



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“Obtención de azúcares fermentables por degradación  
fúngica de cáscara de banano (*Cavendish valery*)”**

*Tesis previa a la obtención del título de  
Bioquímico-Farmacéutico*

**Autor:**

**Fabián Enrique Granda Sivisapa**

**Director:**

**Ing. Ana Beatriz Hernández Ruiz**

**LOJA-ECUADOR**

**2009**

# DEDICATORIA

*A Dios por permitirme vivir y alcanzar mi sueño  
A mi Padre por dar su vida por su familia quiero que sepas que  
llevare por siempre tu ejemplo de vida en mi memoria y en mi  
corazón*

*A mi madre Litamar su presencia en mi  
vida es el regalo más grande que Dios me ha hecho  
A mis Hermanos por sus principios inflexibles, su determinación  
y su incesante aliento durante mi vida académica*

***Fabián Enrique***

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja por permitirme utilizar las instalaciones del CBCM para llevar a cabo este proyecto.

Expresar un muy sentido agradecimiento a la Ing. Beatriz Hernández, directora de tesis por su acertada y valiosa dirección en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Ing. Fabián Carrión por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi proyecto de tesis en el laboratorio de Microbiología.

A la Ing. Patricia Ruiz mi amiga y compañera por su dedicación y colaboración para la realización de este trabajo.

## CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Fabián Enrique Granda Sivaspa declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigadores, trabajos científicos o técnicos o tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Fabián E. Granda S.  
TESISTA

Ing. Ana Beatriz Hernández  
DIRECTOR DE TESIS

## **CERTIFICACIÓN DE APROBACIÓN**

Ing.  
Ana Beatriz Hernández Ruiz  
DIRECTORA DE TESIS

Certifica:  
Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por Fabián Enrique Granda Sivilapa, previo a la obtención del título de BIOQUIMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, de 2008

Ing. Beatriz Hernández  
DIRECTORA DE TESIS

# AUTORÍA

Los conceptos, ideas, conclusiones y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de su autor.

Fabián Enrique Granda Sivisapa

## CONTENIDOS

|   |     |
|---|-----|
| Certificación   | II  |
| Autoría   | III |
| Dedicatoria   | IV  |
| Agradecimiento  | V   |
| Cesión de Derechos  | VI  |
| Contenidos  | VII |
| <br>  |     |
| 1. <b>RESUMEN</b> .....                                   | 1   |
| 2. <b>ABSTRACT</b> .....                                  | 2   |
| 3. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                              | 3   |
| 3. Biomasa y Material Lignocelulósico.....                | 5   |
| 3.1.1. Celulosa.....                                      | 7   |
| 3.1.2. Hemicelulosa.....                                  | 8   |
| 3.1.3. Lignina.....                                       | 9   |
| 3.2. Banano: Características y Composición.....           | 10  |
| 3.3. Hongos: Características generales.....               | 11  |
| 3.3.1. Importancia de los Hongos.....                     | 13  |
| 3.4. Actividad Enzimática.....                            | 14  |
| 3.4.1. Lignina Peroxidasa (LiP).....                      | 15  |
| 3.4.2 Lacasa.....   | 16  |
| 3.5. Aplicaciones Biotecnológicas.....                    | 17  |
| 3.5.1. Biopulpaje.....                                    | 17  |
| 3.5.2. Bioblanqueo.....                                   | 18  |
| 3.5.3 Biorremediación.....                                | 19  |
| 3.5.4. Mejoramiento de la digestibilidad de forrajes..... | 19  |
| 3.5.5. Bioetanol.....                                     | 20  |
| 3.6. Descripción de Pretratamientos.....                  | 20  |
| 3.6.1. Pretratamientos Físicos.....                       | 21  |
| 3.6.2. Pretratamientos Fisicoquímicos.....                | 21  |
| 3.6.3. Pretratamientos Biológicos.....                    | 21  |
| 3.6.4. Pretratamientos Químicos.....                      | 21  |
| 3.7. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....                          | 22  |
| 3.7.1. OBJETIVO GENERAL.....                              | 22  |
| 3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                         | 22  |
| 3.7.3. Hipótesis de Trabajo.....                          | 23  |
| 3.7.4. Diseño experimental y variables de estudio.....    | 23  |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>24</b> |
| 4.1. Diseño experimental.....  | 24        |
| 4.2. Nomenclatura.....   | 24        |
| 4.3. Sitio de Estudio y Recolección de Muestras.....   | 24        |
| 4.3.1. Recolección de especies Fúngicas.....   | 25        |
| 4.4. Evaluación Cualitativa de Enzimas Celulolíticas y Ligninolíticas.....   | 25        |
| 4.4.1. Enzimas Ligninolíticas.....   | 25        |
| 4.4.2. Enzimas Celulolíticas.....  | 25        |
| 4.5. Pretratamientos.....  | 26        |
| 4.6. Fermentación.....   | 26        |
| 4.7. Evaluación Cuantitativa de Enzimas Ligninolíticas....   | 27        |
| 4.7.1. Determinación de la actividad de la LiP.....  | 27        |
| 4.7.2 Determinación de la actividad Lacasa.....  | 27        |
| 4.8. Cuantificación de glucosa.....  | 29        |
| 4.8.1. Reactivos.....  | 29        |
| <br>   |           |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>  | <b>30</b> |
| 5.1. Producción de Glucosa.....  | 32        |
| 5.2. Prueba de comparaciones múltiples para la variable pretratamiento (Glucosa).....  | 32        |
| 5.3. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable Hongo (producción enzimática).....                                  | 36        |
| 5.4. Producción de Lacasa.....   | 37        |
| 5.4.1 Pruebas de comparaciones múltiples para la variable Concentración de Sustrato (producción de lacasa).....              | 38        |
| 5.5. Producción de Lignina peroxidasa.....   | 39        |
| 5.5.1. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable Concentración de Sustrato (producción de Lignina Peroxidasa)..... | 40        |
| <br>   |           |
| <b>6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>46</b> |



## 1. RESUMEN

La creciente y constante contaminación ambiental causada por los residuos agrícolas de cultivos a gran escala, obliga a buscar alternativas para mitigar los efectos sociales y ambientales de los mismos, a fin de darles un valor agregado usándolos en procesos biotecnológicos. Se estudió la obtención de glucosa mediante la degradación fúngica de cáscara de banano (*Cavendish valery*) y se cuantificó la actividad de 2 enzimas ligninolíticas Lacasa y Lignina peroxidasa. Se usó cáscara de banano como sustrato en tres concentraciones 1, 5 y 10 % a las cuales se le aplicó tres tipos de pretratamientos: molido, troceado e hidrotérmico con la finalidad de debilitar las fibras y tener acceso a las moléculas de celulosa y almidón para obtener azúcares fermentables. Los hongos (codificados como 70M, 110M, 138M) fueron previamente seleccionados mediante screening enzimático cualitativo para enzimas celulolíticas y ligninolíticas. Estos fueron inoculados en medio basal junto al sustrato (cáscara de banano) para ser sometidos a fermentación durante 20 días a 125 rpm; de las cuales se tomaron muestras diarias para la cuantificación de glucosa y enzimas Lacasa y Lignina peroxidasa. La mayor producción de glucosa reportó un valor de 1.346 g/L para el pretratamiento Hidrotérmico, al 5% de sustrato, con el hongo 110M a los 5 días de la fermentación. El mejor resultado en cuanto a la actividad de enzima Lacasa fue 19.201 UI/L al día 10 de fermentación para el pretratamiento troceado con el hongo 138M al 10%. La mayor actividad de enzima Lignina peroxidasa fue de 7.715 UI/L, con el tratamiento molido a los 4 días de fermentación a la concentración del 1% con el hongo 110M.

## 2. ABSTRACT

The increasing and constant environmental pollution caused by the agricultural residues of crops on a large scale forces to look for alternatives to mitigate the social and environmental effects of the same ones in order to give them an added value using them in biotechnological processes. The obtaining glucose was studied by means of the degradation fungal of peel of banana (*Cavendish valery*) and we cuantificated the activity of 2 ligninolytic enzymes lacasa and lignin peroxidase. Banana peel was used as substrate in three concentrations 1, 5 and 10% with three types of pretreatments: grinding, cutting and hydrothermal order to weaken the fibers and have access to the molecules of cellulose and starch to get fermentable sugars. Fungi (coded as 70M, 110M, 138M) were previously selected by screening for qualitative enzyme cellulolitic and ligninolytic enzymes. These were inoculated in the medium basal next to the substrate (banana peel) for be subjected to fermentation for 20 days at 125 rpm, of which samples were collected daily for quantification of glucose and Lacasa and lignin peroxidase enzymes. The most increased glucose production reported a value of 1, 346 g / L for the hydrothermal pretreatment, 5% of substrate, with the fungus 110M to 5 days of fermentation. The best result in terms of enzyme activity was Lacasa 19,201 IU / L to the tenth day of pre-cut for the fermentation with the fungus 138M 10%. The majority of enzyme Lignin peroxidase activity was 7715 IU / L with treatment milled to 4 days fermentation at a concentration of 1% with the fungus 110M.

### 3. INTRODUCCIÓN

El desarrollo y búsqueda de nuevos mecanismos biotecnológicos que permitan mitigar los daños ocasionados por la degradación de productos naturales es de mucha importancia, especialmente para aquellos producidos a gran escala por su uso en la alimentación. Esta degradación da lugar a la producción de gases tóxicos y de efecto invernadero, atracción de vectores y producción de lixivianos (Morales y Uribe. 1985; Fuentes y Bayona, 1994), que tienen consecuencias a corto, mediano y largo plazo, una de las alternativas ha este problema es utilizar microorganismos capaces de aprovechar estos desechos y transformarlos en productos de interés. (Agricultura de las Américas 1989).

