

EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES ENDOGLUCANASA, EXOGLUCANASA, LACASA Y LIGNINA PEROXIDASA EN DIEZ HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

EVALUATION OF ENDOGLUCANASE, EXOGLUCANASE, LACCASE, AND LIGNIN PEROXIDASE ACTIVITIES ON TEN WHITE-ROT FUNGI

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES ENDOGLUCANASE, EXOGLUCANASE, LACASE E LIGNINA PEROXIDASE EM DEZ FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA

Sandra Montoya B.¹, Óscar Julián Sánchez T.², Laura Levin³

RESUMEN

Este trabajo presenta una vía de rastreo de producción de enzimas lignocelulolíticas en diez especies de hongos de pudrición blanca: *Lentinula edodes*, *Schizophyllum commune*, *Trametes trogii*, *Coriolus versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus* y *Auricularia delicata*. Estas especies primero fueron rastreadas sobre medios de cultivo sólido que contienen carboximetil celulosa, celulosa cristalina, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) y azure B, los cuales evidenciaron la producción de las enzimas endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa (LiP). Las actividades celulolíticas fueron detectadas a los cinco días de

Recibido para evaluación: 23 nov de 2012. **Aprobado para publicación:** 21 mayo de 2014

1 Universidad de Caldas, Instituto de Biotecnología Agropecuaria. Magíster en Ingeniería Química. Manizales, Colombia.

2 Universidad de Caldas, Instituto de Biotecnología Agropecuaria. Doctor en Ingeniería. Manizales, Colombia.

3 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Doctora en Ciencias. Buenos Aires, Argentina.

Correspondencia: osanchez@ucaldas.edu.co

incubación con el indicador rojo congo, formándose un halo claro-blanco en las zonas donde se degrada la celulosa. Para las ligninasas, este rastreo consistió en el seguimiento a la formación de halos verdes por oxidación del ABTS para lacasa y halos de decoloración sobre el azure B para la LiP durante 14 días de incubación. De este rastreo cualitativo, se seleccionaron cuatro cepas (*G. lucidum*, *L. edodes*, *C. versicolor* y *T. Trogii*), como las mejores productoras de enzimas celulolíticas y ligninolíticas. Estas cuatro especies fueron inoculadas sobre un sustrato de aserrín de roble, obteniéndose 51,8% de lignina degradada por *L. edodes* y 22% de celulosa degradada por *C. versicolor*.

ABSTRACT

This paper presents a way of tracking the production of lignocellulolytic enzymes in ten species of white rot fungi: Lentinula edodes, Schizophyllum commune, Trametes trogii, Coriolus versicolor, Pycnoporus sanguineus, Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Grifola frondosa, Pleurotus ostreatus and Auricularia delicata. These species were first screened on solid culture media containing carboxymethyl cellulose, crystalline cellulose, ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) and azure B, which showed the production of endoglucanase, exoglucanase, laccase and lignin peroxidase (LiP) enzymes. Cellulolytic activities were detected after five days of incubation with congo red indicator, forming a clear-white halo in areas where cellulose was degraded. For ligninases, the tracking consisted of the monitoring in the formation of green halos due to ABTS oxidation for laccase, and decolorization halos on azure B for LiP during 14 days of incubation. From this qualitative screening, four strains were selected (G. lucidum, L. edodes, C. versicolor and T. trogii) as the best producers of cellulolytic and ligninolytic enzymes. These four species were inoculated on a substrate of sawdust oak, yielding 51,8% of lignin degraded by L. edodes and 22% of cellulose degraded by C. versicolor.

RESUMO

Este trabalho apresenta uma maneira de seguir produção da enzimas lignocelulolíticas em 10 espécies de fungos da podridão branca: Lentinula edodes, Schizophyllum commune, Trametes trogii, Coriolus versicolor, Pycnoporus sanguineus, Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Grifola frondosa, Pleurotus ostreatus e Auricularia delicata. Estas espécies foram primeiramente rastreados em meio de cultura sólido contendo os reagentes de carboximetil celulose, celulose cristalina, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolone-6-sulfonato)) e azure B que mostrou a produção de enzimas de endoglucanase, exoglucanase lacase, peroxidase de lignina e (LiP). Atividades celulolíticas foram detectados após cinco dias de incubação com o indicador vermelho congo, formando um claro halo-branco em áreas degrada a celulose. Para ligninasas, esta consistia de rastreamento faixa formação de halo verde por oxidação de ABTS a lacase e descoloração halos no lábio azure B, durante 14 dias de incubação. Esta triagem qualitativa, foram selecionados quatro cepas: G. lucidum, L. edodes, C. versicolor e T. trogii, cepas como os melhores produtores de enzimas

PALABRAS CLAVE:

Celulasas, Ligninasas, *Lentinula edodes*, *Coriolus versicolor*, Celulosa.

