Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

“EFECTO DE LA PODA DE VID SOBRE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS DE *Lentinula edodes*”

POR:

ROSINA CABRERA RUIZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA **OCTUBRE DE 2010**

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de Rosina Cabrera Ruiz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias.

Elisa M. Valenzuela S

Dra. Elisa M. Valenzuela Soto

Director de tesis

Dr. Jesús Ali Asaff Torres

Dr. Martín C. Esqueda Valle

Dra. Leticia M. Sánchez Herrera

DECLARATORIA INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves de material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial y total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A. C.).

La publicación en comunicación científica o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A. C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del Director de tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

DEDICATORIA

A mis padres, por enseñarme el camino correcto en esta vida,

Gracias a ellos soy quien soy.

A mi abuela Rosina, por sus consejos y cariño.

A José Luis por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto. Por fomentar en la juventud la importancia de la ciencia y tecnología para el desarrollo de México.

Al Centro en Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en sus instalaciones.

A todo el personal de CIAD que de manera indirecta ayudaron en mi estancia. Don Héctor, Karla y Ernesto de servicios de apoyo. A Laura García, Argelia Marín, Héctor Galindo y Verónica Araiza de división de programas académicos, y todas las personas de departamento de cómputo. A Gerardo Reyna y Luis Conde de biblioteca, quienes siempre tuvieron una sonrisa.

A los M.C. Aldo Gutiérrez y M.C. Alfonso Sánchez por el apoyo técnico brindado de su parte.

Al laboratorio de ecología química de la Dra. Irasema Vargas, por todas las facilidades que me brindaron para la realización de gran parte de mi trabajo. A Coni, Paulina, Lupita, Soco y Yolanda porque siempre me apoyaron en todo.

Al laboratorio de proteínas de estrés, por su paciencia en este tiempo, por compartir sus conocimientos y hacerme sentir parte de ustedes. Gracias por brindarme

su cariño Dra. Elisa Valenzuela, M.C. Ciria Figueroa, Jesús, Hilda, José, Juan Pablo, Leslie, Edith y Miriam.

A los miembros de mi comité de tesis, Dr. Ali Asaff, Dr. Martín Esqueda y Dra. Leticia Sánchez, por sus consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros de maestría, especialmente a Lucina, Rita, Judith, Javier y Salvador, por brindarme su amistad.

A mis amigos de la vida, Magda, Rocio, Edith, Priscilia, Rodolfo y Manuel, gracias por estar conmigo en los buenos y malos momentos. Siempre los llevo en mi corazón.

A mi familia, mis padres Fidel y Luz María. Mis hermanos Janeth y Edgar. Mis abuelas María Julia y Rosina, gracias por brindarme su apoyo. A mis abuelos Abelardo y Lamberto que aunque ya no están con nosotros, siempre me demostraron su cariño.

A José Luis, una de las personas más importantes en mi vida. Gracias por estar a mi lado y ser mi ángel de la guarda. Para ti, mi más grande admiración y amor.

Gracias a todas las personas que me han acompañado en este camino formando parte de mi vida…

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS……..…….. ix

LISTA DE TABLAS……..… xi

RESUMEN……. 1

INTRODUCCIÓN……..... 3

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA…….….. 6

Composición química de los materiales lignocelulósicos……..…. 6

Celulosa y hemicelulosa…..……. 6

Lignina……..…….…….. 7

Degradación de materiales lignocelulósicos……..……. 8

Enzimas ligninolíticas…….. 9

Peroxidasas……. 10

Oxidasas…….. 11

Lacasas…… 12

Mecanismo de degradación de lignina…….……. 13

Cooperación enzimática…… 15

Modulación del crecimiento fúngico…… 17

Mecanismo de regulación de ligninólisis…….…….. 18

Regulación a nivel genético…… 18

Regulación a nivel metabólico……..…….. 20

Regulación a nivel enzimático……. 21

JUSTIFICACIÓN……...… 23

HIPÓTESIS……... 24

OBJETIVOS……...…… 25

Objetivo general……..……..…….... 25

Objetivos específico……...…..……..…… 25

CAPÍTULO 1……..…….…..…… 26

Uso de la poda de vid como un sustrato alternativo para la producción eficiente de *Lentinula edodes*...…….……. 26

Resumen……...……. 27

Introducción……..……. 28

Materiales y métodos……..……. 30

Resultados y discusión…… 35

Conclusiones……....……..……. 47

CAPÍTULO 2…….…….. 49

Efecto de enzimas excretada de *Lentinula edodes* sobre el extracto metanólico de poda de vid……..….. 49

Resumen……..……. 50

Introducción…….……. 51

Materiales y métodos…….……. 52

Resultados y discusiones…….…….……. 54

Conclusiones……..…….. 62

PERSPECTIVAS……. 63

BIBLIOGRAFÍA…..…….……. 64

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Fig. 1	Modelo estructural del polímero de lignina.	8
Fig. 2	Modelo β-1 de oxidación de compuestos fenólicos de lignina por lacasa.	13
Fig. 3	Modelo general de degradación de lignina para hongos de la pudrición blanca.	15
Fig. 4	Cinética de crecimiento de *Lentinula edodes* cultivado sobre poda de vid y paja de trigo.	37
Fig. 5	Producción de lacasa y MnP en el cultivo de poda de vid y paja de trigo en relación a los niveles de producción de biomasa relativa ($\xi=X/X_M$).	43
Fig. 6	Efecto de los componentes del extracto de poda de vid sobre la actividad extracelular de *Lentinula edodes.*	46
Fig. 7	Mecanismo de reacción entre el ABTS, las enzimas extracelulares y el extracto metanólico de poda de vid.	55
Fig. 8	Espectros de absorbancia de la interacción del ABTS y las enzimas extracelulares de *Lentinula edodes*.	56
Fig. 9	Espectros de absorbancia del radical catiónico del ABTS ($ABTS^{\cdot+}$) y el extracto de poda de vid.	57

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Parámetros de crecimiento y producción de lacasa y MnP durante la fermentación sólida de *Lentinula edodes* sobre poda de vid y paja de trigo.	39
Tabla 2	Caracterización de las fracciones del extracto de poda de vid y paja de trigo.	47

RESUMEN

Lentinula edodes es un organismo que pertenece al grupo de los hongos de la pudrición blanca, se desarrolla sobre materia orgánica en descomposición, ya que secreta enzimas que participan en el proceso de degradación de la lignocelulosa. Este organismo es utilizado para el consumo humano y es ampliamente cultivado sobre residuos agroindustriales. El método más apropiado para el desarrollo de estos hongos es la fermentación en estado sólido, ya que este tipo de cultivos proporciona condiciones muy similares a su hábitat natural. Se ha observado que la poda de vid ocasiona un incremento en la eficiencia biológica y una disminución en el tiempo de desarrollo de este organismo. Sin embargo, aún no se conocen los factores que influyen para que este sustrato proporcione ventajas para su crecimiento con respecto a otros. En este trabajo se realizó un estudio comparativo a cerca del efecto de la poda de vid y paja de trigo sobre el desarrollo micelial y la producción de enzimas ligninolíticas de *Lentinula edodes*, buscando elucidar los posibles factores que determinan que la poda de vid sea un mejor sustrato. Se encontró que *L. edodes* se desarrolló a una velocidad 100% veces mayor en poda de vid con respecto a paja de trigo, aunque la biomasa máxima alcanzada en ambos cultivos fue similar. Así mismo, se detectó la producción de las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa (MnP) a lo largo de la fermentación con perfiles similares a los de crecimiento, lo cual indica que la producción de estas

enzimas se encuentran asociadas a este. La producción de lacasa y MnP fue mayor en la fermentación sobre paja de trigo, lo que indica que el material lignificado en este sustrato es más complejo, por lo que el hongo requiere hacer un gasto energético mayor para la síntesis de enzimas que le permitan metabolizar dicho sustrato y garantizar su crecimiento. Por último la separación cromatográfica de los componentes de los extractos metanólicos de poda de vid y de paja de trigo mostró la presencia de una mayor cantidad de compuestos en el primero, que además pueden ser fácilmente oxidados por el sistema enzimático del organismo. Estos resultados indican que la estimulación en la velocidad de crecimiento de *L. edodes* se debe a la mayor accesibilidad de nutrientes en este sustrato.

INTRODUCCIÓN

Los materiales lignocelulósicos están formados principalmente por componentes poliméricos de celulosa, hemicelulosa y lignina, y en menor proporción por compuestos extraíbles no estructurales, como fenoles, taninos, esteroles, azúcares y almidón. La lignina es una red tridimensional distribuida en las capas de la pared celular de las plantas junto con la hemicelulosa, formando una matriz amorfa, en la cual se encuentran integradas las fibras de celulosa. Las fuertes uniones físicas y químicas entre estos polímeros, hacen extremadamente difícil su degradación (Gaitán-Hernández et al., 2006).

El proceso de degradación de lignocelulosa es una etapa central para el reciclaje de carbono de los ecosistemas. Los hongos de la pudrición blanca son los principales organismos que intervienen en este proceso, ya que tienen la habilidad de secretar enzimas oxidativas extracelulares involucradas en la descomposición de los componentes de la pared celular, predominantemente lignina (Martínez et al., 2005).

En este grupo de organismos se clasifica a *Lentinula edodes*, conocido comúnmente como shiitake. Es un hongo saprobio, ampliamente cultivado en el este de Asia, se utiliza para consumo directo, además su uso se ha relacionado con importantes propiedades medicinales y aplicaciones biotecnológicas y ambientales (Chang, 2006). *Lentinula edodes* tiene la capacidad de producir una gran cantidad de enzimas responsables de la descomposición selectiva de

materiales orgánicos. Principalmente enzimas hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) y oxidativas (ligninolíticas), que catalizan reacciones de óxido-reducción para degradar los componentes poliméricos en moléculas de bajo peso molecular que pueden ser asimiladas como nutrientes por el organismo. La expresión de estas enzimas se ha relacionado con factores ambientales, composición del medio de cultivo y la presencia de sustratos lignocelulósicos (Elisashvili et al, 2008a).

Existe evidencia de que algunos materiales lignocelulósicos pueden contener concentraciones significantes de carbohidratos e inductores que desempeñan un papel importante en la producción enzimática. Los compuestos aromáticos regulan la síntesis de enzimas ligninolíticas y su efecto es muy específico dependiendo de las peculiaridades fisiológicas del hongo, lo que garantiza un crecimiento fúngico abundante (Sun et al., 2004).

En este contexto se ha cultivado a *L. edodes* sobre diversos sustratos lignocelulósicos, como tallos de algodón, paja de trigo, cebada y arroz, mejorándose notablemente la degradación de lignina y crecimiento fúngico (Domondon et al., 2004). También se ha empleado poda de vid, observándose una alta eficiencia biológica y rendimientos elevados en su producción, aspectos que hacen de este sustrato una excelente alternativa para optimizar la producción de *L. edodes* (Sánchez et al., 2002; Gaitán-Hernández et al., 2006).