Ecuador es un país muy rico en diversidad que se ve reflejada en la gran variedad de especies animales y vegetales. En el Ecuador el principal producto agrícola de exportación lo constituye el banano a la vez es uno de los principales contribuyentes a la economía nacional después del petróleo. Según datos oficiales del Ministerio de Agricultura y Ganadería reflejan una superficie bananera de 153.403 hectáreas comprendidas entre las provincias de El Oro, Guayas y Los Ríos, que incluidas áreas no registradas de otras provincias llegan a un total de 180.000 hectáreas, considerando a esta superficie cultivada de plantaciones bananeras como excesiva. En el año 2007 se registró un volumen de exportación de 4'651.342 TM, lo que representa aproximadamente el 80 % de la producción y el 20% restante corresponde a fruta que no esta en la capacidad de ser exportada, denominado banano de rechazo generado durante la etapa de selección y empaque de la fruta. (Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador 2006). De este residuo (1'162.835 TM/año) una parte es utilizado en la alimentación animal y en otros casos es degradada al ambiente ocasionando problemas de contaminación ambiental, que da lugar a emisión de gases de efecto

invernadero, atracción de vectores y producción de lixiviados que arremeten contra la calidad hídrica, superficial y subterránea de los suelos. (Afanador, A. 2005).

Como una alternativa para dar solución a este problema y además dar un valor agregado este puede ser utilizado como sustrato para la degradación enzimática microbiana debido a su contenido en material lignocelulósico lo que lo convierte en un sustrato altamente productivo de azúcares fermentables y enzimas celulolíticas, ligninolíticas y amilolíticas producidas por ciertos hongos que a su vez tienen numerosas aplicaciones en procesos industriales, como la obtención de alcohol carburante. (Shah, M; *et al* 2005). La utilización de materiales lignocelulósicos viene siendo investigada intensamente, debido a que estos representan el mayor componente de los residuos agrícolas y desechos agroindustriales en el mundo, y constituyen una fuente abundante y segura de recursos renovables y energía.(Giraldo *et al.* 2007)

Análisis bromatológicos de la cáscara banano revelaron que su humedad es de 89.10 %, almidón 39.89 %, hemicelulosa 14.8 %, celulosa 13.2 %, Lignina 14.0 %, Calcio 0.39 %, Magnesio 0.16, Fibra 11.32 % (Monsalve *et al.* 2006), dependiendo estos porcentajes del estado de madures de la fruta. (Sharrock y Lusty 2000), (Monsalve F. John. *Et al* 2006).

Dentro de las características fisiológicas de los hongos una de las más importantes es su capacidad para degradar polímeros, como la celulosa y el almidón, siendo estos uno de los principales componentes de la biomasa vegetal. (Ramírez y Cocha 2003). La celulosa como componente estructural de los vegetales funciona en la materia prima vegetal como un secuestrador o barrera estructural que limita la liberación de componentes de interés para la industria (Rastogi *et al* 1998; Sarker *et al.*1999); por ejemplo componentes alimenticios, extracción de jugos, extracción de

almidón, colorantes, antioxidantes, etc. (Ovando-Cachón 2005) La celulosa es un polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa, las cuales están unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos, formando cadenas largas lineales que a su vez se unen mediante enlaces de hidrogeno intramolecular formando estructuras supramoleculares cristalinas, organizadas y resistentes. (Chou et al 1981; Fan et al 1982; Ljungdahl & Ericsson 1985). La lignina presente en los vegetales tiene entre otras funciones la de proporcionar rigidez a la planta y que actúa como puente de unión entre las células de la fibra vegetal por lo cual otorga resistencia al ataque de microorganismos ya que impide el paso de enzimas degradativas a la pared celular. (Cunningham R 1994).

El uso de pretratamientos nos permitirá la desfibrilación, solubilización y remoción de celulosa para aumentar el rendimiento en la producción de productos fermentables y una mayor susceptibilidad al ataque microbiológico y enzimático. (Cunningham R 1994)

En nuestro país dentro del sector agrícola la producción bananera es la de mayor importancia por esta razón el área de Biotecnología Microbiana de CBCM cree conveniente investigar la degradación enzimática de la cáscara de banano usando cepas fúngicas para obtener azúcares fermentables que pueden ser usados en la industria y dar un valor agregado a los desechos que produce este sector.

### **Biomasa y Material Lignocelulósico**

Postulamos el concepto de biomásica, para definir un enfoque sustentable en el manejo de residuos agroindustriales y similares que, de manera equivalente a la *petroquímica*, parte, históricamente, del uso inicial del recurso natural (materiales lignocelulósicos y *petróleo* respectivamente) como insumo energético. (Lopez & Lopretti 2004). El término biomasa, en el sentido amplio, se refiere a cualquier tipo de materia orgánica que haya tenido su origen

inmediato en un proceso biológico, el concepto de biomasa comprende productos tanto de origen vegetal como animal. (Bär Brenda 2006). En la actualidad se ha aceptado este término para denominar al grupo de productos energéticos y materias primas de tipo renovable que se originan a partir de la materia orgánica formada por vía biológica. Quedan, por tanto, fuera de este concepto los combustibles fósiles o los productos orgánicos derivados de ellos, aunque también tuvieron un origen biológico en épocas remotas. (Bär Brenda 2006).

Teniendo en cuenta la definición anterior de biomasa, ésta se puede clasificar, según su origen en:

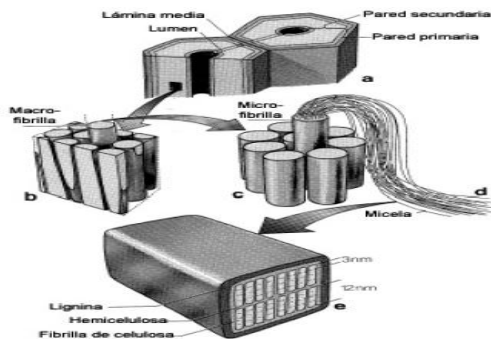
**Biomasa natural:** Es la que se produce en la naturaleza sin ninguna intervención humana. El problema que presenta este tipo de biomasa es la necesaria gestión de la adquisición y transporte del recurso al lugar de utilización. Esto puede provocar que la explotación de esta biomasa sea inviable económicamente.

**Biomasa residual (seca y húmeda):** Son los residuos que se generan en las actividades de agricultura (leñosos y herbáceos) y ganadería, en las forestales, en la industria maderera y agroalimentaria, entre otras y que todavía pueden ser utilizados y considerados subproductos. (Miliarium Aureum 2004)

La madera y otros materiales lignocelulósicos representan la fuente de carbono renovable más abundante sobre la Tierra. La fabricación de papel es uno de los principales usos industriales de la biomasa lignocelulósica, pero ésta también representa una fuente potencial de biocombustibles y compuestos químicos. La mayor parte del carbono fijado durante la fotosíntesis se acumula en la pared vegetal. Esta pared cumple distintas funciones: de esqueleto, protección frente al ataque biológico, resistencia a los cambios de presión osmótica, y participación en el flujo de nutrientes (Betts et al, 1991). Los tres componentes principales de la pared celular de las plantas vasculares son la celulosa, la lignina y la hemicelulosa. Las moléculas que forman la pared

celular vegetal se mantienen unidas mediante una combinación de enlaces covalentes y no covalentes.

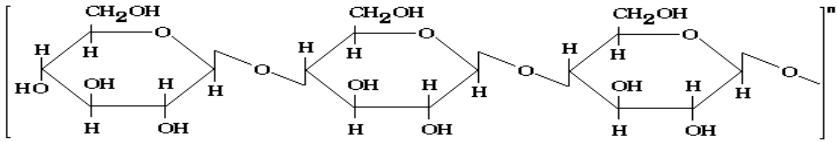
**Grafico Nº 1. Composición del Material Lignocelulósico**



### 3.2. Celulosa

La celulosa es el polímero lineal individual más importante de las plantas, constituyendo entre el 40-50% de la pared celular de la planta, consiste en un monómero de glucosa unida por enlace  $\beta$  (1-4) (Wainwright, M. 1995). La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las distintas cadenas de glucosa, haciéndolas muy resistentes e insolubles al agua; de esta manera se originan fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales, dándoles así la necesaria frigidez. Las fibrillas de celulosa muy empaquetadas y dispuestas en haces paralelos rodean a la célula formando capas cruzadas. Estas fibrillas se hallan aglutinadas por una matriz compuesta de hemicelulosa, proteína y pectina (Paz, V. 1985)

**Grafico N° 2. Molécula de celulosa**



### 3.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa esta presente en la pared celular de la planta y en ella forma un gel acuoso en el cual están embebidas las microfibrillas de celulosa (Cunninghan, R. 1994).

La palabra hemicelulosa es un término que se utiliza para designar a un grupo de heteropolisacáridos. Es un polímero formado principalmente por pares de cinco átomos de carbono (pentosanos): C-xilosa y L-arabínosa y de hexosanos (C<sub>6</sub> o azúcares de seis átomos de carbono) D-glucosa, D-manosa y D-galactosa. También contiene pequeñas cantidades de ácidos orgánicos. Los azúcares tipo C<sub>6</sub> son fácilmente fermentables a etanol, pero los microorganismos normalmente usados en la industria para obtener alcohol etílico no son capaces de metabolizar los azúcares de cinco átomos de carbono. A diferencia de la celulosa, la cual tiene siempre la misma estructura y composición, las de hemicelulosas pueden variar simplemente entre especies de plantas. Las cadenas poliméricas individuales contienen de 50 a 100 unidades monoméricas de azúcares, debido a que las cadenas de hemicelulosa no son lineales, tienen ramificaciones laterales y no tienen estructura regular, este polímero no es cristalino y es fácilmente hidrolizado. De los tres componentes celulares, la hemicelulosa es la primera en ser atacada por los hongos causantes de la pudrición por poseer cadenas más bien



cortas, debido a la solubilidad y a la localización expuesta alrededor de las microfibrillas de celulosa.

