



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**“EFECTO DE CUATRO EXTRACTOS NATURALES SOBRE EL  
CRECIMIENTO MICELIAL DE *Agaricus bisporus*,  
*Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*”**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Agropecuarias**

**P R E S E N T A**

**Quim. José María Adolfo Barba Chávez**

**COMITÉ TUTORAL**

**Directora**

**Dra. Silvia Denise Peña Betancourt**

**Asesores**

**Dr. Jorge Soriano Santos**

**Dr. Hermilo Leal Lara**

México D. F. Septiembre del 2007

A MI FAMILIA

CON TODO MI AMOR

# INDICE GENERAL

Resumen	06
Introducción	08
1.- Marco teórico	14
1.1.- Uso de materiales y formas de cultivo	14
1.1.1.- <i>Agaricus bisporus</i>	14
1.1.2.- <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
1.1.3.- <i>Lentinula edodes</i>	15
1.2.- Productos de desecho agroindustrial	17
1.2.1.- Desechos de sustrato y composta	17
1.2.2.- Residuos de café	17
1.2.3.- Residuos de madera y corteza de encino	18
1.3.- Enzimas ligninolíticas y lacasas	19
1.3.1.- Estructura de la lacasa	20
1.4.- Propiedades de las lacasa de los hongos	26
2.- Planteamiento del problema	28
3.- Hipótesis	29
4.- Objetivos	30
4.1.- Objetivo general	30
4.2.- Objetivos particulares	30
5.- Metodología	31
5.1.- Materiales y métodos	31
5.2.- Preparación de inóculo y desarrollo micelial	31
5.2.1.- Obtención de extractos acuosos de residuos agroindustriales por la técnica de extracción continua	31

5.2.2.- Preparación de medios de cultivo	32
5.2.3.- Inoculación de los medios de cultivo con los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lentinula edodes</i> y <i>Agaricus bisporus</i>	32
5.3.- Determinación de fenoles en los extractos acuosos por análisis químico	34
5.3.1.- Análisis cualitativo de fenoles totales	34
5.3.1.1.- Prueba con soluciones de gelatina y cloruro férrico.	34
5.3.1.2.- Prueba de fenoles con nitrato cérico	35
5.3.1.3.-Prueba de fenoles con agua de bromo	35
5.3.1.4.- Prueba de fenoles con cloruro férrico y piridina.	36
5.3.1.5.-Prueba de Liebermann´s con ácido nítrico	36
5.3.2.- Análisis cuantitativo de fenoles totales	38
5.3.2.1.- Curva patrón de ácido tánico	39
5.4.-Análisis químico proximal de residuos agroindustriales	39
5.4.1.- Determinación de azúcares por el método con 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	39
5.4.2.- Determinación de fibra cruda	39
5.4.3.- Determinación de proteína cruda	40
5.4.4.-Determinación de cenizas	40
5.5.- Determinación de la velocidad radial o cinética del crecimiento micelial de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lentinula edodes</i> y <i>Agaricus bisporus</i>	41
5.6.- Efecto de los extractos acuosos sobre la producción de la biomasa de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lentinula edodes</i> y <i>Agaricus bisporus</i>	42
5.7.- Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lentinula edodes</i> y <i>Agaricus Bisporus</i>	3

5.8.- Efecto de los extractos acuosos sobre la producción de proteína de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lentinula edodes</i> y <i>Agaricus bisporus</i>	44
6.- Resultados	46
6.1.- Análisis químico proximal	46
6.2.- Análisis químico cualitativo de fenoles totales	47
6.3.- Análisis químico cuantitativo de fenoles totales	48
6.4.- Cinética de crecimiento micelial de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Lentinula edodes</i> y <i>Agaricus bisporus</i>	50
6.5.- Biomasa	51
6.6.- Actividad enzimática	53
6.7.- Rendimiento enzimático respecto a la biomasa	55
7.- Discusión	58
8.- Conclusiones	61
9.- Bibliografía	62

## Resumen

A través de los años, el conocimiento de los hongos se ha incrementado de tal forma que actualmente es motivo de estudio por numerosos especialistas, surgiendo así, nuevos conocimientos que incluyen aspectos taxonómicos, ecológicos, nutricionales, bioquímicos y farmacológicos. Por otra parte, la gran producción de diversos tipos de desechos residuales es un motivo importante para buscar aplicaciones diferentes en la bioremedación. La utilización de sustratos de algunos materiales orgánicos agroindustriales (paja de trigo, cebada, rastrojos de maíz, pulpa, cascarilla de café y madera) son usados para el cultivo de los hongos comestibles pero dan origen a residuos de desecho parcialmente degradados. En el caso de los hongos, refleja lo benéfico de seguir estudiando "su actividad metabólica", por la capacidad enzimática de lacasas y peroxidasas que tienen sobre la biodegradación de lignina y celulosa en diferentes sustratos. El cultivo de hongos actualmente es uno de los campos económicamente importantes en el área de los alimentos, en especial sobre la producción de las especies *Agaricus*, *Pleurotus* y *Lentinula*. Estudios recientes han mostrado resultados positivos al aplicar ciertos compuestos químicos como inductores de crecimiento como ABTS, guayacol o ácido tánico usados como sustratos específicos en la producción enzimática de lacasas. Se planteó el aprovechamiento de estos residuos agroindustriales (bagazo de café, corteza de encino sustrato y composta usados en el cultivo de hongos comestibles) en forma de extractos acuosos mezclados con los medios de cultivo y registraron un efecto "inductor" en el crecimiento y desarrollo micelial de los hongos cultivados *in vitro*. De esta manera buscando favorecer lo anterior se adicionaron extractos acuosos a diferentes concentraciones sobre el medio de cultivo de los hongos *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, y *Lentinula edodes*. El objetivo fue analizar en cada uno de los experimentos la presencia y contenido de fenoles en los extractos acuosos por análisis cualitativo y cuantitativo usando catecol y ácido tánico como testigos se realizó un análisis químico proximal y se efectuó la cinética de crecimiento, biomasa, proteína y actividad enzimática para cada uno de los hongos. Los resultados mostraron su mejor comportamiento aplicando los extractos a diferentes concentraciones en los medios de cultivo para cada uno de los hongos. Para *A. bisporus* registró mejor comportamiento con los extractos siguientes: para cinética de crecimiento al 75% con café, con café y paja al 25% para biomasa, con café al 50% para actividad enzimática y con paja al 50% para el rendimiento enzimático. Para *L. edodes*, registró mejor cinética con composta al 10%, biomasa con café al 25% y con encino al 10%, para actividad enzimática con paja al 25% y con encino al 10%, y para el rendimiento enzimático con café al 10 y 25% respectivamente. Para *P. ostreatus*, registró mejor cinética con encino al 25%, para biomasa con paja al 25%, para actividad enzimática con paja al 10% y para el rendimiento enzimático, con paja al 25%. Con estos resultados se comprobó mejor desarrollo de los hongos al mezclar una cantidad determinada de extractos con compuestos fenólicos a los medios de cultivo para *A. bisporus*, *L. edodes* y *P. ostreatus in vitro*. Finalmente estos cuatro residuos registraron diferentes comportamientos en el desarrollo micelial de los hongos antes mencionados, pero los resultados mostraron características mejores que el testigo.

## ABSTRACT

Knowledge of mushrooms has been increased throughout history and consequently they have been studied by several researchers interested in mushroom's taxonomy, ecology, nutrition, biochemistry or pharmacology aspects. On the other hand, because there is a great waste of several sources, it is necessary to investigate its application by means of bioremediation. Residues partially degraded are obtained as consequence of using agroindustrial residues from wheat, barley, maize, coffee and wood for edible mushroom culture. Especially for mushrooms, it is very useful to pursue researching on its "metabolic activity" due to laccase and peroxidase activities on lignin and cellulose content of several sources. Recently, mushrooms culture is a very important field of study in food science, which is focused on *Agaricus*, *Pleurotus* and *Lentinula* species. Recently some investigations have shown the role of ABTS, guaiacol or tannic acid as growth inducers. As well as, specific substrates of laccases. The objective of this work was to assess the polyphenols content of aqueous extract of residues obtained from coffee, oak bark and compost by both quantitative and qualitative analysis, where catechol and tannic acid were used as control. Additionally the following analyses were performed: proximal analysis, growth kinetics, biomass, protein and enzymatic activity to each mushroom sample. Data obtained showed a better behavior when the aqueous extract was added at several concentrations in mushroom growth medium. *A. bisporus* had a better behavior when the following extracts were added: 75% coffee for growth kinetic, 25% straw and coffee for biomass, 50% coffee for enzymatic activity and 50% straw for enzymatic yield. *L. edodes* recorded 10% compost for growth kinetic, 25% coffee and 10% oak for biomass and 25% straw and 10% oak for enzymatic activity and 10% or 25% coffee for enzymatic yield. *P. ostreatus* recorded 25% oak for growth kinetic, 25% straw for biomass, 10% straw for enzymatic activity and 25% straw for enzymatic yield. Results showed a better mushroom growth *in vitro* when a specific amount of aqueous extract containing phenols is added to growth medium for *A. bisporus*, *L. edodes* and *P. ostreatus*. Eventually, these four residues showed different behavior on mushroom micelial growth, but the results had better features than the control.

## Introducción

La diversidad fúngica en México es muy amplia, debido a la posición biogeográfica en la que se encuentra ubicado. Localizado entre las grandes regiones, la neártica y la neotropical. Además su intrincada orografía favorece a una gran variedad de climas, lo que provoca el complejo mosaico general que cubre el territorio nacional (Guzmán, 1995).

En México el cultivo de hongos comestibles se inicio desde mediados de 1930, sin embargo, la actual industria en el país data apenas de 40 años, con el cultivo del champiñón (*Agaricus bisporus*), utilizando técnicas y cepas extranjeras. A partir de 1974, se empezó a cultivar las llamadas “setas”, también llamadas “orejas blancas” u “orejas de cazahuate” (*Pleurotus ostreatus*) que cada vez tienen más aceptación comercial (Martínez-Carrera y col., 1991). Estos hongos han llamado la atención, debido a su crecimiento sobre una gran diversidad de residuos agrícolas y sobre todo porque a nivel nacional se producen millones de toneladas anuales de este tipo de residuos, siendo una alternativa con gran potencial para el cultivo de hongos. (Mata y Martínez-Carrera, 1988).

Los hongos son un recurso natural que puede ser explotado a nivel comercial, ya sea cultivándolos o extrayéndolos directamente del bosque (Martínez y col., 1984; Guzmán, 1993). A través de los años, el conocimiento de los hongos se ha incrementado de tal forma, que actualmente es motivo de estudio por numerosos especialistas. Han surgido así, nuevos conocimientos que incluyen aspectos taxonómicos, ecológicos, médicos, nutricionales, toxicológicos y más recientemente los temas farmacológicos y bioquímicos. El desarrollo biotecnológico moderno hace notar la importancia del cultivo de los hongos, permitiendo su desarrollo en condiciones óptimas para mejorar la producción de biomasa total. La utilización de materiales orgánicos agroindustriales para el cultivo de los hongos comestibles refleja su extraordinaria actividad metabólica. El cultivo de hongos ha evolucionado con el tiempo y actualmente es un campo económicamente importante, en especial sobre la producción de especies de *Agaricus*, *Pleurotus* y *Lentinula*.



*Agaricus bisporus* es el hongo comercial que más se ha cultivado mundialmente. Es conocido como champiñón blanco el cual representó el 32% de la producción en 1997 (Chang, 1999, Kües y Liu, 2000). Esta especie se cultiva típicamente en una base fermentada de paja, mezclada con excretas de animal.

*Pleurotus* spp., se le conoce como seta “ostra” u “oreja de cazahuate” en algunos mercados, en la zona centro del país. Representa el 14% de las especies comestibles a nivel mundial (Chang, 1999), se puede cultivar en materiales como aserrín, fibras y/o residuos vegetales los cuales combinan proteína y carbohidratos disponibles.

Otro hongo es *Lentinula edodes* conocido como Shiitake, originario de Japón. Actualmente se cultiva a gran escala en china dándose a conocer ampliamente y su consumo representa el 25% en la producción mundial (Chang, 1999). Esta especie se cultiva en troncos de encino o roble. Su crecimiento en general es lento, actualmente se cultiva también en otros sustratos solos o mezclados como son pajas, aserrín o viruta, pulpa y cascarilla de café.

Los hongos saprofitos realizan una labor de suma importancia en los ecosistemas donde viven. Representan un eslabón importante en la cadena alimenticia; degradando de la materia orgánica debido a que poseen un complejo enzimático que descompone la celulosa, hemicelulosa y lignina (Guzmán, 1993). Por otra parte, los materiales lignocelulósicos están constituidos esencialmente por celulosa (45-60%), hemicelulosa (15-50%) y lignina (10-30%). A la celulosa se le considera como el material renovable más abundante de la biosfera. El principal obstáculo que limita el aprovechamiento total de la celulosa, presentes en los residuos lignocelulósicos, es su asociación con la lignina. La principal función de la lignina es proteger a los polisacáridos vegetales contra el ataque microbiano. Sin embargo, este compuesto limita la utilización de la celulosa y hemicelulosa como forraje, ya que su digestibilidad disminuye conforme aumenta el contenido de lignina (Kirk y col., 1987; 1993).

Se ha encontrado que únicamente ciertos hongos pueden atacar material lignocelulósico y se clasifican dentro de tres categorías, en función de los cambios físicos causados a la madera, como consecuencia de la acción enzimática de dichos organismos. Los primeros son conocidos como hongos de pudrición blanda que degradan la celulosa y hemicelulosa, pero no la lignina. Los hongos de pudrición oscura o café, degradan la celulosa, hemicelulosa y parcialmente la lignina, y por último los hongos de pudrición blanca capaces de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina. Dentro de este grupo los basidiomicetes son los más eficaces (Kuhad y col., 1997).

Los materiales lignocelulósicos se pueden clasificar como desperdicios o esquilmos agrícolas o agroindustriales como pajas, rastrojos, pulpas y cascarillas de café, tamos de cereales, cascarillas de arroz, cascarillas de algodón, cortezas de árboles, cáscaras de frutos, entre muchos otros; residuos forestales y desechos lignocelulósicos urbanos como pastos, desperdicios vegetales de frutas y verduras, residuos de café, etc.). Son complejos lignocelulósicos que por su difícil biodegradabilidad tienen poco valor nutritivo para animales y son poco eficientes para ser utilizados como abono. La degradación se puede llevar a cabo con el empleo de hongos de la pudrición blanca (Dorado y col., 1999; Eggert y col., 1997; Ericsson y col., 1990 Martínez y col., 1994).

En México la producción nacional de esquilmos agrícolas fue de 25 millones de toneladas, en 1986 (Mata y Martínez-Carrera, 1988); previendo un aumento anual del 5% estimando aproximadamente 55 millones para el 2007. En actividad forestal, la producción de biomasa desperdiciada es todavía mucho mayor, si consideramos que la producción de biomasa vegetal en el planeta sobrepasa las 200 mil toneladas/año y el 10%, de esta es producida por cultivos agrícolas y el 75% aproximadamente se genera en zonas boscosas (Valencia, 2000). La disponibilidad de estos desechos agroindustriales puede ser una alternativa para el cultivo de hongos comestibles que ha presentado un gran interés actualmente por el cultivo comercial. El aprovechamiento integral de los insumos que produce el campo y la agroindustria, tienen un impacto e importancia tanto en el ámbito económico como para la conservación del medio

ambiente. Además el cultivo de hongos comestibles sobre residuos agroindustriales se considera como una alternativa en la producción de alimentos con elevado contenido proteico (Chang y Quimio, 1982). Martínez-Carrera y col., (1993) han señalado que el cultivo comercial de *Pleurotus* tiene un gran potencial en México por convertir los residuos lignocelulósicos en alimento, que por una parte puede ser el hongo cultivado y por otra, el sustrato agotado, el primero para un mercado cada día más interesado en su consumo y el segundo como manejo de forraje para el ganado vacuno. En todo este proceso la enzima lacasa se encuentra en múltiples isoformas para la degradación de estos residuos (Muñoz y col., 1997; Han y col., 1996).

Por otra parte, para la degradación del sustrato, donde el hongo crece en forma natural o aplicando tecnologías para su cultivo, se necesitan enzimas ligninolíticas, que permitan llevar a cabo sus funciones. La transformación de celulosa o hemicelulosa a monosacáridos, es llevada a cabo por hongos ligninolíticos entre ellos *Pleurotus* spp, que utilizan un amplio rango de hidrolasas para la degradación de la madera (Leonowicz y Col., 1999).

El papel de las enzimas lacasas en los hongos comestibles actualmente es de gran importancia. Debido a su aplicación biotecnológica; miembro de la familia oxidoreductasa, también referida como azuloxidasa, producida en hongos y plantas (Reinhammar., 1970 La lacasa es abundante en los hongos de la pudrición blanca, por su habilidad para la degradación de la lignina de la madera en la naturaleza. Esta actividad enzimática se ha encontrado en aproximadamente 500 especies de hongos donde se han aislado (Eriksson., 1993), entre ellas se encuentra *A. bisporus* (Matcham y Wood, 1992), y diversas especies de *Pleurotus* (Palmieri y col., 1997).

Sin embargo, poco se sabe de los patrones de producción de enzimas, lacasas, que se consideran fundamentales para el crecimiento de los hongos sobre las fibras lignocelulósicas y que quizá desempeñen un papel fisiológico en la maduración del micelio por la oxidación de compuestos aromáticos endógenos (Rogalski, 1996). Martínez, (1996), Giardina y col., (1999), han demostrado que los cultivos de *Pleurotus*, producen al menos 6 isoformas

distintas de lacasas, con estructuras primarias diferentes y que las lacasas excretadas al medio son distintas de las fijadas a la biomasa. Young y col., (1989), menciona que la identificación de diferentes lacasas hace posible estudiar algunas propiedades cinéticas y de termoestabilidad, siendo estas características muy atractivas para los procesos biotecnológicos.