Debido a la importancia que representa la producción de los hongos de la pudrición blanca y a la ventaja que ofrece la poda de vid sobre la producción

de *L. edodes*, es necesario establecer cómo influye este sustrato en su desarrollo. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto de la poda de vid en el crecimiento micelial y producción de enzimas lignolíticas de *L. edodes* en cultivo sólido.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Composición química de los materiales lignocelulósicos

La composición química de las plantas difiere considerablemente y es afectada por factores genéticos y ambientales. La madera y otros materiales lignocelulósicos están compuestos principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, y también puede contener pequeñas cantidades de sustancias de bajo peso molecular, denominadas sustancias extraíbles y minerales (Wong, 2009)

Celulosa y hemicelulosa

Los tejidos de la pared celular de las plantas son ricos en celulosa y hemicelulosa, y contienen pequeñas cantidades de pectina. La composición y las proporciones de las fracciones de los polisacáridos mencionados pueden diferir en grupos taxonómicos de plantas. En general la estructura de los polímeros de hemicelulosa de la pared celular primaria es diferente a los de la pared celular secundaria (Barceló et al., 2004)

La celulosa es la sustancia orgánica más abundante sobre el planeta tierra, constituye aproximadamente el 50% del peso seco en materiales lignocelulósicos, es un polímero lineal de moléculas de glucosa unidas por enlaces β-1,4-glucosídicos. En la naturaleza se encuentra en un estado de alta

organización de fibras cristalinas que son difíciles de disociar o hidrolizar, bajo procesos enzimáticos (Malherbe y Cloete, 2002).

La hemicelulosa está conformada de polisacáridos asociados a moléculas de celulosa en los tejidos lignificados de la pared celular de las plantas. Es el segundo componente más abundante entre los materiales vegetales y puede representar hasta el 40% de su peso seco. Las moléculas de hemicelulosa son heteropolisacáridos cortos de uniones de cadenas de hexosas y pentosas, ácido urónico, y otros azúcares en menor proporción (Rajarathnam y Bano, 1989).

Lignina

La lignina es un componente estructural que se sintetiza en la pared celular de las plantas vasculares. Se encuentra distribuida junto con hemicelulosa en el espacio de microfibras de celulosa en la pared celular primaria y secundaria para conferirle dureza a los tejidos del xilema, y en la lamela media como un componente de unión de las células. La matriz de lignina cubre las fibras de celulosa y hemicelulosa para protegerlas contra el ataque microbiano (Higuchi, 1990).

La molécula de lignina es un heteropolímero muy irregular e insoluble con pesos moleculares que van desde los 100 000 daltones. Está formada por subunidades de fenil propano unidas a moléculas de *p*-hidroxifenil, guayacil, y

siringil, mayoritariamente por enlaces β-O-4 (alquil-aril éter). La variación del número de uniones intermonoméricas origina diferentes estructuras moleculares, razón por la cual, la hidrólisis enzimática de este polímero es extremadamente difícil (Fig. 1) (Malherbe y Cloete, 2002).

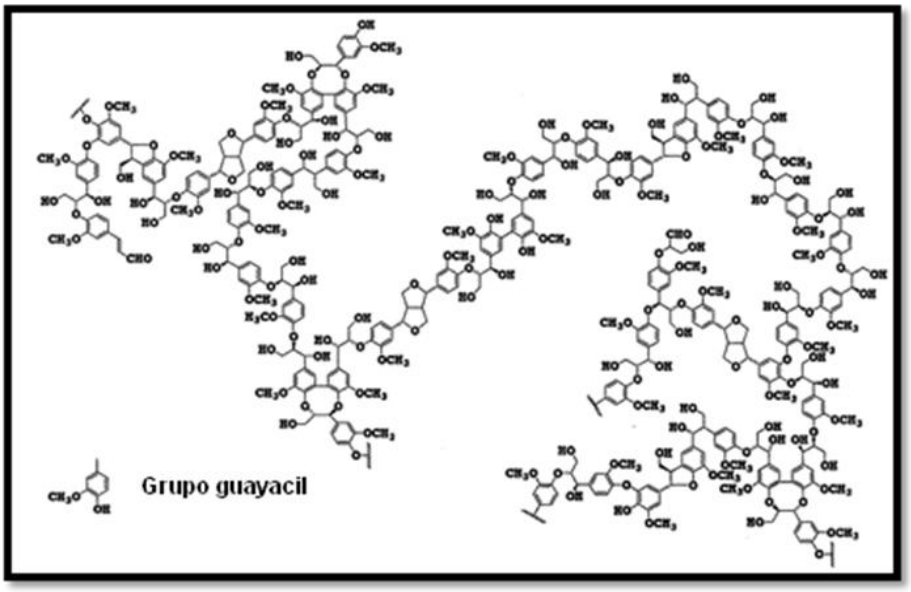


Fig. 1. Modelo estructural del polímero de lignina. Unidades monoméricas guayacil propano unidas por enlaces éter y carbono-carbono (Malherbe y Cloete, 2002).

Degradación de materiales lignocelulósicos

La lignocelulosa es un sustrato complejo por lo que su biodegradación depende de las condiciones ambientales y de la capacidad degradativa de los microorganismos que la realizan (Malherbe y Cloete, 2002). Los hongos de la

pudrición blanca son los principales organismos degradadores de los materiales lignocelulósicos debido a su habilidad para secretar un amplio grupo de enzimas capaces de modificar los carbohidratos presentes y la lignina (Gilbertson, 1980; Martínez et al., 2005). Dentro del grupo de hongos de la pudrición blanca se clasifica a *L. edodes* o shiitake. Es un organismo con gran interés comercial. Los pocos estudios disponibles sugieren que cuando crece sobre madera es moderadamente ligninolítico y selectivamente remueve la lignina (Leatham, 1986).

Estudios sobre el metabolismo de *L. edodes* han demostrado que durante la primera etapa de crecimiento se da una baja actividad celulósica y una alta actividad ligninolítica, así como también, una alta concentración extracelular de especies reactivas de oxígeno, lo cual sugiere que estos compuestos tienen una función importante durante el proceso de degradación (Vane et al. 2003; Belinky et al., 2003). En etapas avanzadas del cultivo, la ligninólisis disminuye en aproximadamente 22% y se incrementa la degradación de polisacáridos (Vane et al., 2003).

Enzimas ligninolíticas

La degradación o modificaciones de la lignina por hongos de la pudrición blanca es un punto clave en la descomposición de la lignocelulosa. En este proceso intervienen un conjunto de enzimas hidrolíticas y oxidativas que son

necesarias para que los organismos realicen una bioconversión eficiente de los residuos de materiales orgánicos (Higuchi, 2006). En seguida se describen este conjunto de enzimas excretadas por hongos de la pudrición blanca.

Peroxidasas

Las hemoligninasas constituyen una familia de enzimas responsables de numerosas funciones biosintéticas y degradativas. En este grupo se encuentran lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil (Wong, 2009).

Lignina peroxidasa (LiP). Es una enzima relativamente poco específica para sus sustratos con un peso molecular de 42 000 Da, contiene un grupo protohemo IX por molécula. Cataliza una serie de reacciones de oxidación en la cadena lateral alquil de la lignina, entre estas, la escisión $C\alpha$-$C\beta$, oxidación de alcohol bencílico a aldehídos o cetonas, escisión intradiol en estructuras fenilglicol, e hidroxilación de grupos metileno bencílicos. También cataliza la oxidación acoplada de fenoles. Todas las reacciones requieren H_2O_2 (Tien y Kirk, 1984).

Manganeso peroxidasa (MnP). Esta enzima contiene un grupo prostético hierro protoporfirina IX, es una glicoproteína de 46 000 Da. Cataliza la oxidación de Mn (II) a Mn (III), el cual a su vez oxida sustratos fenólicos, incluyendo

lignina, tioles, y aminas (Wariishi et al., 1992). Es estimulada por ácidos orgánicos, tales como gliconato, malonato, glucoronato y 2-hidroxibutirato (Mester y Field, 1997).

Peroxidasa versátil (VP). Algunos estudios en especies de *Pleurotus* han demostrado la existencia de un tercer tipo de peroxidasa ligninolítica, denominada peroxidasa versátil. Se ha demostrado que esta enzima combina las características de LiP y MnP, para llevar a cabo la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos de manera similar al mecanismo de LiP, y la oxidación de Mn (II) a Mn (III) de forma similar a MnP (Camarero, 1999).

Oxidasas

Otro grupo de enzimas extracelulares involucradas en la degradación de lignina son oxidasas generadoras de H_2O_2. La función de estas enzimas es reducir los radicales que se forman en la primera etapa de la ligninólisis para evitar la repolimerización de la lignina. Dentro de este grupo se han identificado aril-alcohol oxidasa y veratril alcohol oxidasa (Wong, 2009)

Aril-alcohol oxidasa (AAO). Es una enzima secretada por ciertas especies de basidiomicetos. Presenta amplia especificidad por grupos bencil, cinamil, naftil y alcoholes primarios alifáticos, como sustratos. Está involucrada

en la producción de H_2O_2, mediante ciclos redox de aldehídos aromáticos. El H_2O_2 es un co-sustrato de las ligninasas ligninolíticas, por lo que su generación es importante para que el proceso de degradación de lignina se realice de forma continua (Varela et al., 1999).

Veratril Alcohol Oxidasa (VAO). Es otra oxidasa que evita la repolimerización de la lignina. Presenta un amplio rango de especificidad de sustrato por alcoholes y quinonoides. Su función es reducir los radicales fenoxi realizando de forma acoplada la oxidación de alcohol veratrílico a aldehído veratrílico (Marzullo et al., 1995).

Lacasas

Las lacasas son el grupo de enzimas más importantes que participa en la primera etapa de la degradación de lignina en hongos de la pudrición blanca. Cataliza la sustracción de un electrón de compuestos fenólicos empleando O_2 como aceptor de electrones originando radicales fenoxi, los cuales posteriormente oxidan el Cα, provocando la ruptura del enlace aril-Cα y/o del enlace Cα-Cβ (Youn et al., 1995). El rompimiento de los anillos aromáticos de las subunidades fenólicas y no fenólicas de la lignina ocasiona la generación de especies reactivas de oxígeno (Muñoz et al., 1997). En la figura 2 se señala un modelo de acción de la enzima.