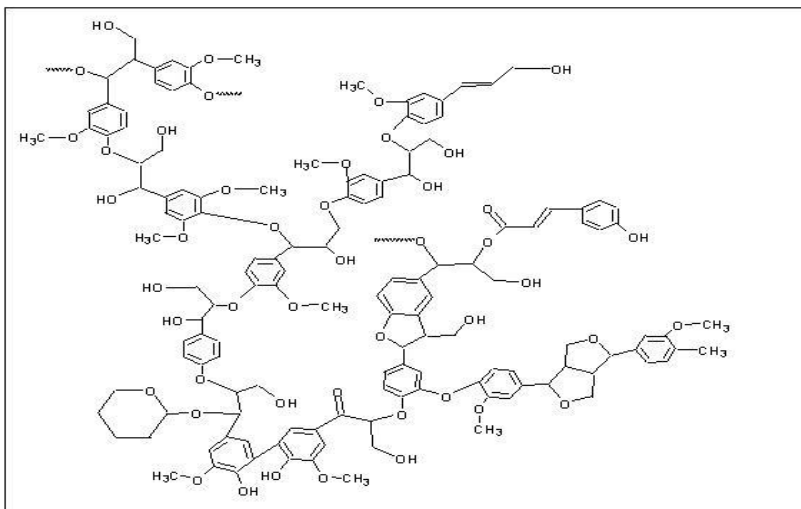
### **3.4. Lignina**

La lignina, después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y la forma más abundante de material aromático en la biosfera. La madera y otros tejidos vasculares contienen alrededor del 20-30% de lignina. (Dávila G. Vázquez R. 2001). La mayor parte de ésta se encuentra dentro de las paredes celulares, entremezclada con las hemicelulosas y formando una matriz que rodea las ordenadas microfibrillas de celulosa. Este compuesto provee de rigidez a las plantas superiores ya que actúa como pegamento entre las fibras de celulosa formando la lámina media. (Kirk, T. K., Farrell, R. L. 1987). Además, protege a los carbohidratos fácilmente degradables (celulosa, hemicelulosa) de la hidrólisis enzimática microbiana. (Dávila G. Vázquez R. 2001)

Biosintéticamente, la lignina proviene de tres alcoholes precursores: el alcohol *p*-hidroxicinámico (cumarílico), el alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico (coniferílico) y el alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico. La copolimerización por radicales libres de estos alcoholes, iniciada por peroxidasas vegetales, da lugar al polímero de lignina. (Kirk, T. K., Farrell, R. L. 1987). Químicamente este polímero es heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo, y altamente ramificado. (Fritsche, W., Hofrichter, M. 1999). Este componente de la madera realiza múltiples funciones que son esenciales para la vida de las plantas. Por ejemplo, posee un importante papel en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos. Proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células de la madera, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones y flexiones. Realmente, los tejidos lignificados resisten el ataque de los microorganismos,

impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular. (Cunningham R. López G. 1994)

### Grafico N° 3. Estructura de la Lignina



Fuente: Brunow, G. 2001

### 3.5. Banano: Características y Composición

El banano pertenece al orden Zingiberales, familia Musaceae y género *Musa* (Soto, 1985). Bananas son frutas tropicales de plantas herbáceas de origen asiático. Bananas y plátanos tienen la característica general de las frutas, es decir, tienen un valor nutritivo que radica fundamentalmente en su contenido de carbohidratos. (J. Ly. 2004).

Los bananos verdes contienen del 20 – 22% de la materia seca, principalmente en forma de almidón. Cuando estas maduran el almidón se convierte en azúcares simples como: sacarosa, fructuosa y glucosa. Los azúcares presentes en la pulpa de banano maduro, son fácilmente asimilables. Los

principales son sacarosa (66%), glucosa (20%) y fructuosa (14%) (Hurtado, F. 2001). Suelen cultivarse con fines comerciales o de autoconsumo humano en muchas partes del mundo. Las bananas en particular, que son las cultivadas en condiciones de plantación, suelen generar un volumen importante de residuos y sobrantes de frutas. (J. Ly. 2004). La cáscara de banano esta compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina pero su composición varía con el origen del material. (Monsalve F. John. *Et al* 2006). La cáscara de banano es una fuente abundante de material celulósico, es el constituyente externo del banano y representa alrededor del 40% en peso. (Monsalve F. John. *Et al* 2006).

**Tabla Nº 1. Característica Química de la Cáscara de Banano**

| <b>COMPONENTE</b>   | <b>CASCARA DE BANANO (% base seca)</b> |
|---------------------|--|
| <b>Almidón</b>      | <b>39.89</b>                           |
| <b>Humedad</b>      | <b>89.10</b>                           |
| <b>Hemicelulosa</b> | <b>14.8</b>                            |
| <b>Celulosa</b>     | <b>13.2</b>                            |
| <b>Lignina</b>      | <b>14.0</b>                            |
| <b>Magnesio</b>     | <b>0.16</b>                            |
| <b>Calcio</b>       | <b>0.29</b>                            |
| <b> Cenizas</b>     | <b>11.37</b>                           |

Fuente: Laboratorio de Microbiología. (UNC)

Elaboración: Monsalve et al.

### **3.6. Hongos: Características generales**

Los hongos constituyen un conjunto de seres vivos que incluye desde organismos unicelulares u organismos pluricelulares macroscópicos. Están formados por células eucariotas con una pared rígida, se caracterizan por ser

inmóviles, presentar nutrición heterótrofa por absorción y reproducción asexual y sexual.

Los hongos unicelulares son microscópicos, poseen forma redondeada y se denominan levaduras. La mayor parte de los hongos, sin embargo son pluricelulares, están formados por células cilíndricas alargadas, que se disponen linealmente para constituir largos filamentos, denominados hifas. Todas las hifas al crecer forman micelios (Apuntes de Microbiología UAB)

Los hongos son organismos eucariotas típicos y poseen un núcleo que contiene varios cromosomas (siete en *Candida albicans*, ocho en *Aspergillus nidulans* y dieciséis en *Saccharomyces cerevisiae*) delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplásmicos, como mitocondrias, vacuolas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas 80 S. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplásmica, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular. La estructura de las células de los hongos es muy diferente de la de las bacterias que son organismos procariontes. (García de la Rosa, J. 2002.)

La pared celular de los hongos posee diferentes constituyentes químicos como ser polisacáridos, proteínas, lípidos y otras sustancias. La constitución varía entre las diferentes especies. También varía con la edad del hongo, ya que sustancias que pueden estar presentes en las hifas jóvenes, desaparecen en las más viejas o depositar otros materiales y enmascarar la presencia de constituyentes iniciales, también la composición del medio, el pH y la temperatura, influyen en la composición de las paredes de los hongos (Saenz P. 2005).

La mayoría de los hongos poseen un papel importante en la naturaleza, en la que se hallan ampliamente distribuidos, degradando y reciclando la materia orgánica muerta a

merced de sus numerosas potencialidades metabólicas de tipo quimioheterótrofo. Crecen fácilmente en los medios de cultivo convencionales dando lugar a colonias visibles macroscópicamente, con morfología bien diferenciada según están formadas por levaduras u hongos filamentosos (Apuntes de Microbiología UAB).

### **3.6.1. Importancia de los Hongos**

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas. (Isco, J. et al 1997).

La mayoría de los hongos conocidos viven en la naturaleza sobre materia orgánica muerta, saprofiticamente y por ende su principal rol ecológico es la degradación o descomposición de estos sustratos, reciclando y retornando a los suelos o en otros ambientes, los nutrientes básicos. Los hongos en otros aspectos son altamente ventajosos en alimentos (hongos de sombreros comestibles), en la maduración de los quesos, en las fermentación y elaboración de bebidas (cerveza, vino), del pan y también en la industria farmacéutica en la producción de antimicrobianos.(Vázquez Rafael. 2005)

### 3.7. Actividad Enzimática

Las enzimas se definen habitualmente como sustancias proteicas elaboradas por una célula viva que cataliza una reacción específica necesaria para el mantenimiento de la vida (Asanza H. Jácome E. 2006).

La catálisis enzimática implica la formación de un complejo entre el reactivo (sustrato) y la enzima, en un proceso de equilibrio. Este complejo se denomina complejo de Michaelis. El sustrato se une a una región específica de la enzima, denominada el sitio activo, que es el complemento geométrico del sustrato y únicamente pueden formar el complejo de Michaelis los sustratos que poseen la forma complementaria adecuada. (Valero F, 1998). La especificidad es una característica fundamental de las enzimas por lo que una enzima y un sustrato no llegan a adherirse si sus formas no encajan con exactitud. (Asanza H. Jácome E. 2006)

Los hongos ligninolíticos más eficaces se encuentran entre los basidiomicetos. Para ello, cuentan con una batería de enzimas extracelulares, oxidasas y peroxidasas, que contribuyen, en determinadas condiciones, a despolimerizar la compleja estructura de la lignina para posibilitar el ataque de los polisacáridos que constituyen una importante fuente de energía. (Cullen, D. 1997)

El paso clave en la degradación de la lignina es el ataque inicial por agentes extracelulares responsables de su despolimerización, y liberación de compuestos de bajo peso molecular, que sufren posteriores reacciones y son finalmente mineralizados intracelularmente. En general todos los agentes ligninolíticos, incluyendo enzimas y compuestos de bajo peso molecular (que a menudo actúan como mediadores redóx), degradan la lignina mediante un proceso oxidativo (Kirk y Cullen, 1998). Las unidades de lignina son oxidadas monovalentemente a radicales libres (generalmente

de tipo catiónico) que, en función de su estructura y condiciones del entorno, sufren diversas reacciones químicas incluyendo reacciones de despolimerización. Los compuestos de bajo peso molecular procedentes de la despolimerización de la lignina son finalmente metabolizados hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las enzimas extracelulares fúngicas involucradas en el proceso de degradación de la lignina son de tipo oxidoreductasa, incluyendo lacasas, peroxidasas y oxidasas productoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kirk y Cullen, 1998).