KEYWORDS:

Cellulases, Ligninases, *Lentinula edodes*, *Coriolus versicolor*, Cellulose.

PALAVRAS-CHAVE:

Celulasas, Ligninasas, *Lentinula edodes*, *Coriolus versicolor*, Celulose.

celulolíticas e ligninolíticas. Estas cuatro especies foram inoculados sobre um substrato de madeira de carvalho serradura, obtendo-se 51,8% de lignina por L. edodes degradada e 22% de celulose degradada por C. versicolor.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas lignocelulolíticas juegan un rol importante en la conversión del complejo lignocelulósico en azúcares fermentables para la producción de alcohol carburante en la actualidad [1]. Las enzimas celulolíticas son consideradas de gran importancia industrial. Por ejemplo, ellas han sido ampliamente utilizadas para reemplazar la hidrólisis ácida como método de conversión de celulosa en azúcares fermentables, especialmente glucosa para la producción de etanol y otros alcoholes de importancia industrial, asimismo, para la glucosa obtenida es utilizada como materia prima para la manufactura de diferentes alimentos para animales, humanos y productos químicos. Las celulasas también son utilizadas en diversos procesos de fermentación para la producción de sustancias de uso industrial como el ácido láctico, en procesos de fermentación aceto-butílica; en el mejoramiento de la textura del papel (liso), biodesentintado para reciclado del papel utilizando una mezcla de celulasas, pectinasas, xilanasas y lipasas; en el biopulido de telas para el tratamiento superficial de las pelusas, en la elaboración de paños super absorbentes, en la extracción de jugos, aromas, aceites y pigmentos con agregados enzimáticos de celulasas, pectinasas y xilanasas, éstas rompen paredes celulares y hace más eficiente la extracción; en la elaboración de aditivos no calóricos [2,3,4,5]. De igual forma, las ligninasas son utilizadas para la designificación de los materiales lignocelulósicos dispuestos para alimentación de rumiantes. Por ejemplo, la industria de producción de carne bovina en el mundo presenta dificultades para mantener estable el suministro de alimentos para los animales. Uno de los principales inconvenientes es la variación del clima, lo que ha generado que este segmento de la industria alimentaria busque nuevas alternativas para el mantenimiento de la alimentación animal [6]. En el planeta se desechan grandes cantidades de materiales lignocelulósicos que generan contaminación y que pueden ser utilizados para este fin utilizando complejos de enzimas ligninolíticas para la degradación de la lignina y posteriormente realizar los ensilajes o las transformaciones y suplementaciones requeridas por los animales [7, 6].

La producción de enzimas degradadoras del complejo lignocelulósico, se realiza a partir de microorganismos que las producen, entre los que se encuentran los hongos de pudrición blanca [8]. Los materiales lignocelulósicos en promedio se componen de 40-50% de celulosa, 25-40% de hemicelulosa y 25-35% de lignina y otros monómeros en menor proporción [9]. Estos materiales pueden ser degradados en medios naturales por los hongos de pudrición blanca a través de las enzimas que excretan, como el complejo de celulasas celulasas: endoglucanasas, exoglucanasas, otras que degradan oligosacáridos como la β -glucosidasa, las óxidorreductasas, como lacasas, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa, las cuales son las enzimas responsables de la degradación del complejo lignocelulósico [10, 11].

Los materiales lignocelulósicos son los sustratos indicados para el desarrollo de muchos hongos. Estos materiales lignocelulósicos constituyen el principal componente de los vegetales y sus residuos, así como de residuos agroindustriales, forestales y residuos sólidos urbanos, entre otros [5]. Los hongos de pudrición blanca presentan como característica especial la capacidad de degradar la lignina hasta su mineralización a CO_2 y agua gracias a las grandes cantidades de óxido-reductasas que excretan. Además tienen la capacidad de producir y transformar sustancias no fenólicas en fenólicas para su fácil degradación y la obtención de sustancias aromáticas de menor tamaño que la lignina y de menor toxicidad. Aunque estos hongos no pueden usar el carbono obtenido como fuente de energía, ellos son considerados como los mejores organismos degradadores de sustancias aromáticas que han sido encontrados hasta el momento [12]. Estos hongos también degradan celulosa y hemicelulosa, cuya hidrólisis provee una fuente verdadera de energía [13, 3].

Entre los hongos de pudrición blanca como potentes agentes productores de enzimas lignocelulolíticas, se encuentran especies de los géneros *Auricularia*, *Schizophyllum*, *Lentinus*, *Polyporus*, *Pycnoporus* y *Trametes*, entre otros [14]. Especies de estos géneros como *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Auricularia delicata*, *Trametes trogii* y *Lentinula edodes*, en la actualidad son reconocidas por su gran capacidad de degradación de celulosa y lignina. Asimismo, estos hongos han sido utilizados en diferentes procesos con fines de biodegradación de diferentes polímeros: carbohidratos, aromáticos, hidrocarburos, colorantes sintéticos, etc. [15-17].