Se sabe que la lignina es el segundo polímero estructural más abundante en la naturaleza (después de la celulosa) y el material aromático más abundante, responsable del almacenamiento de alrededor del 40% de la energía solar captada por las plantas (Leonowicz y col., 1999). La biodegradación de la lignina representa un punto importante en el reciclamiento de la fuente de carbono de la Tierra, porque los ecosistemas forestales contienen alrededor de 150,000 millones de toneladas de madera. Esto es confirmado por Leonowicz y col., (1999). También afirman, que aunque los principales constituyentes de la madera, (celulosa), pueda ser utilizados por varios organismos, su hidrólisis *in situ* por muchos de estos, esta limitado por la degradación del polímero de lignina recalcitrante, el cual esta formado por la polimerización de p-hidroxicinamil alcoholes.

Sin embargo, los hongos de la clase de los basidiomicetes, han desarrollado una gran capacidad para la despolimerización oxidativa y subsiguiente mineralización de la lignina, que permite la utilización de la celulosa por otros microorganismos. En años recientes diversos estudios de la biodegradación de la lignina han sido llevados a cabo con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Las primeras evidencias de las peroxidasas involucradas se remontan a la inhibición de la degradación de lignina por la enzima catalasa (Shuttleworth, 1986).

La ligninoperoxidasa se caracteriza por poseer un potencial redox de oxidación alto y por la degradación de compuestos aromáticos no fenólicos, tales como alcohol veratrílico y bencenos metoxilados (Staszczak y col., 1996). La manganeso peroxidasa de *P. chrysosporium*, requiere estrictamente de  $Mn^{2+}$  para completar el ciclo catalítico y quelar el  $Mn^{3+}$  formado, el cual puede actuar como un oxidante eficiente de fenoles y otros compuestos (Han, 1996).

A causa de que muchas estructuras que constituyen al complejo de la lignina no son fenólicas, la enzima Lignina–peroxidasa (LiP) fue considerada la principal responsable de la despolimerización de la lignina (Ander y Marzullo, 1997). Esta idea es aceptada generalmente, aunque las evidencias sugieren que la biodegradación de la lignina puede proceder siempre y cuando exista un ataque del  $Mn^{3+}$  quelado, como fuerte oxidante químico generado por la MnP (Szklarz y Leonowicz, 1989).

El hongo *Pleurotus eryngii*, tiene la capacidad de degradar selectivamente la lignina cuando crece en los sustratos naturales y es considerado como un organismo modelo para estudios de la biodegradación de la lignina en plantas de ciclo anual y relacionadas con aplicaciones biotecnológicas (Klibanov y Alberti, 1981; Ferrer y col., 1991; Heinfling, 1998).

El propósito de esta investigación fue el aprovechamiento del contenido de compuestos fenólicos que actuaran como sustrato en la producción enzimática de los hongos y que pudieran extraerse con agua mediante un sistema continuo de desechos agroindustriales (paja y composta agotadas) en la producción de seta y champiñón, corteza de encino y residuos de café. Mezclados con los medios de cultivo a diferentes concentraciones analizando su comportamiento cinético sobre el crecimiento micelial de los hongos, dichos extractos presentaron un contenido diferente de compuestos fenólicos que permitió comparar el aumento en la producción de enzimas lacasas en el crecimiento micelial inoculando el hongo *in vitro*. Los mejores resultados serán extrapolados posteriormente sobre sustratos definidos experimentalmente para determinar el crecimiento de cuerpos fructíferos. Este proyecto se desarrolló como una alternativa de reciclar los residuos agroindustriales, con el fin de contribuir a minimizar la contaminación y desperdicio de estos desechos orgánicos en el medio ambiente; ya que los procesos de biodegradación natural, no funcionan a la misma velocidad con que son generados, estos se acumulan llegando inclusive a convertirse en un peligro para el equilibrio ecológico.

## 1. Marco teórico

Los hongos han estado ligados al hombre desde tiempos inmemoriales; los estudios realizados sobre estos organismos señalan su amplia distribución en diversos nichos ecológicos y su papel es relevante con relación a los hábitos alimenticios del hombre y sus propiedades toxicológicas. A través de los años, el conocimiento de los hongos se ha incrementado de tal forma, que actualmente es motivo de estudio por numerosos especialistas. Han surgido así, nuevos conocimientos que incluyen aspectos taxonómicos, ecológicos, nutricionales y más recientemente los temas farmacológicos, toxicológicos y bioquímicos. La evolución del conocimiento que ha presentado desde la época prehispánica, es notable tanto en sus generalidades, nutritivas y tóxicas, las cuales han dejado una importante brecha, utilizándose de un modo u otro, enriqueciendo el acervo etnomicológico, micológico y a su vez apoyando de manera importante la ciencia y tecnología.

### 1.1.- Uso de materiales y forma de cultivo

La utilización de sustratos de algunos materiales orgánicos agroindustriales (paja de trigo, cebada, rastrojos del maíz, pulpa, cascarilla de café, bagazo de caña, aserrín de diversas maderas, etc.) para el cultivo de los hongos comestibles refleja lo extraordinario de su capacidad para seguir desarrollando "su actividad metabólica". El cultivo de hongos ha evolucionado y actualmente es uno de los campos económicamente importantes en el área de los alimentos, en especial sobre la producción de las especies *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula* y de otros no menos importantes. En los siguientes puntos se menciona el uso de materiales y forma de cultivo para cada especie.

#### 1.1.1.- *Agaricus bisporus*

Es el hongo comercial que más se cultiva mundialmente, conocido como champiñón blanco, representó el 32% de la producción en 1997 (Chang., 1999; Kűes y col., 2000). Esta especie se cultiva típicamente en paja, mezclada con excreta animal (pollinaza o gallinaza) y agregando yeso o carbonato de calcio

con el fin de ajustar el pH ligeramente alcalino. Los materiales experimentan un proceso inicial en dos fases de temperatura en la fermentación, primero, la temperatura se eleva hasta 85°C durante aproximadamente 17 días y la segunda se condiciona para la pasterización iniciando a 60°C y disminuyendo a 45°C manteniendo el proceso durante 12 días. En la etapa de la colonización del hongo una vez sembrado en la composta, esta se cubre con una capa de turba u otro material conveniente con el fin de mantener una humedad adecuada. Y en un plazo de dos semanas, los hongos se pueden cosechar, esta puede durar tres semanas, después de este tiempo la composta se considera agotada y se elimina después de darle un nuevo tratamiento de térmico. Este proceso lo llevan a cabo solo algunas empresas, otras lo tienen comprometido con personas que lo aplican como abono para enriquecer la tierra de siembra; y algunas otras empresas no les dan ningún tratamiento ni uso, simplemente lo tiran.

#### **1.1.2.- *Pleurotus* spp.**

Es el hongo “seta u ostra” como se le conoce, representa una de las especies comestibles de *Pleurotus* que represento el 14% de la producción mundial en 1997 (Chang., 1999; Kües y col., 2000). Este hongo se puede cultivar en varios materiales como aserrín de madera, fibras y/o residuos vegetales que se combinan proteína y carbohidratos disponibles para optimizar su crecimiento. El proceso en el tratamiento puede variar de un material a otro, se procede a prefermentar o calentar por un tiempo, o agregar productos químicos para aumentar la selectividad del hongo. Después de que se completa la colonización, el sustrato colonizado se somete a las condiciones convenientes de iniciación y maduración de los cuerpos fructíferos. Después de tres o cuatro cosechas de la seta, el sustrato se considera agotado, el cual es eliminado dándole un tratamiento térmico previo.

#### **1.1.3.- *Lentinula edodes***

Es el hongo conocido como Shiitake, representó un 25% en la producción mundial de 1997 (Chang., 1999; Kües y col., 2000). Esta especie se cultiva en

materiales naturales (troncos) o sintéticos como el aserrín (en bolsas). El material natural pueden ser de varias especies de árboles normalmente es roble, este se usa y prepara después de la caída de hojas, se cortan trozos de un metro de longitud, que después de un mes se pueden inocular con el hongo Shiitake mediante micelio en taquetes de madera. Después de hasta un año de incubación, los troncos colonizados se pasan a condiciones del inicio de fructificación. Los hongos se cosechan dos veces por año durante varios años. Los cultivos sintéticos se forman de aserrín de madera, de paja, rastrojo de maíz, desechos del café (cascarilla-pulpa) o mezclas de estos, a los que se les agrega algo de harina de cereal para optimizar las necesidades de los hongos para un mejor crecimiento. El sustrato preparado, se esteriliza o pasteriza y se va colocando en bolsas de plástico para su siembra con semilla cubierta de micelio “blanco de hongo”, ya sembradas pasan por un período de incubación hasta su colonización total del sustrato por el micelio y una vez cubierto por el micelio se cambia a la zona para su fructificación. Después de varias cosechas, las bolsas con material sintético se eliminan dándoles un tratamiento de calentamiento previo. Los troncos pueden durar varios meses inclusive uno o dos años produciendo y luego se desechan. Así también algunas otras especies de hongos comestibles o bien medicinales se han experimentado aprovechando los residuos de diferentes plantas con el fin de reciclar estos materiales, en todo este proceso se ha observado un incremento en compuestos metabólicos de los hongos como las lacasas, (Talorete y col., 2002; El-Fallal y El-Kattan, 1997; Ardon y col., 1998).

La producción anual total de los principales residuos agrícolas es alrededor de 45 millones de toneladas de desechos a nivel nacional, entre estos esta la producción de los sustratos “agotados” por los hongos producidos industrialmente. Actualmente estos se utilizan para otros fines como bioremedación (de contaminación de aguas y suelos, relleno, combustible, rehúso en la cobertura del cultivo de hongos (Singh-Anshu y col. 2002, 2003). Y en el cultivo del champiñón en lugar de “cobertura de musgo ó peat most”, o bien como alimento para ovinos (Zadrazil, 2000; Chefetz y col; 1998, Ortega-Cerrilla, 1998).



## **1.2.- Producción de desechos agroindustriales**

### **1.2.1.- Desechos de sustratos y compostas**

Como se menciona anteriormente la producción mundial de hongos comestibles es de 6.2 millones de toneladas al año, (Chang, 1999; Kües y col., 2000). Y en solo tres especies recae el 71% de la producción mundial, la especie de *A. bisporus* representa el 32%, *L. edodes* el 25% *P.leurotus spp* el 14%, y el 29% restante lo cubren diferentes especies de hongos comestibles. De esta producción por cada tonelada de hongos (peso fresco), se genera de 1 a 2 toneladas de materia seca de sustrato degradado por los hongos, siendo este un desecho que es un material semiagotado, o “quemado” como se le conoce en algunas empresas de producción de champiñón. Si consideramos que el uso de los residuos es variado, tan solo el 40% del sustrato degradado por los hongos pertenece al *A. bisporus*, Una de las alternativas de uso es por ejemplo, en lombricultura y alimento para ovinos.

La producción mundial de *P. ostreatus*, es aproximadamente de 950,000 ton/año, (Chang, 1999; Kües y col., 2000). México produce 40000 ton/año y es el principal productor en América Latina con un 46% y 16º lugar a nivel mundial. (Sánchez, 2005).

### **1.2.2.- Residuos de café**

El cultivo de café en México abarca una superficie aproximada de 560,000 ha ubicadas en 3000 comunidades de 12 estados de la república representando aproximadamente un tercio del total de las exportaciones agrícolas. Se considera que está dentro de los seis primeros cultivos de importancia a escala nacional (maíz, trigo, sorgo, frijón, caña y café). Las zonas de distribución se reparten entre Veracruz, Chiapas, Hidalgo y Puebla (Guzmán y Mtz.-Carrera, 1985).

Los desechos del café se encuentran entre los materiales susceptibles de ser utilizados como sustrato en el cultivo de hongos comestibles. En nuestro país a partir de los estudios pioneros del Institución Nacional de Recursos Bióticos

(INIREB) hoy instituto de Ecología, se han venido desarrollando varias tecnologías para la utilización de los desechos de café, y principalmente la pulpa, como sustrato para el cultivo del hongo comestible *P. ostreatus*. Así, Martínez y colaboradores en 1984, usaron un sustrato a base de pulpa fresca de café (*Coffea arabica* L) obteniendo una eficiencia biológica (EB) de 113.35% para la cepa Inireb-8 y con mezclas de pulpa de café y paja de cebada. La mejor EB se registró de 152.70% para la misma cepa (Martínez y Morales, 1988). Estos desechos presentan una fuente de compuestos fenólicos que pueden ser aprovechados y que hasta el momento no se ha dado el interés a estos residuos de los beneficios cafetaleros ni a los residuos que se originan también como el “bagazo”.

### **1.2.3.- Residuos de madera y corteza de encino**

El encino es una madera que se utiliza en aplicaciones industriales y medicinales tanto la madera como la corteza se emplean con frecuencia en medicina tradicional. Pérez y Mata (2002) realizaron un estudio en el cual se evaluó la capacidad de adaptación al cultivo de cepas del género *Pleurotus* en madera de pino. La selección de estas cepas se hizo a partir de la medición del área micelial alcanzada por cada uno de estos sustratos de viruta de pino, inoculadas a partir de dos tipos de inóculo (en agar y semillas de sorgo) invadidos por el micelio de cada una de las cepas estudiadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas de *P. ostreatus* presentaron mayor adaptabilidad a su cultivo en viruta de pino que las cepas pertenecientes a *P. pulmonarius*.

La biodegradación de la lignina representa una etapa que es clave en el reciclamiento de la fuente de carbono del mundo, porque los ecosistemas forestales contienen alrededor de 150, 000 millones de toneladas de madera. Esto es confirmado por Leonowics y col., (1999). También afirman, que aunque los principales constituyentes de la madera, por ejemplo la celulosa, pueda ser utilizado por varios organismos, su hidrólisis *in situ* por muchos de estos, está limitado por la degradación de lignina recalcitrante, el cual está formado por la polimerización de p-hidroxicinamil alcoholes.

### 1.3.- Enzimas ligninolíticas y lacasas

En la actualidad se conocen muchos hongos basidiomicetes que producen múltiples formas electroforéticas de lacasas, tanto intra como extracelulares así lo han demostrado estudios realizados con gel de poliacrilamida (PAGE)-zimógrama o electroenfoque (Wood, 1980; De Vries y col., 1986; Choi y col., 1987). Blaich y Esser (1975), introdujeron múltiples isoformas de la enzima lacasa, Kerrigan y Ross (1988) observaron similitudes aparentes entre las lacasas de esta especie, afirmando que se puede aplicar esta técnica en hongos de diferente grupo taxonómico. Este método puede aplicarse para la identificación de cepas productoras de lacasas y también para la diferenciación entre especies de *Pleurotus*.

Wood (1983) y Savoie (1998), realizaron un estudio de la degradación lignocelulósica durante el ciclo de vida del hongo comestible *A. bisporus* en composta, obteniendo una degradación de ambos polímeros, la degradación de celulosa fue más extensa durante la producción del cuerpo fructífero. Para la degradación de la lignina no hubo gran diferencia durante el ciclo de vida del *A. bisporus.*, determinandose los cambios en las actividades enzimáticas durante el crecimiento de *A. bisporus*.

Silva (2003) evaluó el crecimiento y la actividad enzimática de nueve variedades de Shiitake, *Lentinula edodes* (Berk, Pegler), cultivado en eucalipto y granos de arroz y determinando la actividad de las lacasas.

Rodríguez (2003) estudió la decoloración de residuos líquidos de destilería (vinaza) y del cultivo de setas comestibles (extracto líquido de pulpa de café), mediante el cultivo sumergido de *Pleurotus* spp, así como la producción de la enzima lacasa producidas por este hongo, empleando estos residuos coloreados tanto de la destilería como del beneficio de café como medios de cultivo del hongo observando una decoloración gradual del medio empleado a partir de la vinaza.

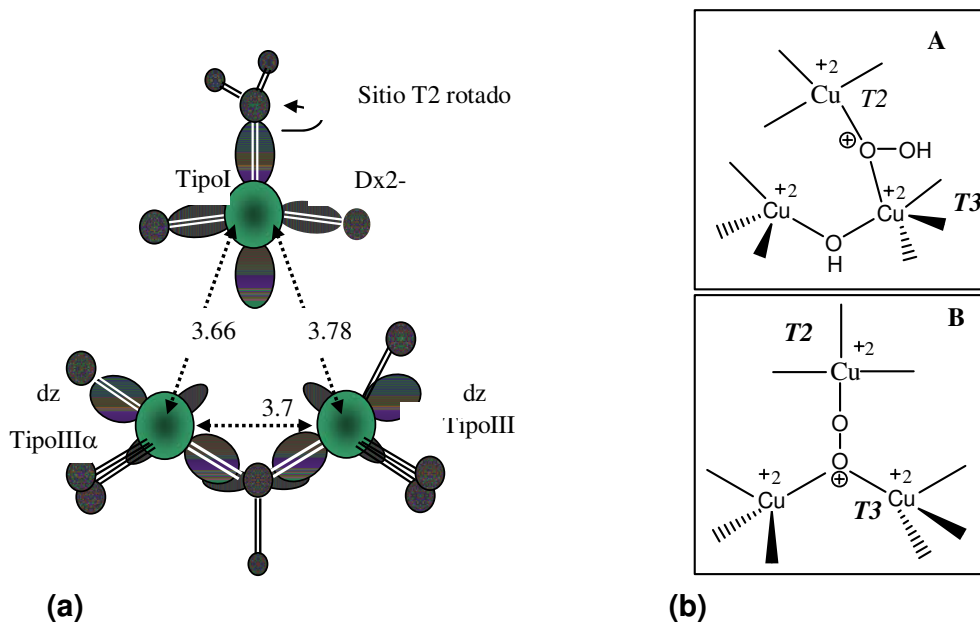
Los hongos tienen la propiedad de ser fuentes enzimáticas, esta actividad enzimática se ha encontrado en cerca de 500 especies de hongos donde se han aislado (Eriksson, 1993), entre ellas *A. bisporus* (Matcham y col., 1992) y diversas especies de *Pleurotus*, (Palmieri y col. 1997, 2003). Siendo la lacasa la más abundante.

