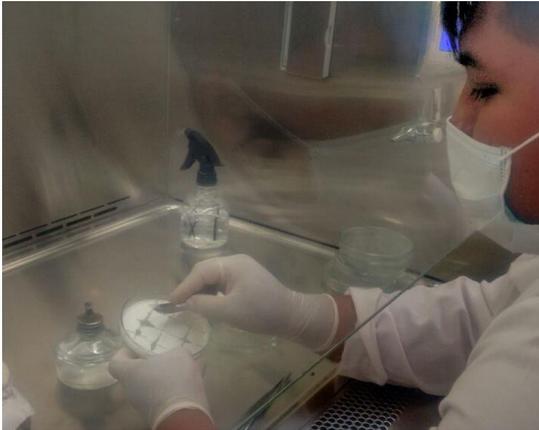
Tabla 6. Análisis de la varianza para la variable temperatura de los extractos enzimáticos.

| Fuente de variación | G.L | Suma de cuadrados | Cuadrado de media | F-Valor | P > F |
|---------------------|-----|-------------------|-------------------|---------|--------|
| Tratamiento | 11 | 19.69669722 | 1.79060884 | 25.22 | <.0001 |
| Error | 24 | 1.70386667 | 0.07099444 | | |
| Total | 35 | 21.40056389 | | | |

Tabla 7. Análisis de la varianza para la variable Absorbancia del extracto enzimático.

| Fuente de variación | G.L | Suma de cuadrados | Cuadrado de media | F-Valor | P > F |
|---------------------|-----|-------------------|-------------------|---------|--------|
| Tratamiento | 11 | 0.58779275 | 0.05343570 | 33.62 | <.0001 |
| Error | 24 | 0.03815000 | 0.00158958 | | |
| Total | 35 | 0.62594275 | | | |

6.2. Anexo 2. Fundamentación fotográfica de la investigación.



Obtención del micelio de *Pleurotus ostreatus*



Incubación de los hongos en horno a temperaturas controladas.



Adecuación del sustrato (Tuza de maíz), esterilización y molienda



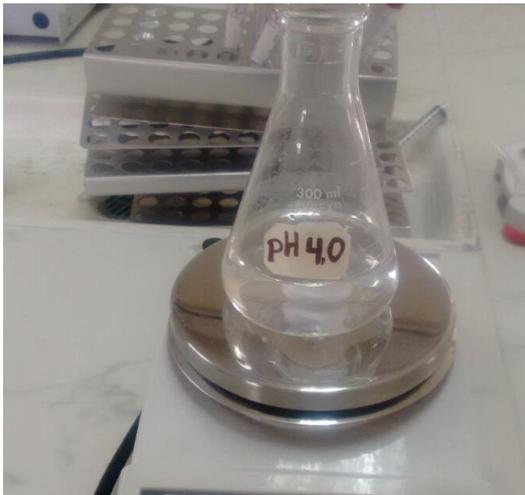
Colonización del sustrato (tuza de maíz).



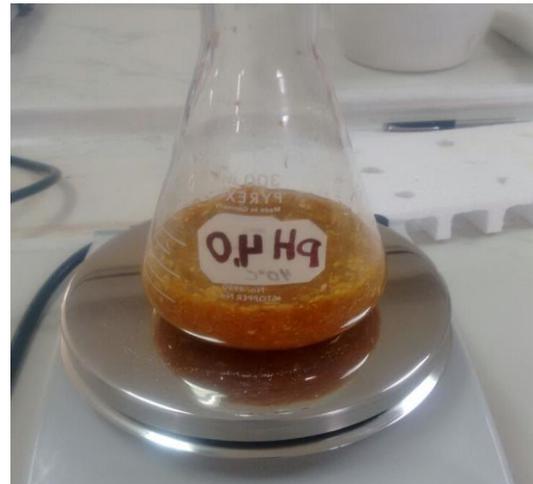
Fructificación del hongo.



licuado del sustrato (tuza de maíz).



Elaboración del buffer de extracción



Extracción del sustrato digerido



Colocando a los tubos vacutainer



Incubación de los extractos en baño maría



Centrifugado del extracto.



Separación del extracto acuoso (enzimas).



Extractos acuosos obtenidos



Evaluación de la espectrofotometría de los extractos enzimáticos