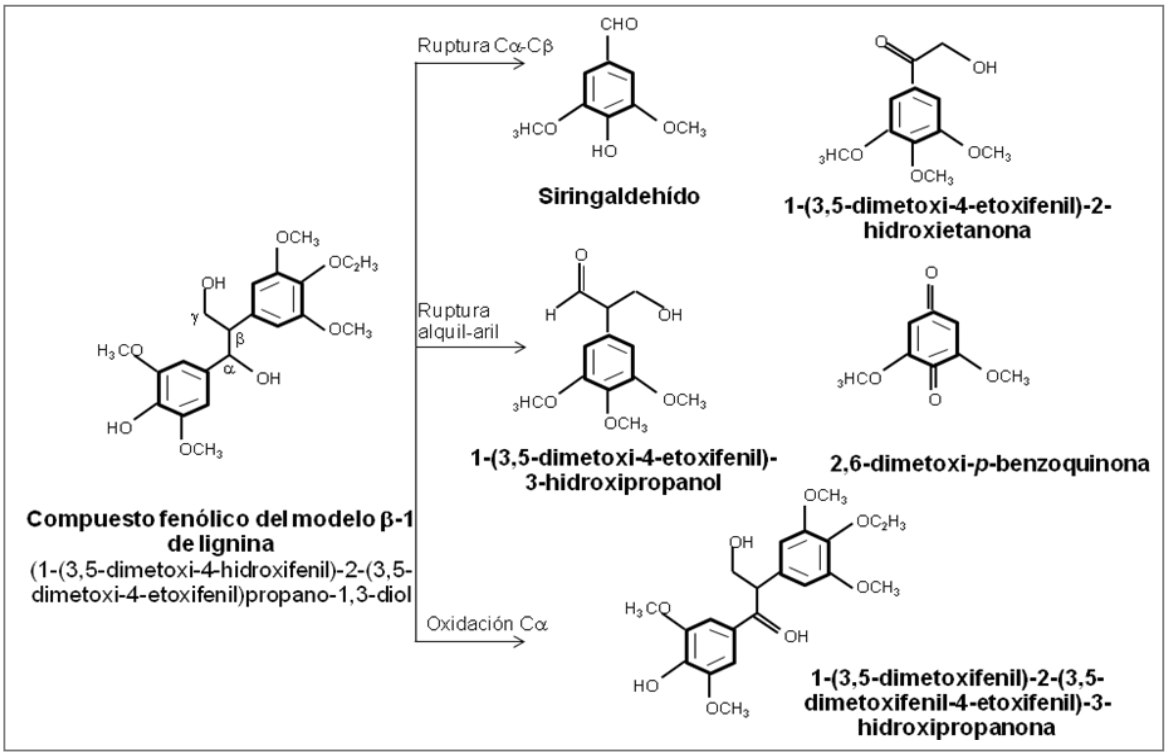


Fig. 2. Modelo β-1 de oxidación de compuestos fenólicos de lignina por lacasa. (Wong, 2009).

Mecanismo de degradación de lignina

El modelo involucrado en la degradación macromolecular de lignina por hongos de la pudrición blanca está formado por tres etapas: 1) rompimiento oxidativo de cadenas laterales de propilo entre el carbono α- y β- originando la formación de ácido benzoico, 2) escisión de los enlaces β-aril éter y modificación de las cadenas laterales estructurales, y 3) degradación de núcleos aromáticos a partir de la oxidación de los anillos (Higuchi, 1990).

Para que el proceso de degradación de lignina inicie, es necesaria la activación de una enzima por especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2. Esta enzima realizará la catálisis para la producción de mediadores catiónicos (compuestos orgánicos o Mn III-quelante) que llevarán a cabo el ataque electrofílico en las subunidades de lignina, sustrayendo un electrón del sustrato. Una vez que el polímero es oxidado, el sustrato es oxigenado provocando el rompimiento de enlaces y produciendo dos fragmentos, uno de los cuales es un radical (Hammel et al., 1985).

Los aldehídos aromáticos son el sustrato para la generación de H_2O_2 por acción de aril alcohol oxidasas mediante reacciones de oxidación (los radicales fenólicos generados que no son reducidos por oxidasas a compuestos fenólicos pueden repolimerizarse). Posteriormente los compuestos fenólicos formados son reoxidados por acción de lacasas y ligninasas. Los radicales fenoxi también pueden sufrir ruptura en el enlace Cα-Cβ para formar *p*-quinonas.

Las quinonas contribuyen en la activación de oxígeno mediante ciclos de reacciones redox del hierro (III) presente en la madera, por radicales catiónicos superóxido o directamente por radicales semiquinonas, y su reoxidación con la correspondiente reducción de H_2O_2 a radicales hidroxilos libres. Los grupos hidroxilos formados son importantes oxidantes que pueden iniciar el ataque de la lignina en la etapa inicial de biodegradación de la madera (Fig. 3) (Gutiérrez y Martínez, 1996). En la etapa final de la ligninólisis, los productos simples

generados entran a las hifas fúngicas y se incorporan a las rutas catabólicas intracelulares (Martínez et al., 2005).

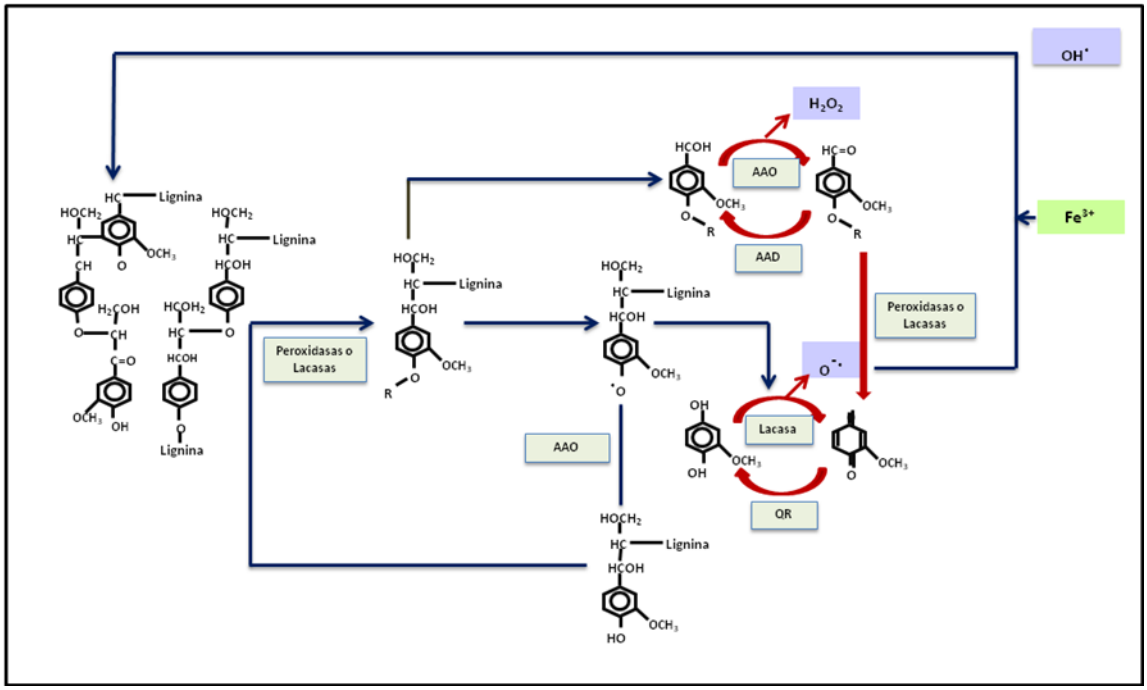


Fig. 3. Modelo general de degradación de lignina para hongos de la pudrición blanca. (Adaptado de Higuchi, 2006; Harris-Valle et al., 2007).

Cooperación enzimática

El mecanismo biológico de degradación de lignina ha sido extensamente estudiado (Barceló et al., 2004). Debido a la complejidad del sistema enzimático involucrado, uno de los aspectos que ha tenido gran importancia ha sido descifrar cómo las enzimas participantes en el proceso de ligninólisis, se encuentran coordinadas. Los sistemas de degradación de lignina estudiados

muestran que la depolimerización de lignina requiere de la acción de más de una enzima y, en algunos casos, la contribución de moléculas mediadoras (Guillén et al., 2000).

Las enzimas extracelulares lacasas son capaces de oxidar sustratos fenólicos del polímero de lignina. Las reacciones de oxidación de lacasa sobre los compuestos fenólicos monoméricos y poliméricos proceden primero con la formación de radicales intermediarios muy inestables que pueden experimentar una rápida asociación y su polimerización. La prevención de la recondensación de los intermediarios reactivos es un paso necesario en el proceso para lograr una depolimerización eficaz (Higuchi, 2006).

El sistema enzimático conformado por lacasa y VAO muestra que estas enzimas están acopladas (Martínez et al., 2005). En especies del género *Pleurotus*, se ha demostrado que los radicales fenoxi producidos por lacasa pueden ser reducidos por acción de la VAO en presencia de alcohol veratrílico que es oxidado a aldehído veratrílico previniendo así la polimerización de las subunidades de lignina (Marzullo et al., 1995).

En el proceso de degradación de lignina son necesarias las especies reactivas de oxígeno para la activación de ligninasas (LiP y MnP). En *Pleurotus eryngii* se ha propuesto un mecanismo en donde la lacasa participa en la activación de O_2 mediante reacciones de óxido-reducción de aldehídos aromáticos para generar H_2O_2, por su parte la enzima AAO reduce aldehídos aromáticos para producir H_2O_2 y el radical $^{\cdot}OH^{-}$. (Guillén et al., 2000).

Así, se ha demostrado que lacasa y AAO participan de forma cooperativa para prevenir la repolimerización de los radicales de lignina, y mediante sinergismo producir radicales hidroxilo. Estos últimos, son los mayores agentes oxidantes generados por hongos de la pudrición blanca y que participan en el ataque inicial de la lignocelulosa cuando las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar la pared celular de los vegetales (Guillén et al., 2000).

Modulación del crecimiento fúngico

El crecimiento micelial fúngico puede ser estimulado por productos de degradación de los materiales lignocelulósicos. En especies del género *Pleurotus*, *Lentinula* y *Stropharia* se ha observado un incremento en la velocidad de crecimiento al suplementar el medio de cultivo con β-adenosina, flavonoides, ácido vainillínico y compuestos fenólicos derivados de lignina (*p*-hidroxibenzaldehído, siringaldehído, ácido *p*-coumárico y acido ferúlico). Estos compuestos se encuentran de manera natural en los tejidos vegetales, su efecto está relacionado con la concentración en la que se encuentren, y su presencia afecta la actividad de lacasas y dioxidasas (Domondon et al., 2004; Beltrán-García et al., 2001).

Contrariamente, el cultivo de basidiomicetos ligninolíticos sobre sustratos de madera con alto contenido de lípidos muestra una disminución en el crecimiento. Los ácidos grasos, saponinas, gliceroles y esteroles presentes en

los tejidos vegetales interfieren con el desarrollo de estos organismos. Probablemente la peroxidación de los lípidos de origen vegetal por las especies reactivas de oxígeno ocasionan daños a las membranas citoplasmáticas (Sánchez et al., 2002).

Mecanismo de regulación de ligninólisis

La variabilidad observada en la capacidad de degradación de componentes lignocelulósicos por hongos de la pudrición blanca está influenciada por factores tales como, la naturaleza del sustrato, condiciones ambientales y principalmente por factores genéticos de las especies. En función de estos aspectos el proceso de ligninólisis puede estar regulado a nivel génico, molecular y enzimático (Tengerdy y Szakacs, 2003).

Regulación a nivel génico

Debido al bajo grado de secreción de enzimas y las dificultades de su aislamiento a partir de sustratos lignocelulósicos, particularmente madera, sólo se ha podido indicar en pocos casos, qué enzimas ligninolíticas se expresan sobre estos sustratos.