### 1.3.1.- Estructura de la lacasa

La lacasa en los vegetales es un componente de la lignina, pero las lacasas de los hongos no. Los primeros estudios para elucidar la estructura de las lacasas de hongos fueron en *Phanerochaete chrysosporium*. Se ha observado que al purificarse tiene una considerable homogeneidad. Estas enzimas son clasificadas dentro de la familia de las *oxidases multicobre*. Poseen en su sitio activo 4 cobres clasificados de la manera siguiente: 1 tipo I, 1 tipo II, y un par acoplado binuclear tipo III. Sus características indican que el sitio tipo I (o cobre azul), es en donde existe la transferencia de carga del metal que involucra un azufre de una cisteína y el Cu tipo II el cual absorbe la luz ultravioleta a 605 nm.

El Cu tipo II exhibe una baja absorbancia y el sitio III involucra un acoplamiento de dos centros de cobre, involucrados en la absorbancia a 330 nm. Todos los cobres están involucrados en el mecanismo catalítico para la transferencia de electrones, durante el mecanismo enzimático de oxidación de compuestos fenólicos para la formación de quinonas.

En la figura 1, se observa el acoplamiento de dichos átomos de cobre y las distancias en Ångstrom, así como su intervención en la oxidación de compuestos fenólicos. Hasta estos momentos, en el basidiomiceto *P. ostreatus* se han observado isoenzimas con dos átomos de zinc, un átomo de hierro, y solo un átomo de cobre por molécula enzimática. Aunque otras isoenzimas que se han extraído de diversos hongos tienen características diversas.



**Figura 1 (a y b).** Estructura del sitio activo de las oxidasas multicobre y formación del puente peróxido. En (a) se representa el sitio de acoplamiento trinuclear. Los sitios tipo II y III fueron obtenidos por cálculos en los campos de unión superpuestos, incluyendo el orbital p del puente hidróxido oxígeno. El tipo II está rotado 90° para su claridad. En (b) se muestran dos posibles modelos para el puente peróxido. Al acoplamiento trinuclear, la parte (A) se muestra el puente entre el Cu tipo 2 y el Cu tipo 3. En (B) se muestra el puente entre los tres Cu. (Salomón E., 1996)

Estas consideraciones son útiles para explicar porque es crucial para las enzimas lacasas, tener un suministro adecuado de cobre en el medio de cultivo y porque este tipo de metal podría ser inductor de las enzimas.

Se ha observado que la importancia de las enzimas consiste en que los hongos de la clase de los basidiomicetes, han desarrollado una capacidad para la despolimerización oxidativa y subsiguiente mineralización de la lignina, que permite la utilización de la celulosa por otros microorganismos. Así dos de las peroxidases involucradas en la degradación de la lignina son la ligninoperoxidasa (LiP) y la enzima manganeso peroxidasa (MnP), y alguna otra peroxidasa que determina la degradación de celulosa (Muñoz y col. 1997). Las peroxidasa y las lacasas han sido observadas en cultivos líquidos crecidos con *Pleurotus* como responsables de la generación de peróxido de hidrógeno junto de lacasas. Se ha medido la degradación o despolimerización

ligninocelulósica por especies de *Pleurotus* sobre la utilización de pajas y para la detección de enzimas ligninolíticas (Tabla 1). Además de las enzimas LiP, MnP y lacasas, la especie *Pleurotus* posee otra enzima que es la Aril alcohol oxidasa (AAO), encargada de la ruptura de las unidades fenólicas y oxidación de alcoholes bencílicos que es dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabla 1.** Actividad enzimática extracelular y la descomposición ligninocelulósica de la paja por varias especies de hongos. La actividad fue detectada sobre el alcohol veratrílico (LiP) y de lacasas, AAO y MnP que se muestran como Unidades/100 g de paja inicial.

	<b>MnP</b>	<b>AAO</b>	<b>Lacasa</b>	<b>Polisacarido / lignina</b>
<b><i>P. ostreatus</i></b>	300	4	66	4.4
<b><i>P. chrysosporium</i></b>	70	0	0	2.2
<b><i>Trametes versicolor</i></b>	20	0	12	2.5
<b><i>Paja control</i></b>	0	0	0	2.6

La lacasa p-difenol dioxigeno oxidoreductasa es una de las pocas enzimas que ha sido estudiada desde fines de la década de los noventas. Pertenece a un grupo de enzimas llamadas oxidasas de cobre azul. Este grupo usa oxígeno como aceptor de electrones para remover hidrógenos de los grupos hidroxilo fenólicos. Esta reacción conduce a radicales libres que, como se ha demostrado con modelos de compuestos de la lignina, pueden conducir al rompimiento de cadenas laterales y anillos aromáticos. La lacasa también puede oxidar sustratos no fenólicos en presencia de mediadores redox apropiados. Estas enzimas tienen un amplio rango de sustratos y es señalada como inespecífica en cuanto al sustrato reducido. El rango de sustratos oxidados puede variar según el tipo de lacasa de que se trate. La especificidad del sustrato de las lacasas puede ser explicado dependiendo de las funciones que han sido adscritas a las lacasas, estas son: formación de pigmentos, degradación de la lignina y destoxicación. (Temp y Eggert 1999; Koroljova y col., 1998) Un método simple del incremento en la producción de enzimas es la aplicación de inductores.

Esos son usualmente el sustrato de la enzima, o sustancias estructuralmente similares a los sustratos o análogos de sustratos de crecimiento natural de razas silvestres de hongos. Algunos de estos compuestos químicos sintéticos que se han utilizado como inductores en el crecimiento micelial de *P. ostreatus*

y *P. pulmonarius* son los siguientes: siringaldazina, ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbencenzotiazolinasulfónico), siringaldazina y guayacol. (Rao y col., 1995; Das y col., 1997; Saparrat y col., 2002), que se reportan como inductores y que presentan mejor actividad relativa. La reacción general de oxidación de fenoles se ve en las **figuras 2 y 3**.

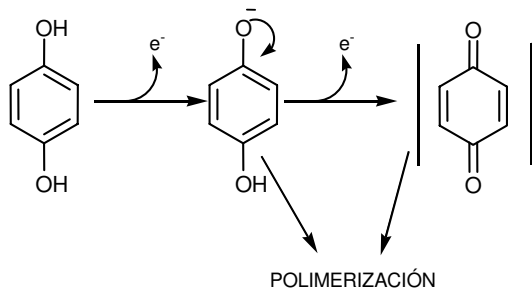


Figura 2

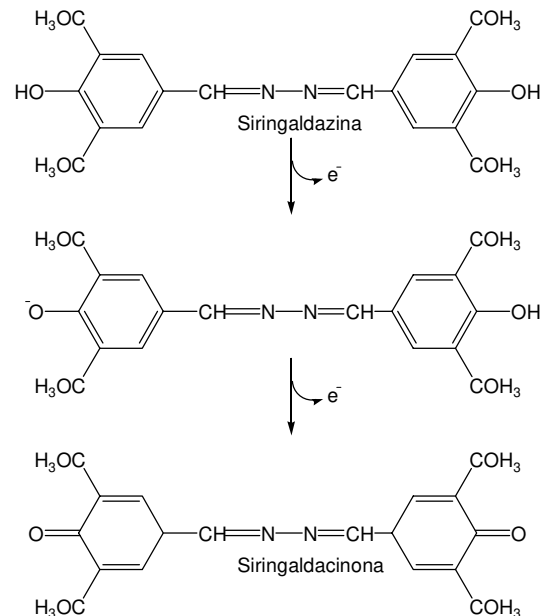


Figura 3

**Figura 2.** Mecanismo general de la oxidación de alcoholes aromáticos (hidroquinona) para formar un radical libre que puede convertirse en quinona, catalizada por una enzima o por reacomodo espontáneo (Thurston, 1994).

**Figura 3.** Reacción que presenta también una oxidación con la siringaldazina, donde el primer producto de la reacción es un radical libre y la formación de la dicetona (tipo quinona) puede ser enzimática o por reacomodo de electrones (Thurston, 1994).

Las lacasas (p-difenol-dioxígeno reductasa; EC 1.10.3.2) han sido muy estudiadas. Se les ha llamado enzimas cuproproteínas. Este grupo de enzimas utiliza oxígeno como un aceptor de electrones para remover hidrógenos de los grupos hidroxilo fenólico, reacción que conduce a la formación de radicales libres, como los obtenidos con compuestos parecidos a las unidades fenólicas de la lignina. Las cuproproteínas pueden despolimerizar a la lignina por el rompimiento de los enlaces alquil-arílicos, la oxidación de alcoholes bencílicos y el rompimiento de las cadenas laterales y los anillos aromáticos (Solomon, 1996).

El papel de las lacasas en la degradación de la lignina ha sido el punto central de un gran número de estudios biotecnológicos. La capacidad de las enzimas lacasas de catalizar la oxidoreducción dependiente de oxígeno por mecanismos de mediadores libres, se ha tomado con mucha atención en áreas de la cinética y también de sus propiedades electro-catalíticas (Wong y col., 1999).

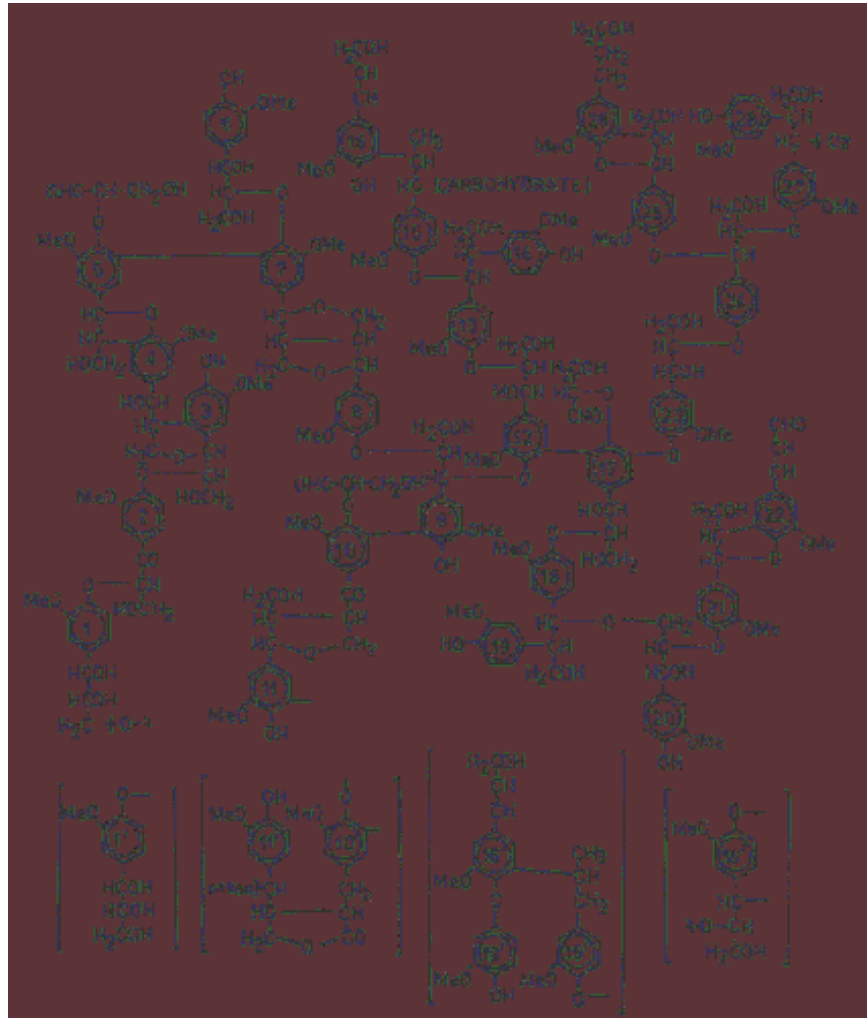
Velázquez-Cedeño (2004) investigó la influencia de *Trichoderma longibrachiatum* en la producción de enzimas lignocelulolíticas por *P. ostreatus* durante su crecimiento vegetativo en un sustrato de paja. Las variaciones en la producción de estas enzimas revelaron algunos efectos de *T. longibrachiatum* porque están implicadas en la degradación de materiales lignocelulósicos; la reducción de estas enzimas pudo afectar de hecho el crecimiento de *P. ostreatus*, el estudio de estas variaciones reveló los sistemas enzimáticos que desempeñan un papel en la respuesta al estrés ambiental. Se centró este análisis en la celulasa,  $\alpha$ -D-glucosidasa y en dos fenoloxidasas, lacasa y Manganese-peroxidasa (MP). Las fenoloxidasas son enzimas implicadas en la degradación de la lignina (Hiroi y Eriksson 1976; Thurston, 1994). La lacasa (EC 1, 10, 3, 2) es la oxidasa de cobre azul que cataliza la oxidación de compuestos aromáticos mientras que reduce oxígeno a agua. Son enzimas relativamente inespecíficas que pueden oxidar el monofenol, *o,p*-difenol y el aminofenol. Las isoformas de lacasa varían entre las especies dependiendo de las condiciones del cultivo (Farnet y col., 1999). Las MP también oxidan compuestos fenólicos pero en presencia de  $H_2O_2$  y del manganeso. Además, se han encontrado a estas enzimas implicadas en la respuesta al estrés ambiental (Rayner y col., 1994).

Las lacasas en las plantas, han sido constantemente estudiadas y en los hongos basidiomicetes forman parte relevante de la maquinaria enzimática, estudios sobre la deslignificación se han efectuado con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, el cual contiene las dos peroxidases mencionadas anteriormente (LiP y MnP), que son capaces de romper enlaces fundamentales en la estructura de la lignina, además de un amplio rango de compuestos formados por anillos (Farell y col., 1989).



La lacasa puede romper porciones de las estructuras fenólicas que componen a la lignina, directa o indirectamente. La lacasa tiende a despolimerizar los sustratos fenólicos *in vitro*, sin que se elimine la posibilidad de que esta enzima contribuya al rompimiento de la lignina y en vez de ella, las enzimas peroxidasas polimericen algunos sustratos *in vitro*. De Jong y col. (1992), confirmaron que la combinación de la lacasa y la enzima LiP es necesaria, para complementar a otras enzimas que se encargan de la degradación de la lignina para la formación de compuestos altamente reactivos o tóxicos, que le confieren protección al micelio en crecimiento. Otra función de esos compuestos, es el ataque para la despolimerización química de la lignina y con ello una mayor penetración de los hongos a la madera (Bes y col., 1987), como se muestra en el **figura 4**.

Algunas de estas enzimas, disponibles en la naturaleza y que ejercen esta acción son las polifenoloxidasas. Recientemente su uso se ha extendido hacia la remoción de desperdicios tóxicos (Singh-Anshu y col., 2003) y también a nivel laboratorio para remover compuestos de tipo carcinogénico como aminas aromáticas a partir de efluentes industriales (Eggen-Trine y col. 2003). Una de las peroxidasas aplicables es la lacasa; miembro de la familia oxidoreductasa, también referida como azuloxidasa, producida en plantas (Leontievsky y col., 1997; Giardina y col., 1999).



**Figura (4)**- Reacción de la distribución de la lignina “Lignum” de la madera como sustrato, que proporciona los nutrientes para el buen desarrollo del micelio y cuerpo fructífero, comprende 19 unidades fenólicas.

#### 1.4.- Propiedades de las lacasas de los hongos

Se han investigado desde 1999 una serie de propiedades de las lacasas, de las muchas que se han encontrado en diferentes especies de hongos, resaltando 5 enzimas lacasas encontradas tanto en *P. ostreatus* como en *P. pulmonarius*. (Szkларz y col. 1989; Thurston y col. 1994; Das y col. 1997; Ardón y col. 1998; Bockle y col. 1999; Leonowicz 1999) **tabla 2.**

**Tabla 2.-** Comparación entre las características de las lacasas en los hongos

<b>Organismo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Masa (KDa)</b>	<b>% carbohidratos</b>	<b>Cobre (átomos /mol)</b>
<i>Agaricus bisporus</i>	2	100 y 65	15	2
<i>Aspergillus nidulans (conidial)</i>	1	110	12	
<i>Armillaria mellea</i>	1	59		
<i>Botritis cinerea</i>	2	72	80	
<i>Lentinula edodes</i>	1	66		
<i>Lycoperdon sp</i>	1	78	40	2
<i>Monocillium indicum</i>	1	100 y 72		
<i>Neurospora crassa</i>	1	65	11	3
<i>Phelvia radiata</i>	1	64		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	5	62-70	45	
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	5	55-70	40	
<i>Podospora anserina</i>	3	70, 80, y 390	25, 23, y 22	3
<i>Polyborus versicolor</i>	2	60 y 65	14	4
<i>Pycnoporus coccinus</i>	1	70		
<i>Schizophyllum commune</i>	1	62		

## 2. Planteamiento del problema

Actualmente, uno de los principales problemas que presentan las zonas urbanas y semiurbanas con gran densidad poblacional es la contaminación de sólidos y el deterioro ecológico del medio ambiente. Aproximadamente son 380.000 toneladas de residuos agrícolas y subproductos que son reciclados parcialmente (Sánchez, 2005). Dentro de estos está la basura generada en la producción de hongos comestibles, los desechos que se generan en los beneficios de café como pulpa y cascarilla no menos importante son los residuos del bagazo de café generados en gran número de cafeterías y restaurantes de todo el país, que también representan y otros de productos vegetales leñosos como son algunos árboles como encino, y pino y arbustos.