### 3.7.1. Lignina Peroxidasa (LiP)

La primera enzima mostrada para atacar los compuestos del tipo lignina fue la lignina peroxidasa, aislada de *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk y Tien, 1984). Esta enzima es producida por la mayoría de especies de hongos de pudrición blanca. LiP es una peroxidasa con un grupo hemo como cofactor y emplea  $\text{H}_2\text{O}_2$  como primer aceptor de electrones. La LiP puede oxidar directamente sustratos aromáticos no fenólicos, siendo el más estudiado el alcohol veratrílico (Papinutti, et al., 2003).

Esta enzima oxida el núcleo aromático (fenólico y no fenólico) por la remoción de un electrón, generando radicales fenoxi y radicales catión. Por último, reacciona espontáneamente con nucleótidos (principalmente con agua) y oxígeno molecular. El resultado es una "combustión enzimática" en la cual las uniones C-C y C-O son divididas, depolimerizando el polímero y abriendo los anillos aromáticos, formando en consecuencia abundantes productos aromáticos y alifáticos. LiP no es aparentemente producida por algunos hongos de pudrición blanca, incluyendo *Ceriporiopsis subvermispora*, lo que hace pensar que no es requerida en todos los hongos, es decir, que los hongos de pudrición blanca tienen más de un sistema enzimático para degradar la lignina. (Katar, M. et al 1997)

La LiP se diferencia de otras peroxidasas por su alto potencial de oxido-reducción, lo que le permite oxidar directamente compuestos aromáticos no fenólicos, y por

tanto, la mayor parte de las unidades de lignina. (Rodríguez R. Francisco. 2006.)

El alcohol veratrílico es un sustrato para la LiP y es usado en ensayos espectrofotométricos para monitorear su actividad por medición de la producción de veratrildehído en presencia de  $H_2O_2$ . El veratríl alcohol es producido extracelularmente como un metabolito secundario por muchos hongos de pudrición blanca y mejora la actividad de la LiP probablemente para proteger la LiP de una posible inactivación por exceso de  $H_2O_2$  (Asanza H. Jácome E. 2006).

### **3.7.2. Lacasa**

La Lacasa fue la primera enzima aislada de las plantas pero también esta presente en hongos y en algunas bacterias. La lacasa usualmente es la primera enzima ligninolítica secretada por hongos alrededor del medio. (Asanza H. Jácome E. 2006). Las lacasas son glicoproteínas producidas por algunos hongos y bacterias, que catalizan la oxidación de diferentes compuestos fenólicos. Son enzimas excepcionalmente versátiles, que pueden ser empleadas en diversos procesos industriales (bioblanqueo y depuración de los efluentes de industrias papeleras, degradación de compuestos fenólicos contaminantes, etc). (González Arzola K. y Falcón Sanabria M. A. 2003)

Las lacasas son metaloenzimas de tipo fenoloxidasas que contienen cobre en su centro activo y catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminos aromáticos sustituidos liberando  $H_2O$  al utilizar  $O_2$  como aceptor final de electrones (Thurston, 1994). Debido a su bajo potencial redóx, las lacasas sólo oxidan directamente las unidades fenólicas de la lignina. (Ferreira P. 2004). Sin embargo, también son capaces de oxidar las unidades no fenólicas mediante un sistema en el que están implicados compuestos de bajo peso molecular naturales (incluyendo metabolitos fúngicos) o



sintéticos que actúan como mediadores redox (sistema lacasa-mediador) (Ferreira P. 2004).

La enzima oxidasa ataca principalmente sustratos fenólicos, pero en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT), 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzothiazoline-6-sulfónico) ABTS o ácido violúrico (Bourbonnais, R, et al. 1997) éstos actúan como cooxidantes y capacitan a la enzima para atacar a sustratos más difícilmente oxidables como los de tipo no fenólico. La lacasa es la enzima más ampliamente distribuida entre los hongos de pudrición blanca. (Asanza H. Jácome E. 2006).

### **3.8. Aplicaciones Biotecnológicas de las enzimas Ligninolíticas**

#### **3.8.1 Biopulpaje**

El biopulpaje es el tratamiento dirigido a la biomasa vegetal empleando microorganismos ligninolíticos y sus enzimas, previo al pulpaje químico o mecánico. El objetivo primario del biopulpaje es la remoción selectiva de la lignina, usualmente expresada como una reducción en el número kappa –una medida del contenido de lignina, con una mejora asociada a la calidad del papel. La remoción biológica de la lignina de la pulpa tiene el potencial de reducir el consumo de energía eléctrica y química durante el subsecuente pulpaje no biológico. (Esser, K. y Bennett, J. 2002). Los hongos ligninolíticos más eficaces se encuentran entre los basidiomicetos que cuentan con una batería de enzimas extracelulares, oxidasas y peroxidasas, que contribuyen a despolimerizar la compleja estructura de la lignina. (Asanza H. Jácome E. 2006)

### 3.8.2 Bioblanqueo

El bioblanqueo es la remoción o destrucción biológica de pequeñas cantidades de lignina residual y otros materiales coloreados que permanecen en la pulpa después de que el pulpaje se ha completado. Estos compuestos son decolorados por químicos fuertemente oxidantes incluyendo el cloro, hipoclorito, dióxido de cloro, ozono y peróxido de hidrógeno. El cloro y estos óxidos son potentes agentes blanqueadores pero generan efluentes que contienen compuestos orgánicos clorados de alto y bajo peso molecular peligrosos para el medio ambiente. (Asanza H. Jácome E. 2006)

El bioblanqueo es un proceso extracelular y algunos progresos se han logrado con el desarrollo de sistemas enzimáticos libres de células que blanquean la pulpa y facilitan el blanqueo químico. Las Xilanasas se han desarrollado hasta el punto donde estas son usadas comercialmente para promover el blanqueo con menor cantidad de químicos. Estas enzimas funcionan por la remoción precipitada del Xilano de la superficie de la pulpa, incrementando la permeabilidad de la pulpa a los agentes del blanqueo y rompiendo enlaces covalentes entre la lignina y la hemicelulosa. (Asanza H. Jácome E. 2006). Entre las oxidasas producidas por los hongos de pudrición blanca, se ha demostrado que las MnP blanquean las pulpas. (Kaneko, *et al.* 1994).

### **3.8.3. Biorremediación**

La capacidad de los hongos de transformar una gran cantidad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de contaminaciones. Este potencial radica en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más comunes de los suelos. Por otra parte, los hongos tienen una capacidad muy notable para acumular metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc (Martín. Carmen, *et al* 2004). Así mismo estos hongos son eficientes secuestradores de isótopos radioactivos, lo que podría resultar de utilidad para descontaminar zonas afectadas por accidentes nucleares. (Asanza H. Jácome E. 2006).

### **3.8.4. Mejoramiento de la digestibilidad de forrajes.**

La microflora del rumen es responsable de la fermentación de los polisacáridos de las plantas a químicos simples capaces de ser absorbidos por el animal hospedador. Sin embargo, la microflora tiene mejor capacidad de fermentar los polisacáridos covalentemente unidos a la lignina y una fracción significativa de alimento lignocelulósico podría no ser digerido por el animal. (Esse, K. y Bennett, J. 2002).

Los métodos para desacoplar los polisacáridos de la lignina podrían ofrecer un significativo incremento en la digestibilidad y contenido nutricional de biomasa. Los residuos de la agricultura, en virtud de su elevado contenido de polisacáridos, son potencialmente usados en la alimentación animal. La separación y la extracción de la lignina de la lignocelulosa se logra con tratamientos físicos y químicos generalmente no son prácticos debido a su elevado costo, al uso de peligrosos químicos y al desagradable sabor que ellos

producen. El tratamiento biológico con hongos causantes de pudrición blanca ha sido investigado como un medio de deslignificación selectiva de forrajes. Con la aplicación de estos tratamientos se logran cambios químicos deseables en suma a la pérdida de lignina de los alimentos tratados incluyendo un incremento en la digestibilidad y proporción de proteína, celulosa y hemicelulosa. (Asanza H. Jácome E. 2006).

### **3.8.5. Bioetanol**

El proceso de obtención de etanol a partir de un sustrato lignocelulósico involucra como etapa fundamental la producción de azúcares fermentables a partir de su principal constituyente la celulosa. Los polisacáridos presentes en el banano de rechazo, pueden ser convertidos a azúcares fermentables por procesos hidrolíticos. Estos azúcares pueden ser convertidos a alcohol, utilizando prácticas biotecnológicas simples y muy conocidas, como la fermentación (Grupo Interdisciplinario de estudios moleculares GIEM). El Bioetanol tiene innumerables aplicaciones: bebidas fermentables para consumo humano, en la industria se emplea en gran cantidad en procesos como: disolución de la nitrocelulosa, disolvente de colorantes en industrias alimenticias y textil; disolventes de resinas, jabón, aceites y ceras; y en oxidación en la fabricación de ácido acético, vinagre, acetaldehído. Así también como biocombustible se puede mezclar con la gasolina para mejorar sus propiedades usándose en proporción del 10 al 25% ya que logra un índice de octano entre el 70 y 75% mayor que el de la gasolina sin mezclar. (Monsalve F. John. *Et al* 2006).

### **3.9. Descripción de los Pretratamientos**

El objetivo de los pretratamientos para obtener azúcares fermentables es aumentar la susceptibilidad del material para

obtener un sustrato lignocelulósico reactivo que sea altamente accesible al ataque del carácter microbiológico y enzimático en el contexto de la utilización o procesamiento bioquímico de los mismos (Cunningham, R. 1994).

Además los pretratamientos consiguen remover total o parcialmente la lignina y la hemicelulosa y reducir el tamaño de las partículas de material (Medel, F.)

**3.9.1. Pretratamientos Físicos.-** Estos subdividen el material en partículas finas que poseen una alta razón de superficie/volumen haciendo que la celulosa sea altamente susceptible a la hidrólisis. La acción mecánica también causa una reducción de la cristalinidad y en el grado de polimerización de la celulosa. (Cunningham, R. 1994).

