

# INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE UNA FUENTE DE NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE LIGNINASAS

## INFLUENCE THE ADDITION OF NITROGEN SOURCE ON PRODUCTION OF LIGNINASES

## INFLUENÇA DA ADIÇÃO DE UMA FONTE DE NITRÔGENIO NA PRODUÇÃO DE LIGNINASE

LINA MARCELA GIL<sup>1</sup>, KATHERINE MANJARRES-PINZON<sup>2</sup>, YINETH PIÑEROS-CASTRO<sup>3</sup>,  
EDUARDO RODRIGUEZ-SANDOVAL<sup>4</sup>

### RESUMEN

*Durante el proceso de extracción de aceite de palma se producen grandes cantidades de residuos ricos en lignina y hemicelulosa denominados "raquis", los cuales fueron un buen sustrato para el crecimiento del hongo Pleurotus ostreatus en fase sólida durante 10 días de fermentación y a una temperatura de 28°C. Este trabajo se enfoco en evaluar la actividad enzimática de la lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa a partir del cultivo de Pleurotus ostreatus sobre residuos de palma modificando las condiciones de tamaño de partícula del sustrato (2, 3 y 4 cm) y la fuente de nitrógeno (NH<sub>4</sub>Cl y KNO<sub>3</sub>). La actividad de la lignina peroxidasa fue casi nula en el sustrato sin suplemento. Por otro lado, las mejores condiciones encontradas para la producción de lacasa (7,42 U/L) fue en cultivo sin*

**Recibido para evaluación:** 21/08/2011. **Aprobado para publicación:** 22/03/2012

- 1 Ingeniera de Alimentos. Programa de Ingeniería de Alimentos. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. Colombia.
- 2 Ingeniera de Alimentos. Candidata Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Docente Auxiliar. Escuela de Ingeniería de Alimentos. Facultad de Ingeniería. Universidad del Valle. Cali. Valle del Cauca. Colombia.
- 3 Ingeniera Química. Magister en Ingeniería Química. Doctora en Ingeniería. Profesora Asociada. Departamento de Ingeniería. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia.
4. Ingeniero Químico. Doctor en Ingeniería. Profesor Asociado. Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Núcleo el Volador. Medellín. Antioquia.:

**Correspondencia:** edrodriguez@unal.edu.co

suplemento con tamaño de partícula de 3cm, y para manganeso peroxidasa (20,29 U/L) fue en el cultivo suplementado con nitrato de amonio ( $NH_4Cl$ ) en una relación de carbono/nitrógeno de 20 y un tamaño de partícula de 3cm.

## ABSTRACT

Large amounts of waste rich in lignin and hemicelullose named empty fruit brunch or "raquis" are produced during palm oil extraction process in Colombia. These waste products were a good substrate for growing of *Pleurotus ostreatus* in solid phase during 10 days of fermentation at 28°C. The aim of this study was to evaluate the enzymatic activity of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase from the culture of *Pleurotus ostreatus* on the empty fruit brunch of palm oil with different particle size (2, 3 and 4 cm) and nitrogen source ( $NH_4Cl$  and  $KNO_3$ ). The activity of lignin peroxidase was not detected in the substrate without supplement. On the other hand, the better conditions for laccase activity (7,42 U/L) was in the substrate without supplement and with particle size of 3 cm, and for manganese peroxidase (20,29 U/L) was in the substrate supplemented with ammonium chloride ( $NH_4Cl$ ) in carbon/nitrogen ratio of 20 and with particle size of 3 cm

## RESUMO

Durante o processo de extração de óleo de palma são produzidas grandes quantidades de resíduos que são ricos em lignina e hemicelulose, os quais foram um bom substrato para o crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* na fermentação durante 10 dias a uma temperatura de 28 ° C na fase sólida. Este trabalho concentrou-se em avaliar a atividade enzimática da lacase, manganeso peroxidase e lignina peroxidase de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de palma de óleo mudando as condições do tamanho das partículas do substrato (2, 3 e 4 cm) e fonte de nitrogênio ( $NH_4Cl$  e  $KNO_3$ ). Os resultados mostraram que a atividade da peroxidase lignina foi quase zero no substrato sem adição de suplemento. Para a produção de lacase (7,42 U/L) a melhor condição foi encontrada para um tamanho de partícula de três centímetros sem adição de suplemento, e para manganeso peroxidase (20,29 U/L) a melhor condição é para uma cultura com nitrato de amônio ( $NH_4Cl$ ) em uma relação C/N de 20 e um tamanho de partícula de 3 cm.