En el Distrito Federal, en el año 2000, la estimación en la producción de desechos fue de 25,000 toneladas diarias, de estas, el 40% es orgánica, el 20% papel y cartón y el resto muy diversa (INEGI, 2001). Para darnos una idea de lo que se desperdicia de composta y sustratos del cultivo comercial de hongos, por cada kilo de hongo fresco, se genera 1.4 kg de sustrato degradado por hongos, y se considera que su reutilización total agroindustrial representa una quinta parte en diferentes formas.

Basado en lo anterior y en estudios de Das y col., (1997), Rashad-Mona y col. (2002) y Thurston (1994), que mencionan a la lacasa, como una de las enzimas producidas por plantas, mohos y algunas levaduras y bacterias, por ser fenoloxidasa y que prefiere los compuestos de lignina con grupos fenólicos libres Kirk y Farrel (1987). Se propone la aplicación de extractos acuosos en presencia de grupos fenólicos considerando a estos como “inductores” de crecimiento micelial se espera que con la aplicación de estos sobre los medios de cultivo, se mejore el desarrollo de los hongos *in vitro*. Siendo esta una forma de reciclar los residuos de paja, café, composta y encino.

### 3. Hipótesis

La presencia de fenoles en extractos acuosos de residuos agroindustriales composta agotada, sustrato de paja agotado, bagazo de café y corteza de encino, cuando son mezclados en algún medio de cultivo para *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*, favorecerá el crecimiento, de masa micelial y enzimas del tipo de las lacasas.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de cuatro extractos acuosos de composta, sustrato de paja, bagazo de café y corteza de encino; en los medios de cultivo sólidos hongos comestibles.

#### 4.2.1. Objetivos particulares

1. Caracterización química de extractos acuosos de (composta, sustrato de paja, bagazo de café y corteza de encino).
2. Determinar fenoles por análisis cualitativos y cuantitativos por espectrofotometría UV-VIS. de (composta, sustrato de paja, bagazo de café y corteza de encino).
3. Evaluar el efecto de los extractos acuosos (composta y sustrato de paja, bagazo de café y corteza de encino), sobre la cinética de crecimiento micelial de hongos comestibles (*A. bisporus*, *P. ostreatus* y *L. edodes*).
4. Determinar el efecto de los extractos acuosos (composta y sustrato de paja, bagazo de café y corteza de encino), sobre la producción de biomasa producida por cada hongo comestible en estudio.
5. Determinar la actividad enzimática de lacasa de las hongos cultivados en medio sólido, y con diferentes concentraciones de los extractos acuosos por medio de la oxidación del reactivo ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolinasulfónico (ABTS).

## 5. Metodología

### 5.1.- Materiales y métodos

Se emplearon tres cepas de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*, aislada en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. *Lentinula edodes*, (shiitake) donada por el Departamento de Hongos del Instituto de Ecología de Xalapa Ver. y *Agaricus bisporus* (HM12.15N), (champiñón) donada por el Laboratorio de Biotecnología de Hongos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 5.2.-Preparación de inóculo y desarrollo micelial

#### 5.2.1.- Obtención de extractos acuosos por extracción continúa

Cada uno de los cuatro extractos de residuos agroindustriales, se obtuvieron a partir de la extracción de 200 g de residuo con 1 L de agua destilada por la técnica de extracción continua a temperatura de ebullición durante 3.5 h, cumplido el tiempo la solución se filtró en caliente a través de una malla fina de tela y se ajustó a temperatura ambiente. Se repitió la filtración y se ajustó a 1 L del volumen de cada uno de los extractos con agua potable. Los extractos acuosos de residuos agroindustriales que se utilizaron **figura 7**, dos fueron de paja, pero con diferente proceso; el primero fue el sustrato de paja utilizado para el cultivo de “seta” (que no se fermenta) y el segundo extracto fue el de paja fermentada o composta (agotada o “quemada” como se le conoce en algunas plantas productoras de champiñón) utilizada para el cultivo de *A. bisporus*, el tercer residuo fue el “bagazo” de café (residuo de café que fue empleado en restaurantes y cafeterías) y el cuarto fue la corteza de encino, una planta leñosa o árbol (*Quercus* sp), que se utiliza mucho en medicina naturista para ciertas molestias bucales.

### 5.2.2.- Preparación de los medios de cultivo sólido

Los medios de cultivo se prepararon con papa dextrosa agar (PDA), se pesaron 39 g para cada una de las cepas de *P. ostreatus* y *L. edodes*, y 33.6 g de extracto de malta agar (EMA) para *A. bisporus*, ambos medios se aforaron a un 1 L de solución compuesta por agua y con cada uno de los extractos de los residuos agroindustriales. Para preparar cada mezcla de solución o medio de cultivo, se agregaron 10, 25, 50 y 75% respectivamente de cada extracto acuoso. De estos se obtuvieron cuatro medios a diferentes concentraciones de cada extracto acuoso para cada hongo. Cada medio se calentó previamente hasta su completa disolución, en seguida se esterilizó a 120°C por 40 min en autoclave, pasado este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente entre 35-40°C, de esta manera se vació aproximadamente 20 a 25 mL de medio en cada una de las cajas.

Así de esta forma, cada medio preparado con los extractos acuosos de residuos agroindustriales contienen diferentes compuestos químicos de interés que son los que tienen grupos funcionales de tipo fenólicos o polifenólico, parecidos a los inductores de crecimiento mencionados anteriormente, siringaldazina, ácido 2,2'-azinobis-3-etilbencentiazolinasulfónico (ABTS), guayacol Bourbonnais y col., (1995), Das y col., (1997), ácido tánico, y ácido ferúlico entre otros **figura 8**, que han sido utilizados sobre la generación potencial de enzimas ligninolíticas.

### 5.2.3.- Inoculación de medios de cultivo con los hongos *P. ostreatus*, *L. edodes* y *A. bisporus*

Una vez preparadas las cajas de Petri con el medio, se inocularon 20 cajas con cada una de las cepas de *P. ostreatus*, *L. edodes*, usando los medios comerciales de (PDA) y (EMA) para *A. bisporus*. Las cajas se mantuvieron en incubación **figura 5** a una temperatura de 23°C, aproximadamente 20 días para adaptar a las cepas con este medio. Del mismo modo para controlar el experimento se preparó un testigo. Una vez invadida cada una de las cajas, se



guardaron y posteriormente se escogió la mejor desarrollada **figura 6**, para llevar a cabo la parte experimental.

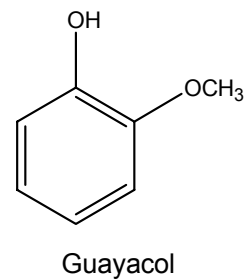
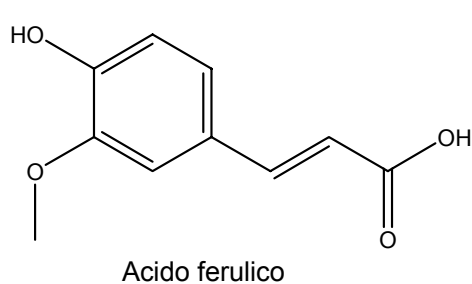
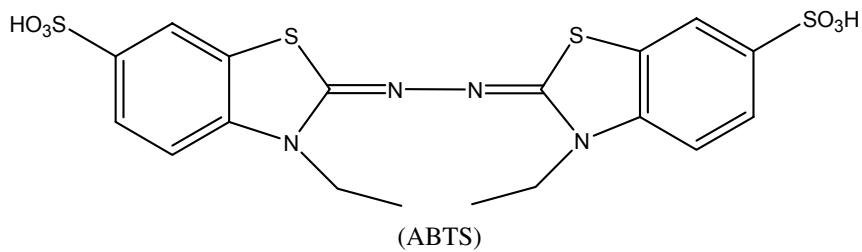


**Figura 5.-** Cajas de Petri con medio



**Figura 6.-** Invasión micelial en caja

**Figura 7.-** Matraces con cada uno de los extractos.



**Figura 8.-** Estructura molecular del ácido 2, 2-azinobis-3-etilbentiazolinasulfónico (ABTS), ácido ferulico y Guayacol.

### **5.3. Determinación de fenoles por análisis químico en los extractos acuosos.**

#### **5.3.1. Análisis cualitativo de fenoles totales**

El procedimiento para el desarrollo de fenoles totales se desarrolló de manera cualitativa ó por “análisis a la gota”, el cual, es un proceso confiable y efectivo que se caracteriza por la formación de un precipitado y una coloración y/o turbidez, al ser positiva el análisis

El análisis cualitativo de fenoles se realizo a cada una de las muestra de los extractos acuosos, siguiendo el método de Peña (2000). El método se basa en la propiedad de los taninos de formar complejos insolubles con las proteínas, esta reacción se hace evidente con la adición de cloruro de sodio, a medida que se agrega los complejos son más insolubles y permite su determinación fácilmente, comparándose siempre con un testigo como: catecol, pirogalol y/o resorcinol figura 12, y Jiménez y col., (1994), Lee & Chen, (1996).

##### **5.3.1.1 Prueba con soluciones de cloruro de sodio al 10%, Gelatina al 1% y cloruro férrico al 1%.**

##### **Procedimiento**

Se pesaron y molieron 30 g de cada una de las muestras, se pasaron por un tamiz # 24, se coloco cada una en un vaso de precipitados con 100 mL de alcohol etílico al 80% durante 20 min, se evaporo el alcohol por baño María. Se tomo una alícuota de 50 mL y se le adiciono 25 mL de agua destilada caliente, se agito y se dejo enfriar cada una de las muestras. Se colocaron 5 mL de cada muestra en tubos de ensayo y se agrego de 0.2 a 0.6 mL de la solución de cloruro de sodio al 10% para precipitar compuestos de alto peso molecular que podrían interferir en el análisis. Se filtro cada mezcla y agrego de 0.3 a 0.5 mL de una solución acuosa de grenetina al 1% y se observa. Sí se forma un precipitado se confirma la presencia de taninos.

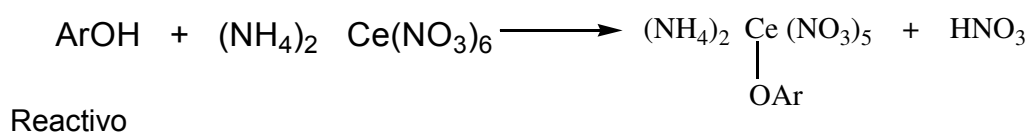
Se repite esta prueba con cloruro férrico de la misma manera.

Al adicionar cloruro férrico se diferencia los taninos condensados de los hidrosolubles.

Una coloración azul-verdosa con formación de precipitado confirma la presencia de fenoles.

### 5.3.1.2 Prueba de fenoles mediante nitrato cérico amónico.

La reacción general en la identificación de fenoles se presenta en la siguiente reacción:



Añadir 1.3 mL de ácido nítrico concentrado a 40 mL de agua destilada y disolver 10.96 g de nitrato de cerio y amonio, una vez disuelto este aforar a 50 mL.

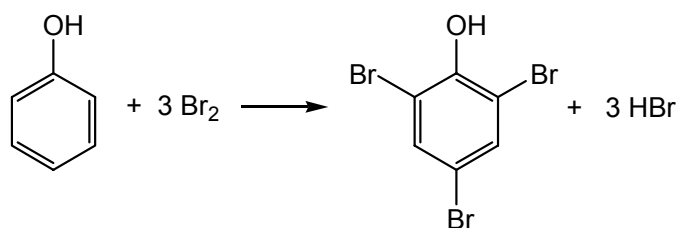
### Procedimiento

A 1 mL del reactivo, se agregó 0.5 mL de cada una de las muestras problema y se observó la formación o cambio de coloración.

Una coloración de amarillo a rojo es positiva para alcóxidos de cério IV; si se observa la formación de un precipitado y coloración café indica la presencia positiva de fenoles no y di sustituidos (Shriner y col. 1990).

### 5.3.1.3 Prueba con agua de bromo para la determinación de fenoles.

La reacción general se presenta de la siguiente forma:



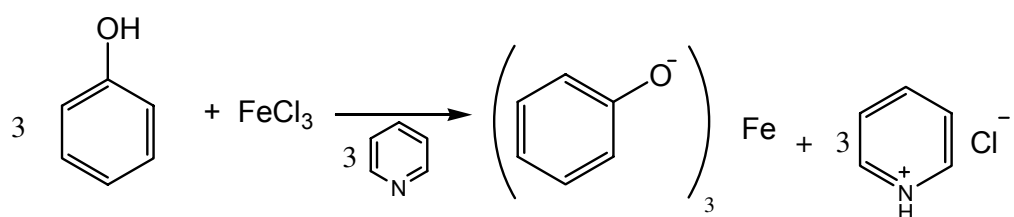
## Reactivo

Se prepara en una campana de extracción de gases, mezclando 10 mL de agua con la adición de 1 mL de bromo gota a gota y con agitación hasta obtener una solución sobresaturada.

Se mezclaron 0.5 mL de cada una de las muestras a analizar en 10 mL de agua en un tubo de ensaye y se añade solución de agua de bromo gota a gota y con agitación; la formación de un precipitado negro o la decoloración de la solución indica prueba positiva para fenoles (Shriner y col. 1990).

#### 5.3.1.4 Prueba con Cloruro férrico anhidro al 1% y piridina para la determinación de fenoles.

La reacción general se presenta de la siguiente manera:



A 5 mL de la muestra se le agregó 2 mL de cloroformo. Se agitó la solución y se calentó suavemente por unos segundos, se enfrió y se le agregó 2 gotas de la solución de cloruro férrico al 1% seguido de 3 gotas de piridina, se agitó y se observa el color producido inmediatamente; una coloración azul, violeta, púrpura, verde o rojo marrón es positiva la presencia de fenoles (Shriner y col. 1990).

#### 5.3.1.5 Prueba de Liebermann's, reacción con ácido nítrico para la determinación de fenoles.

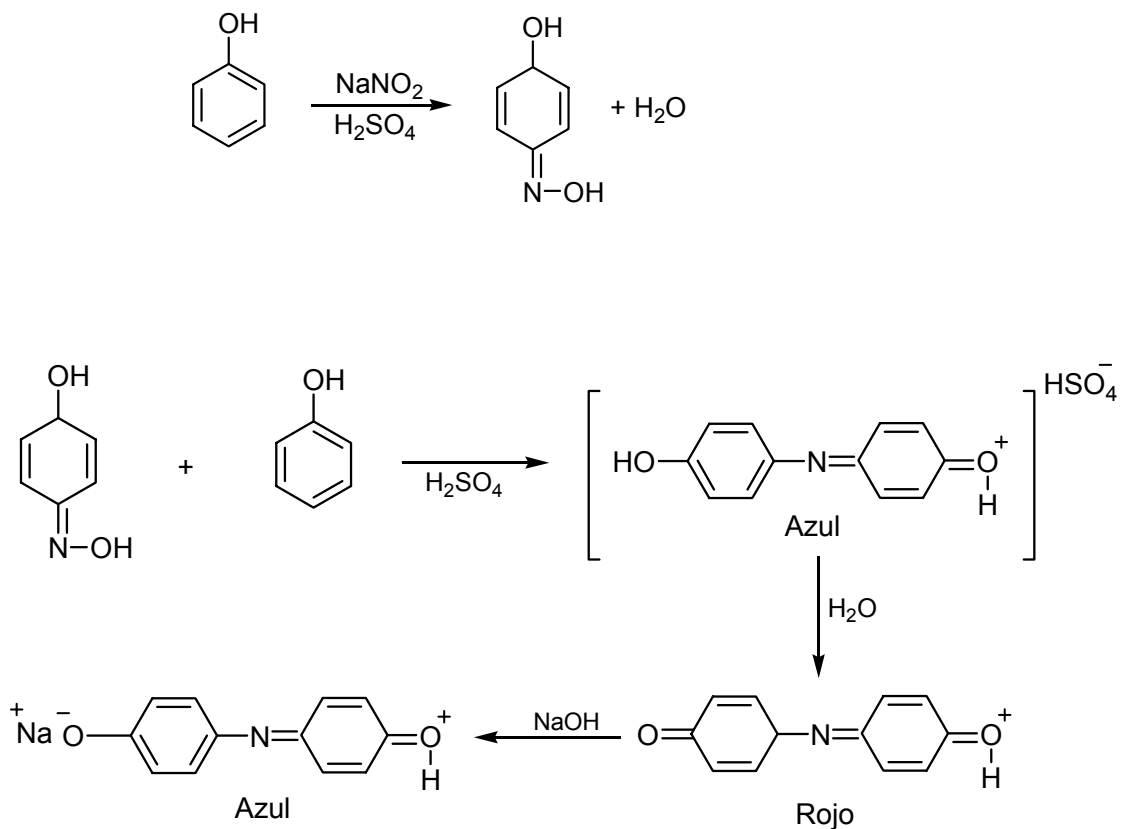
## Reactivo

Añadir 0.4 g de nitrito de sodio a 8 mL de ácido sulfúrico hasta una completa disolución.

## Procedimiento

A cada 2 mL de la mezcla anterior, se agregó con mucho cuidado 1 mL de de cada una de las muestras, problema y se observo.

La reacción general se presenta de la siguiente manera:



Un color azul a rojo, indica la presencia de fenoles. Si se vierte este complejo formado en 20 mL de agua helada cambia la coloración a rojo y cuando se le agrega unas gotas de hidróxido de sodio al 10% a la mezcla cambia la coloración nuevamente a azul (Shriner y col. 1990).

### 5.3.2.-Análisis cuantitativo de fenoles totales (método espectrofométrico)

Se preparó una curva patrón con una solución estándar 0.2 g de ácido tánico, aforando con 100 mL de agua. (Peña 2000).

La solución amortiguadora se preparó pesando 10 g de acetato de sodio mezclándose con 1.6 mL de ácido acético glacial y se aforó con 100 mL con agua destilada, el pH se ajustó a 4.6 y se conservó en refrigeración.

El reactivo de FAS por sus siglas en ingles (fast Arabic-gum solution) se preparó mezclando 1 mL de goma arábiga al 10% con una solución reguladora de acetatos y aforando a 100 mL con agua destilada. Esta solución se conservó en frasco ámbar y en refrigeración (4°C).