Los métodos cualitativos constituyen una buena herramienta para la búsqueda rápida (rastreo) de enzimas que degraden el complejo lignocelulósico [9, 18]. Estas pruebas proporcionan una indicación certera de la presencia de estas enzimas con el fin de realizar una adecuada selección de cepas de hongos respecto al grupo de enzimas que producen, disminuyendo la cantidad de pruebas cuantitativas, que son mucho más costosas y demandan mayor tiempo. Sin embargo, estos métodos tienen limitaciones especialmente de precisión, aunque juegan un rol importante en procesos de selección de cepas [19, 20].

Actualmente se emplean varios métodos cualitativos para la detección de celulasas, entre los que se encuentran los medios sintéticos con el reactivo específico sobre el cual actúa la enzima. Por ejemplo, para la detección de la endoglucanasa se emplea carboximetil celulosa (CMC), para exoglucanasas se usa celulosa cristalina o agar azure celulosa. Estas dos enzimas o grupo de enzimas generalmente se detectan por la formación de un halo blanco alrededor de la colonia. Para la β -glucosidasa se emplea agar esculina (6,7 dihidroxicumarino 6-glucósido) como fuente única de carbono. La enzima β -glucosidasa forma glucosa, la cual es excretada al medio y forma un halo negro en torno a la colonia; este halo negro también puede formarse cuando se realizan las pruebas para las enzimas celulolíticas, endoglucanasas y exoglucanasas [9, 21]. Para detectar ligninasas, se emplean reactivos que las óxido-reductasas puedan degradar. Por ejemplo, para la detección de ligninasas como la enzima lignina peroxidasa (LiP) se utiliza azure B, el cual se decolora por la acción de esta enzima [22] y la detección de lacasa se hace a través de la preparación de un medio con el reactivo ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiazolin-6-ácido sulfónico)), el cual se oxida en presencia de la enzima lacasa [23, 24].

El objetivo de este trabajo fue determinar el microorganismo con mayor potencial para degradar celulosa y lignina sobre residuos lignocelulósicos mediante el rastreo de las enzimas lignocelulolíticas producidas por diez especies de hongos macromicetos: *L. edodes*, *S. commune*, *T. trogii*, *C. versicolor*, *P. sanguineus*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *P. ostreatus* y *A. delicata*.

MÉTODO

Hongos

Los siguientes hongos de pudrición blanca empleados para el rastreo fueron obtenidos de la colección

del Laboratorio de Macromicetos de la Universidad de Caldas: *L. edodes* (CICL54), *S. commune* (UCS004), *T. trogii* (BAFC463), *C. versicolor* (PSUWC430), *P. sanguineus* (UCS003), *G. applanatum* (UCS001), *G. lucidum* (UCC002), *G. frondosa* (PSUMCC 922), *P. ostreatus* (UCC001) y *A. delicata* (UCS002). Las cepas fueron mantenidas en caja de Petri con agar papa dextrosa (PDA) a 4°C.

Rastreo de celulasas

Los medios de cultivo para el rastreo de las actividades endoglucanasa y exoglucanasa, se formularon con 1,7% de agar-agar, y 0,1% de CMC para las endoglucanasas y 0,1% de celulosa cristalina para las exoglucanasas como única fuente de carbono. El medio fue auto clavado durante 15 minutos a 121°C. Las diez cepas de hongos fueron inoculadas en cuatro cajas de Petri por especie y por triplicado y se incubaron por 5 días a 25°C. Las colonias fueron reveladas con el colorante azoico rojo congo al 0,3% por 15 minutos con posterior lavado del colorante empleando una solución 1 N de NaCl [9]. En todos los casos se realizó observación y medición de la formación de halos de decoloración y del crecimiento micelial de cada una de las especies.

Rastreo de ligninasas

Para estimar la presencia de LiP se empleó el colorante heterocíclico azure B en una concentración de 50 μ M en medio agar PDA. Para la enzima lacasa se empleó ABTS al 0,035% (p/v) en un medio heterogéneo con la siguiente composición en g/L: 10 glucosa, 2 K_2HPO_4 , 0,5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 extracto de levadura, 0,5 $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 Cl_2Ca , 0,0064 $CuSO_4$, 22 agar-agar y 0,35 de ABTS. Se inocularon las diez cepas preseleccionadas en cuatro cajas de Petri por triplicado. Se incubaron por 14 días a 25°C. Posteriormente se determinó el halo de decoloración para los medios con azure B y la formación de halo verde para los medios con ABTS, así como el tamaño de la colonia en todos los casos [9].