En *Phanerochaete chrysosporium* se encontró que el nivel de mRNA del gen *lip* (codifica para LiP) se incrementa cuando la fuente de nitrógeno se limita

en el cultivo, también se detectó que las bajas concentraciones de nitrógeno y la presencia de manganeso inducen la expresión de los genes *mnp* que codifican para MnP. Esto sugiere que en estas condiciones la secuencia de la proteína activadora 2 (AP-2) presente en la región promotora para los genes *lip* y *mnp1*, puede estar involucrada en la regulación de la transcripción génica favoreciéndose el proceso de ligninólisis (Li et al., 1995).

Por otra parte, Ohga y Royse (2001) analizaron la transcripción de los genes que codifican para lacasa y celulasa durante el crecimiento y desarrollo de *L. edodes* utilizando como sustrato virutas de madera. Encontraron que la regulación transcripcional de los mRNAs que codifican para lacasa y celulasa está estrechamente correlacionada con cambios en la actividad de estas enzimas. La actividad de lacasa fue máxima en la etapa de desarrollo micelial cuando los niveles de transcripción de los genes para lacasa fueron máximos, en esta etapa los niveles de mRNA de celulasa permanecieron bajos. En la etapa de fructificación del hongo se observó una disminución en la actividad de lacasa y se incrementó la transcripción de los genes que codifican para celulasa, así como su actividad.

Regulación a nivel metabólico

Son poco los estudios que señalan el mecanismo de interacción entre los componentes del sustrato empleado en el cultivo de organismos degradadores de lignina y las enzimas involucradas en el proceso de ligninólisis.

Se ha sugerido un mecanismo de producción de especies reactivas en el metabolismo de *Pleurotus eryngii*, que consiste en una serie de ciclos redox de quinona intracelular-extracelular (Guillén et al., 2000). El mecanismo inicia con la reducción divalente de quinonas, seguido por la acción de lacasa para una oxidación de hidroxiquinonas a semiquinonas, la cual se autooxida generando radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) que se reducen a H_2O_2, con la consecuente reducción de Fe^{3+} que conducen a la generación de OH^-. Es posible que en la madera existan complejos hierro-polímeros catalíticamente activos que participan en la producción *in situ* de OH. Sin embargo, los niveles de Fe^{+3} presentes son bajos o no están activos, es posible que *P. eryngii* sintetice algunos metabolitos con capacidad quelante de hierro (Guillén et al., 2000). Estudios realizados con hongos de la pudrición café (no producen enzimas ligninolíticas) han mostrado que estos metabolitos pueden ser compuestos fenólicos y oxalato (Martínez et al., 2005).

La β-adenosina es un precursor del cAMP (adenosin monofosfáto cíclico), uno de los principales segundos mensajeros en la modulación de procesos celulares. En cultivos suplementados con paja para el desarrollo de

hongos se ha detectado la presencia de β-adenosina. Este compuesto funciona probablemente como un precursor de cAMP, el cual acelera la morfogénesis, resultando en una formación temprana del primordio que favorece la producción de cuerpos fructíferos (Domondon et al., 2004).

Regulación a nivel enzimático

Se ha demostrado que los compuestos aromáticos presentes en sustratos lignocelulósicos desempeñan un papel muy importante en la regulación de enzimas ligninolíticas excretadas por los hongos de la pudrición blanca. Existen diversos trabajos donde se ha demostrado que los componentes extraíbles con solventes orgánicos de algunos residuos lignocelulósicos, tienen un efecto en la actividad específica de lacasa, MnP, AAO y LiP (Elisashvili et al., 2009; Domondon et al., 2004).

Ardon et al. (1998), utilizaron un sistema de fermentación en estado sólido para evaluar el efecto de extractos obtenidos de tallos de algodón sobre la secreción de enzimas ligninolíticas de *Pleurotus ostreatus*. Dichos resultados indicaron que el extracto crudo de tallos de algodón contiene sustancias fenólicas provocan un incremento en la actividad enzimática, así como la posible presencia de una molécula específica utilizada como sustrato por la enzima.

Por otra parte, Harris-Valle et al. (2007), evaluaron el efecto de extractos polares y no polares sobre la actividad de las principales enzimas ligninolíticas en *L. edodes*. Los patrones de actividad de las enzimas ligninolíticas fueron diferentes para los extractos polares y los no polares, siendo los primeros los que mostraron una secuencia en el mecanismo de acción de dichas enzimas. Estos resultados indicaron que la regulación de la actividad ligninolítica, está influenciada por la polaridad de los compuestos extraídos de madera y que los compuestos encontrados en los extractos polares, son los responsables de modular la actividad enzimática en un patrón comparable al modelo de degradación de lignina propuesto para hongos de podredumbre blanca.

JUSTIFICACIÓN

Lentinula edodes es un hongo capaz de degradar eficientemente materiales lignocelulósicos. Se ha observado que en fermentación en estado sólido sobre poda de vid se logra una alta eficiencia biológica y rendimiento, estimulado posiblemente por la composición del sustrato. En este sentido, se sabe que diversos factores como el tipo de cepa, tipo de cultivo (fermentación sólida o líquida) y condiciones ambientales pueden afectar el desarrollo de un organismo. Sin embargo, son pocos los trabajos enfocados en determinar los factores que provocan que ciertos sustratos promuevan un mejor crecimiento del organismo. Por lo cual, es importante establecer por qué la poda de vid promueve un aumento en la velocidad del crecimiento fúngico de *L. edodes,* así como determinar qué factores son los que provocan que este hongo se desarrolle mejor cuando se cultiva sobre este sustrato con respecto a otros sustratos.

HIPÓTESIS

La poda de vid, utilizada como sustrato para la producción de *Lentinula edodes*, favorece el crecimiento micelial del hongo, debido a la mayor biodisponibilidad de nutrientes y a un estímulo en la producción de enzimas ligninolíticas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un estudio comparativo a cerca del efecto de la poda de vid y la paja de trigo sobre la fase de desarrollo micelial y la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas de *Lentinula edodes*.

Objetivos específicos

- Establecer una cinética de crecimiento de *L. edodes* en fermentación en estado sólido utilizando los sustratos poda de vid y paja de trigo.
- Determinar la actividad de lacasa y manganeso peroxidasa (MnP) durante la fase de crecimiento micelial de *L. edodes* en diferentes sustratos y cuantificar su rendimiento específico de producción.
- Obtener un extracto metanólico de poda de vid y paja de trigo y caracterizarlo por cromatografía en capa fina.
- Establecer un posible mecanismo de modulación de las enzimas ligninolíticas *de L. edodes*.

CAPÍTULO 1

Uso de la poda de vid como un sustrato alternativo para la producción eficiente de *Lentinula edodes*.

Resumen

Se cultivó a *Lentinula edodes* en fermentación sólida utilizando poda de vid o paja de trigo como sustrato. La velocidad específica de crecimiento fue 100% mayor en el cultivo con poda de vid (μ_M = 0.95 días^{-1}) en relación al cultivo con paja de trigo (μ_M = 0.47 días^{-1}). Por lo que respecta a la producción específica de la enzima MnP ($Y_{P/X}$) se observaron diferencias ($p<0.05$), siendo 6 veces mayor en paja de trigo que en poda de vid ($Y_{P/X}$=0.00211 U/mg de proteína/ppm CO_2 y $Y_{P/X}$=0.00038 U/mg de proteína/ppm CO_2 respectivamente. En la producción específica de lacasa sí se observaron diferencias ($p<0.5$) entre los cultivos, resultando aproximadamente 8 veces más alta la estimada en poda de vid ($Y_{P/X}$=0.00060 U/mg de proteína/ppm CO_2) que la de poda de vid ($Y_{P/X}$=0.00008 U/mg de proteína/ppm CO_2). El cultivo sólido suplementado con los extractos metanólicos de la poda de vid, mostró la formación de una pigmentación café intensa conforme se daba el crecimiento del hongo, posiblemente esta coloración sean productos de degradación del material ligninolítico de este sustrato. La cromatografía en capa fina del extracto metanólico de poda de vid mostró un mayor número (6 fracciones) y abundancia de compuestos, mientras que en paja de trigo sólo 3 fracciones. La intensa pigmentación café generada en el cultivo sólido suplementado con el mediador $ABTS^{\cdot+}$ y con el extracto de poda de vid indica que este grupo de compuestos son susceptibles a oxidación enzimática. Al cabo de 4 días, la

coloración café se desvanece, reapareciendo la coloración azul del estado oxidado del mediador ($ABTS^+$). Este hecho señala que los productos de oxidación formados van siendo metabolizados por el hongo. Al parecer, el mayor número de compuestos biodisponibles en la poda de vid hacen de este sustrato una excelente alternativa para la producción de *L. edodes*.

Introducción

Lentinula edodes (Berk.) Pegler, conocido como shiitake, pertenece al grupo de los hongos de la pudrición blanca. Su producción es de gran interés comercial, pues sus cuerpos fructíferos son empleado para consumo humano y contienen sustancias bioactivas con propiedades medicinales (Chang, 1996). Este organismo tiene la capacidad de crecer sobre residuos de madera, ya que secreta enzimas hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) y oxidativas (ligninolíticas) que le confieren la habilidad de degradar los componentes individuales de lignocelulosa (Leatham, 1985).

Los principales sustratos empleados para la producción de los hongos de la pudrición blanca, son las pajas y salvados de trigo, cebada, arroz y residuos de algodón con rendimientos de producción aceptables (Sánchez y Royse, 2001). Debido a la importancia que representa el desarrollo de estos organismos, investigaciones recientes se han enfocado en la búsqueda de sustratos alternativos capaces de optimizar el proceso de cultivo y cuya

disponibilidad esté asegurada (Vane et al., 2003; Siilva et al., 2005; Elisashvili y Kachlishvili, 2009). Se ha reportado que otros residuos agroindustriales de importancia como la poda de vid, para la producción de *L. edodes* poseen ventajas considerables frente a otros sustratos como. Por ejemplo, la disminución en los tiempos de formación de primordios, mayor eficiencia biológica, altos rendimientos y ciclos de producción cortos (Gaitán-Hernández et al., 2006; Sánchez et al., 2002).

La producción de uva es una actividad importante en el noroeste de México (Sonora) donde existen 21,367 ha destinadas a su cultivo (INEGI, 2007) que generan una gran cantidad de material podado sin aplicación alguna. Estas características colocan a la poda de vid como una opción muy atractiva para la producción *L. edodes* y otros hongos de la pudrición blanca.

Estudios recientes han demostrado que la cepa y la composición del medio de cultivo determinan la capacidad del organismo para su desarrollo. En sistemas de fermentación sólida se ha propuesto que la presencia de concentraciones significativas de carbohidratos solubles e inductores en el medio, aseguran el incremento en el crecimiento y la eficiencia de producción de las enzimas degradadoras de lignocelulosa (Elisashvili y Kachlishvili, 2009). Sin embargo, los estudios en este sentido son pocos y en poda de vid se desconocen los factores que propician sus ventajas como sustrato para el cultivo de hongos de la pudrición blanca.