### **Procedimiento**

A 10 mL de la muestra se agregaron 30 mL de hidróxido de sodio 0,05 M, se calentó suavemente durante 20 min y se dejó reposar 24 h. Pasado el tiempo, se filtró y se aforó a 50 mL con agua destilada.

#### **5.3.2.1.-Curva patrón de ácido tánico**

Se midieron alícuotas de 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mL de la solución patrón de ácido tánico en matraces aforados de 50 mL, se adicionaron 5 mL del reactivo de FAS a cada uno y se aforo a 50 mL con agua destilada, se mezcló perfectamente, se colocan 9 mL en la celda de lectura y se agregó 1 mL de solución de cloruro férrico al 1%. Se leyó la absorbancia de cada una de las muestras a 725 nm, con los datos obtenidos se trazó la curva patrón en función de la concentración de ácido tánico para interpolar los valores obtenidos de las muestras en la curva patrón.

#### **Lectura de las muestras**

Se tomó una alícuota de 10 mL del extracto preparado y se adicionó 5 mL del reactivo de FAS aforando a 50 mL con agua destilada, se mezcló perfectamente, de esta solución se colocan 9 mL en la celda de lectura y se agregó 1 mL de solución de cloruro férrico al 1%. Se midió la absorbancia a 725 nm en el espectrofotómetro. "Temoespectronic modelo BioMate 3".

## **5.4. Análisis químico proximal de residuos agroindustriales**

### **5.4.1. Determinación de Carbohidratos por el método 3,5-dinitrosalisílico (DNS)**

El contenido de azúcares reductores se determinó de acuerdo al método de Patil y Smith (1977), La glucosa se determinó por cuantificación de grupos reductores con el reactivo 3,5-dinitrosalisílico (DNS) Miller (1959). La reacción se llevó a cabo con 1 mL del extracto y 1 mL del reactivo de DNS.

Se preparó una curva de calibración de 0 a 300 mg/mL con glucosa cada una de las mezclas de reacción se agitaron en un vortex y se mantuvieron a baño María a temperatura de ebullición durante 5 min para desarrollar la coloración producto de la reacción que nos permitió realizar la lectura de absorbancia a 575 nm, en un espectrofotómetro.

Para la determinación de carbohidratos se realizó con la solución de cada muestra problema extraído en caliente (5 g de muestra triturada o molida en 100 mL de agua) por 1 h.

Con los datos obtenidos se trazó la curva patrón en función de la concentración de glucosa para interpolar los valores obtenidos de las muestras en la curva patrón, (tabla 4, figura 9).

### **5.4.2. Determinación de fibra cruda (fibra soluble)**

Para este análisis se utilizó el método de la AOAC (1980). Se pesó y se colocó 1 g de muestra desengrasada en un matraz redondo de fondo plano, y se realizó la digestión con 100 ml de reactivo ADF (bromuro de cetil-trimetilamonio al 2% en ácido sulfúrico 1 N) durante 1 h, la muestra se filtró a través de un embudo con base de vidrio poroso previamente pesado, se lavó el filtrado con 50 ml de agua destilada caliente en dos ocasiones, posteriormente se lavó con acetona hasta obtener una estabilidad en el color. El embudo se secó a 100°C por 12 h, se dejó enfriar a una temperatura de 22°C dentro de un desecador de control, se pesó y se determinó la fibra por diferencia de peso.

### 5.4.3. Determinación de proteína cruda

Para determinar el nitrógeno presente, se utilizó el método de micro Kjeldahl (AOAC, 1980), en donde el contenido de nitrógeno es convertido en sales de amonio (sulfatos) por la digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado. Esta digestión también oxida al hidrógeno y carbono a dióxido de carbono y agua. Para la digestión de la muestra, se colocaron 0.12 g de muestra en matraces micro Kjeldahl, junto con 0.8 g de catalizador, dicho catalizador está compuesto por la mezcla de  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1:9 p/p y al final se agregó 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 5 perlas de ebullición; la digestión se realizó hasta que no hubiera desprendimiento de humos y el color de la muestra se tornara verde brillante.

Una vez completada la digestión, se procedió a realizar la destilación, agregando primeramente 25 mL de agua destilada fría a la muestra digerida y se transfirió al aparato de destilación micro Kjeldahl, a esta solución se le agregó 15 mL de NaOH al 40% para alcalinizar el medio y liberar al amoníaco por destilación a temperatura de ebullición. La solución destilada se recibió en 10 ml de ácido bórico al 2% agregando 3 gotas de la solución indicadora de pH (Solución alcohólica de rojo de metilo 0.2% y solución acuosa de azul de metileno 0.1% v/v), hasta completar un volumen total de 20 mL.

Ya destilado el amoníaco, se tituló con HCl 0.1 N, y el contenido de proteína cruda se determinó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 6,25 (factor de conversión de nitrógeno a proteína).

### 5.4.4. Determinación de cenizas

Se colocaron 2 g de muestra en un crisol a peso constante, la muestra se carbonizó sobre una flama de mechero hasta que dejó de desprender humos y se calcinó en una mufla a 600°C hasta que las cenizas presentaron un color blanco o ligeramente grisáceo, se pasó a un desecador 30 min y se pesó a peso constante por dos ocasiones (AOAC, 1980). La diferencia entre las dos pesadas no debía ser mayor de 1-5 mg.



### 5.5. Determinación de la velocidad radial o cinética de crecimiento micelial de las cepas de *P. ostreatus*, *A. bisporus* y *L. edodes*

Esta etapa de estudio comprende el proceso que determina: velocidad o cinética de crecimiento, producción de biomasa, actividad enzimática específica. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado y en intervalos de tiempo de 0 a 12 días.

Las cepas se inocularon sobre medio sólido definido, mezclándose con los diferentes porcentajes de extractos acuosos de los desechos agroindustriales respectivamente en cajas Petri. Se realizaron medidas consecutivas y aleatorias a al diámetro de los crecimientos de la colonia micelial formada por cada hongo. Las mediciones se realizaron en los primeros dos o tres días en el caso de *P. ostreatus* y *A. bisporus* y cada 3 o 5 días para el *L. edodes* como se muestra en la **figura 9**.

La evaluación, de la cinética de crecimiento se realizo utilizando el método de (Sarralde-Corona y col. 1997).

$$r = \bar{d} / 2 = (d_1 - d_i) / 2 \quad (1)$$

Donde:

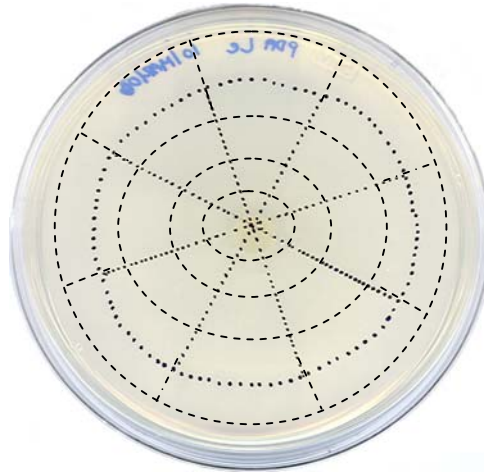
$d_1$  = diámetro parcial

$d_i$  = diámetro inicial

$\bar{d}$  = diámetro promedio

$r$  = radio

$$A = (\Pi) * (\bar{r}^2) = (3.1416) * (\bar{d})$$



**Figura 9-** Trazo del diámetro de la colonia micelial de manera aleatoria formada en cajas de Petri

### **5.6. Efecto de los extractos acuosos sobre la producción de la biomasa de las cepas de *P. ostreatus*, *A. bisporus* y *L. edodes***

La biomasa se extrajo de cada una de las cajas con medio, realizado mediante un “raspado suave” con una micro espátula enjuagando cada raspado en agua desionizada contenida en un vaso de precipitado. Esta solución con biomasa, se calentó a 35°C/20 s en un horno de microondas, se filtró y se lavó sobre un embudo Buchner a presión reducida con agua desionizada, se terminó de filtrar y se secó, determinando la producción de biomasa por diferencia de peso.

Con la formula exponencial **(3)**; se obtiene la biomasa producida por día. Y se considera como la densidad de la biomasa formada ( **$\rho$** ) por día según la formula **(2)**.

$$A = \text{cm} / \text{día.}$$

$$\mu = \text{g micelio} / \text{día}$$

$$\rho = \mu / A = (\text{g micelio} / \text{cm}^2) \quad \mathbf{(2)}$$

La biomasa formada por día fue calculada con la siguiente formula

**Donde:**

$$X_{cal.} = \frac{K}{1 + \left( \frac{K - X_0}{X_0} \right) e^{(-\mu t)}} \quad (3)$$

$X_{cal.}$  = Biomasa calculada al día  
 Correspondiente (micelio seco)  
 $K$  = Biomasa máxima  
 $X_0$  = Biomasa inicial  
 $\mu$  = Velocidad específica de crecimiento  
 $t$  = Tiempo (días)

Estos cálculos se realizaron para cada uno de los tratamientos (hongos inoculados *in vitro* con su respectiva mezcla de extractos acuosos de residuos agroindustriales).

### **5.7 Efecto de los extractos acuosos sobre la actividad enzimática de los hongos de *P. ostreatus*, *A. bisporus* y *L. edodes***

La actividad enzimática de las oxidasas o de lacasas del micelio de los hongos, se determinó por el método de Eggert y col. (1996), Das y col., (1997), Koroljova y col., (1998). Se preparó el reactivo de ABTS 125  $\mu$ M en un amortiguador de acetato de sodio 0.1 M a pH 6.5. Una vez preparado los reactivos, se procedió a preparar la muestra de la siguiente manera: en cada ocasión que se trabajó una muestra micelial, esta se lavó con agua desionizada y se filtró. La biomasa obtenida se homogenizó con un micro homogenizador Wheaton con 1 mL de agua desionizada. La suspensión resultante se centrifugó a 7000 rpm, durante 15 min, a 4°C, en una centrifuga Ependorf modelo 5403, posteriormente se filtró a través de membranas de 0.8  $\mu$ m y se almacenó en alícuotas de 1 mL a 2-4°C con solución amortiguadora de acetatos para obtener el extracto crudo. A 10  $\mu$ l de extracto crudo, se le agregó 790  $\mu$ l de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 6.5 y 200  $\mu$ l de reactivo-sustrato de ABTS, para dar un volumen total de 1 ml, se agitó por medio de un vortex y se midió la absorbancia a 420 nm durante 5 min cada 25 seg en un espectrofotómetro. Una unidad de actividad se define como el incremento de 1 unidad de absorbancia/minuto, la actividad específica se define como unidades de

enzima/mg de proteína y es la cantidad de micromoles de lacasa que reacciona oxidando al ABTS (ácido 2,2-azinobis-3-etilbencenzotiazolinasulfónico) en función de la cantidad de proteína presente en la biomasa producida. Los resultados se muestran en las figuras (21 a 23).

Para determinar el efecto de la actividad enzimática se empleó la fórmula siguiente:

$$AEe = \mu\text{mol E}/\mu\text{g P} \quad (4) \quad \text{Donde:}$$

AEe = Actividad enzimática específica

$\mu\text{mol E}$  = Micromoles de enzima

$\mu\text{g P}$  = Microgramos de proteína

También se realizó el cálculo para determinar el rendimiento enzimático con respecto a la biomasa de cada una de las tres cepas de estudio, empleándose la siguiente fórmula:

$$(Y_{E/X}/t) \quad (5) \quad \text{Donde:}$$

Y = Pendiente

E = ( $\mu\text{gE}/\text{mL} \cdot \text{min}$ )

X = Biomasa ( $\text{mg}/\text{mL}$ )

T = Tiempo

Considerándose como la pendiente de las curvas correspondientes (enzima/biomasa/tiempo), comparándose contra el porcentaje de extracto utilizado para el tratamiento de cada una de las cepas.

### **5.8. Producción de proteína de los hongos *P. ostreatus*, *A. bisporus* y *L. edodes***

La determinación de proteínas se realizó por la técnica de Bradford (1976). Con el siguiente procedimiento.

A la biomasa obtenida se homogenizó con un micro homogenizador Wheaton con 1 mL de agua desionizada. La suspensión resultante se centrifugó a 7000 rpm, durante 15 min, a 4°C, en una centrifuga Ependorf modelo 5403, posteriormente se filtró a través de membranas de 0.8 µm y se almacenó en alícuotas de 5 a 10 mL a 2-4°C. A cada una de las mediciones se agregaran 800 µL del extracto y se le adicionaran 200 µL de reactivo de Bradford (Azul brillante de Coomassie G250, alcohol etílico, ácido fosfórico (BioRad)). Se incubaron a temperatura ambiente 20-22°C, durante 5 min, y en seguida se midió la absorbancia a 595 nm, en un espectrofotómetro.

La proteína determinada en la biomasa producida se considero para complementar el cálculo de actividad enzimática específica.

## 6 Resultados

### 6.1 Análisis químico proximal

Se realizó el análisis químico de los residuos agroindustriales (composta, bagazo de café, sustrato de paja y corteza de encino) los resultados se presentan en la **tabla 3**, que son los valores obtenidos. Estos valores muestran que la composta y el café son los de mejor contenido de proteína cruda a diferencia de paja y encino. En cuanto al contenido de carbono el encino obtuvo el valor más alto 6.30 mg/mL. La composta registró el mejor contenido de fibra cruda y cenizas.

**Tabla 3.-** Composición de residuos agroindustriales (g/100 base seca)

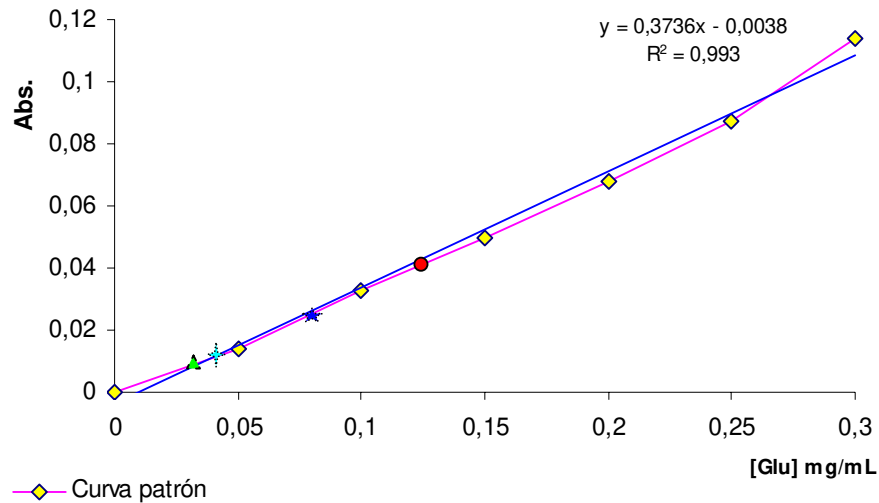
Residuo	N %	Proteínas %	Carbohidratos (mg/mL)	Fibra cruda %	Cenizas %
Composta	1.0	6.25	0.29 ± 0.236	84.58	7.35
Café	0.83	5.20	0.124 ± 4.71x10 <sup>-4</sup>	99.94	0.04
Sustrato (paja)	0.46	2.85	0.26 ± 0.011	99.35	0.41
Encino	0.21	1.3	6.3 ± 9.43x10 <sup>-4</sup>	95.9	0.27

Los resultados registrados en la tabla anterior se obtuvieron en g/100g base seca. Los valores de carbohidratos de composta y paja se multiplicaron por su factor de dilución 1/10 y encino por su factor de 1/100 y su desviación estándar.

**Tabla 4, figura 10.**

**Tabla (4).**-Valores obtenidos en el análisis de carbohidratos las muestras problema e interpolación en la curva patrón de glucosa.

Muestra	[Gluc] mg/mL	Absorbancia
Café	0.124	0.041
Encino	0.063	0.024
Composta	0.029	0.011
Paja	0.026	0.01



**Figura 10.** - Interpolación de los valores obtenidos en la determinación de carbohidratos en la Curva patrón con glucosa por el método de DNS (3,5-dinitrosalisílico, Patil y Smith 1977; Miller 1959).

## 6.2.- Análisis químico cualitativo para la determinación de fenoles totales

Este análisis se caracterizó por la formación de un precipitado, una coloración y/o turbidez, al ser positiva la identificación **figura 11**,



**Figura 11.** Resultado del análisis cualitativo de las muestras de residuos agroindustriales.

El resultado en el análisis químico cualitativo de grupos fenólicos, nos mostró la presencia de estos compuestos. Las reacciones son las características para compuestos como pirogalol resorsinol y catecol figura 12, Los resultados de esta prueba se muestran en la **tabla 5**.

**Tabla 5.** Resultado del análisis cualitativo aplicado a cada una de los extractos de desechos agroindustriales comparándose contra el testigo (catecol).