Determinación del contenido de fibra de los sustratos

Para determinar el contenido de fibra fue necesario elaborar sustratos empleando 98% de aserrín de roble y 2% carbonato de calcio (porcentajes en base seca) al 60% de humedad y pH 5,5. El sustrato fue empacado en frascos de 125 mL con 30 g y llevados a esterilización a 121°C por 30 min. Posteriormente los

sustratos fueron inoculados al 4% con cada una de las cepas (cuatro frascos por cada especie) y se llevaron a incubación por 30 días en penumbra y 25°C. Luego del proceso de inoculación, los frascos fueron tapados con interlón y película parafinada con el fin de filtrar el aire enurante el tiempo de incubación. Este experimento se realizó por triplicado. La determinación de la fibra se realizó a partir de la medida de fibra detergente neutra, fibra detergente ácida y fibra lignino-ácida, a partir de las cuales fueron calculados los contenidos de fibra soluble, hemicelulosa, celulosa y lignina [25].

Determinación cuantitativa de actividades enzimáticas

Los extractos para la determinación de las actividades enzimáticas (celulolíticas y ligninolíticas) fueron obtenidos por la adición de 12 mL de agua destilada estéril neutra a 1 g de medio sólido fresco, sometido a ultrasonido por 5 min y agitación por 10 min con posterior filtración y centrifugación.

Hidrolasas. Para la determinación de la actividad endo-1,4-β-D-glucanasa (E.C.3.2.1.4) se usó CMC como sustrato al 0,5% en buffer acetato de sodio pH 4,8 en reacción con 100 μL de extracto enzimático por 30 min a 50°C. La reacción enzimática se detuvo con la adición del reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico) [26]. Se continuó con la reacción de DNS para la determinación de azúcares reductores, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de azúcares reductores en un minuto. Para cuantificar la actividad se elaboró una curva patrón de azúcares reductores con distintas concentraciones de glucosa. Para la actividad exo-1,4-β-D-glucanasa (E.C.3.2.1.91) se usó celulosa cristalina al 1% en buffer acetato de sodio con pH de 4,8 como sustrato, en reacción con 100 μL de extracto enzimático a 50°C por 60 min. La reacción se detuvo adicionando el reactivo DNS. Se continuó con la determinación de azúcares reductores por el método DNS y se centrifugó antes de leer la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Una unidad de actividad enzimática de exoglucanasa fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de azúcares reductores en un minuto. La actividad β-glucosidasa (E.C.3.2.1.21) se determinó por la reacción que se produce entre el sustrato, *p*-nitrofenil β-D-glucopiranosido al 0,02%, en buffer acetato de sodio con pH de 4,8 y 100 μL de extracto enzimático a 50°C por 30 min. La reacción se detuvo adicionando solución buffer Clark y Lubs (pH 9,8) y se

leyó la absorbancia a una longitud de onda de 430 nm ($\epsilon_{430} = 18,5/\text{mM cm}$) (Wood y Bhat, 1988). Una unidad de actividad enzimática β-glucosidasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de producto (*p*-nitrofenol) en un minuto. Para cuantificar la actividad se elaboró una curva patrón con *p*-nitrofenol. La actividad endo-1,4-β-D-xilanasas (E.C.3.2.1.8) se determinó mediante la reacción producida entre el sustrato xilano al 0,2% en buffer acetato de sodio con un pH de 4,8 y 100 μL de extracto enzimático a 50°C por 30 min. La reacción se detuvo adicionando DNS y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Una unidad de actividad enzimática de endo-1,4-β-D-xilanasas se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de azúcares reductores en un minuto. La curva patrón de azúcares reductores se elaboró con xilosa.

Actividades ligninolíticas. Para la determinación de la actividad lacasa (E.C.1.10.3.2) se utilizaron 0,5 mM de ABTS en una solución 0,1 M de buffer acetato de sodio a un pH de 3,6 como sustrato, según el método de Paszczyński y Crawford [27], leyendo el aumento de absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36/\text{mM cm}$) luego de 3 min de reacción a 30°C. Una unidad de actividad de lacasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de ABTS en 1 minuto. Para la cuantificación de la actividad lignina peroxidasa (E.C.1.11.1.14) se aplicó el método del azure B [22], que usa como sustrato una solución 32 μM de azure B, 100 μM de H₂O₂ y 150 μL de extracto enzimático. La mezcla de reacción se realizó en buffer tartrato de sodio 50 mM a un pH de 4,5 y se inició la reacción con una solución de peróxido de hidrógeno 100 μM. La lectura de la disminución de absorbancia se hizo a 650 nm. Una unidad actividad enzimática es equivalente al decrecimiento de 0,1 unidades de absorbancia por minuto y por mL (U/min/mL).