En este artículo se realizó un estudio comparativo, cultivando *L. edodes* sobre poda de vid y paja de trigo. Se evaluaron los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de enzimas, se caracterizaron los extractos metanólicos de los sustratos y se evaluó su biodisponibilidad con el propósito de explicar el origen de las diferencias en los rendimientos y velocidades de crecimiento.

Materiales y métodos

Cepas y preparación del inóculo

Se utilizó la cepa IE-105 de *Lentinula edodes* donada por el Instituto de Ecología, Unidad Xalapa, Veracruz. La cepa se mantuvo en cajas petri conteniendo agar papa dextrosa (PDA), refrigeradas a 4°C. El inóculo se preparó creciendo la cepa en medio sólido de composición químicamente definida, 2 g de KH_2PO_4, 0.5 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g de $CaCl_2$, 2 g de NH_4NO_3, 5 g de carboximetilcelulosa (CMC) y 20 g de agar-agar, pH 4.5 a 25°C (Kirk et al., 1976).

Sustratos lignocelulósicos

La poda de vid se recolectó en los campos de La Costa de Hermosillo, Sonora y la paja de trigo de obtuvo de manera comercial. Los sustratos se homogenizaron a un tamaño de partícula de 2 cm de longitud en un molino mecánico y se hidrataron por 16 h hasta un 60 y 80% de humedad respectivamente.

Condiciones del cultivo

Se utilizaron matraces de 125 mL conteniendo 4 g de los sustratos (peso seco. Se inocularon con 3 cm^2 de micelio desarrollado sobre láminas de agar y se incubaron a 25°C.

Estimación de biomasa

La producción de biomasa se estimó midiendo la producción de CO_2 con un sensor de CO_2 Scienceworkshop modelo CI-7599 de Pasco. El crecimiento se ajustó al modelo logístico para estimar los parámetros de crecimiento (μ_M y X_M).

Ensayos de actividad enzimática y cuantificación de proteína

La extracción de las enzimas extracelulares contenidas en los cultivos se realizó siguiendo el método descrito por Elisashvili et al., (2008b). El contenido de cada matraz se licuó 2 veces con 25 mL de agua destilada (volumen total de 50 mL). Los sólidos y la biomasa se separaron filtrando con gasa, seguido de centrifugación a 4°C (6000 x *g* por 20 min).

El sobrenadante obtenido después de separar la biomasa fue empleado para cuantificar actividad enzimática. La actividad de lacasa se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm debido a la oxidación del ácido 2,2'.azino-bis-[3-etiltiazolina-6-sulfonato] (ABTS) 0.3 mM en buffer de malonato de sodio 5 mM (pH 4.5). Se usó un coeficiente de extinción molar para $ABTS^{+\cdot}$ de 36,000$M^{-1}cm^{-1}$ (Zhao et al., 1996).

La actividad de MnP se monitoreó siguiendo el incremento en absorbancia a 270 nm, producto de la formación del complejo Mn III-malonato a partir de malonato de sodio 50 mM (pH 4.5) y $MnSO_4$ 0.5 mM en presencia de H_2O_2 0.1 mM. El coeficiente de extinción molar para el complejo Mn III-malonato es de 11,590 $M^{-1}cm^{-1}$ (Wariishi et al., 1992). La proteína total se cuantificó por el método colorimétrico de Bradford (1976).

Obtención y caracterización de extractos de los sustratos lignocelulósicos

Se obtuvieron extractos metanólicos de poda de vid y paja de trigo por maceración. Los sustratos se trituraron en un molino mecánico hasta un tamaño de partícula homogénea de 0.5 mm, se reposaron en ausencia de luz durante 16 días a 25°C. Los extractos se concentraron eliminando el solvente con un rotavapor.

Los extractos se caracterizaron por cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizó como fase estacionaria placas de aluminio (Sílicagel 60F254) y como fase móvil la mezcla cloroformo-metanol-ácido fórmico (85:15:1), se reveló con luz UV.

Bioensayo con extractos de los sustratos lignocelulósicos

El bioensayo consistió en realizar un cultivo sólido de *L. edodes* sobre agar conteniendo 2 g de KH_2PO_4, 0.5 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g de $CaCl_2$, 2 g de NH_4NO_3, 5 g de CMC, 20 g de agar-agar, 0.2 g de ABTS y 0.5 mg/mL de extracto (pH 4.5), el control absoluto del ensayo fue un cultivo sin ninguno de los extractos. El inóculo consistió en un disco de micelio de 4 mm de diámetro y las placas se incubaron a 25°C durante 7 días (Nazareno-Saparrat et al., 2000). Los resultados provienen de dos repeticiones del cultivo con tres réplicas por muestreo.

Análisis de datos

La producción de biomasa se ajustó a la ecuación logística de Velhurst-Pearl (1).

$$X(t) = \frac{X_M}{1 - \left[{(X_M - X_0)}/{X_0 e^{\mu_M t}} \right]} \qquad (1)$$

Donde X (t) es la biomasa en cualquier tiempo de la fermentación medida como CO_2, X_0 es la biomasa inicial (ppm CO_2), μ_M es la velocidad específica de crecimiento máxima (días^{-1}) y X_M es la biomasa máxima en el periodo de cultivo (ppm CO_2).

La ecuación ajusta los datos experimentales al menor valor de la suma de cuadrado del error en función de los parámetros X_0, X_M y μ_M (Viniegra-González et al., 2003).

La cinética de producción de enzimas se modeló usando la ecuación de Luedeking y Piret (2) como una función de la biomasa para predecir $Y_{P/X}$ y *k* de lacasa y MnP excretadas por *L. edodes* durante el periodo de fermentación.

$$P(t) = Y_{P/X} X_M \left[\xi - \xi_0 + \nu \ln\left(\frac{1-\xi_0}{1-\xi} \right) \right] \qquad (2)$$

Donde P es la formación de producto (U/mg de proteína), $Y_{P/X}$ represente el rendimiento de producto en términos de biomasa (unidades de producto por unidad de biomasa) y $\nu = k/Y_{P/X}\,\mu_M$ donde *k* es la tasa secundaria de formación (destrucción) de producto. Para -1 $k < 0$, el gráfico (P vs ξ) proporciona una línea convexa con un valor máximo de P, muestra la presencia de degradación de producto durante la fermentación. Para $k = 0$, el gráfico es una línea recta y representa que P sólo está asociado con el crecimiento. Para $k > 0$, el gráfico es cóncavo, indicando la formación de P no asociada al crecimiento o parcialmente asociada a crecimiento (Viniegra-González et al., 2003).

Para ajustar el modelo de las ecuaciones se utilizó el paquete estadístico NCSS 2007 (Hintze, 2006). Las diferencias entre las medias de los parámetros evaluados se detectaron mediante los límites fiduciales con un nivel de probabilidad del 95%.

Resultados y discusión

Efecto del sustrato sobre el crecimiento micelial

En una fermentación sobre sustrato sólido los hongos filamentosos colonizan por adhesión expandiéndose por todo el sustrato, por lo que la separación de la biomasa para su estimación se complica (Tengerdy y Szakacs, 2003). Existen métodos indirectos que pueden ser utilizados para medir el

crecimiento de un organismo. Estos métodos se basan en la sustitución de la determinación de biomasa microbiana por la determinación de un parámetro determinable con mayor facilidad, cuyo valor puede correlacionarse con precisión con el de biomasa (Leveau y Bouix, 2000). Paralelamente a la aparición de biomasa existen productos que se generan en el metabolismo del organismo, como la producción de CO_2 durante la respiración., por lo que el uso de este tipo de métodos facilita la estimación del crecimiento microbiano en una fermentación sólida.

En la Fig. 4 se muestran las cinéticas de crecimiento micelial de *L. edodes* sobre poda de vid y paja de trigo. Se observa que en el primer caso, el tiempo en el que se alcanza la biomasa máxima es aproximadamente 9 días, mientras que en el caso de la paja de trigo es de 14 días. En ambos sustratos el crecimiento de *L. edodes* tuvo un periodo exponencial, pero sobre poda de vid este fue más acelerado (mayor pendiente).

En la Tabla 1 se presentan los parámetros de crecimiento estimados para los cultivos evaluados. La biomasa máxima (X_M) fue similar en ambos sustratos (2349.57 ppm de CO_2 en poda de vid y 2238.15 ppm de CO_2 en paja de trigo). Sin embargo la velocidad específica de crecimiento (μ_M) del hongo en poda de vid resultó 100% más alta ($p<0.05$) que la que se presenta en paja de trigo (0.95 y 0.47 d^{-1} respectivamente).

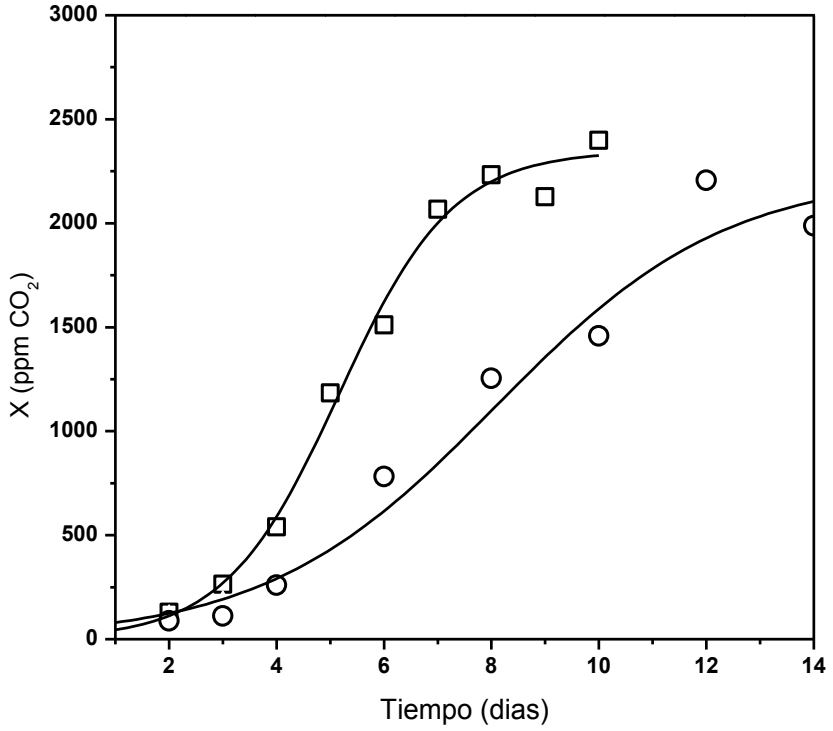


Fig. 4. Cinética de crecimiento de *Lentinula edodes* cultivado sobre poda de vid (□) y paja de trigo (O). Los símbolos corresponden a las medias de los datos experimentales y las líneas a las curvas ajustadas al modelo.