Pruebas	Encino	Café	Composta	Paja	Testigo
<sup>1</sup> Agua de bromo	+++	++++	++	++	+++
<sup>2</sup> Cloruro de sodio-grenetina/Cloruro férrico	++++	++++	+++	+++	+++
<sup>3</sup> Cloruro férrico-piridina	++++	++++	+++	++	+++
<sup>4</sup> Prueba de Liebermann's ácido nitroso	++++	+++	++	++	+++
<sup>5</sup> Prueba de nitrato de cerio y amonio	++++	++	++++	++	+++

(++++) Máximo color y referencia del efecto

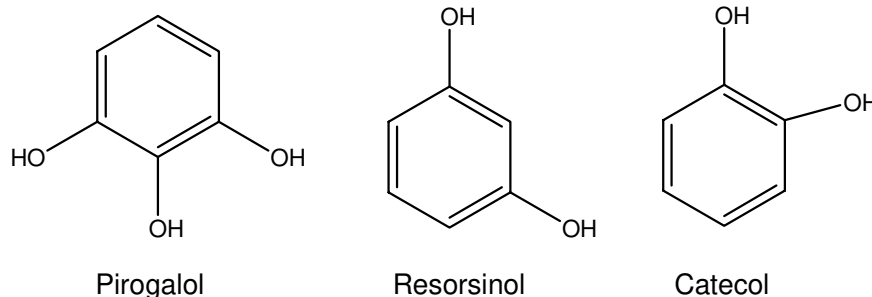
<sup>1</sup> Precipitado blanco o decoloración de la solución

<sup>2</sup> Coloración azul-verdosa o negra-verdosa

<sup>3</sup> Coloración amarillo pálido a marrón verdosa

<sup>4</sup> Color azul y cambia a rojo con agua y retorna al color azul con NaOH al 10%

<sup>5</sup> Cambio de coloración de amarillo a rojo o café



**Figura 12.** Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos.

### 6.3.- Análisis químico cuantitativo de fenoles totales

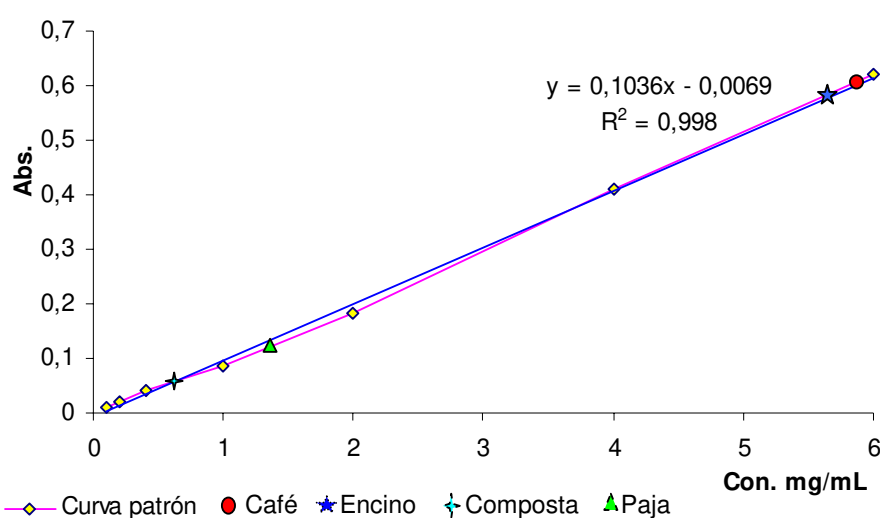
Una vez confirmado la presencia de compuestos de tipo fenólico, se determinó leyendo la absorbancia en el espectrofotómetro e interpolando los valores en la curva patrón, para cada uno de los residuos agroindustriales. En la **figura 13** y



**tabla 6**, se muestra los resultados que permiten cuantificar la presencia de compuestos fenólicos. A la muestra de encino se le realizó una dilución 1/10 a registrando la mayor absorbancia.

**Tabla 6.**- Valores interpolados en la curva estándar de ácido tánico resultados de la determinación de fenoles totales.

mL de solución estándar	Absorbancia a 725 nm	Concentración mg/mL
Encino	0.578	56.5 ± 0.123
Paja	0.136	1.41 ± 0.034
Composta	0.059	0.67 ± 5.4x10 <sup>-3</sup>
Café	0.599	5.86 ± 0.077



**Figura 13.** Interpolación de los valores obtenidos en la curva patrón de ácido tánico para cuantificar compuestos fenólicos presentes en los diferentes extractos de subproductos agroindustriales.

La tabla 7, muestra los cálculos del contenido de compuestos fenolicos totales en cada uno de los extractos agroindustriales agregados a cada uno de los medios de cultivo, el mayor contenido correspondió al encino.

**Tabla 7** Contenido de compuestos fenólicos totales de cada uno de los extractos de residuos agroindustriales en el medio de cultivo.

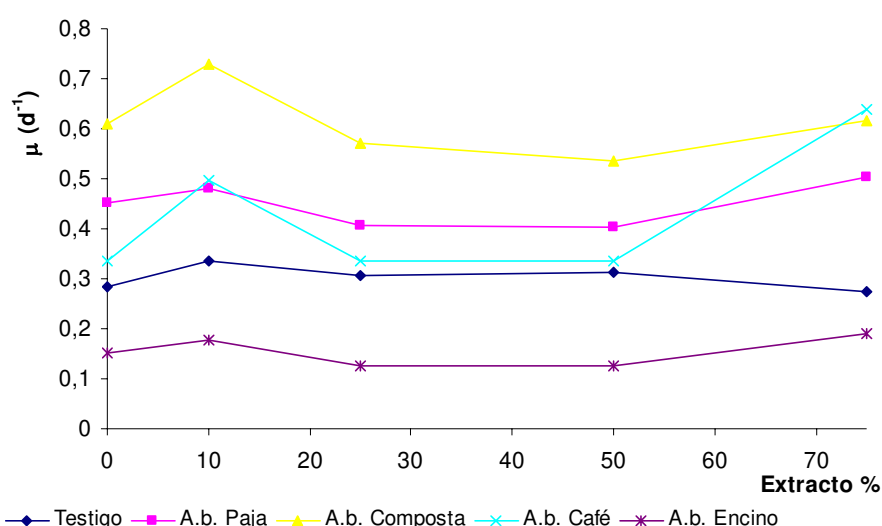
Dilución	Encino (g/L)	Café (g/L)	Composta (g/L)	Paja (g/L)
1.0/10	0.565	0.058	0.006	0.014
2.5/10	1.412	0.146	0.017	0.035
5.0/10	2.825	0.293	0.033	0.070
7.5/10	4.237	0.439	0.050	0.105

#### 6.4.- Cinética de crecimiento micelial de las cepas de *P. ostreatus*, *A. bisporus* y *L. edodes*

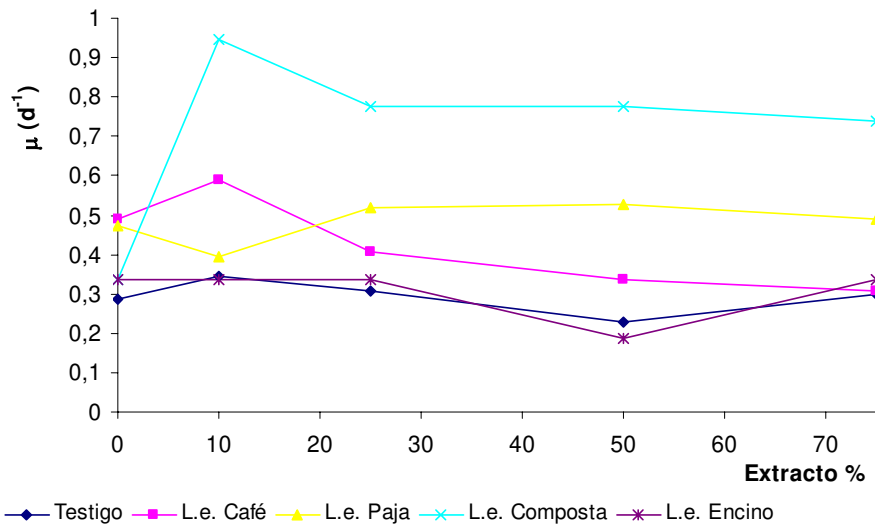
Con respecto a *A. bisporus* este mostró su mejor resultado con el extracto de composta al 10%, con el tratamiento con café obtuvo su valor más alto al 75% de extracto. Con paja su valor máximo se observó al 75% de extracto. Con encino el mejor dato se determinó al 10%, sin embargo se observó un resultado por debajo del grupo testigo, **figura (14)**. El mejor resultado de *A. bisporus* se obtuvo con el tratamiento de composta al 10%.

*L. edodes*, registró el valor más alto con el tratamiento de composta al 10%, con café, mostró su valor más alto también al 10%, paja presentó un comportamiento similar entre los tratamientos al 25 y 50%, con el tratamiento de encino no hubo efecto **figura (15)**. El mejor resultado de *L. edodes* se registró con el tratamiento de composta al 10%.

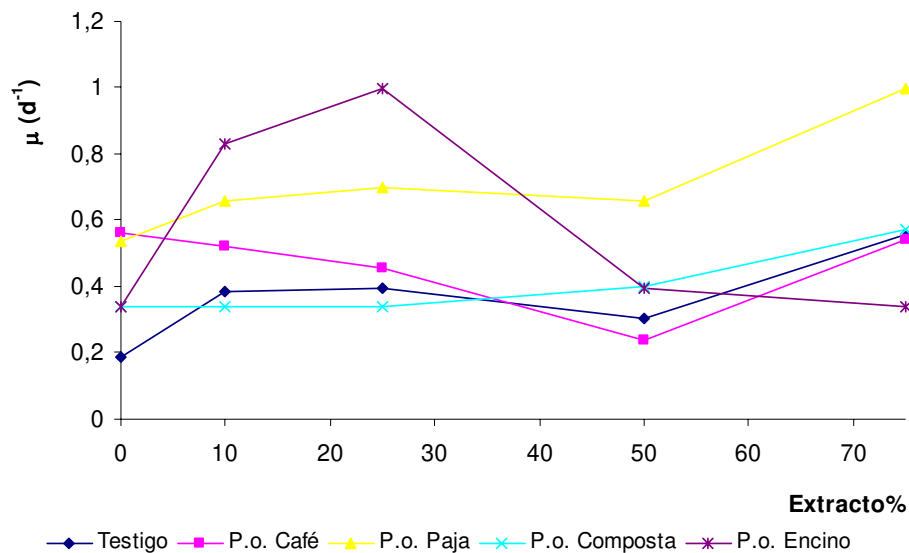
Finalmente, *P. ostreatus* mostró el mejor valor con el tratamiento de encino al 25% y con paja al 75%. **Figura 16**, así mismo de manera similar se demostró con el tratamiento de café y composta observando su máximo valor por debajo de encino y paja y similar al testigo. El mejor resultado de *P. ostreatus* se obtuvo con el tratamiento de encino al 25%.



**Figura 14.** Velocidad específica de crecimiento de *A. bisporus* con diferentes concentraciones de extractos de café encino, composta y paja.



**Figura 15.** Velocidad específica de crecimiento de *L. edodes* con diferentes concentraciones de extractos de café encino, composta y paja.

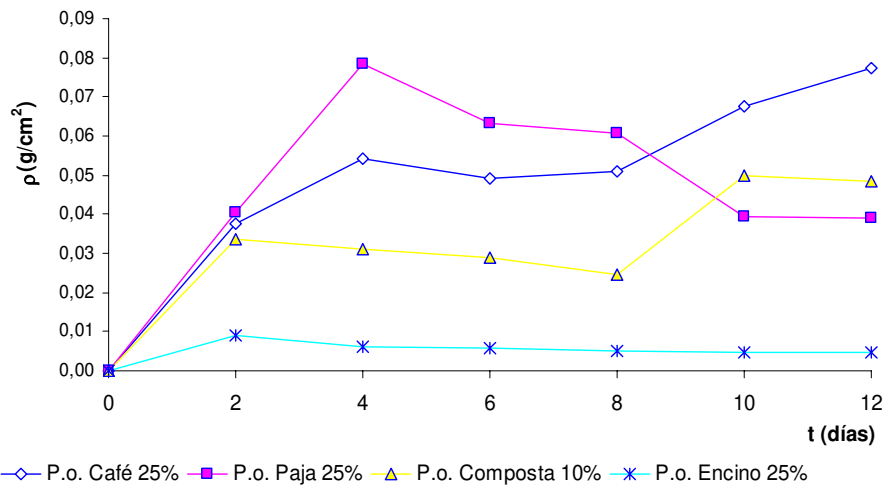


**Figura 16.-** Velocidad específica de crecimiento de *P. ostreatus* con diferentes concentraciones de extractos de café encino, composta y paja.

### 6.5.- Determinación de biomasa

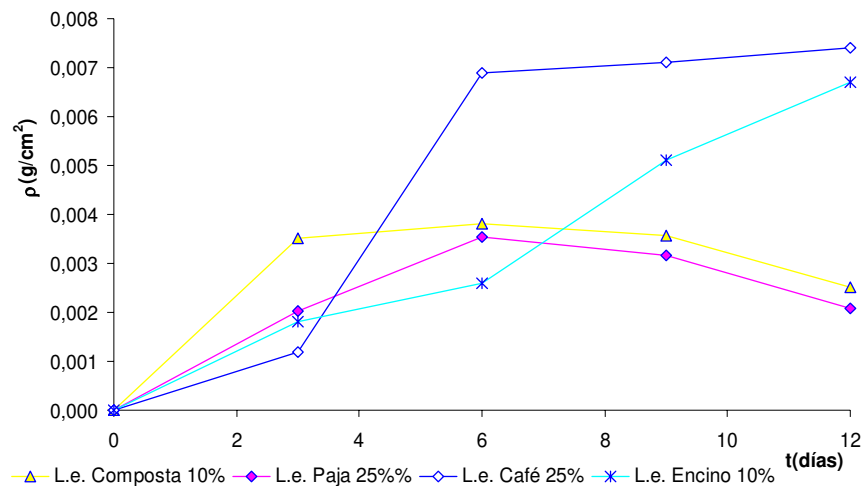
En la **figura 18**, se observa que *P. ostreatus* presentó el mayor contenido de biomasa con el tratamiento a 25% de paja, aunque disminuyó. Con el tratamiento de composta al 10% la mejor determinación se observó a partir de día 10 al 12. Sin embargo para el café al 25% mostró un incremento el mejor

desarrollo para el día 12; así mismo para el 25% de encino aunque fue menor que los tratamientos con paja, café y composta. Siendo paja y café los mejores tratamientos.



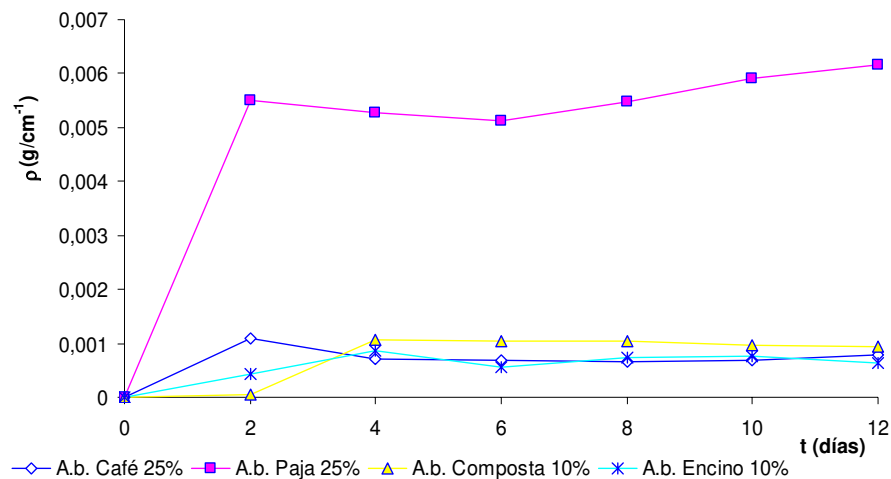
**Figura 18.** Curva de contenido de biomasa de *P. ostreatus* en los diferentes tratamientos

Con *L. edodes* el mejor resultado lo registró con extracto de café al 25%, seguido de encino al 10% al día 12. Tanto composta como para paja en el día 6 de su crecimiento se les determinó el mayor contenido de biomasa formada, para luego disminuir. El mejor tratamiento fue para café con 25%. **Figura 19**



**Figura 19.** Curva del contenido de biomasa de *L. edodes* en los diferentes tratamientos.

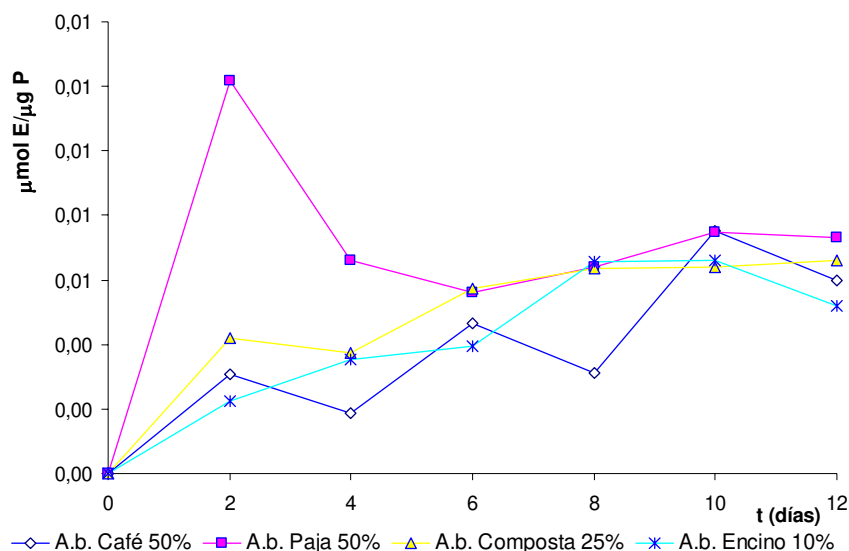
En la **figura 20**. Se presenta el resultado obtenido de *A. bisporus*, obteniendo Siendo el tratamiento de paja al 25% el de mejor resultado del 2º al 12º día, con café el mejor resultado se dio en el 2º día de su crecimiento con el 25% del tratamiento, el mejor contenido de biomasa con los tratamientos de composta y encino se registro con 10% de extracto en el 2º día de crecimiento; tuvieron un comportamiento similar pero por debajo de los resultados de paja al 25%.