## PALABRAS CLAVES:

*Pleurotus ostreatus*, Lignina, Lacasa, Resíduos de palma.

## KEYWORDS:

*Pleurotus ostreatus*, Lignin, Lacasse, Palm oil wastes.

## PALAVRAS CHAVE:

*Pleurotus ostreatus*, Lignina, Lacase, Resíduos de palma

## INTRODUCCIÓN

La expansión global de la agricultura y de la industria alimentaria ha hecho que se incremente la obtención de residuos lignocelulósicos. Estos materiales se componen básicamente por celulosa, hemicelulosa y lignina y son conocidos por ser excelentes sustratos para la producción de enzimas ligninocelulolíticas. Estas enzimas extracelulares son generadas del metabolismo de hongos filamentosos, los cuales tienen la capacidad de producirlas y poseen aplicaciones industriales especialmente en la industria de textiles y papel [1].

En la búsqueda de fuentes naturales renovables para la producción de enzimas y biocombustibles se encuentran los residuos derivados de la explotación de la palma de aceite, los cuales se presentan en gran cantidad debido al crecimiento de este cultivo. Colombia durante el 2006 reportó un área sembrada de 303768 ha; con un rendimiento de 3,86 t de aceite.ha<sup>-1</sup>, lo que equivale a una producción de 710407 t de aceite/año [2].

Durante el procesamiento del aceite de palma se generan grandes cantidades de raquis o racimos vacíos (Empty Fruit Brunch o EFB), ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos residuos se pueden utilizar como sustratos para el cultivo de hongos filamentosos capaces de producir enzimas extracelulares con actividad lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa [1]. La lignina es un biopolímero hidrofóbico con varias unidades de fenil-propanol entrelazados que constituyen una macromolécula amorfa e insoluble que mantiene fuertemente unida la pared celular [3]. Varios estudios han puesto en evidencia que químicamente la degradación de la lignina implica una serie de cambios oxidativos, que conducen a una progresiva despolimerización y liberación de compuestos de bajo peso molecular hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. El proceso de degradación de la lignina ocurre durante el metabolismo secundario, cuando hay limitación de nutrientes. Los hongos como *Pleurotus osteratus* poseen varios sistemas de enzimas lignocelulósicas esencialmente fenol-oxidasas, las cuales son responsables de la conversión de los polifenoles y permiten degradar grandes polímeros, incluyendo la lignina [3,4].

El hongo *P. ostreatus* es considerado como el segundo hongo comestible más consumido en Europa y pertenece al grupo de hongos denominado de podredumbre blanca. Su complejo enzimático se propone como un posible degradador de compuestos xenobióticos y se conforma principalmente por enzimas oxidativas: Lacasa (Lcc), lignina peroxidasa (LiP), y manganeso peroxidasa (MnP) [5]. Sin embargo, a pesar de ser un hongo de pudrición blanca solo produce 2 de las 3 enzimas del sustrato del complejo enzimático. Según estudios previos, el hongo *P. ostreatus* es capaz de crecer sobre sustratos muy económicos como lo son los residuos agrícolas [6], dentro de los que se incluyen pulpa de café [7], bagazo de caña [8], hojas y cáscaras de plátano [9].

Otro estudio evaluó las condiciones óptimas de pH y temperatura en las cuales el hongo *P. ostreatus* produjo su complejo enzimático con actividad Lcc y MnP, encontrando las mejores condiciones para la actividad Lcc a un pH de 4,6 y una temperatura de 31°C, para MnP a pH 3,5 y 33°C. Asimismo, este trabajo reportó actividades máximas de 463,9 U/L y 47,5 U/L para Lcc y MnP, respectivamente, y se logró degradar lignina en un 43,25% [10].

El propósito de este trabajo fue aprovechar el raquis de palma por medio de rutas biotecnológicas para la producción de enzimas ligninasas a partir del cultivo de *P. ostreatus*, evaluando la influencia del tamaño de partícula del sustrato y la fuente de nitrógeno.