**3.9.2. Pretratamientos Fisicoquímicos.-** Todos los pretratamientos de esta categoría consideran el uso del vapor para modificar la estructura lignocelulósica. Se utiliza vapor solo o en presencia de agentes químicos como SO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y NaOH.. (Cunningham, R. 1994).

**3.9.3. Pretratamientos Biológicos.-** Estos utilizan microorganismos degradadores de madera que atacan la lignina. Estos incluyen bacterias, hongos de pudrición blanda, café y blanca. Los agentes responsables de la degradación son enzimas extracelulares como la lignina-peroxidasa (LiP), peroxidasa dependiente de Mn (MnP) y lacasa. (Cunningham, R. 1994).

**3.9.4. Pretratamientos Químicos.-** El objetivo de estos es remover o sacar lignina y/o hemicelulosa sin afectar significativamente la celulosa. Los residuos sometidos a estos tratamientos son más fáciles y susceptibles de ser atacados por enzimas celulolíticas. (Cunningham, R. 1994).

### **3.10. OBJETIVOS DEL PROYECTO**

#### **3.10.1. OBJETIVO GENERAL.**

- Obtener azúcares fermentables a partir de la degradación fúngica - enzimática de celulosa presente en la corteza de banano

#### **3.10.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Aislar y purificar cepas fúngicas a partir de muestras obtenidas de tres plantaciones de banano de la provincia del Oro
- Determinar cualitativamente la actividad celulolítica y ligninolítica de todos los aislamientos fúngicos
- Determinar el pretratamiento óptimo (molienda, troceado, hidrotérmico) aplicado a la corteza de banano para incrementar la producción de glucosa
- Determinar la influencia de la concentración del sustrato en la producción enzimática a través de la medición de glucosa obtenida
- Determinar cuantitativamente la producción de enzimas ligninolíticas de todos los tratamientos
- Identificar la cepa fúngica de mayor productividad enzimática

### 3.10.3. Hipotesis de Trabajo

#### Hipotesis

**Hi:** El pretratamiento aplicado influye en el rendimiento de glucosa obtenida

**Ho:** El pretratamiento aplicado no influye en el rendimiento de glucosa

**Hi:** La concentraciones de sustrato influye en la producción de enzimas ligninolíticas

**Ho:** la concentración de sustrato no influye en la producción de enzimas ligninolíticas

**Hi:** Las especies fúngicas poseen la misma capacidad de degradación sobre la cáscara de banano.

**Ho.** Las especies fúngicas no poseen la misma capacidad de degradación sobre la cáscara de banano

### 3.10.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y VARIABLES DE ESTUDIO

El diseño experimental a utilizar es el **Diseño Factorial**

**Diseño a utilizar:** Diseño Factorial

**a = Pretratamiento    b = Concentración de sustrato    c = hongo**

a<sub>0</sub>= Molienda            b<sub>0</sub>= concentración 1%            c<sub>0</sub>= Hongo 1 (70M)

a<sub>1</sub>= Troceado            b<sub>1</sub>= concentración 5%            c<sub>1</sub>=Hongo 2 (110M)

a<sub>2</sub>= Hidrotérmico        b<sub>2</sub>= concentración 10%            c<sub>2</sub>=Hongo 3 (138M)

Variable de respuesta: Concentración de glucosa obtenida, UI/L de enzimas Lacasa y Lignina Peroxidasa

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Diseño experimental**

Se utilizó el diseño factorial, de acuerdo a los 3 pretratamientos, 3 concentraciones y las 3 especies fúngicas, con un total de 27 tratamientos por tres repeticiones, dando 81 ensayos.

### **4.2. Sitio de Estudio y Recolección de Muestras**

La recolección de muestras de especies fúngicas y de banano de rechazo se realizó en haciendas bananeras pertenecientes a tres cantones de la provincia de El Oro (El Guabo, Pasaje, Arenillas). Las muestras fúngicas se tomaron de frutos en descomposición, troncos, y Endófitos del follaje del banano y de plantas cercanas para posteriormente en laboratorio ser aisladas con el fin de obtener cepas puras e iniciar el screening enzimático.

La recolección del banano de rechazo se realizó en los mismos sectores de la toma de muestras fúngicas. Seguidamente en el laboratorio se procede a lavado con agua corriente y con alcohol 70%, posteriormente se realiza la remoción de la corteza de la fruta en tiras muy finas para finalmente ser llevadas a secado en una estufa a 50°C. Este proceso nos permite detener la maduración, eliminar agua de la muestra y disminuir el riesgo de contaminación durante el almacenamiento. Las cepas fúngicas aisladas fueron mantenidas en cajas petri con medio de cultivo MYP a 4 °C para cultivos de reposición y posibles repeticiones.



### 4.3. Recolección de especies Fúngicas

Tabla N° 2. Recolección de especies fúngicas

| Población | Hacienda bananera | Altitud (msnm) |
|-----------|-------------------|----------------|
| El Guabo  | La Soledad        | 9              |
| Pasaje    | Corralitos        | 12             |
| Arenillas | Fabiola           | 17             |

Fuente: "Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de pulpa de banano"

Elaboración: Patricia Ruiz

### 4.4. Evaluación Cualitativa de Enzimas Celulolíticas y Ligninolíticas

Se realizó evaluación cualitativa de todas las especies aisladas, para encontrar las que presenten una actividad enzimática celulolítica y ligninolítica importante.

#### 4.4.1. Enzimas Ligninolíticas

El ensayo cualitativo se realiza como una evaluación preliminar para la detección de enzimas ligninolíticas presentes en las especies aisladas, empleando ABTS como inductor y revelador a una concentración de 10mM. Este es colocado en el medio de cultivo inicial MYP, un cambio a coloración verdosa influenciado por la variación del pH es el indicador preliminar de la presencia/ausencia de enzimas ligninolíticas.

#### 4.4.2. Enzimas Celulolíticas

Se realizó a todas las especies aisladas usando tiras de papel filtro Wathman cortadas en cuadros de 1 cm que fueron adicionadas al medio de cultivo MYP a concentraciones del 5 y 10%. Se tomaron como resultados positivos el crecimiento del micelio del hongo.

#### **4.5. Pretratamientos**

Las muestras de corteza de banano después del proceso de secado fueron sometidas a 3 tipos de pretratamientos.

**MOLIENDA:** Se llevo a cabo en un molino de compresión de dos rodillos (molino de mano). Luego las muestras fueron tamizadas hasta obtener un tamaño de partícula de 0.500 um. Esta materia prima fue sometida a luz UV por 8 horas

**TROCEADO:** Las muestras secas se cortaron con una tijera estéril hasta obtener un tamaño promedio de 5 mm y luego fueron esterilizadas con luz UV durante 8 horas.

**HIDROTÉRMICO:** Las muestras fueron sometidas a presión de vapor utilizando un autoclave a 121 °C/20min y despresurizando rápidamente para debilitar la fibras lignocelulósicas las muestras y facilitar el acceso a las enzimas.

#### **4.6. Fermentación**

Se realiza en matraces de 250ml, que contiene 100ml de medio basal el cual se suplementa con las concentraciones de sustrato establecidas: 1%, 5%,10% de cáscara de banano, esto se realiza para cada pretratamiento (troceado, molienda e hidrotérmico), y para cada hongo escogido para la experimentación. En los medios estériles se inocula un disco de agar impregnado con micelio de 1 cm de  $\Phi$ , se incuba a T de 30°C con agitación constante a 125 rpm. A partir de las primeras 24 horas se toman muestras del fermentado para determinar la actividad enzimática y de glucosa respectivamente y se repite esta operación cada día.

## **4.7. Evaluación Cuantitativa de Enzimas Ligninolíticas**

Para evaluar cuantitativamente la actividad ligninolítica se aplica el respectivo protocolo para cada enzima: Lignina peroxidasa (GRANDA R., Diana *et al* 2005), y Lacasa (Tinóco *et al.* 2001), que se leen por espectrofotometría UV/VIS a la longitud de onda indicada y el resultado se expresa como actividad enzimática.

### **4.7.1. Determinación de la actividad de Lignina peroxidasa.**

Se realiza a 310 nm, por 5 minutos. Se lee aumento de abs a 310 nm.

Volumen total en la cubeta: 900  $\mu$ L

- Buffer tartrato de sodio 0.150 M, pH 3, 30°C: 750  $\mu$ L, varía según volumen de medio extracelular tomado.
- Medio extracelular: entre 15 - 50  $\mu$ L
- Sustrato: alcohol veratrílico 10 mM: 50  $\mu$ L
- Medio extracelular entre 15 – 50  $\mu$ L
- Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%): 50  $\mu$ L.

Las unidades de actividad para la LiP se definen como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1  $\mu$ mol de alcohol veratrílico por minuto.(GRANDA R., Diana *et al* 2005)

### **4.7.2 Determinación de la actividad Lacasa**

Se tomaron 800  $\mu$ l del extracto enzimático en tubos de ensayo y se adicionaron a cada tubo 100  $\mu$ l de 2,2 azinobis, 3 etil-benzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) 0.5 mM y 100  $\mu$ l de una solución amortiguadora de acetato de sodio pH 4.5; utilizando como blanco agua desionizada en lugar de ABTS.

Finalmente, se leyó la absorción a 420 nm ( $\epsilon_{420}$  36000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Una unidad de lacasa es definida como un micromol de ABTS oxidado por minuto (Tinoco *et al.* 2001). Leer incremento de abs en 2 minutos a 420 nm. Vira a verdoso. El blanco es el reactivo solo.