Análisis estadístico

Para la selección de las cepas con mejor comportamiento en la producción de enzimas celulolíticas y ligninolíticas se realizaron dos experimentos sucesivos. El primero, consistió en el seguimiento de las 10 cepas aplicando técnicas semi cuantitativas registrando el diámetro de los halos de decoloración /oxidación de los diferentes sustratos. El segundo experimento se deriva de los resultados del primero; a las cuatro cepas con mejor respuesta, se les realizó una prueba cuantitativa de degradación de fibra discriminada. En el primer caso, se realizó un diseño completamente aleatorizado a una vía donde la variable de respuesta

fue la formación de los halos y el número de repeticiones fue de 12. Para el caso de las enzimas celulolíticas se tuvo en cuenta la formación del halo de degradación del colorante rojo congo (endoglucanasa y exoglucanasa). En el caso de las enzimas ligninolíticas se realizaron pruebas para la lacasa siendo su variable de respuesta la formación de halo de oxidación verdoso; también se hicieron pruebas para la LiP donde la variable de respuesta fue la formación de un halo de decoloración sobre el medio de cultivo con azure B. En el segundo experimento consistente en la determinación cuantitativa de la fibra, se realizó un análisis estadístico para determinar la capacidad de degradación de lignina, celulosa y hemicelulosa sobre aserrín de madera, incubado a 25°C durante 30 días.

Para la evaluación del rastreo de celulasas se realizó un análisis de varianza ANOVA a una vía, tomando como factor la cepa a 10 niveles y como variable de respuesta la formación de los halos. Se empleó el programa *Statgraphics*® Versión 5.1. También se evaluó la capacidad de degradación y las actividades enzimáticas lignocelulolíticas sobre sustrato lignocelulósico, de las cuatro especies de hongos preseleccionadas en las pruebas cualitativas. Para ello se realizó un ANOVA a una vía utilizando el mismo programa estadístico.

RESULTADOS

Rastreo en placa de enzimas celulolíticas

A las diez cepas pre-seleccionadas (*L. edodes*, *S. commune*, *T. trogii*, *C. versicolor*, *P. sanguineus*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *P. ostreatus* y *A. delicata*) se les realizó un rastreo a fin de seleccionar las cepas con mejor comportamiento en la producción de las enzimas celulolíticas endoglucanasa y exoglucanasa. Se evaluó, luego de cinco días de incubación, el tamaño de los halos de degradación formados y el tamaño de la colonia en mm. Como resultado del ANOVA se obtuvo un valor $p < 0,5$ (0,000), lo que mostró una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas a un nivel de confianza del 95% para definir cuáles cepas fueron significativamente diferentes unas de otras. Se realizó una prueba de Tukey a fin de determinar que tratamientos fueron estadísticamente diferentes. Posteriormente, se realizó el análisis de los residuales de homocedasticidad y de normalidad siempre y cuando la varianza fuera homogénea. En ningún caso los residuales pasaron ambas pruebas (homocedasticidad y normalidad) por lo que se debió

realizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Esta prueba mostró diferencia significativa con valor $p < 0,5$ (0,000) e indicó que las mejores cepas para la producción de enzimas celulolíticas fueron *G. lucidum*, *L. edodes* y *C. versicolor*.

No todas las cepas evaluadas resultaron capaces de crecer en medios con celulosa como única fuente de carbono. Algunas cepas crecieron muy poco o no presentaron crecimiento sobre ninguno de los dos medios (*G. frondosa*, *A. delicata*, *G. applanatum* y *S. commune*); sin embargo, en todos los casos se observó secreción de enzimas celulolíticas ya que se apreció un halo decolorado alrededor del inóculo, no superior en promedio a los 12 mm (Cuadro 1). Las cepas de *P. sanguineus*, *T. trogii* y *P. ostreatus* crecieron y decoloraron el rojo congo, pero en menor medida que las cepas de *L. edodes*, *G. lucidum* y *C. versicolor*. Entre ellas se destacó la cepa *C. versicolor*.

Rastreo en placa de enzimas ligninolíticas

La evaluación del rastreo de ligninasas (lacasa y LiP) se realizó con un ANOVA a una vía, tomando como factor la cepa a 10 niveles y como variable de respuesta la formación de los halos. Como resultado del ANOVA se obtuvo un valor $p < 0,05$ (0,000), lo que mostró una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas con un nivel de confianza del 95%. Para definir cuáles cepas fueron significativamente diferentes unas de otras se realizó una prueba de Tukey a fin de determinar que tratamientos fueron es-

Cuadro 1. Diámetros del halo de crecimiento micelial al quinto día de incubación.