## METODOS

**Microorganism.** La cepa de *Postreatus* utilizada se aisló de un cuerpo fructífero comercial mediante la técnica de resiembra en agar extracto de malta (Agar-Agar Scharlau 07-490, Extracto de Malta Scharlau) al 2% (p/v) a 28°C [6]. La cepa se conservó en agua destilada estéril y se mantuvo a 4°C [11].

**Inóculos.** El hongo se cultivó en agar extracto de malta durante 7 días a 28°C. Los inóculos líquidos se realizaron colocando aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> de micelio cultivado sobre el agar, en 25 mL de medio de cultivo Mijarna, pH 6, con la siguiente composición: 4 g.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,75 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,8 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,06 g.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,5 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,005 g.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05 g.L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,002 g.L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g.L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.2 g.L<sup>-1</sup> extracto de levadura y 10 g.L<sup>-1</sup> glucosa. El montaje se realizó en erlenmeyers de 100 mL, previamente esterilizados. Se incubó a 28° C con agitación orbital a 200 rpm durante 8 días.

**Tratamiento del sustrato "raquis".** Los racimos vacíos o "raquis" se obtuvieron de cultivos de palma localizados en Cumaral –Meta, Colombia, los cuales fueron lavados, desinfectados, secados a 40°C durante 6 días y cortados hasta un tamaño de partícula de 2, 3 y 4 cm. Se caracterizó su contenido de nitrógeno mediante el método de Kjeldahl por NTC 4657 [12], de carbono por el método de Walkley-Black combustión húmeda [13], de humedad y de cenizas [14].

**Suplemento con fuentes de nitrógeno.** El medio de cultivo Mijarna fue suplementado con 2 tipos de fuentes ( $\text{KNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) cada uno con 3 niveles (0, 1 y 2), donde en el nivel cero (0) no participa ninguna fuente de nitrógeno y la relación carbono/nitrógeno (C/N) es igual a 44,13. Los niveles 2 y 3 corresponden a un C/N igual a 40 y 20, respectivamente, para cada una de las fuentes de nitrógeno. Mediante la Ecuación (1) se relacionan los gramos de cada fuente de nitrógeno que se necesita para alcanzar las relaciones planteadas.

$$\frac{C}{N} = \frac{g \text{ C EFB}}{g \text{ N medio sales} + g \text{ N EFB} + g \text{ N}} \quad (\text{Ec.1})$$

Donde,  $g \text{ C EFB}$  son los gramos de carbono que posee los residuos sólidos,  $g \text{ N medio sales}$  son los gramos de nitrógeno en el medio utilizado para el crecimiento del hongo,  $g \text{ N EFB}$  son los gramos de nitrógeno en los EFB

### Cultivo en fase sólida del *Pleurotus ostreatus*

El cultivo en fase sólida se realizó en bolsas de polipropileno esterilizables con capacidad de 250 g con 40 g de sustrato y a una humedad del 66%. A cada bolsa se le adicionaron 38 mL de medio de cultivo Mijarna con un pH de 6 y 30 mL de la fuente de nitrógeno ( $\text{KNO}_3$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) con relaciones de C/N de 20 y 40. Se esterizaron durante 30 min a  $121^\circ\text{C}$ , luego se enfriaron y se les adicionó 25 mL de inóculo. La fermentación se llevó a cabo a  $28^\circ\text{C}$  en oscuridad, durante un tiempo total de 10 días para cada uno de los tratamientos estipulados.

**Análisis enzimáticos.** Para la obtención de los complejos enzimáticos se utilizó buffer de acetato de sodio 0,1M con pH 5 en una cantidad de 20 mL por cada 5 g de sustrato, se agitó vigorosamente y se separaron los sólidos mediante centrifugación a 5000 rpm durante una hora. Se tomaron 10 mL del sobrenadante para medir las siguientes actividades enzimáticas:

**Lacasa:** La determinación de la enzima lacasa (Lcc) se llevó a cabo por la oxidación ABTS [2,2- Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] al catión ABTS+ [15] con un volumen de reacción de 2 mL que

comprende a 200 mL de ABTS 1 mM, 600 mL de buffer acetato de sodio 0,1M, pH 5 y 1200 mL de extracto enzimático. La absorbancia se tomó a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro (Unicam Helios B NC 9432 UVB 1000E, Termo Spectronic, Rochester NY), realizando medidas al inicio de la reacción y tres minutos después, para obtener un delta de absorbancia útil en los cálculos, donde se utilizó un coeficiente de extinción de  $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . [15,16]. Una unidad enzimática se define como 1 mmol de producto formado por minuto ( $U = \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ), bajo las condiciones del ensayo. Las unidades enzimáticas (U/L) de Lcc se calculan utilizando la Ecuación 2. Al obtener la absorbancia se realizan los siguientes cálculos para obtener finalmente las unidades enzimáticas (U/L).

$$Lcc \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{mi} \times L} \right) = \frac{\Delta ABS \times \text{mol} \times \text{cm} \times V_r}{\xi \times V_m \times t} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde,  $\Delta ABS$  es la lectura de absorbancia final - lectura de absorbancia inicial,  $V_r$  es el volumen total de la reacción,  $\xi$  es el coeficiente de extinción que tiene un valor de  $36000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $V_m$  es el volumen de la muestra [17].

**Manganeso peroxidasa:** La determinación de la enzima manganeso peroxidasa (MnP) se realizó por la oxidación del rojo de fenol [18], el cual consiste en adicionar 200  $\mu\text{L}$  de rojo de fenol con concentración de  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 200  $\mu\text{L}$  de lactato de sodio (Sigma) con una concentración de  $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  y pH 4,5, 200  $\mu\text{L}$   $\text{MnSO}_4$  (J.T.Baker) con una concentración de  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 400  $\mu\text{L}$  de albumina de huevo (Panreac) al 0.5% (p/v), 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno (Merck) con una concentración de  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  en buffer de succinato de sodio a pH 4,5 en una concentración de  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Por último, se adicionó 1000  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y se detuvo la reacción a los 5 min con 80  $\mu\text{L}$  NaOH (2N). La temperatura de la reacción fue de  $37^\circ\text{C}$ . La lectura de absorbancia se efectuó a 610 nm después de la reacción en el espectrofotómetro previamente mencionado [6]. Las unidades enzimáticas (U/L) de MnP se calculan empleando la Ecuación 3. .

$$MnP \left( \frac{\mu mol}{min \times L} \right) = \frac{\Delta ABS \times mol \times cm \times Vr}{\xi \times Vm \times t} \quad (Ec.3)$$

Donde,  $\Delta ABS$  es la lectura de absorbancia final - lectura de absorbancia inicial,  $Vr$  es el volumen total de la reacción,  $\xi$  es el coeficiente de extinción que tiene un valor de  $4460 M^{-1} cm^{-1}$  y  $Vm$  es el volumen de la muestra [6].

**Lignina peroxidasa:** La determinación de la enzima lignina peroxidasa (LiP) radicó en la oxidación de  $80 \mu L$  de alcohol veratrílico (Aldrich D-13)  $10mM$  en presencia de  $20 \mu L$  de  $H_2O_2$  (Merck)  $4mM$ ,  $400 \mu L$  de buffer tartrato (Riedel-Dehaen.Seelze-Hannover)  $0,25M$  y  $1500 \mu L$  del extracto enzimático. Esta reacción completó un volumen de  $2 mL$ . La lectura se realizó a  $310 nm$  antes y después de los  $3 min$  de reacción. El blanco para esta medición es la misma proporción de reactivos y de extracto enzimático descritos anteriormente. Sin embargo, los  $20 \mu L$  de  $H_2O_2$  son reemplazados por agua destilada. Las unidades enzimáticas (U/L) de LiP se calculan empleando la Ecuación 4.

$$LiP \left( \frac{\mu mol}{min \times L} \right) = \frac{\Delta ABS \times mol \times cm \times Vr}{\xi \times Vm \times t} \quad (Ec.4)$$

Donde,  $\Delta ABS$  es la lectura de absorbancia final - lectura de absorbancia inicial,  $Vr$  es el volumen total de la reacción,  $\xi$  es el coeficiente de extinción que tiene un valor de  $165 L mmol^{-1} cm^{-1}$  y  $Vm$  es el volumen de la muestra [6].