Existen estimaciones de velocidades específicas de crecimiento para otros basidiomicetos sobre mezcla de granos, como la reportada por Straatsma et al., (1991), quienes encontraron una μ para *Agaricus bisporus* de 0.79 d^{-1}. Dicha velocidad es menor a la estimada para *L. edodes* crecido en poda de vid. Los datos obtenidos en nuestro trabajo soportan los resultados previamente

reportados en los que se demuestra que *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* disminuyen su tiempo de producción cuando son cultivados sobre poda de vid (Gaitán-Hernández et al., 2006; Sánchez et al, 2002).

Los resultados obtenidos en este experimento no proporcionan información sobre los factores que provocan una mayor producción de cuerpos fructíferos (eficiencia biológica) del organismo cuando crece sobre poda de vid. Sin embargo, son contundentes para establecer que el incremento en la velocidad de desarrollo micelial es determinante para disminuir los tiempos de reproducción del hongo, y con ello aumentar su producción. Desde el punto de vista comercial, una reducción en los tiempos de producción y un incremento en los rendimientos tienen un impacto importante en la reducción de los costos de producción de basidiomicetos, lo que hace de la poda de vid un sustrato altamente atractivo para la producción de este tipo de organismos.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento y producción de lacasa y MnP durante la fermentación sólida de *Lentinula edodes* sobre poda de vid y paja de trigo.

Parámetro	Unidades	Poda de vid	Paja de trigo
Biomasa			
X_M	ppm CO_2	2349.57 (±216.07)[a]	2238.15 (±465.38)[a]
μ_M	días^{-1}	0.95 (±0.26)[a]	0.47 (±0.17)[b]
R^2		0.9764	0.9634
Lacasa			
$Y_{P/X}$	U/mg proteína/ppm CO_2	0.00034 (±0.00018)[a]	0.00008 (±0.00011)[b]
k	U/mg proteína/ppm CO_2.días	-0.00002 (±0.00002)[a]	-0.000004 (±0.0000003)[b]
R^2		0.8612	0.8626
MnP			
$Y_{P/X}$	U/mg proteína/ppm CO_2	0.00060 (±0.00022)[b]	0.00221 (±0.00072)[a]
k	U/mg proteína/ppm CO_2.días	0.00019 (±0.00005)[a]	-0.00013 (±0.0001)[b]
R^2		0.9767	0.9225

Literales diferentes en renglones significa diferencias estadísticas (α=0.05). Los números en paréntesis indican la desviación estándar.

Producción de enzimas lignocelulósicas

En la Fig. 5 se presenta el efecto del sustrato sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa (MnP) en función de la biomasa relativa ($\xi = X/X_M$).En general se observa que la forma de las figuras son casi líneas rectas, lo que significa que la producción de estas dos enzimas, está asociada principalmente al crecimiento, independientemente del tipo de sustrato utilizado.

Se obtuvo un valor de $k < 0$ (línea convexa) para lacasa en ambos cultivos, lo que indica una asociación parcial de la producción de enzima con el crecimiento (Fig. 5a). Para MnP en paja de trigo, también se observó una asociación de la producción de enzima con el crecimiento con degradación en cierta etapa del crecimiento ($k<0$). Contrario a lo anterior, se obtuvo un valor de $k>0$ para la producción de MnP en poda de vid, resultado que indica que en la fase estacionaria de crecimiento hay un incremento en su producción (Fig. 5b).

La ecuación de Luedeking y Piret representa un modelo mixto de crecimiento. La primer parte de la ecuación, incluye el rendimiento de producto por unidad de biomasa ($Y_{P/X}$) e indica la asociación de la formación de enzimas con el crecimiento. La segunda parte de la ecuación considera la tasa secundaria de formación o degradación de producto (k) e indica la fase no asociada al crecimiento. De acuerdo a este criterio, al comparar los parámetros cinéticos para lacasa y MnP de los cultivos sobre poda de vid y paja de trigo, el valor del producto de los parámetros $Y_{P/X}\ \mu_M$ es, en ambos sustratos para

lacasa es, aproximadamente 10 veces superior al valor de k. Esto indica que la contribución del término asociado a crecimiento es mucho mayor que el término no asociado. En el caso de la MnP, para el cultivo sobre poda de vid, el término asociado a crecimiento es tan solo 3 veces superior al término no asociado, lo que indica que esta enzima se produce parcialmente asociada a crecimiento. En el caso de paja de trigo, nuevamente la relación aproximada es de 10:1, siendo la producción principalmente asociada a crecimiento.

La presencia de lacasa a lo largo de la fermentación tanto en poda de vid como en paja de trigo sugiere que esta enzima forma parte del metabolismo primario de *L. edodes* a diferencia de otros hongos de la pudrición blanca en donde esta enzimas forman parte del metabolismo secundario y no están asociadas con el crecimiento (Barreto-Xavier et al., 2007, Leatham, 1986). Además, las diferencias observadas en MnP con ambos sustratos indican que esta enzima posiblemente forma parte de un sistema de regulación por los componentes del sustrato poda de vid.

Scheel, et al. (2000) midieron la expresión de estas lacasa y MnP, encontrando un incremento en la expresión de MnP debido a la presencia de compuestos fenólicos en el medio de cultivo, demostrando que esta enzima se encuentra regulada por los componentes presentes en el medio. Contrariamente a esto, siempre se detectó la presencia de lacasa, aún en ausencia del inductor, demostrando que esta enzima es constitutiva. Aunque en este trabajo no se midieron los niveles de expresión de lacasa y MnP, el

comportamiento predicho por la ecuación de Piret para MnP indica que posiblemente esta enzima se encuentra regulada por los componentes del sustrato poda de vid, y que lacasa excretada por *L. edodes* es una enzima constitutiva.

En la Tabla 1 se presentan los rendimientos de producción de lacasa y MnP. Los niveles de actividad y la producción para lacasa fueron mayores en el cultivo sobre poda de vid (hasta1 U/mg de proteína al final de la fermentación y $Y_{P/X}$ =0.00034).

La actividad de MnP se mantuvo en niveles similares en ambos sustratos (hasta 4 U/mg de proteína al final de la fermentación). Sin embargo, se observaron diferencias en los rendimientos ($P<0.05$), siendo mayor la síntesis de enzima en paja de trigo con respecto a poda de vid ($Y_{P/X}$=0.00221 U/mg de proteína/ppm CO_2 y $Y_{P/X}$=0.00060 U/mg de proteína/ppm CO_2 respectivamente).

Estos resultados indican que el estímulo en la actividad y producción de lacasa y MnP, posiblemente se deben a que existen diferencias en el tipo de material libre presente en los sustratos evaluados.

Se sabe que MnP es una enzima necesaria para la oxidación inicial del polímero de lignina, por lo que la mayor producción de MnP en el cultivo con paja de trigo puede estar relacionada con una composición más compleja de dicho sustrato.

.

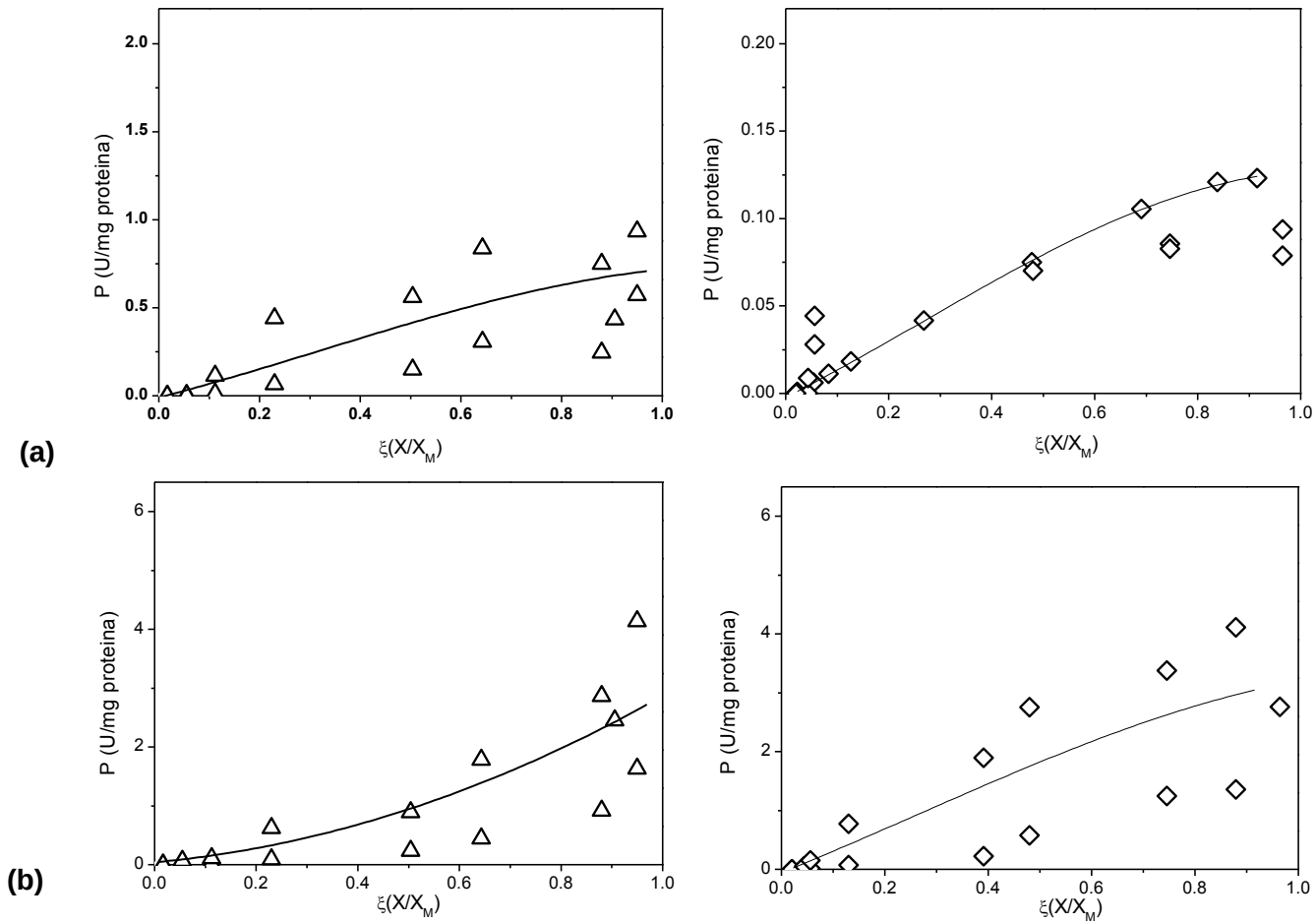


Fig. 5. Producción de lacasa (a) y MnP (b) en el cultivo de poda de vid (Δ) y paja de trigo (◊) en relación a los niveles de producción de biomasa relativa ($\xi = X/X_M$). Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas corresponden a las curvas ajustadas al modelo.

En este sentido, la síntesis de mayor cantidad de enzimas requiere de un mayor gasto energético por parte del organismo. La inversión en energía y el tiempo necesario para sintetizar dichas proteínas posiblemente es un factor que determina la menor velocidad de crecimiento del organismo en paja de trigo.