**Figura 20.** Curva del contenido de biomasa de *A. bisporus* en los diferentes tratamientos.

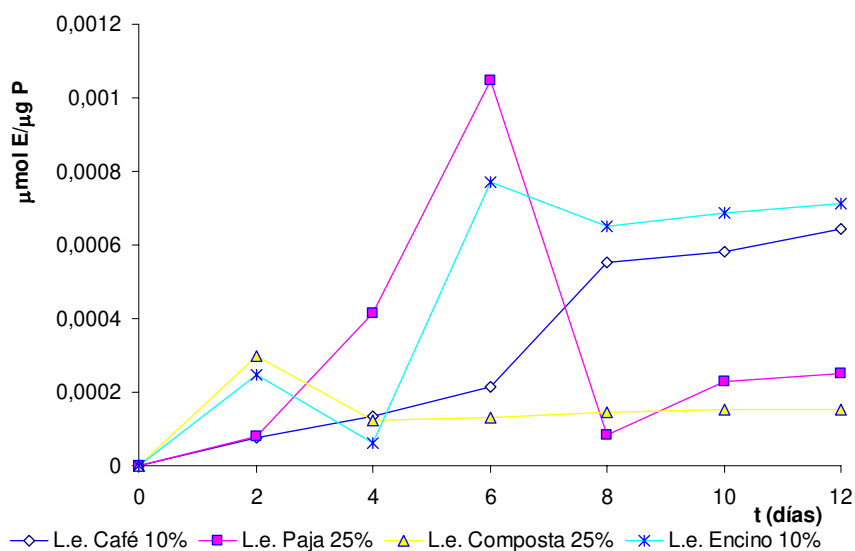
### 6.6.- Determinación de la actividad enzimática

Para *A. bisporus* **Figura 21**, con el tratamiento de paja al 50% se observó la mayor actividad enzimática en el segundo día y a partir del sexto día se comportó similar a los otros tres extractos, sin embargo, con los tratamientos de encino al 10% y composta al 25% su mejor determinación se registró en el octavo día y el mejor contenido de biomasa para el tratamiento con café se realizó al 50% de extracto en el día 10. Siendo la mejor actividad la del tratamiento de paja al 50%.



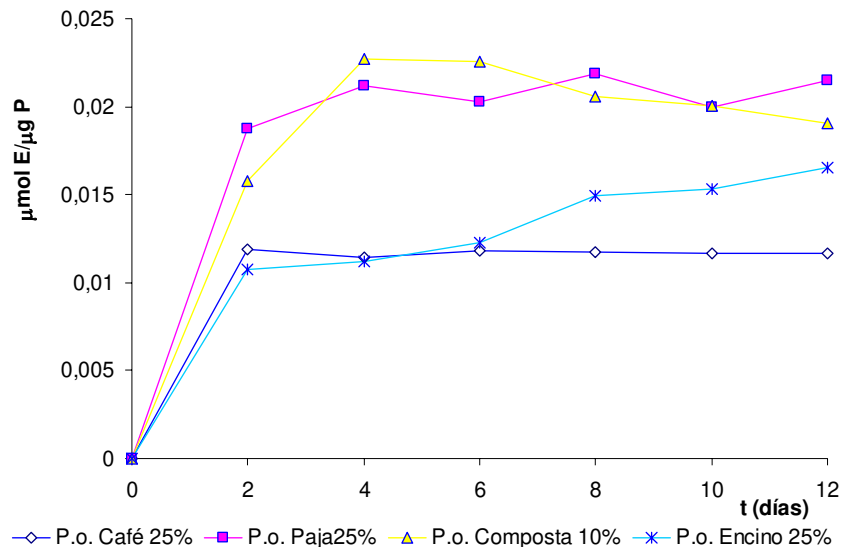
**Figura 21.** Actividad enzimática específica de *A. bisporus*, expresada como  $\mu\text{moles}$  de enzima/mg de proteína de con diferentes concentraciones de extractos agroindustriales.

El mejor resultado en los tratamientos para *L. edodes* correspondió al de paja 25% en el día 6. Así mismo sucede para encino al mismo día con el tratamiento al 10% y para café se observa un mayor incremento en el decimo día, **figura 22.**



**Figura 22.** Actividad enzimática específica de *L. edodes*, expresada como  $\mu\text{moles}$  de enzima/mg de proteína de con diferentes concentraciones de extractos agroindustriales.

En la **figura 23**. Para *P. ostreatus*, los mejores resultados obtenidos en los diferentes tratamientos, el mejor comportamiento se produjo con paja al 25% y composta al 10% manteniendo su actividad casi constante durante todo el desarrollo. Café y encino al 25% de extracto respectivamente mostraron una actividad ascendente y casi constante a través de su desarrollo, pero por debajo de paja y composta.

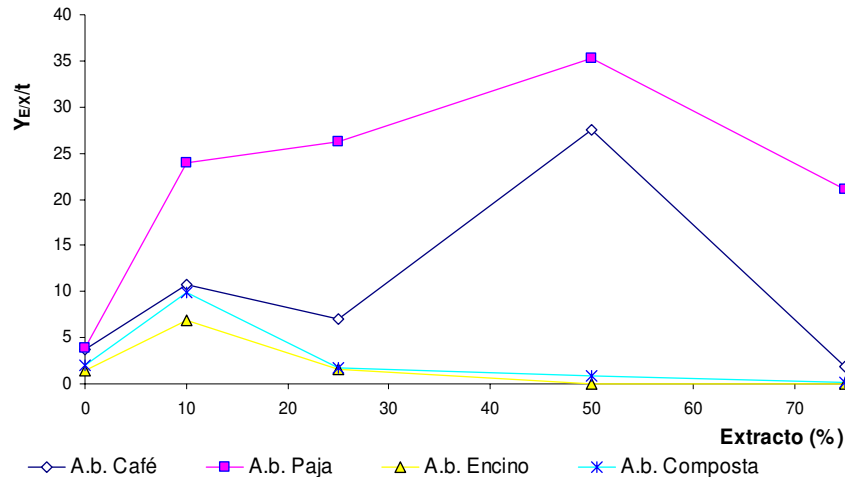


**Figura 23.** Actividad enzimática específica de *P. ostreatus*, expresada como  $\mu$ moles de enzima/mg de proteína de con diferentes concentraciones de extractos agroindustriales.

### 6.7.- Rendimiento enzimático respecto a la biomasa

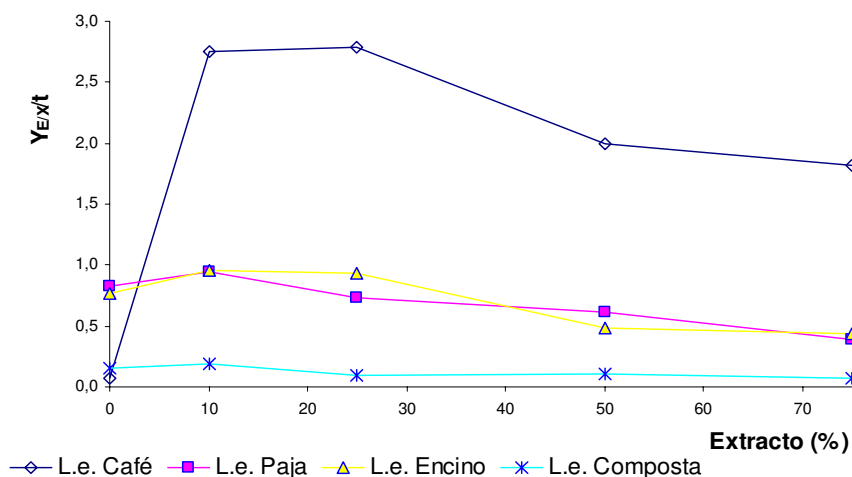
Una vez determinada la biomasa y la actividad específica de crecimiento, para obtener un resultado representativo y con un mínimo de error se determinó el rendimiento enzimático respecto a la biomasa producida respecto al tiempo de crecimiento ( $Y_{E/X}/t$ ). Esta característica fue calculado determinando la pendiente de las curvas correspondientes (enzima/ biomasa/tiempo) y se comparó contra el porcentaje de extracto utilizado. Así, el comportamiento de cada uno de los hongos con cada extracto, registró una diferencia entre la relación de la actividad enzimática con respecto a la biomasa en el transcurso del periodo de crecimiento micelial *in vitro*.

Para *A. bisporus* **figura 24**, denota su punto máximo de rendimiento de actividad enzimática en la concentración de 50% de los extractos de café y paja, siendo este ultimo el que presenta un incremento casi constante de 10 a 50% de extracto y decae a mayor concentración con ambos extractos. Sin embargo también denota una actividad media en 10% de los extractos tanto de café como de composta y encino.



**Figura 24.** Interrelación de la pendiente de actividad enzimática con la biomasa de *A. bisporus* en cada uno de los tratamientos

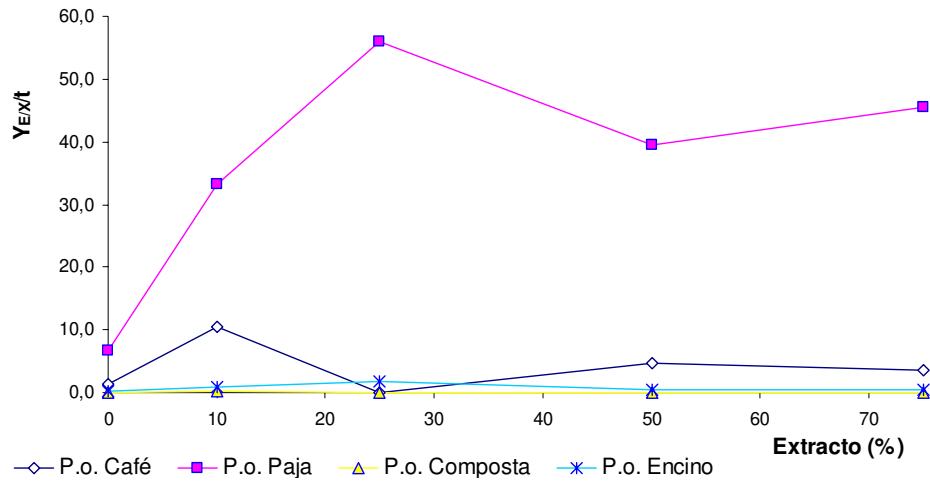
Para *L. edodes* **figura 25**, se observa que el mejor resultado en el rendimiento de actividad enzimática en función de la biomasa y tiempo se obtuvo en la concentración al 10 y 25% con extracto de café.



**Figura 25.** Interrelación de la pendiente de actividad enzimática con la biomasa de *L. edodes* en cada uno de los tratamientos.



El comportamiento de *P. ostreatus* **figura 26**, obtuvo su mejor comportamiento con una concentración al 25% de extracto de paja, Y con el tratamiento de café al 10% aunque con ambos a mayor concentración la curva decae. Para los extractos de encino y composta, se registro un rendimiento muy bajo.



**Figurara 26.** Interrelación de la pendiente de actividad enzimática con la biomasa de *P. ostreatus* en cada uno de los tratamientos.

## 7. Discusión

Se ha establecido que compuestos sintéticos como ABTS y siringaldazina ácido tánico, ácido ferúlico 2-naftol alcohol veratrílico guaiacol entre otros compuestos fenolicos son sustratos en la producción de lacasas y por tanto son inductores sintéticos porque aumentan la actividad enzimática de algunos hongos basidiomicetos en los medios de cultivo Das, y col., (1997).

En los resultados obtenidos en el análisis químico proximal, se denotó una mayor cantidad en el contenido de N y proteínas en el residuo de composta debido quizás al contenido de aditivos agregados en el proceso de fermentación. Sin embargo el café también presenta un valor similar pero debido a su contenido natural de compuestos nitrogenados. El valor más bajo de N y proteínas lo mostró el encino, pero a su vez presenta el mayor contenido de carbohidratos. Los resultados obtenidos en el análisis químico cualitativo con los extractos de composta, paja, café y encino, mostraron la presencia de compuestos fenólicos. Así mismo en la determinación cuantitativa dichos compuestos fueron determinados en mayor cantidad en encino y café. Partiendo de estos resultados se estableció, que dichos extractos mejoraran el efecto inductivo sobre la producción de lacasas como lo menciona (Das, y col, 1997; Koroljova-Skorobogart'ko y col, 1998). Y por tanto mostrar un incremento en la cinética de crecimiento, producción de la masa micelial y actividad enzimática de *P. ostreatus*, *L. edodes* y *A. bisporus*. Como se muestra en algunas investigaciones realizadas, principalmente con *A. bisporus* crecido en una variedad de sustratos principalmente lignocelulosicos se evidencio la producción de enzimas como Mn-peroxidasa y lacasa. A través del crecimiento micelial de *A. bisporus* en composta de paja de trigo que produce gran cantidad extracelular de fenol oxidasas (lacasa, tyrosinasa y peroxidasa) como enzimas ligninolíticas (Trejo–Hernández M. R, 2001).

En la medición de la cinética de crecimiento los resultados que se observaron mostraron los mejores crecimientos para cada uno de los hongos en presencia de diferentes concentraciones de extractos agroindustriales. De los datos obtenidos, con *A. bisporus*, se obtuvo la cinética de crecimiento más eficiente con extracto de café al 75%, también con el de composta y paja al 10 y 75% respectivamente. Con encino los resultados en cada uno de los tratamientos

estuvieron por debajo del grupo testigo. Con esta observación se argumenta que el contenido de compuestos fenólicos presentes en el extracto de café al 75%, composta al 10% y paja al 75% favorecieron la cinética de crecimiento para *A. bisporus*, y por tanto el comportamiento con el tratamiento de encino fue inhibitorio.

*L. edodes* mostró su mejor cinética con extracto de composta al 10% favoreciéndose por el contenido de compuestos presentes en el tratamiento, el resultado con encino registró un comportamiento similar al testigo. Lo cual indica que también en este caso se inhibe el desarrollo del hongo.

*P. ostreatus* registró un comportamiento contrario a los anteriores, su mejor resultado se presentó con extracto de encino al 25%, con lo cual quiere decir que la presencia del tipo de fenoles del café no le favorecieron en la cinética a este hongo y por tanto este influyendo otro factor que al momento se desconoce.

La biomasa producida en cada uno de los hongos presentó una variación con respecto al comportamiento de la cinética de crecimiento, sin guardar una relación con los mejores resultados de cinética.

Para *P. ostreatus* el mejor desempeño se determinó con los extractos de café y paja al 25% respectivamente, Obteniéndose valores más bajos para los otros tratamientos con encino y composta. Lo cual llama la atención porque el contenido de fenoles en cada tratamiento es diferente, en este caso el extracto de café presenta más cantidad de fenoles que paja.

*L. edodes*, presentó la mejor producción de biomasa con extracto de café al 25% y también con encino al 10%. En este caso se puede observar que ambos tratamientos contienen el valor más alto de fenoles y por lo tanto decir que la presencia de dichos compuestos incluidos en el medio de cultivo favorece la producción de biomasa para este hongo.

Para *A. bisporus*, su mejor registro en la producción de biomasa fue con extracto de paja al 25%, y con una marcada diferencia al resultado obtenido con los otros tres extractos. Por lo tanto se argumenta en este caso que con poco contenido de fenoles como lo registró la paja, puede influir para inducir una mayor cantidad de biomasa.

La actividad enzimática, para *A. bisporus*, denota su mejor determinación con paja al 50% en el segundo día. Y a partir del 4º al 12º día se comportó de

manera similar al desarrollo registrado con los otros tres extractos a partir del 6º día. La observación es que el aumento de biomasa se ve favorecido con el tratamiento de paja pero al 25%. Por lo tanto se necesitó una cantidad mayor para obtener una actividad también alta.

Para *L. edodes* su mejor comportamiento lo presento con el extracto de paja al 25% y con encino al 10% indicándose mejor al 6º día de desarrollo, por debajo de paja pero mayor que con café al 10% y composta al 25% que mostró un desarrollo casi lineal por debajo de todos los extractos. Aun así el mejor en este caso es encino, aunque decayó en su actividad; se recuperó del 8º al 12º día en su desarrollo.

*P. ostreatus* su mejor actividad se observó con paja al 25% y composta al 10% manteniéndose casi constante su actividad en todo su desarrollo; El comportamiento con café y encino al 25% respectivamente mostró una similitud en su comportamiento gráfico pero por debajo de paja y composta. Siendo los extractos de paja y composta con los que mejor desempeño se registró.

En la determinación del rendimiento enzimático con respecto a la biomasa producida durante el tiempo de crecimiento, *A. bisporus*, denoto una actividad mayor en la concentración de 50% de los extractos de paja y café, guardando cierta relación con la actividad enzimática con café al 50% y marcando una amplia diferencia con composta y encino.

Para *L. edodes*, Se observó que el rendimiento de actividad enzimática se obtuvieron en la concentración al 10 y 25% con extracto de café, guardando una relación respecto a biomasa obtenida con este tratamiento. con una marcada diferencia sobre los resultados que presenta también los extractos de paja, encino y composta respectivamente.

*P. ostreatus* su mayor rendimiento fue con el extracto de paja al 25%, manteniendo una relación con la actividad registrada con paja al 25%. Con lo que se puede interpretar que con poca cantidad de fenoles se obtuvo buen rendimiento de enzima y biomasa. Para café, encino y composta con respecto a paja se nota una diferencia en su determinación, denotan valores cercanos a la línea base.

## 8. Conclusiones

Las mezclas realizadas de los medios de cultivo con cada uno de los tratamientos realizados para *P. ostratus*, *L. edodes* y *A. bisporus*, presentaron un papel importante por la presencia de compuestos fenólicos determinados a cada extracto. Considerando que el “único agente extraño” presente en la mezcla de los medios de cultivo para los hongos, fueron las diferentes concentraciones de extracto acuoso de los residuos mencionados en cada tratamiento. Por lo cual se concluye que los fenoles si influyen en los resultados obtenidos tanto en la determinación de la cinética como biomasa y actividad enzimática, observando que dichos resultados en la mayoría de las determinaciones en el comportamiento de los tres hongos fueron mejores que el testigo. Sin embargo se observó también inhibición como se demuestra en la medición de la velocidad específica de crecimiento en *A. bisporus* con el tratamiento de encino. Se concluye también que para *A. bisporus*, *L. edode* y *P. ostreatus*, la producción de enzimas en algunos casos “no” va ligada al crecimiento aunque se observe un efecto inductivo enzimático. Sin embargo en *P. ostreatus* si se observó que la producción de enzimas va ligada al crecimiento y por lo tanto hay un efecto inductivo en presencia de fenoles.