**Análisis estadístico.** Para el estudio se usó un diseño experimental factorial  $3^3$ . Los factores fueron tamaño de partícula del raquis ( $2, 3$  y  $4 cm$ ) y fuente de nitrógeno con  $KNO_3$  y con  $NH_4Cl$ , cada uno con diferentes relaciones de carbono/nitrógeno (C/N) ( $44,13, 40$  y  $20$ ), tal como se muestra en el Cuadro 1. Se realizó un análisis de varianza simple ANOVA, con un intervalo de confianza del  $95\%$  donde se analizaron las diferencias significativas mediante la prueba de Duncan, utilizando Stagraphics. Las variables de respuesta fueron las actividades enzimáticas lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa del complejo enzimático derivado del cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre EFB de palma de aceite. Los experimentos se realizaron por triplicado.

**Cuadro 1.** Diseño Factorial

Factor	Niveles
Tamaño de partícula	$2 cm (\pm 0,2 mm)$
	$3 cm (\pm 0,2 mm)$
	$4 cm (\pm 0,2 mm)$
Fuente de nitrógeno $KNO_3$	C/N= $44,13$
	C/N= $40$
	C/N= $20$
Fuente de nitrógeno $NH_4Cl$	C/N= $44,13$
	C/N= $40$
	C/N= $20$

## RESULTADOS

**Caracterización de los residuos de palma "raquis".** En el Cuadro 2 se observan los resultados obtenidos en la caracterización de los residuos de palma o "raquis" en base seca. [19] reportaron valores de carbono de  $53\%$ , nitrógeno de  $0,9\%$  y contenido de humedad de  $24\%$ . Los valores de carbono y nitrógeno son muy similares a los reportados en este estudio,  $50,6 \%$  y  $1,12\%$ , respectivamente. Sin embargo, hay una diferencia apreciable con el contenido de humedad ( $65,6\%$ ), lo que puede ser debido a las condiciones de cultivo y de secado del sustrato.

### Influencia del tamaño de partícula.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de la evaluación de los tamaños de partícula ( $2, 3$  y  $4 cm$ ) de los residuos de palma sin suplemento. Las mayores actividades enzimáticas de lacasa (Lcc) y manganeso peroxidasa (MnP) se encuentran con los menores tamaños de "raquis", posiblemente debido a que se aumenta el área expuesta del material lignocelulósico y esto favorece el ataque enzimático. La Figura 1 muestra que en los tres tamaños, los valores de actividad más altos los alcanzó la enzima MnP. Por el contrario la actividad lignina peroxidasa (LiP) fue la más baja a un tamaño de partícula de  $4 cm$  ( $0,788 U/L$ ), resultado similar al reportado por Lopez *et al.* [3], y Reddy *et al.* [9], quienes encontraron valores máximos de actividad para la LiP producida por el hongo *P.ostreatus* de  $0,153 U/mg$ .

**Cuadro 2.** Caracterización de los residuos "raquis"

Determinación	% compuesto*
Carbono	$50,6 \pm 2$
Nitrógeno	$1,12 \pm 0,06$
Humedad	$65,6 \pm 0,73$

**Cuadro 3.** Efecto del tamaño de partícula\*

Tamaño	Lac	Lip	MnP
2	6,08±1,045	0,11±0,026	4,10±1,95
3	7,42± 0,76	-0,96±0,788	10,19±0,056
4	1,79± 0,347	0,78±0,091	5,50±0,502

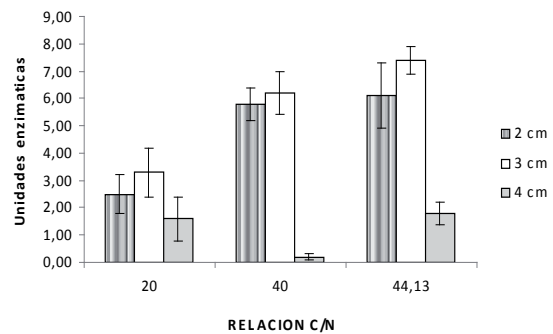
\*Valor promedio±desviación estándar

La producción de MnP y Lcc es mayor que la producción de LiP con *Postreatus*. Baldrian y Snajdr [20] reportaron valores de 22 ±6 U/L para Lcc y de 1,6 ± 0.3 U/L para MnP después de 28 días, confirmando al mismo tiempo que no se encontró actividad de LiP. Este hecho indica que posiblemente el metabolismo de este género de hongos no produce en las condiciones de estudio mayores actividades para la LiP, razón por la cual no se siguió estudiando la influencia de las fuentes de nitrógeno para esta enzima.