Por su parte, la enzima lacasa tiene como función oxidar compuestos menos complejos generados por MnP u otras peroxidasas (Higuchi, 1990). Algunos estudios de fermentación en estado sólido de basidiomicetos indican que la presencia de compuestos fenólicos en el medio de cultivo ocasionan un incremento en la actividad de dicha enzima (Sato et al., 2007; Rosales et al., 2005). En este sentido, la mayor actividad y producción de lacasa observada en el cultivo con poda de vid, sugiere la existencia de moléculas derivadas de lignina menos complejas susceptibles a oxidación por lacasa, de esta manera al encontrar compuestos más biodisponibles en el medio de crecimiento, *L. edodes* efectúa de forma más acelerada la degradación dicho sustrato.

Efecto de los extractos metanólicos de los sustratos en la actividad extracelular

En la Fig. 6 se presentan los resultados del bioensayo realizado para evaluar el efecto de los extractos metanólicos de poda de vid y paja de trigo sobre la actividad extracelular de *L. edodes*. El ABTS (incoloro) es una molécula que puede ser oxidado por ligninasas (MnP) o lacasa formando su radical catiónico $ABTS^{\cdot+}$ (verde), por lo que este compuesto sirvió como indicador para

evaluar el efecto de las enzimas excretadas por el organismo sobre el sustrato presente en el medio.

En los cultivos control se observó un cambio en la coloración del medio a verde durante el periodo de crecimiento, producto de la oxidación del ABTS por las enzimas excretadas por *L. edodes*. En los cultivos suplementados con paja de trigo se detectó un comportamiento similar al del control. En cambio, los cultivos con extracto de poda de vid, presentaron una coloración café desde el inicio del crecimiento. A partir del día 4 la coloración café fue desvaneciendo y el medio empezó a adquirir tonalidades verdes (oxidación del ABTS).

Se ha demostrado que el ABTS es una molécula que puede actuar como mediador catiónico entre lacasa y el sustrato de la enzima (compuestos fenólicos), acelerando con ello el proceso oxidativo del sustrato (Bourbonnais et al., 1998; Matsumura et al., 1986). Existen estudios realizados con hongos de la pudrición café (grupo de organismos moderadamente ligninolíticos) en donde se ha demostrado la presencia de un material café en el medio de cultivo correspondiente a una oxidación parcial del polímero de la lignina (Martínez et al., 2005).

De acuerdo al comportamiento observado en el cultivo suplementado con extracto de poda de vid, el ABTS actuó como intermediario entre las enzimas excretadas por el hongo y los componentes presentes en la poda de vid. Posiblemente la coloración café observada en este sistema se debe a la formación de compuestos de oxidación de la lignina. Al parecer, con el

transcurrir del tiempo los compuestos contenidos en el extracto de poda de vid van siendo consumidos (desaparición del color café) y el ABTS se va oxidando (aparición del color verde). El comportamiento observado en el sistema con extracto de paja de trigo, sugiere que los compuestos presentes en este son más complejos o se encuentran menos biodisponibles, por lo que las enzimas excretadas por el organismo simplemente utilizaron como sustrato al ABTS presente en el medio.

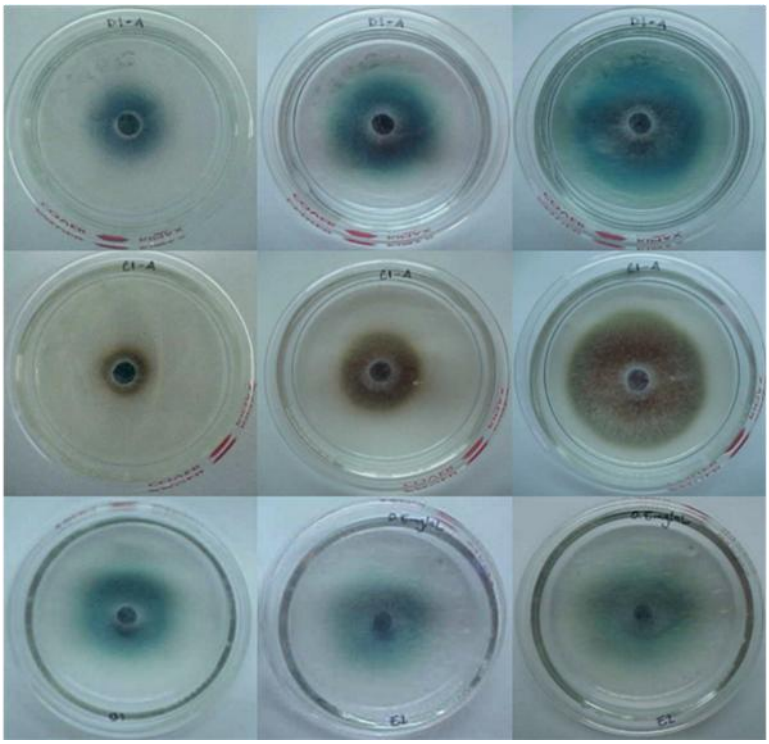


Fig. 6. Efecto de los componentes del extracto de poda de vid sobre la actividad extracelular de *Lentinula edodes*. (a) Cultivo control, (b) extracto de poda de vid, (c) extracto de paja de trigo.

Caracterización de los extractos de los sustratos lignocelulósicos

Mediante TLC se detectaron seis fracciones en el extracto de poda de vid, mientras que en el de paja de trigo se detectaron tres fracciones con diferentes factores de retardo (Tabla 2). La alta polaridad del solvente utilizado para la extracción, la naturaleza de la fuente de la cual se extrajeron y la actividad a la luz UV indica que las fracciones pueden contener compuestos fenólico.

Se sabe que los materiales lignificados son apropiados para el desarrollo de basidiomicetos (Elisashvili et al., 2008a) y que la velocidad de crecimiento de estos organismos está influenciada por el impedimento estérico y accesibilidad del sustrato (Tengerdy y Szakacs, 2003). De acuerdo a lo anterior se sugiere que el material lignificado del sustrato poda de vid se encuentra más degradado, por lo que la accesibilidad del hongo a los nutrientes es mayor.

Tabla 2. Caracterización de las fracciones del extracto de poda de vid y paja de trigo.

FRACCIÓN	R_f					
	I	II	III	IV	V	VI
Madera de vid	0.067	0.167	0.292	0.475	0.550	0.617
Paja de trigo	0.133	0.575	0.633			

R_f=Factor de retardo

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio muestran claramente que la mayor biodisponibilidad de compuestos en poda de vid susceptibles a oxidación por las enzimas excretadas por *Lentinula edodes*, es el factor que determina la mayor velocidad de crecimiento en la etapa de desarrollo micelial del hongo, y es lo que provoca una mayor productividad del organismo en este sustrato a diferencia de otros como la paja de trigo.

CAPÍTULO 2

Efecto de enzimas extracelulares de *Lentinula edodes* sobre el extracto metanólico de poda de vid

Resumen

Se obtuvieron espectros de absorción del extracto metanólico de poda de vid, antes y después de su la interacción con las enzimas extracelulares de *Lentinula edodes*. Se encontraron 8 picos máximos de absorbancia para el extracto en el rango del UV del espectro. La naturaleza de su origen, la polaridad elevada del solvente utilizado para la obtención del extracto y las longitudes de onda en donde se detectaron los picos máximos de absorbancia indican que estos compuestos posiblemente son de naturaleza fenólica. Se observó un cambio en los espectros de absorción de los componentes contenidos en el extracto metanólico al ser adicionado con el extracto enzimático extracelular de *L. edodes.* Este hecho indica que hay modificaciones químicas de los componentes indicando su susceptibilidad a la oxidación enzimática, empleando un mediador como el ABTS.

Introducción

La lignina es un polímero heterogéneo distribuido en la pared celular de las plantas, siendo la única molécula que puede ser degradada completamente por oxidación de sus unidades monoméricas, mientras que por hidrólisis sólo puede darse una descomposición parcial (Higuchi, 2006).

Para poder oxidar la lignina, los hongos de la pudrición blanca producen un grupo de enzimas extracelulares. Las tres principales enzimas que participan directa o indirectamente sobre la degradación de la lignina son lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Kersten y Cullen, 2007).

La lacasa en una proteína que pertenece a la familia de las enzimas multicobre, cataliza la sustracción de $1e^-$ del grupo hidroxilo de compuestos fenólicos formando los correspondientes radicales fenoxi que pueden experimentar repolimerización. (Wong, 2008).

Existe evidencia de que lacasa puede actuar sobre compuestos no fenólicos con el acoplamiento de moléculas mediadoras de bajo peso molecular (Kirk y Cullen, 1998). Dentro de los mediadores más ampliamente estudiados en la actualidad se encuentra el ácido 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS), para el cual se ha establecido un mecanismos de reacción (Bourbonnais et al., 1998)

El objetivo del presente trabajo es evidenciar si la poda de vid posee compuestos oxidables por lacasa u otras enzimas del mismo grupo excretadas por *L. edodes* utilizando el mediador ABTS.

Materiales y métodos

Obtención de extractos

Ver metodología del Capítulo 1 de este manuscrito.

Microorganismos y medio de cultivo

Ver metodología del Capítulo 1 de este manuscrito.

Cultivo líquido

Se prepararon empleó el medio descrito por Kirk et al. (1976), conteniendo por litro 2 g de KH_2PO_4, 0.5 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g de $CaCl_2$, 2 g de NH_4NO_3 y 5 g de carboximetilcelulosa (CMC). Matraces Erlenmeyer conteniendo 30 mL de medio que fueron inoculados con 6 discos de micelio de 6 mm de diámetro tomados de la periferia de un cultivo de 16 días en medio glucosa-peptona agar (GPA). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 25 °C y una a una agitación de 150 rpm durante 14 días.

Obtención del extracto crudo

Del cultivo líquido se obtuvo un extracto crudo, para lo cual se separó la biomasa filtrando con una membrana de nitrocelulosa y el sobrenadante se empleó para obtener las proteínas extracelulares por precipitación con acetona, manteniendo una relación de 15 mL de acetona por cada 3 mL de medio de cultivo, refrigerando a -20 °C durante 6 h, para después centrifugar a 5000 rpm por 10 min.

El precipitado se resuspendió en un volumen de solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM y KCl 10 mM, pH 4.0 y 250 µM de fenil-metil-sulfonil fluoruro como inhibidor de proteasas que representaba el 1% del volumen utilizado en la precipitación. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su utilización para cuantificación de proteína y ensayo de actividad enzimática (Harris-Valle et al., 2007).

Ensayo de actividad de lacasa

La actividad de lacasa se cuantificó midiendo la oxidación de 2,2´-azinobis-3-etil-bentiazoline-6-sulfonato (ABTS) 0.3 mM en una solución de malonato de sodio a una concentración de 5 mM, pH 4.5, monitoreando la absorbancia a 420 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar de 36 000 $M^{-1}cm^{-1}$ (Zhao et al., 1996).