Especie	Diámetro halo/crecimiento micelial (mm)
<i>A. delicata</i>	8
<i>S. commune</i>	6,5
<i>T. trogii</i>	26
<i>C. versicolor</i> *	65
<i>G. frondosa</i>	10
<i>G. lucidum</i> *	59
<i>G. applanatum</i>	12
<i>P. sanguineus</i>	27
<i>L. edodes</i> *	62
<i>P. ostreatus</i>	31

*Estadísticamente diferentes a las demás especies en producción de celulasas

tadísticamente diferentes. Posteriormente, se realizó el análisis de los residuales de homocedasticidad y de normalidad, siempre y cuando la varianza fuera homogénea. En ningún caso los residuales pasaron ambas pruebas (homocedasticidad y normalidad) por lo que se debió realizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Esta prueba arrojó diferencia significativa con valor $p < 0,05$ (0,000) e indicó que los mayores productores de enzimas ligninolíticas fueron *T. trogii* y *C. versicolor*. En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos con ABTS (para detectar lacasa) y azure B (para detectar LiP), donde (-) corresponde a un halo verdoso de oxidación del ABTS o blanquecino de decoloración del azure B menor a 1 cm de diámetro, (+) corresponde a un halo entre 1 y 2,9 cm de diámetro, y (++) corresponde a un halo mayor a 3 cm de diámetro a los 14 días de incubación. De las 10 cepas de hongos, solamente el *S. commune* dio negativa (-) en las tres repeticiones que se realizaron a cada cepa para las dos enzimas rastreadas (lacasa y LiP), lo que implica que para esta cepa debe realizarse una serie de pruebas adicionales a fin de corroborar su comportamiento frente a la producción de enzimas ligninolíticas. En las cajas de ABTS con *L. edodes*, *G. lucidum*, *C. versicolor* y *T. trogii* se observó un halo de oxidación verde intenso mayor a 3 cm de diámetro (++) y en las cajas con azure B, *T. trogii* y *C. versicolor* produjeron halos de decoloración mayores a 3 cm (++) . Luego de realizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis a todos los datos obtenidos de estas pruebas cualitativas de rastreo de enzimas ligninolíticas se obtuvo diferencia significativa (valor

$p < 0,05$) entre las especies de hongos, resultando *C. versicolor* y *T. trogii* como las mejores cepas productoras de ligninasas.

Capacidad de degradación de celulosa y lignina

De acuerdo con los resultados obtenidos del rastreo cualitativo realizado, en las cuatro cepas con mejor respuesta (*L. edodes*, *C. versicolor*, *G. lucidum* y *T. trogii*) se evaluó la capacidad de degradación de lignina y celulosa sobre un sustrato sólido a base de aserrín de roble durante 30 días de incubación (figura 1). A los resultados obtenidos de la degradación de los componentes de la fibra en forma discriminada por cada una de las cuatro especies de hongos preseleccionadas en las pruebas cualitativas, se les realizó un ANOVA a una vía arrojando como resultados que hubo diferencia significativa en la degradación de lignina con un valor- $p < 0,05$ (valor $p = 0,0219$). El hongo *L. edodes* degradó el mayor porcentaje de lignina (51,8%) correspondiente a una disminución de la cantidad de lignina del 29,86% en el sustrato crudo a 14,4% después de 30 días de incubación, seguido de *T. trogii* el cual a los 30 días de incubación dejó el sustrato con 14,94% de lignina. Asimismo, se realizó una prueba de comparación múltiple entre las cuatro especies de hongos y los datos finales de lignina obtenidos, ratificando que *L. edodes* fue la especie que degradó la mayor cantidad de lignina en 30 días de incubación con un nivel de significancia del 95%.

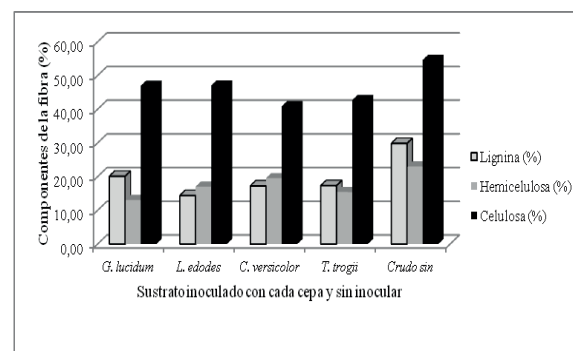
En referencia a la degradación de celulosa, se encontró que hubo diferencia significativa (valor- $p = 0,0362$) entre las cuatro especies de hongos preseleccionadas corroborándose con una prueba de comparación múltiple a un nivel de significancia del 95%. *C. versicolor* degradó el mayor porcentaje de

Cuadro 2. Capacidad de oxidación del ABTS o decoloración del azure B.