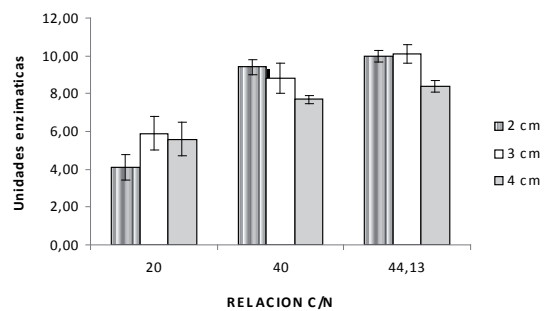
### Influencia de la fuente de nitrógeno.

En la Figura 1 se presentan los valores de las actividades enzimáticas de lacasa (Lcc) y manganoso peroxidasa (MnP) con fuente de nitrógeno KNO<sub>3</sub>. En la Figura 1a se muestra que la actividad Lcc disminuyó con el aumento en la fuente de nitrógeno KNO<sub>3</sub> en las diferentes relaciones C/N. Los tamaños de partícula de 2 y 3 cm se comportaron de forma similar. En este estudio el tamaño de partícula no influye significativamente en la producción de Lcc, lo cual es similar a lo reportado por Salmones *et al.* [7], quienes lograron valores de actividad Lcc con tamaño de 1 cm sobre sustrato de paja de trigo alrededor de 10,12 U/L y para tamaños mayores a 5 cm actividades de 5,4 U/L.

La actividad Lcc en los cultivos suplementados en una relación C/N de 40 no presentan diferencias significativas con los no suplementados (C/N = 44,13). Los resultados indican que esta fuente de nitrógeno no favorece la producción de complejos con actividad Lcc, ni siquiera con bajas concentraciones, ya que no se observa ninguna diferencia importante con los no suplementados y no tienen una tendencia respecto al aumento de la actividad. La Figura 1b muestra la actividad MnP, donde se observa que el tamaño de 3 cm posee la mayor actividad (10,19, 9,14 y 5,86 U/L), aunque su actividad presentó un comportamiento de disminución continua a medida que se suplementaba con la fuente de nitrógeno. Esta situación es parecida a los tamaños de partícula de 2 y 4 cm, ya que también

**Figura 1.** Actividades enzimáticas con fuente de nitrógeno KNO<sub>3</sub> a) Lacasa b) Manganoso peroxidasa

a)

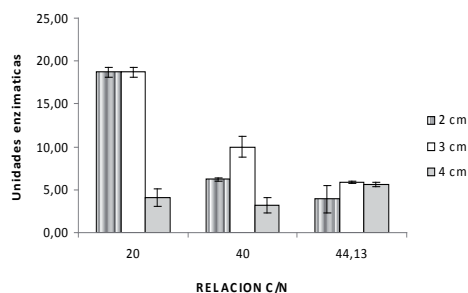
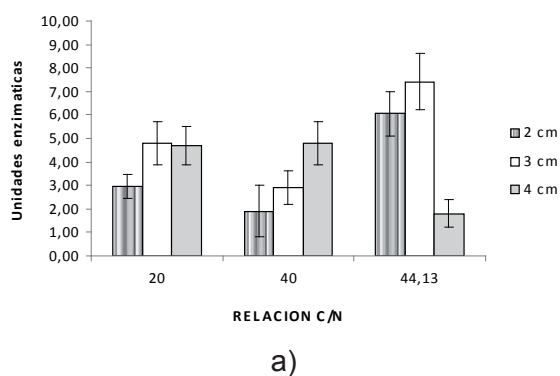


b)

disminuye su actividad. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Mirjana *et al.* [21], con valores cercanos a 8±0,7 U/L en relaciones de C/N igual a 25.