Según los resultados obtenidos, los extractos que pueden tener una aplicación a mayor escala en el cultivo de hongos son los de paja, en primera instancia, por que presento mayor actividad enzimática, con un contenido moderado de fenoles que los extractos de café y composta, Sin embargo, para que esto suceda o pueda aplicarse se requiere de estudios complementarios más profundos.

El extracto menos recomendable para el cultivo de *P. ostreatus*, *L. edodes* y *A. bisporus*, es el de encino, a pesar de tener los valores más altos de fenoles, registro los resultados experimentales más bajos en términos generales, al ser agregado a los medios de cultivo para determinar tanto cinética de crecimiento como producción de biomasa y actividad enzimática. Por lo que es posible la disminución de biomasa y menor actividad se deba al mayor contenido y la variedad de compuestos fenólicos presentes en el extracto de encino. Aunque en cinética se haya registrado un valor máximo no quiere decir que registre alta formación de biomasa micelial.

Este proyecto se desarrolló como una alternativa más de reciclar los residuos agroindustriales, con el fin de contribuir a minimizar en parte la contaminación y desperdicio de estos desechos orgánicos en el medio ambiente; ya que los procesos de biodegradación natural, no funcionan a la misma velocidad con que son generados, estos se acumulan llegando inclusive a convertirse en un peligro para el equilibrio ecológico.

---

## 9.- Bibliografía

1. AOAC. (1980) Official Methods of Analysis of The Association of Analytical Chemistry. Published by the Association of Analytical Chemistry. Washington, D. C.
2. Ardon, O. Kerem, Z. and Hadar, Y. (1998) Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *Apr., Can. J. Microbiol.* **44**: 676-680.
3. Ander P. y Marzullo L. (1997) Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* **53**: 115-131.
4. Bes B., Pettersson B., Lennholm H., Iversen T. y Eriksson K. E. (1987) Synthesis, structure and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**: 310-318.
5. Blaich R. y Esser K. (1975) Function of enzymes in wood destroying fungi. II. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Arch. Microbiol.* **103**: 271-277.
6. Bockle, B. Martínez, M. J. Guillen, F. y Martínez A. (1999) Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and Environmental Microbiology.* **65** (3): 923-928.
7. Bourbonnais, R. Paice, M. G. Reid, D. I. Lanthier, P. and Yaguchi, M. (1999) Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology.* **61**(5): 1876-1808.
8. Bradford M. (1976) *Annal Biochem.* **72**, 248.
9. Chang, S. T. Y Quimio, T. H. (1982) Tropical mushroom, biological nature and cultivation methods. Hong Kong. The Chinese University Press.
10. Chang, S. T. (1999) Word production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk) Sing. in China. *Inter. J. of Medicinal Mushrooms* **1**: 291-300.
11. Choi H. T., Wilks R. L. y Ross I. K. (1987). Formation of sclerotia in liquid cultures of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isoenzymes. *Mycologia.* **79**: 166-172.

- 
12. Das, N. S. Sengupta, and M. Mukherjee, (1997) Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(10): 4120-4122.
  13. De Jong E., De Vries F. P., Field J. A., Van De Zwan R. P. and De Bont J. A. M. (1992) Isolation of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycol. Res.* 96: 1098-1104.
  14. De Vries O. M. H., Kooistra W. H. C. F. y Wessels G. H. (1986) Formation of an extracellular laccase by *Schizophyllum commune* dikaryon. *Journal General Microbiology*. 132: 2817-2826.
  15. Dorado J. Almendros G, Camarero S, Martínez A. T., Vares T and Ataca A. 1999. "Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes". *Enzyme Microb. Technol.*, 25:605-612.
  16. Eggert, Claudia. Temp, U. and Eriksson K. E. L. (1996) The ligninolytic System Of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4):1151-1158.
  17. Eggert C. Temp U. and Eriksson K. E. 1997. "Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*". *FEBS Lett.*, 407:89-92.
  18. Eggen-Trine. (2000). Application of fungal substrate from commercial mushroom production-*Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation. Biological Abstracts* 44 (2-3):117-126.
  19. Eggen-Trine; Sasek-Vaclav. (2003). Use of edible and medicinal oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (jacq. Fr.) Kumm.) Spent compost in remediation of chemically polluted soils. *International journal of Medicinal Mushrooms*; 4 (3): 255-261.
  20. El-Fallal-Amira; El-Kattan-M-H (1997). Effect of plant extracts on the mycelial growth of some cultivated mushrooms. *Egyptian Journal of Microbiology*; 32 (1) 41-48.
  21. Eriksson K. E, Blanchette R. A, and Ander P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer Verlag, New York, NY.
  22. Eriksson K. (1993). Concluding remarks: Where do we stand and where are we going? Lignin Biodegradation and Practical Utilization. *Journal Biotechnology*. 30: 149-158.



- 
23. Farrel R., Murtagh K. E., Tien M., y Kirk K. T. (1989) Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microbiology and Technology*. **11**: 322-328.
24. Farnet AM, Tagger S, Le Petit J. (1999). Effect of copper and aromatic inducers on the laccases of the white rot fungus *Marasmius quercophilus*. *C.R.A.S. Life Sciences*. **322**: 499–503
25. Ferrer I. Dezotti M. y Durán N. (1991) Decolorization of Kraft by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. *Biotechnol. Letters*. **13**: 577-582.
26. Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cenamo G. y Sannia G. (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*. **341**: 655-663.
27. Guzmán, G. y D. Martínez-Carrera, (1985). Planta productora de hongos comestibles sobre pulpa de café. *Ciencia y Desarrollo* (CONACYT) **65**: 41-48.
28. Guzmán G. (1990). La micología en México: Morfología e identificación de los hongos comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. México. Editorial LIMUSA. pp: 1-29.
29. Guzmán, G., (1993). El cultivo de los hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales. Ed. Instituto Politécnico Nacional, México, D. F. 245 pp.
30. Guzmán, G., (1995). "La diversidad de hongos en México". *Ciencia*. **39**:52-57.
31. Giardina, P. Palmieri, G. Scaloni, A. Fontanella, B. Farazo, V. Cennamo, G. and Sannia G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* **341**, 655-663.
32. Han, Young-Hoon. Luang-Soo Shin. Hong-Duk Youn. Yung Chil Han and Sa-Ouk Kang. (1996). Mode of action and active site of an extracellular peroxidase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* **314**, 421-426.
33. Hernández, S. R. Fernández, C. C. Baptista, L. P. (2003) Metodología de la investigación. Caps. 3, 5, 6; tercera edición *Mc Graw Hill*, México.
34. Heinfling A. (1998) Transformation of Industrial Dyes by Manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-Independent Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (8): 2788–2793.

- 
35. Heinzkill, M. Bech, L. Halkier, T. (1998). Characterization of Laccase and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (*Family Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (5): 1601-1606.
  36. Hiroi T., Eriksson K.E. (1976). Microbiological degradation of lignin. Part I. Influence of cellulose on the degradation of lignin by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Svensk Papperstidning* 5:157–161.
  37. INEGI. (2001). Estadística del Medio Ambiente. SEMARNAP. D. F. MEXICO. Pagina web: www.INEGI.com
  38. Jiménez-Remsey, C. M. Rogler, J. C. (1994). Absorption and distribution of 14 C labelled condensed tannins and related sorghum phenolics. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. 42 (4): 963-967.
  39. Kirk, T. K., and R. L. Farrel. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465–505.
  40. Kirk, T. K., J. W. Koning, Jr., R. R. Burgess, M. Akhtar, R. A. Blanchette, D. C. Cameron, D. Cullen, P. J. Kersten, E. N. Lightfoot, G. C. Myers, I. Sachs, M. Sykes, and M. B. Wall. (1993). Biopulping a glimpse of the future? *Research paper FPL-RP-523. Forest Products Laboratory, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, Madison, Wis.*
  41. Klibanov A. M. y Alberti B. (1981) Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluents. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 2: 373-379.
  42. Koroljova, S. O. V. Stepanova, E. E. Gavrilova, V. P. Morozova, N. V. Lubinova, A. N. And Makower A. (1998). Purification and characterization of the constitutive form of laccase from thte basidiomycete *corilus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 27: 48-54.
  43. Kūes, U. and Liu, Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 141-152.
  44. Kuhad R. C., Singh A. y Eriksson K. E. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In K. E. Eriksson (ed) *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Springer-Verlag, Germany. 46-125.
  45. Larralde-Corona, P. López-Isunza, F. Viniegra-González, G. (1997). Morphometric Evaluation of the Specific Growth Rate of *Aspergillus niger* Grown in Agar Plates at High Glucose Levels. *Biotechnology and Bioengineering*. 56 (3) 287-294.

- 
46. Leal-Lara, H. (1985). La utilización microbiológica de desperdicios lignocelulosicos potenciales y perspectivas. Prospectiva de la Biotecnología en México. *Fundación Barrios Sierra*, CONACYT, México D. F.
47. Lee, M. H. Chen, R. L. C. (1996). Novel enzymatic assays for the measurement of tannins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 60 (2): 362-363.
48. Leonowicz A. y Grzywnowicz K., (1981). Quantitative estimation of laccases forms in some white rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microbiology and Technology*. 2: 337-341.
49. Leonowics, A., Rogalski J., Jaszek M., Luterek J., Wojtas-Wasilewska M., Malarczyk E., Ginalska G., Fink-Boots M., and Cho N. S. (1999). Cooperation of fungal laccase and glucose 1-oxidase in transformation of lignin and some phenolic compounds. *Holzforschung* 53.
50. López Cruz J. (2001). "Relación entre la actividad de las enzimas lacasas y la maduración de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*. Tesis de maestría UAM-Izt. México D. F.
51. Martínez, D., M. Quirarte, C. Soto, D. Salmenes y G. Guzmán. (1984). Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agroindustriales en México. *Biol. Soc. Mex. Mic.* 19:207-219.
52. Martínez C. D. Morales, P. (1988). Variación Morfológica y fisiológica de *Pleurotus ostreatus* en la región de Xalapa, Veracruz. *Mic. Neotrop. Aplic.* 1: 71-78
53. Martínez, C. D. R Leben, P. Morales, M. Sobal y A. Larquee-Saavedra. (1991). Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo*. Vol XVI (96):33-43.
54. Martínez, C. D., P. Morales, M. Sobal y A. Larqué-Saavedra. (1993). Reconversión de la industria de los hongos. *Tecnoindustria*. 7:52-59.
55. Martínez A. T, Camarero S. Guillen F, Gutiérrez A, Muñoz C, Varela E, Martínez M. J, Barrasa J. M, Ruel K and Pelayo J. M. (1994). "Progress in biopulping of non-woody materials - chemical, enzymatic and ultrastructural aspecto of wheat-straw delignification whit ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*". *FEMS Microbiol Rev.*, 13:265-274.
56. Martínez M. J., Ruiz-Dueñas F. J., Guillén F. y Martínez A. T. (1996) Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237:424-432.
57. Mata, G. y Martínez- Carrera, D. (1988). Estimación de la producción anual de residuos agroindustriales potencialmente utilizables en el cultivo de hongos comestibles en México. *Rev. Mex. Mic.* 4: 287-296.

- 
58. Matcham S. E. y Wood D. A. (1992). Purification of *Agaricus bisporus* extracellular laccase from mushroom compost. *Biotechnology Letters*. **14**: 297-300.
59. Miller L. G. (1959). Use of dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. **31**(3): 426-428
60. Muez, M. A. (1994). Bases para el cultivo de *Pleurotus*.. *En: I Jornadas técnicas del champiñón y otros hongos comestibles en Castilla-La Mancha*. Patronato de Promoción Económica. Diputación Provincial de Cuenca. p.:129-141
61. Muñoz, C. Guillen, F. Martinez A. T. and Martinez M. J. (1997). Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, Catalytic Properties, and participation in Activation of Molecular Oxygen and Mn<sup>2+</sup> Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. **63** (6): 2166-2174.
62. Palmieri, Gianna, Paola Giardina, Carmen Bianco, Andrea Scalonì, Antonio Capasso, and Giovanni Sannia. (1997). A Novel Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (50): 31301-31307.
63. Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B. y Sannia G. (2000). Copper Induction of laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental Microbiology*. **66** (3): 920-924.
64. Palmieri, Gianna. Giovanna Cennamo, Vincenza Faraco, Angela Amoresano, Giovanni Sannia and Paola Giadina. (2003). Atypical Laccase isoenzymes from Copper supplemented *Pleurotus ostreatus* culture. *Enzyme and Microbial Technology* **33** 220-230.
65. Peña, B. S. D. (2001) *Técnicas analíticas en toxicología de alimentos Manual 7 CBS*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. p 15-21.
66. Pérez, M.R; Mata.G. (2002). Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.ex Fr.) Kumm. Y *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. Y la factibilidad de reutilizar la Madera, *Pinus* Spp para su cultivo. *Foresta Veracruzana* **4**:31-34.
67. Rao S. Koduri and Ming Tien (1995). Oxidation of guaiacol by Lignin Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **270** (38). 22254-22258.
68. Rashad-Mona, M. and Abdou H. M. (2002). Fungal degradation of cabbage leaf liquid waste. *Advances in food sciences* **23** (3): 124-130.
69. Rayner, A. D. M. Griffith, G. S. Wildman, H. G. (1994). Induction of metabolic and morphogenetic changes during mycelial interactions among species of higher fungi. *Biochem Soc Trans*. **22**: 389–394.

- 
70. Reinhammar B. (1979). Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernicifera*. *Biochim Biophys Acta*. **205**: 35-47
71. Rodríguez, S. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* Spp. *Rev Iberoam Micol* **20**:164-168.
72. Rogalski J., Wojtas´Wasilewska M., Bialy B., Luterek J. y Leonowicz A. (1996). A study of aromatic ring cleavage enzymes in *Phlebia radiata*. In Proc. 6 th Intern. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Ind. (E. Srebotnik y K. Messner, Eds), pp. 447–450, "Facultas-Universita" tsverlag Vienna. Austria.
73. Sánchez J. E. (2005). Notas del "Foro regional sobre la producción comercial de hongos comestibles", Nov. Xicotepec de Juárez Puebla.
74. Saparrat, C. N. Guillen, Francisco. Arambarri, Angélica, M. Martínez Angel T. and Martínez María Jesús. (2002). Induction, Isolation, and characterization of two Laccases from the white Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and environmental Microbiology*. **4**: 1534-1540.
75. Savoie, J. M. (1998). Changes in enzyme activities during early growth of the edible mushrooms, *Agaricus bisporus* in compost. *Mycological Research*. **102(9)**:1113-1118.
76. Shriner, R. L. Fuson, R. C. Curtin, D. Y. (1990). *Identificación sistemática de compuestos orgánicos* Editorial LIMUSA p 137, 140, 143.
77. Shuttleworth K. (1986) Soluble and immobilized laccase as catalysts for transformation of substituted phenol. *Enzyme Microbiology Technology*. **8**: 171-177.
78. Silva, E.M. Milagres A. M. F. Machuca A. (2003). Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains on wood residues. *J. Appl. Microbiol*
79. Singh-Anshu and Sharma-Satyawati. (2003). Effect of microbial inoculation mixed solid waste composting, vermicomposting and plant response. *Compost Science and Utilization. Bioresource Technology* **11 (3)**: 190-199.
80. Singh-Anshu and Sharma-Satyawati. (2002). Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Bioresource Technology*. **11 (2)**: 107-111.
81. Solomon E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem.Rev.* **96**: 2563-2605S

- 
82. Stamets p. and Chilton S. (1983). The mushroom Cultivator. A Practical Guide to Growing Mushroom at Home. *Agarikon Press*. Olympia, Washington. p 83.
83. Staszczak M., Nowak G., Grzynowicz K. y Leonowicz A. (1996). Proteolytic Activities in cultures of selected white-rot fungi. *J. Basic Microbiol.* **3**: 193-203.
84. Stirt J. G. y Crawford R L. (1985) Microbial degradation of chlorinated phenols. *Trends Biotechnol.* **3**: 300-305.
85. Szklarz G. y Leonowicz A. (1989). Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia.* **81**(2): 234-240.
86. Talorete, Terence, P. N; Isoda, Hiroko; Maekawa, Takaaki. (2002). *Agaricus blazei* (class basidiomycotina) aqueous extract en chanches the expretión of c-jun protein in MCF7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50** (18): 5162-5166.
87. Temp U. y Eggert C. (1999) Novel Interaction between Laccase and Cellobiose Dehydrogenase during Pigment Synthesis in the White Rot Fungus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology.* **65**(2): 389-395.
88. Thurston C. (1994). The estructure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26
89. Trejo-Hernández M. R, López-Munguia A and Quintero-Ramírez R. 2001. "Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds". *Process Biochemistry* **36**:635-639.
90. Valencia del Toro, G., Garín, A. M. E. (2000). Aspectos generales del cultivo de setas comestibles (*Pleurotus* Spp). UNAM, Iztacala. México. D.F.
91. Velázquez-Cedeño, M. Farnet, A. M. Ferré, E. Savoie, J. M. (2004). Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw *Mycologia*, **96**(4), pp. 712-719
92. Wong Ken K. Y., Kathryn A. B. y Kibblewhite R. P. (1999). Effects of the laccase-mediator system on the handsheet properties of two high kappa Kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology* **25**: 125-131
93. Wood, D.A. and Leatham, G.F. (1983). Lignocellulose degradation during the life cycle of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**: 421-424.

- 
94. Young H. L., Chang W. L. y Chang H. N. (1989). Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. *Applied Microbiology Biotechnology*. **30**: 141-143.
95. Zadrazil F. (1992) In Solid Substrate Cultivation, Edited By H. W. Doelle, D. A. Mitchell y C. E. Rolz. *Elsevier Applied Science*, London and New York, pp 321.