Cepa	Oxidación del ABTS	Decoloración del azure B
<i>L. edodes</i>	++	-
<i>A. delicata</i>	+	-
<i>G. frondosa</i>	+	+
<i>S. commune</i>	-	-
<i>G. applanatum</i>	+	+
<i>G. lucidum</i>	++	+
<i>C. versicolor</i> *	++	++
<i>T. trogii</i> **	++	++
<i>P. sanguineus</i>	+	-
<i>P. ostreatus</i>	+	-

*Estadísticamente diferentes a las demás especies en producción de ligninasas

Figura 1. Componentes de la fibra en los sustratos inoculados a los 30 días de incubación.



celulosa (22%) correspondiente a la disminución en la cantidad de celulosa de 59,56% en el sustrato crudo hasta 46,45% en el sustrato con 30 días de incubación, seguido de *G. lucidum* que redujo el porcentaje de celulosa en el sustrato hasta 46,95%. Sin embargo, dado que todas las cepas resultaron capaces de degradar porcentajes importantes de ambos polímeros, cualquiera de ellas podría utilizarse en la degradación de materiales lignocelulósicos; máxime teniendo en cuenta que los hongos de pudrición blanca pueden potenciar la acción de degradación de los componentes de la fibra variando las formulaciones de sustratos y las condiciones medio ambientales. Los resultados obtenidos en este trabajo tienen concordancia con trabajos realizados por otros investigadores en referencia a los hongos basidiomicetos y en especial los de pudrición blanca, como potentes degradadores de lignina y celulosa [28, 29].

En el cuadro 3 se detallan las actividades enzimáticas cuantitativas promedio (endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, endoxilanas, lacasa y lignina peroxidasa) de los sustratos inoculados con las cuatro cepas preseleccionadas a los 30 días de incubación. *C. versicolor* y *T. trogii* exhibieron resultados significativamente diferentes de *G. lucidum* y *L. edodes* en cuanto a las actividades enzimáticas endoglucanasa (valor-p = $2,71 \times 10^{-5}$) y exoglucanasa (valor-p = $9,16 \times 10^{-5}$) se refiere, por lo que degradaron el mayor porcentaje de celulosa del sustrato (figura 1). Sin embargo, respecto a la actividad de la β -glucosidasa

las especies significativamente diferentes fueron *L. edodes* y *C. versicolor* con un valor-p=0,0144. *L. edodes* mostró ser el hongo de mejor desempeño en cuanto a la degradación de lignina del sustrato utilizado (figura 1) a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas en la producción de enzimas ligninolíticas entre las cuatro cepas. No obstante, al analizar los resultados obtenidos debemos tener en cuenta que el método de extracción utilizado puede no haber garantizado la extracción de todas las enzimas adsorbidas al sustrato.

CONCLUSIONES

A partir del rastreo cualitativo en placa de la producción de celulasas y ligninasas en 10 cepas fúngicas causantes de pudrición blanca, se seleccionaron cuatro hongos: *G. lucidum*, *L. edodes*, *C. versicolor* y *T. trogii* y se evaluó su capacidad para degradar la lignina y la celulosa durante la fermentación en estado sólido de aserrín de roble. De los resultados obtenidos surge que cualquiera de estas cepas que se utilice con fines de degradación de materiales lignocelulósicos probablemente será efectiva. Entre ellas, sin embargo, *L. edodes* degradó el mayor porcentaje de lignina (51,8%) al cabo de 30 días, y *C. versicolor* el mayor porcentaje de celulosa (22%). Lo cual demuestra su potencialidad en procesos industriales de producción de enzimas a partir de materiales lignocelulósicos residuales.

Cuadro 3. Actividades enzimáticas por gramo de sólido seco (sustrato) inoculados con cuatro hongos durante 30 días de incubación.

Cepa	<i>G. lucidum</i>	<i>L. edodes</i>	<i>C. versicolor</i>	<i>T. trogii</i>
Endoglucanasa	3,872	3,371	9,798	10,514
Exoglucanasa	5,132	4,469	9,401	8,148
β -glucosidasa	1,896	4,436	3,496	4,024
Endoxilanas	29,643	25,924	18,869	26,234
Lacasa	7,050	9,489	8,916	9,478
Lignina peroxidasa (LiP)	0,065	0,011	0,097	0,088

Las actividades enzimáticas están expresadas en [UE(μ mol/g s.s min)], y la LiP en (U/mL/min)

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas (Colombia) por la financiación del presente trabajo y al Instituto de Biotecnología Agropecuaria de la misma institución por el apoyo material y de infraestructura. Asimismo, los autores expresan sus agradecimientos a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Argentina) por su apoyo y asesoría durante la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] SÁNCHEZ, O.J. and CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99, 2008, p. 5270-5295.