En la Figura 2 se presentan los valores de las actividades enzimáticas de lacasa (Lcc) y manganoso peroxidasa (MnP) con fuente de nitrógeno NH<sub>4</sub>Cl. El comportamiento de la actividad Lcc suplementando con NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno se presenta en la Figura 2a. Los resultados muestran que con los tamaños de 2 y 3 cm, la actividad tiende a disminuir con el suplemento. Caso contrario sucede para el tamaño de 4 cm, donde la actividad aumenta con el suplemento en las relaciones C/N 20 (actividad enzimática igual a 1,40 U/L) y 40 (actividad enzimática igual a 0,20 U/L). Por la menor área superficial, el microorganismo se provee de la fuente de nitrógeno, en este caso NH<sub>4</sub>Cl, para producir sus complejos enzimáticos, ya que con un tamaño de partícula mayor el metabolismo del hongo se le dificulta la degradación del sustrato.

**Figura 2.** Actividades enzimáticas con fuente de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a) Lacasa b) Manganese peroxidasa



b)

La Figura 2b presenta los resultados para actividad MnP suplementando con diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , representadas en diferentes relaciones de C/N. Los tamaños de partícula 2 y 3 cm son muy parecidos, puesto que tiende a aumentar considerablemente su actividad a medida que se aumenta la fuente de nitrógeno; mientras que el tamaño de partícula de 4 cm se mantiene estable en todos los ensayos y su actividad es relativamente baja. Teniendo en cuenta los valores de actividad enzimática obtenidos, se puede afirmar que la actividad MnP es superior en los cultivos que fueron suplementados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20,29 U/L) en comparación con los cultivos suplementados con  $\text{KNO}_3$  (10,19 U/L).

En general el tamaño de 3 cm reportó una actividad enzimática de MnP con valores altos (4,10 a 10,19 U/L) en comparación con Lcc, donde la mayor actividad fue de 7,42 U/L. Este comportamiento es similar al logrado por Valášková y Baldrian [22], quienes estudiaron varios hongos de podredumbre blanca, y encontraron

actividades MnP de  $32,03 \pm 0,70$  U/L y de Lcc de  $3,24 \pm 0,21$  U/L para el *Postreatus*. Esta relación indica que se produce una actividad de MnP 10 veces mayor que la actividad Lcc, por lo tanto, este hongo tiene tendencia a producir enzimas del tipo redox que ayudan a fragmentar más fácilmente el polímero de la lignina.

En este mismo sentido, la fuente de nitrógeno que favorece la actividad Lcc en todos los tamaños de partícula es el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Por el contrario, la fuente de  $\text{KNO}_3$  disminuye esta actividad. Estos resultados fueron semejantes a la evaluación realizada por Mirjana *et al.* [21], afirmando que entre las fuentes de nitrógeno  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , la que mejora la producción de la actividad Lcc para el *Postreatus* es el nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Los valores encontrados para esta fuente a los 10 días de cultivo fueron de 501 U/L para el cultivo suplementado con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y de 307,2 U/L con  $\text{KNO}_3$ . Lo anterior puede suceder porque en el ciclo del nitrógeno los hongos tienen más facilidad de fijar los compuestos derivados del amoníaco (menor energía de enlace) y no los derivados del nitrito que en este caso es el nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) [21].

## CONCLUSIONES

La producción de enzimas ligninasas se realizó en "raquis" de palma utilizando *P. ostreatus* en cultivos de fase sólida. El tamaño que mostró mejores resultados fue de 2 y 3 cm de partícula; sin embargo, este parámetro no fue predominante sobre las variables de respuesta. La actividad lignina peroxidasa a partir de los residuos de palma sin suplemento presentó valores muy bajos comparados con los obtenidos para manganeso peroxidasa y lacasa. La fuente de nitrógeno influye en la producción de enzimas ligninasas. La mayoría de los cultivos suplementados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  obtuvieron mayores actividades que los no suplementados y los suplementados con  $\text{KNO}_3$ . La mejor fuente de nitrógeno para la producción de enzimas lacasa y manganeso peroxidasa fue para el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Los valores más altos de manganeso peroxidasa (20,29 U/L) se encontraron con la relación carbono/nitrógeno (C/N) de 20 y un tamaño de partícula de 3 cm. En el caso de la lacasa, el mayor valor (7,42 U/L) se encontró en la relación C/N de 44,13 y un tamaño de partícula de 3 cm, lo que se puede atribuir al ciclo de nitrógeno del hongo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto 002IA de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