Cuantificación de las enzimas: Determinado según bibliografía.

$$[\text{concentración}] = \frac{\Delta \text{Abs} \times 1000 \times V_T \times c}{\epsilon \times V_m} = Y \text{ (U/L} \times \text{min}^{-1}\text{)}$$

Donde:

$\Delta \text{Abs}$ : Variación de la absorbancia en los dos minutos (min<sup>-1</sup>)

$V_T$ : Volumen total de la solución (ml)

$V_m$ : Volumen de la muestra

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar, donde:

$\epsilon_{590} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (lacasa)

$\epsilon_{310} = 9333 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (de veratryl alcohol, para ligninperoxidasa)

1000: factor de conversión de moles a  $\mu$ moles

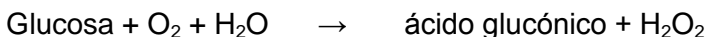
$c$ : Distancia de la cubeta por donde pasa el haz luminoso (1 cm)

Kaplan, L. 1998. Química Clínica. Técnicas de Laboratorio-Fisiopatología-Métodos de análisis. Editorial Panamericana. Argentina. Pp.1118-1120.  
Soler, C. 2000. Final Report. Stork. Wageningen. Pp. 10-20

## 4.8. Cuantificación de glucosa

Para determinar la presencia de glucosa se hizo por medio del método enzimático. Este método se basa en lo siguiente: el agua oxigenada en presencia de la enzima peroxidasa produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona dando lugar a la formación de un cromógeno rojo cereza con absorbancia máxima de 505 nm. (www.wiener-lab.com.ar), (Vázquez Rafael. 2005).

El esquema de reacción es el siguiente:



Para la determinación de glucosa se utilizan 3 tubos de reacción: B (Blanco), S (estándar) y D (desconocido).

### 4.8.1 Reactivos:

Solución estándar: glucosa 1 g/l

Reactivo de trabajo: glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa (POD), 4 – aminofenazona (4 – AF) y buffer fosfato pH: 7.0.

## 5. Resultados

Una vez realizado todos los ensayos cualitativos y cuantitativos bajo los parámetros establecidos para esta investigación los datos obtenidos fueron ordenados para su análisis estadístico utilizando en programa Xlstat-Pro versión 7.5.2. Se rechaza la hipótesis Ho: 1 se rechaza, la hipótesis Ho: 2, 2.1 se acepta y la hipótesis Ho: 3 se acepta.

### **HIPÓTESIS**

#### Hipótesis 1

Ho: El pretratamiento aplicado no influye en el rendimiento de glucosa

#### Hipótesis 2

Ho: la concentración de sustrato no influye en la producción de enzima Lacasa

#### Hipótesis 2.1

Ho: La concentración de sustrato no influye en la producción de enzima Lignina Peroxidasa

#### Hipótesis 3

Ho. Las especies fúngicas no poseen la misma capacidad de degradación sobre la cáscara de banano.

Del total de muestras recogidas en los cultivos bananeros de la provincia del Oro, se obtuvo 90 aislamientos fúngicos.

Dentro del tamizaje enzimático cualitativo aplicado al total de los hongos muestreados se escogieron 3 hongos (70M, 110M , 138M) para realizar nuestro estudio ya que presentan resultados positivos para las diferentes tipos de enzimas analizadas, ver tabla N° 3. Teniendo en cuenta que la cáscara de banano verde presenta biomoléculas como almidón y lignina se escogió hongos que degraden estos

polímeros ya que pueden aportar a la sinergia del proceso degradativo de carbohidratos produciendo mas de una enzima de interés.

**Tabla N° 3. Actividad Enzimática**

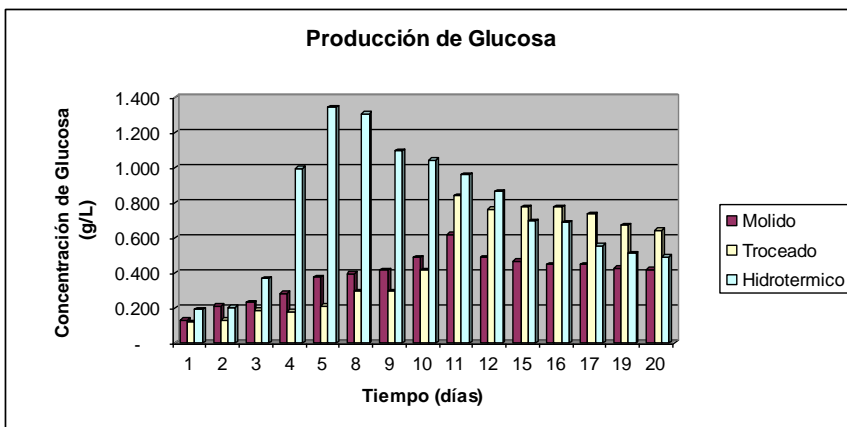
| <b>HONGO</b> | <b>ACTIVIDAD POSITIVA</b>                 |
|--------------|---|
| 70M          | amilolítica y celulolítica                |
| 110M         | amilolítica y pectinolítica               |
| 138M         | Celulolítica, ligninolítica y amilolítica |

Fuente: "Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de pulpa de banano"

Elaboración: Patricia Ruiz

## 5.1. Producción de Glucosa

Grafico N° 4. Producción de Glucosa



La mayor concentración de glucosa se obtuvo en el pretratamiento hidrotérmico con 1.346 g/L a los 5 días de fermentación (Grafico N° 4)

## 5.2. Prueba de comparaciones múltiples para la variable pretratamiento (Glucosa)

**Tabla N° 4. Análisis de diferencias entre pretratamientos con un intervalo de confianza de 95.00% Prueba Duncan**

| Contraste                       | Diferencia | Diferencia estandarizada | Valor crítico | Pr > Dif | Significativo |
|---------------------------------|------------|--------------------------|---------------|----------|---------------|
| <b>Hidrotérmico vs Molido</b>   | 0.475      | 8.907                    | 2.403         | < 0.0001 | Si            |
| <b>Hidrotérmico vs Troceado</b> | 0.434      | 8.132                    | 2.306         | < 0.0001 | Si            |
| <b>Troceado vs Molido</b>       | 0.041      | 0.775                    | 2.306         | 0.461    | No            |

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: El autor



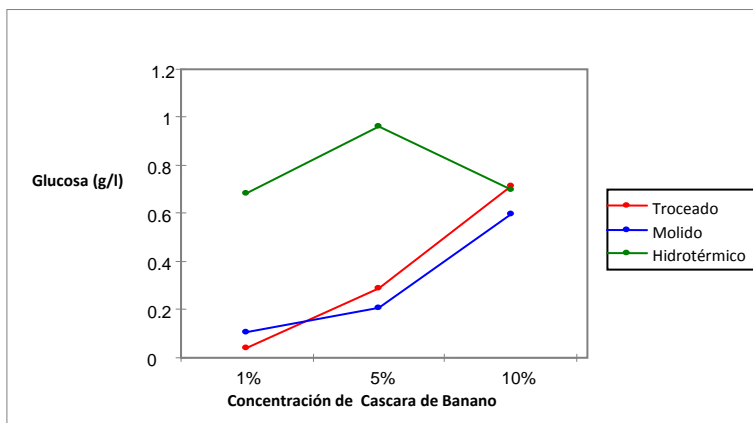
**Tabla 5. Ordenación y agrupamiento de los grupos no significativamente diferentes:**

| <b>Categoría</b>    | <b>Media<br/>estimada</b> | <b>Grupos</b> |
|---------------------|---------------------------|---------------|
| <b>Hidrotérmico</b> | 0.781                     | A             |
| <b>Troceado</b>     | 0.347                     | B             |
| <b>Molido</b>       | 0.306                     | B             |

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: El autor

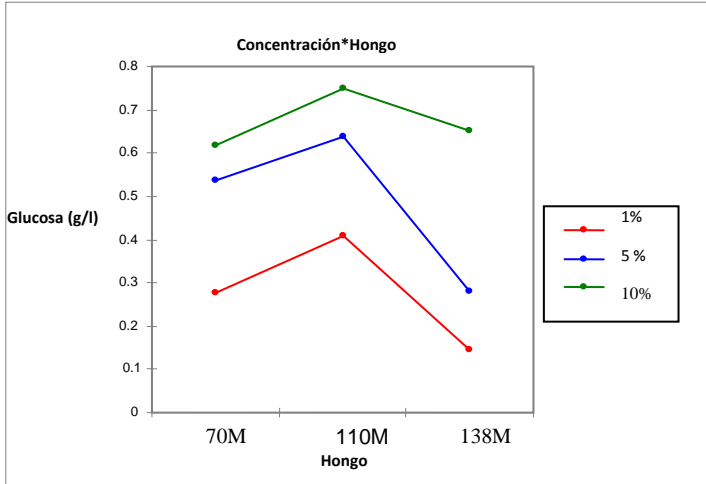
Al aplicar la prueba Duncan con un intervalo de confianza del 95% para establecer la diferencia que existe en el pretratamiento aplicado a la cáscara de banano para la producción de glucosa, se puede apreciar que si existe diferencia significativa entre hidrotérmico/troceado e hidrotérmico/molienda; pero no existe diferencia significativa entre troceado/molienda. El pretratamiento aplicado a la cáscara de banano si influye en el rendimiento de glucosa obtenido, por lo tanto la hipótesis nula ( $H_0$ ) planteada se rechaza.

**Grafico N° 5. Concentración de Glucosa: Pretratamiento frente Concentración de Sustrato**



En el grafico N° 5, denota una mayor producción de glucosa para el pretratamiento hidrotérmico alcanzando su mayor rendimiento a la concentración del 5 % de sustrato.

**Grafico N° 6. Concentración de Glucosa: Hongo frente Concentración de Sustrato**



El hongo de mayor producción de glucosa fue el hongo 110M (grafico N° 6) por arriba de la producción del hongo 70M y 138M. Así mismo la concentración 10% presenta mejores resultados que las concentraciones del 1 y 5% con respecto a los tres hongos utilizados.