- [2] JOSHI, V.K. and PANDEY, A. Biotechnology. Food fermentation Vol. II. New Delhi (Indian): Educational Publishers & Distributors, 1999, 998 p.
- [3] CARLILE, M., WATKINSON, S. and GOODAY, G. The fungi. 2 ed. London (England): Academic Press, 2001, 588 p.
- [4] BOMMARIUS, A.S. and RIEBEL, B.R. Biocatalysis. Atlanta (USA): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004, 611 p.
- [5] SÁNCHEZ, O.J. y CARDONA, C.A. Producción de Alcohol Carburante: Una Alternativa para el Desarrollo Agroindustrial. Manizales (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 2007, 386 p.
- [6] KOUTINAS, A.A., WANG, R. and WEBB, C. Restructuring Upstream Bioprocessing: Technological and Economical Aspects for Production of a Generic Microbial Feedstock From Wheat. Published online in Wiley InterScience, 2004, p. 1-15.
- [7] WEINBERG, Z.G. Biotechnology in developing countries: opportunities in solid state fermentation applied in the agricultural industry. International Journal of Biotechnology, 2(4), 2000, p. 364-373.
- [8] REDDY, C.A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. Current Opinion in Biotechnology, 6, 1995, p. 320-328.
- [9] POINTING, S.B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. Fungal Diversity, 2, 1999, p. 17-33.
- [10] KIRK, T.K. and FARREL, R.L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. Annual Reviews of Microbiology, 41, 1987, p. 465-505.
- [11] ÂNGELO, A.S. Enzimas hidrolíticas. En: Fungos: Uma Introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul (Brasil): Universidade de Caxias do Sul, 2004, p. 263-285.
- [12] ARORA, D.S. and SHARMA, R.K. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, 160, 2010, p. 1760-1788.
- [13] HUDSON, H. Fungal Biology. Maryland (usa): Edward Arnolds Eds, 1986, 298 p.
- [14] MONTOYA, S., GALLEGU, J., SUCERQUIA, A., PELAEZ, B., BETANCOURT, O. y ARIAS, D. Macromicetos observados en bosques del Departamento de Caldas: su influencia en el equilibrio y la conservación de la biodiversidad. Boletín Científico Centro de Museos de Historia Natural, 14 (2), 2010, p. 57-76.
- [15] ARORA, D.S., CHANDER, M. and GILL, P.K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. International Biodeterioration & Biodegradation, 50, 2002, p. 115-120.
- [16] LITTHAUER, D., VAN VUUREN, M.J., VAN TONDER, A. and WOLFAARDT, F.W. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). Enzyme and Microbial Technology, 40, 2007, p. 563-568.
- [17] ELISASHVILI, V., KACHLISHVILI, E., KHANDZIANI, T. and AGATHOS, S.N. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 37, 2010, p. 1091-1096.
- [18] NAZARENO, M.C., BUCSINSZKY, A.M.M., TOURNIER, H.A., CABELLO, M.N. and ARAMBARRI, A.M. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. Revista Iberoamericana de Micología, 17, 2000, p. 64-68.
- [19] MONTENECOURT, B.S. and EVELEIGH, D.E. Semi quantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. Applied and environmental microbiology, 33(1), 1977, p. 178-183.
- [20] TAKANO, M., NISHIDA, A., NAKAMURA, M. Screening of wood-rotting fungi for kraft pulp bleaching by the Poly R decolorization test and biobleaching of hardwood kraft pulp by *Phanerochaete crassa* WD 1694. Journal of Wood Science, 47, 2001, p. 63-68.
- [21] ZHANG, H.P., HIMMEL, M.E. and MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances, 24, 2006, p. 452-481.
- [22] ARCHIBALD, F. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. Applied Environmental Microbiology, 58, 1992, p. 3110-3116.
- [23] THURSTON, C. The structure and function of fungal laccases. Microbiology-UK, 140, 1994, p. 19-26.
- [24] EGGERT, C., TEMP, U., DEAN, J.F. and ERIKSSON, K.L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Letters, 391, 1996, p. 144-148.
- [25] LETERME, P. Análisis de alimentos y forrajes. (Protocolos de Laboratorio). Palmira (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 2010, 66 p.
- [26] MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31(3), 1959, p. 426-428.

-
- [27] PASZCZYNSKI, A. and CRAWFORD, R.L. Degradation of azo compounds by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium* Involment of veratryl alcohol. Biochemistry Biophysics resources communications, 178, 1991, p. 1056-1063.
- [28] BALDRIAN, P. and VALASKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiology Review, 32, 2008, p. 501-521.
- [29] MARTÍNEZ-ANAYA, C., BALCÁZAR-LÓPEZ, E., DANTÁN-GONZÁLEZ, E. y FOLCH-MALLOL, J.L. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. Revista Latinoamericana de Microbiología, 50(3 y 4), 2008, p. 119-131.