## REFERENCIAS

- [1] PANDEY, A., SELVAKUMAR, P. SOCCOL, C. and NIGAM, C. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77(1), 1999, p. 149-153.
- [2] FEDEPALMA. Boletín Económico Fedepalma. 2007. Disponible en: [www.fedepalma.org](http://www.fedepalma.org). [Consultado Diciembre de 2009]
- [3] LÓPEZ, M.R.L., DEL POSTIGO, A.M., GARCÍA, M.T., PEREZ, R., y ALVAREZ, G. Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaen, Jaen, España, 2001, p. 69-106.
- [4] VARES, T., and HATAKKA, A. Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: effects of manganese and malonate. *Can. J. Bot.* 75(1), 1997, p. 61-71.
- [5] WANG, Y., VAZQUEZ-DUHALT, R., and PICKARD, M.A. Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can. J. Microbiol.* 48(11), 2003, p. 675-682.
- [6] ROSAS, J., y HERRERA, J. Estudio Preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes de la industria papelera. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, Colombia, 2003, p. 24-37.
- [7] SALMONES, D., MATA, G., and WALISZEWSKI, K.N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresour. Technol.*, 96(5), 2005, p. 537-544.
- [8] PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., and SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.*, 74(1), 2000, p. 69-80.
- [9] REDDY, G.V., BABU, R.P., KOMARAIH, P., ROY, K.R., and KOTHARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem.* 38, 2002, p. 1457–1462.
- [10] OSPINA, A. Estudio de la producción de ligninasas a partir del cultivo de *Pleurotus sp.* sobre residuos de palma, efecto del pH y la temperatura. Trabajo de pregrado (Ingeniería de Alimentos). Programa de Ingeniería de Alimentos. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia. 110 p. 2007.
- [11] BUENO, L., y GALLARDO, R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología* 15, 1998, p-166-168.
- [12] ICONTEC. Norma Técnica Colombiana (NTC 4657). Alimento para animales. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo del contenido de proteína cruda. Método Kjeldahl. Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC). Bogotá. 6 p., 1999.
- [13] ALLISON L. Organic soil carbon by reduction of chromic acid. *Soil Sci.* 40 (2), 1965, p. 311-320.
- [14] AOAC "Association of Official Analytical Chemists". Moisture and Ash content. AOAC 926.08, 925.09. Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC. Arlington, VA. 1990.
- [15] BUSWELL, J.A., CAI, Y., and CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letter.* 128(1), 1995, p. 81-88.
- [16] CAVALLAZI, J.R., DE ALMEIDA, M.G., and MEGUMI, K.M.C. Laccase production by *Lepista sordida*. *Braz. J. Microbiol.* 34, 2004, p. 261-263.
- [17] LÓPEZ, C., ESPARZA, J.F., HIDALGO, M., LOREAL, O., y RODRÍGUEZ, R. Producción de la enzima lacasa por el hongo *cladsporiumc cladsporoides* en presencia de fenantreno. VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. Habana, Cuba, 2-6 p., 2005.
- [18] KUWAHARA, M., GLENN, J.K., MORGAN, M.A., and GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – dependent oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Federation of European Biochemical Societies.* 169(2), 1984, p. 247-250.
- [19] BAHARUDDIN, A.S., WAKISAKA, M., SHIRAI, Y., ABD-AZIS, S., ABDUL RAHMAN, N.A., and HASSAN, M.A. Co-composting of empty fruit bunches and partially treated palm oil mill effluents in pilot scale. *Int. J. Agric. Res.* 4(2), 2009, p. 69-78.



- [20] BALDRIAN, P., and SNAJDR, J. Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 2006, p. 1023-1029.
- [21] MIRJANA, S., LIMOR, P., FRIESEM, D., HADAR, Y., SOLOMON, P., NEVO, E., and VUKOJEVIC, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb. Technol.* 38(1-2), 2006, p. 65-73.
- [22] VALÁŠKOVÁ, V. and BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Res. Microbiol.* 157, 2006, p. 119-124.