### 5.3. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable Hongo (producción enzimática)

**Tabla Nº 6. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable Hongo (producción enzimática)**

| Contraste           | Diferencia |               | Valor crítico | Pr > Dif | Significativo |
|---------------------|------------|---------------|---------------|----------|---------------|
|                     | Diferencia | estandarizada |               |          |               |
| <b>110M vs 138M</b> | 0.240      | 4.490         | 2.403         | 0.005    | Si            |
| <b>110M vs 70M</b>  | 0.120      | 2.253         | 2.306         | 0.054    | No            |
| <b>70M vs 138M</b>  | 0.119      | 2.237         | 2.306         | 0.056    | No            |

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: El autor

**Tabla Nº 7. Ordenación y agrupamiento de los grupos no significativamente diferentes**

| Categoría   | Media    | Grupos |   |
|-------------|----------|--------|---|
|             | estimada |        |   |
| <b>110M</b> | 0.598    | A      |   |
| <b>70M</b>  | 0.478    | A      | B |
| <b>138M</b> | 0.358    | B      |   |

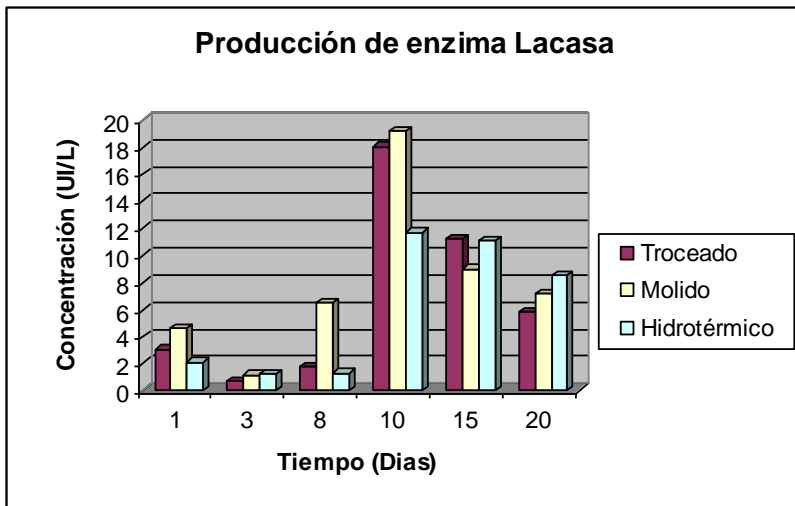
Fuente: Datos experimentales

Elaboración: El autor

Utilizando la prueba Duncan y con un intervalo de confianza del 95% para establecer si las tres especies fúngicas poseen el mismo nivel de degradación de cáscara, se determino que existe diferencia significativa entre el hongo 110M y 138M, así mismo se estable que no existe diferencia significativa entre los hongos 110M/70M y 70M/138M, siendo una de las tres especies significativamente diferente se acepta la hipótesis Ho: 3 planteada al no poseer el mismo nivel de degradación de cáscara de banano.

## 5.4. Producción de Lacasa

Grafico N° 7. Producción de Lacasa



El mejor resultado de actividad de enzima Lacasa se obtuvo con el pretratamiento Molido alcanzando una producción de 19.201 UI/L con el hongo 138M a una concentración del 10% de sustrato. Los mejores resultados de producción para los tres pretratamientos se detallan a continuación:

Tabla N° 8. Mejores Resultados enzima Lacasa

| Tratamientos     | Día de Fermentación | Lacasa (UI/L) |
|------------------|---------------------|---------------|
| <b>M-10-138M</b> | 10                  | 19.201        |
| <b>T-10-70M</b>  | 10                  | 18.021        |
| <b>H-10-70M</b>  | 10                  | 11.701        |

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: El autor

### 5.4.1 Pruebas de comparaciones múltiples para la variable Concentración de Sustrato (producción de lacasa)

**Tabla N° 9. Análisis de diferencias entre concentración de cáscara de banano para la producción enzimática con un intervalo de confianza de 95.00% Prueba Duncan**

| Contraste | Diferencia | Diferencia estandarizada | Valor crítico | Pr > Dif | Significativo |
|-----------|------------|--------------------------|---------------|----------|---------------|
| 10% vs 5% | 2.570      | 1.677                    | 2.403         | 0.271    | No            |
| 10% vs 1% | 1.775      | 1.158                    | 2.306         | 0.280    | No            |
| 1% vs 5%  | 0.795      | 0.518                    | 2.306         | 0.618    | No            |

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: El autor

**Tabla N° 10. Ordenación y agrupamiento de los grupos no significativamente diferentes**

| Categoría | Media estimada | Grupos |
|-----------|----------------|--------|
| 10%       | 13.145         | A      |
| 1%        | 11.370         | A      |
| 5%        | 10.575         | A      |

Fuente: Datos experimentales

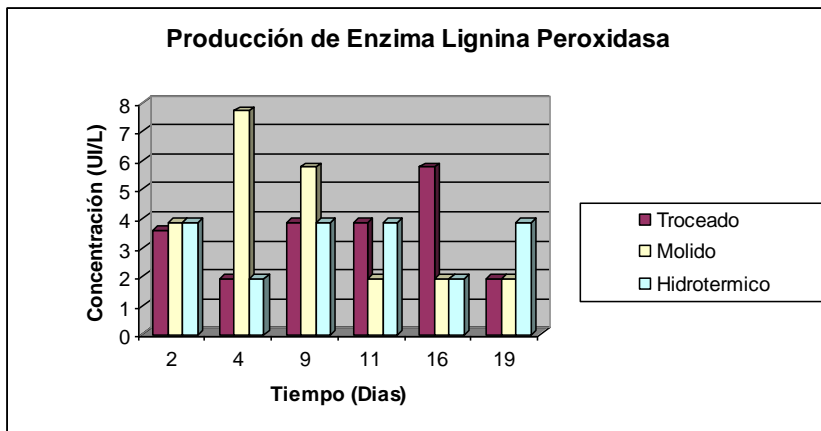
Elaboración: El autor

En la tabla N° 10 se observa que no existe una diferencia significativa en la producción de enzima Lacasa en función a la concentración de sustrato (1-5-10%).

La hipótesis nula  $H_0$  planteada se acepta, ya que la concentración de sustrato no influye en la producción de enzima Lacasa.

## 5.5. Producción de Lignina peroxidasa

**Gráfico N° 8. Producción de Lignina Peroxidasa**



El mejor resultado se obtuvo con el pretratamiento Molienda 7.715 UI/L a una concentración del 1% con el hongo 110M al cuarto día de fermentación tendiendo a la baja con el pasar de los días. Los mejores resultados para enzima Lignina peroxidasa se presentan a continuación:

**Tabla N° 11. Mejores resultados Lignina peroxidasa**

| Tratamientos     | Día de Fermentación | Lignina peroxidasa (UI/L) |
|------------------|---------------------|---------------------------|
| <b>T-1%-110M</b> | 4                   | 7.715                     |
| <b>M-1%-138M</b> | 16                  | 5.786                     |
| <b>H-1%-138M</b> | 11                  | 3.857                     |

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: El autor

### 5.5.1. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable Concentración de Sustrato (producción de Lignina Peroxidasa)

Tabla Nº 12. Análisis de diferencias entre concentración de cáscara de banano para la producción enzimática con un intervalo de confianza de 95.00% Prueba Duncan

| Contraste | Diferencia | Diferencia estandarizada | Valor crítico | Pr > Dif | Significativo |
|-----------|------------|--------------------------|---------------|----------|---------------|
| 10% vs 1% | 0.213      | 0.291                    | 2.403         | 0.955    | No            |
| 10% vs 5% | 0.000      | 0.000                    | 2.306         | 1.000    | No            |
| 5% vs 1%  | 0.213      | 0.291                    | 2.306         | 0.778    | No            |

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: El autor

**Tabla Nº 13.** Ordenación y agrupamiento de los grupos no significativamente diferentes

| Categoría | Media estimada | Grupos |
|-----------|----------------|--------|
| 10%       | 5.572          | A      |
| 5%        | 5.572          | A      |
| 1%        | 5.358          | A      |

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: El autor

Como se puede observar en los cuadros anteriores los resultados obtenidos en cuanto a la producción de enzima Lignina peroxidasa no establecen una diferencia significativa entre las 3 concentraciones utilizadas 1, 5 y 10% por lo tanto aceptamos la hipótesis nula  $H_0$  ya que la concentración de sustrato no influye en la producción de enzima Lignina peroxidasa.



Se determino parámetros antes y después de la fermentación para evaluar la cantidad de biomasa degradada obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla Nº 14. Celulosa Degradada**

| PARÁMETRO A EVALUAR      | VALOR ANTES DE LA FERMENTACIÓN | VALOR DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN | % de Degradación | Tratamiento |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------|-------------|
| % de celulosa en cascara | 79%                            | 40.33%                           | 49.59            | (H-5%-138M) |
|                          |                                | 45.00%                           | 43.48            | (H-10%-70M) |
|                          |                                | 46.33%                           | 42.08            | (H-10%110M) |

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: El autor

El mayor porcentaje de celulosa degradada después de los 20 días de fermentación alcanza 49.59% para el hongo 138M. Los hongos 70M y 110M reportan una degradación 43.48%, 42.08% respectivamente todos estos resultados obtenidos con el pretratamiento hidrotérmico que fue el mejor en cuanto al rendimiento enzimático.

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- La cantidad de glucosa obtenida de 1.346 g/L es baja, valor que se puede dar por que el hongo esta usando la glucosa producida como fuente de carbono y energía (Mera, I. Carrera, J. 2005).
- Al utilizar cáscara de banano como sustrato adicionado al medio basal y realizar lecturas de actividad Lacasa el mejor resultado obtenido fue de 19.201 UI/L que es inferior al de otros reportes de actividad utilizando sustratos diferentes como viruta de roble 100 UI/L (Hatvani N. y Imre M. 2001) y pulpa de café 34.6 UI/L (Murrieta D. 2002) cabe señalar que para estos estudios se utilizaron métodos de hidrólisis ácida e hidratación respectivamente antes de la fermentación, lo que puede explicar la diferencia de valores.
- La LiP se diferencia de otras peroxidasas por su alto potencial de oxido-reducción, lo que le permite oxidar directamente compuestos aromáticos no fenólicos, y por tanto, la mayor parte de las unidades de lignina. (Rodríguez R. Francisco. 2006.) La actividad de Lignina peroxidasa fue de 7.715 UI/L que es inferior al de otros reportes donde se detecto actividad LiP de hasta 50 UI/L secretada por *Phanerochaete chrysosporium* (Khiyami M. A. et al 2006) y 29.2 UI/L usando el mismo hongo (Jiménez. T, et al 1999)
- A pesar de los bajos resultados obtenidos de actividad Lac y LiP se logró degradar un 49.60 % de la celulosa total presente en la cáscara de banano al final de la fermentación; cantidad superior al de otros reportes donde la degradación de celulosa alcanza un 25.5% para mezclas de residuales azucareros con *P. ostreatus* (Escalona, L. et al 2005) y un 20 % para hojarasca de *Nothofagus pumilio* con microhongos endófitos. (Valenzuela. E,

et al 2001). Esto nos permite iniciar con procedimientos de sacarificación y fermentación simultánea debido a la considerable cantidad de celulosa degradada. La SFS es un proceso en la que intervienen los microorganismos fermentadores junto con las enzimas reduciendo la inhibición por producto final, obteniéndose mayores rendimientos que el proceso de hidrólisis y fermentación separada (Ballesteros, M. Oliva, J. 2003)

- Por su estructura compleja y heterogénea, la degradación de la fibra por hongos requiere de un sistema enzimático, en el que las polisacaridasas (xilanasas y celulasas) actúen en conjunto con las enzimas ligninolíticas (Eichlerová *et al.*, 2000). En nuestro trabajo se obtuvo cantidades bajas de actividad enzimática tanto para lacasa y lignina peroxidasa lo que a su vez pudo haber originado que otros complejos enzimáticos (celulolíticos y amilolíticos) presenten una baja actividad en las condiciones de trabajo aquí aplicadas las cuales no fueron estudiadas en este trabajo.
- Cabe señalar que tanto Lacasa y Lignina peroxidasa producidas por muchos hongos de pudrición blanca atacan directamente a la lignina que esta unida por diferentes enlaces carbono-carbono y éter entre monómeros de unidades fenilpropano, rompiendo estos enlaces con reacciones oxidativas además de separar algunos grupos funcionales. (Higuchi, 1990). Posiblemente al aplicar los pretratamientos con la finalidad de debilitar las fibras la cáscara de banano para tener un mejor acceso del ataque fúngico-enzimático para acceder a la celulosa y degradarla; no se logro romper los diferentes enlaces que unen el polímero de lignina pudiendo ser esto causa para la baja producción enzimática.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El análisis de resultados realizado luego del proceso de experimentación permite concluir lo siguiente:

- Se obtuvo 90 aislamientos fúngicos del muestreo microbiológico realizado en los cultivos bananeros.
- Se determinó cualitativamente la actividad ligninolítica y celulolítica de las 90 especies aisladas, se escogió tres especies que presentaron buenas características de crecimiento y resultados positivos para dicha actividad.
- El pretratamiento Hidrotérmico se ha conseguido un mayor rendimiento de glucosa obtenida.
- La mejor actividad para enzima Lacasa se obtiene con el pretratamiento Molienda con un valor de 19.201 UI/L con el hongo 138M
- La mejor actividad para enzima Lignina peroxidasa se obtiene con el pretratamiento Molienda con un valor de 7.715 UI/L con el hongo 110M
- Las tres diferentes concentraciones de sustrato (cáscara de banano) utilizadas producen resultados no significativamente diferentes sobre la actividad enzimática.
- Se determinó que la cepa de mayor productividad es 110M

## Recomendaciones

- Adoptar una técnica de sacarificación y fermentación simultánea que comprende 4 pasos fundamentales: pretratamiento de la materia prima, producción de enzimas, hidrólisis y fermentación; ya que esta técnica permite obtener mejores rendimientos de producto obtenido.
- Buscar nuevas técnicas (hidrólisis acida, adición de agentes químicos solubilizantes) para pretratar el material Lignocelulósico y así separar de forma mas eficiente las moléculas de interés y comparar rendimientos con los tratamiento usados en el presente trabajo
- Buscar nuevos sustratos tomando la cantidad de biomasa producida y su riqueza en polisacáridos de interés para permitir nuevos desarrollos en el conocimiento científico.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R.; KENT, T. 1997. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, "Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of wood". Vol 57: 159-195.
2. Alconada, T. 1992. Enzimas de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas superiores. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires.
3. Baig M.M.V; Baig M.L.B; Baig M.I.A; Yasmien M 2004. Saccharification of Banana agro-waste by cellulolytic enzymes. African journal of Biotechnology Vol 3, 447-450.
4. Cunningham, R. López, G. 1994. Etanol de Lignocelulósicos. Universidad de Santiago de Compostela.
5. CULLEN, D. 1997. *Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. J Biotech. 53: 273-289.*
6. Davila; Vasquez R 2001. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Instituto de Biotecnología UNAM
7. Ferreira N. Patricia. 2004. Estudios de Estructura-Función sobre la enzima Aril-Alcohol-Oxidasa implicada en la degradación de lignina. Universidad de Alcalá. Facultad de Ciencias

8. Forchiassin. F; magnell. P; Diorio. L; Mercuri. O. 1999 Manual de procedimientos. Segunda Edición. Laboratorio de Micología Experimental Universidad de Buenos Aires. Argentina
9. García de la Rosa, J. 2002. Phytophthora infestans: Patógeno o Saprófito. División Agrícola. Pfizer, México.
10. González Arzola K. y Falcón Sanabria M. A. 2003. Propiedades físico-químicas y cinéticas de la enzima lacasa inmovilizada de *Fusarium proliferatum*. Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna.
11. GRANDA R., Diana M., MEJIA G., Amanda I. y JIMENEZ T., Gloria A. UTILIZACIÓN DE RESIDUOS DE PLÁTANO PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON EL HONGO *Lentinus crinitus*. *Vitae*, jul./dic. 2005, vol.12, no.2, p.13-20. ISSN 0121-4004.
12. Hatvani Norá, Mecs Imre. 2001. Producción of Lacasse and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. Institute for Biotechnology. Hungary.
13. HIGUCHI, T. 1990. Lignin biochemistry: Biosíntesis and biodegradation. *Word Sci. Technol.* 24: 23-63.

14. Izco, J., E. Barreno, M. Brugués, M. Costa, J. Devesa, F. Fernández, T. Gallardo, X. Llimona, E. Salvo, S. Talavera y B. Valdés 1997.- Los Hongos en: Botánica Edit. McGraw Hill. p. 241-340.
15. J, Ly. 2004. BANANAS Y PLATANOS PARA ALIMENTAR CERDOS: ASPECTOS DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LAS FRUTAS Y DE SU PALATABILIDAD Instituto de Investigaciones Porcinas. La Habana, Cuba. Vol 11 pp 5-12G
16. Jimenez. T, Mejía. G, y López O. 1999. Actividad de Enzimas Ligninolíticas del *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de Mn<sup>+2</sup>. Rev. Acad.Colombia Ciencia 587-594 pp ISSN-0370.
17. Kirk, T.K. y Cullen, D. (1998) Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Ja: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. (Eds.: Young,R.A. y Akhtar,M.), TAPPI Press, Atlanta, pp. 273-308
18. Khiyami, A. Pometto, A. Kennedy, W. 2006. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in plastic composite support biofilm stirred tank bioreactors.
19. Krishna, Ch. 1998. Production of bacterial cellulases by state bioprocessing of banana wastes. *BioresourceTechnology*. 69,231-239
20. Martín, C. Gonzáles, A y Blanco, M. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados:



contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos de biorrecuperación. Departamento de Microbiología molecular. Madrid –España

21. Meza Juan Carlos et al (2004). Lacasse Producción by pycnoporus cinnabarinus grown on sugar-cane bagasse: Influence of etanol vapours as inducer. Unite Biotechnologie Agro-Industrielle de Marsielle

22. Monsalve J. Medina V. Ruiz Ángela 2006. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y almidón de yuca Universidad de Colombia pp. 21-27

23. Ovando, SL; Waliszewski, K. 2005 Preparativos de celulosas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y Ciencia. Tropico Humedo 21, 111-120.

24. PAPINUTTI V. et al. (2003). Degradación de madera de Álamo por formes sclerodermus: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de Álamo y Cedro. Laboratorio de Micología Experimental. Departamento de biodiversidad y Biología Experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

25. Rhodes, A. Fletcher, D. Principios de Microbiología Industrial, editorial Acriba

26. Rafael Vázquez Duhalt. Destoxificación de contaminantes por actividad peroxidásica. Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos.

27. Ramírez, P.; Cocha J. Maria. 2003. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica
28. Reina A. Monte Carmen. Salvador A. 2004. Nuevo complejo enzimático amilolítico hipertermorresistente del plátano macho (*Musa paradisiaca*)"
29. Rodríguez R. Francisco.2006. ANALISIS MOLECULAR DE LA LACASA DE *Phanerochaete flavido-alva*: Caraterizacion del Gen y regulación por fenoles y metales. Universidad de Granada, Facultad de Farmacia
30. ROLDAN-CARRILLO, Teresa G, RODRIGUEZ-VAZQUEZ, Refugio, VAZQUEZ-TORRES, Humberto *et al.* REMOCIÓN DE ESTIRENO POR *Phanerochaete chrysosporium* EN CULTIVO LÍQUIDO. *INCI*, dic. 2001, vol.26, no.12, p.611-614. ISSN 0378-1844.
31. Saenz Peña 2005, Facultad de ciencias agrarias Universidad Nacional del Nordeste
32. Tinoco, R., Pickard, M.A. y Vazquez-Duhalt, R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 331-335.
33. Thurston, C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.

34. VALERO F. 1998. Ingeniería Bioquímica. Departamento de Ingeniería Química

35. VALENZUELA, EDUARDO; LEIVA, SERGIO y GODOY, ROBERTO. Variación estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de hojarasca de *Nothofagus pumilio*. *Rev. chil. hist. nat.* [online]. 2001, vol. 74, no. 4.