Interacción lacasa-ABTS-extracto de poda de vid

Se obtuvieron espectros de absorción en un rango de longitud de onda de 200-900 nm. Las mediciones se hicieron en un espectrofotómetro (Ultrospec 4000, Pharmacia) colocando 40 µL de extracto crudo y 960 µL de mezcla de reacción (buffer malonato de sodio 5 mM, pH 4.5, ABTS 0.3 mM, extracto de poda de vid en una concentración final de 2 mg/mL).

El extracto de poda de vid se solubilizó en acetona-agua (relación 3:1 en volumen) y se centrifugó a 8000 rpm durante 6 min para eliminar la fracción insoluble y recuperar la porción soluble, con la cual se realizaron los ensayos.

Resultados y discusión

El modelo 1 (Fig. 7) consistió en reaccionar, primeramente, el ABTS con las enzimas secretadas por *Lentinula edodes* (extracto crudo obtenido del cultivo líquido) para formar el primer estado de oxidación del ABTS ($ABTS^{\cdot+}$), y posteriormente la reacción de éste radical con el extracto de poda de vid. En el ensayo se utilizaron como control para detectar cambios en absorbancia, y por lo tanto cambios estructurales, los espectros de absorción del ABTS en solución y del extracto de poda de vid.

En la Fig.8 se muestran los espectros de la etapa 1 del modelo. Los picos máximos para el ABTS en solución fueron a los 320 y 365 nm. Se

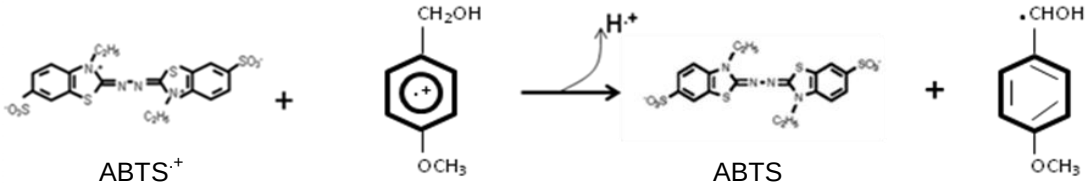
observaron cambios en estos máximos al adicionar el extracto enzimático, generándose una disminución en la absorbancia del ABTS (forma reducida) y generándose un aumento a los 410, 650 y 730 nm característicos del $ABTS^{\cdot+}$ (forma oxidada).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Solís-Oba et al. (2005), quienes reportaron cinco máximos de absorción para el radical catiónico ($ABTS^{\cdot+}$) similares a los de este estudio (214, 394, 414, 646 y 728). Por ello se puede aseverar que las enzimas excretadas por *L. edodes* son capaces de oxidar el ABTS formando el primer estado de oxidación de dicha molécula.

Etapa 1.

ABTS $\qquad$ $ABTS^{\cdot+}$

Etapa 2.



$ABTS^{\cdot+}$ $\qquad$ ABTS

Fig. 7. Mecanismo de reacción entre el ABTS, las enzimas extracelulares y el extracto metanólico de poda de vid. Etapa 1, reacción entre ABTS y enzimas extracelulares; etapa 2, reacción entre el $ABTS^{\cdot+}$ y el extracto de poda de vid.

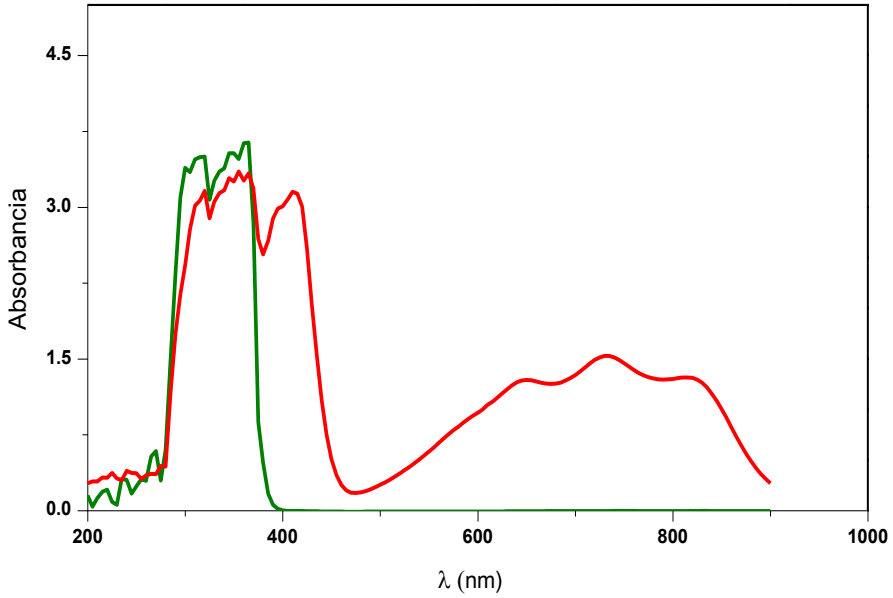


Fig. 8. Espectros de absorbancia de la interacción del ABTS y las enzimas extracelulares de *Lentinula edodes*. ABTS 0.3 mM (▬) y su radical catiónico $ABTS^{\cdot+}$ (▬).

Por otra parte, en la segunda etapa del modelo se adicionó al producto generado ($ABTS^{\cdot+}$) el extracto de poda de vid (máximos de absorbancia a los 210, 230, 250, 275, 285, 310, 330 y 350 nm). Se observaron cambios en el espectro de absorción de ambas especies. Con respecto al $ABTS^{\cdot+}$, desaparecieron los tres máximos característicos de esta molécula (410, 650 y 730 nm), y con respecto al extracto de vid se observó una disminución en sus picos máximos de absorción (Fig. 9).

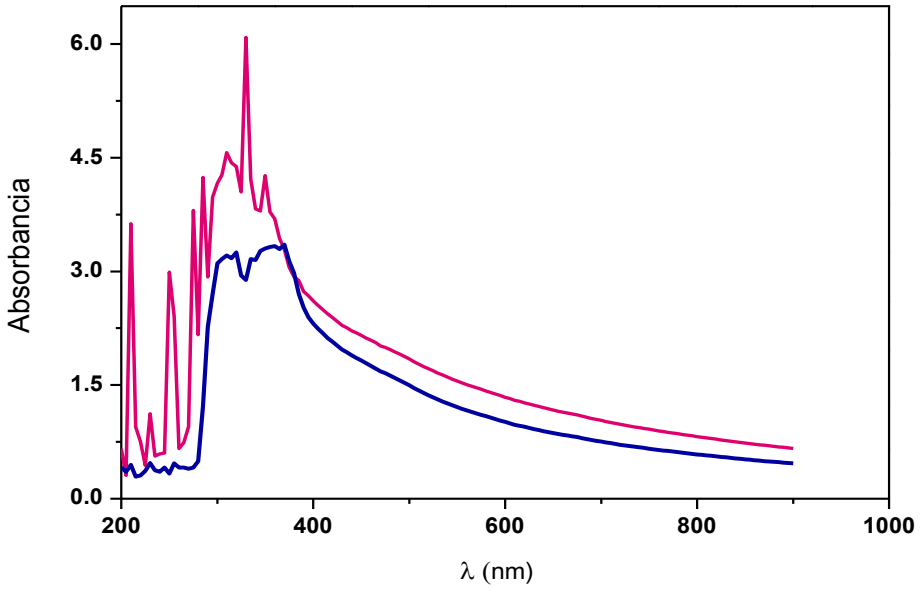


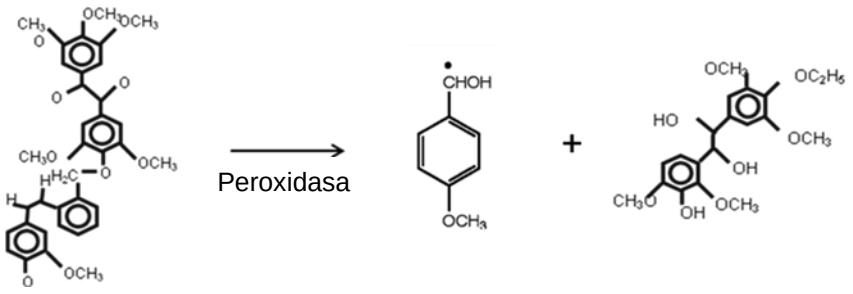
Fig. 9. Espectros de absorbancia del extracto de poda de vid antes y después de la adición de $ABTS^{\cdot+}$ generado por oxidación enzimática. Extracto de poda de vid antes de la adición de $ABTS^{\cdot+}$ (——); extracto de poda de vid después de la adición de $ABTS^{\cdot+}$ (——).

Se ha demostrado que lacasa puede catalizar el acoplamiento del ABTS con derivados fenólicos en pocos minutos y que el radical catiónico se encuentra involucrado en dicho proceso (Matsumura et al., 1986). Apoyando esta hipótesis, Bourbonnais et al., (1998) demostraron que el radical catiónico $ABTS^{\cdot+}$ reacciona eficientemente con compuestos fenólicos, tales como el alcohol vainillínico, formando radicales vainillil, dicho proceso se encuentra involucrado en la degradación de lignina.

De acuerdo a estos antecedentes y a los cambios observados en los espectros de absorción de este estudio, posiblemente en el extracto de poda de vid se encuentren presentes compuestos fenólicos que están interaccionando con el radical catiónico ($ABTS^{\cdot+}$) generándose de esta forma un ciclo de acoplamiento entre las especies reaccionantes.

En la Fig. 10 se muestra el modelo 2 que consistió en reaccionar primeramente las enzimas extracelulares de *Lentinula edodes* con el extracto de poda de vid, y posteriormente reaccionar el producto generado con el ABTS. De igual manera que en el modelo 1, se utilizaron como controles para detectar cambios en absorbancia el espectro del ABTS en solución y del extracto de poda de vid (Fig. 11).

Etapa 1



Etapa 2

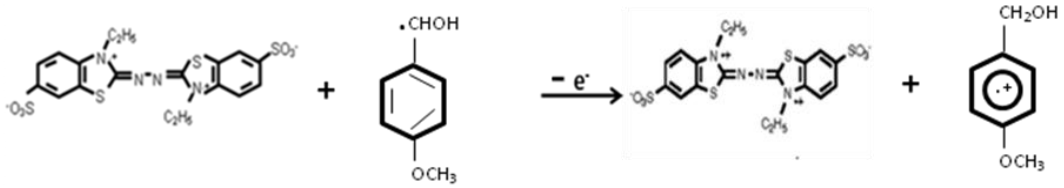


Fig. 10. Mecanismo de reacción entre el extracto metanólico de poda de vid, las enzimas extracelulares y el ABTS. Etapa 1, reacción entre las enzimas extracelulares y el extracto de poda de vid; etapa 2, reacción entre los productos de oxidación del extracto de poda de vid y el ABTS.

Se observó una disminución en los máximos de absorción del extracto (210, 230, 250, 275, 285, 310, 330 y 350 nm) y la presencia de dos máximos 310 y 350 nm, lo cual sugiere un posible consumo o modificación en la estructura de los componentes del extracto por enzimas lacasas o ligninasas excretadas por *L. edodes* (Fig. 11).

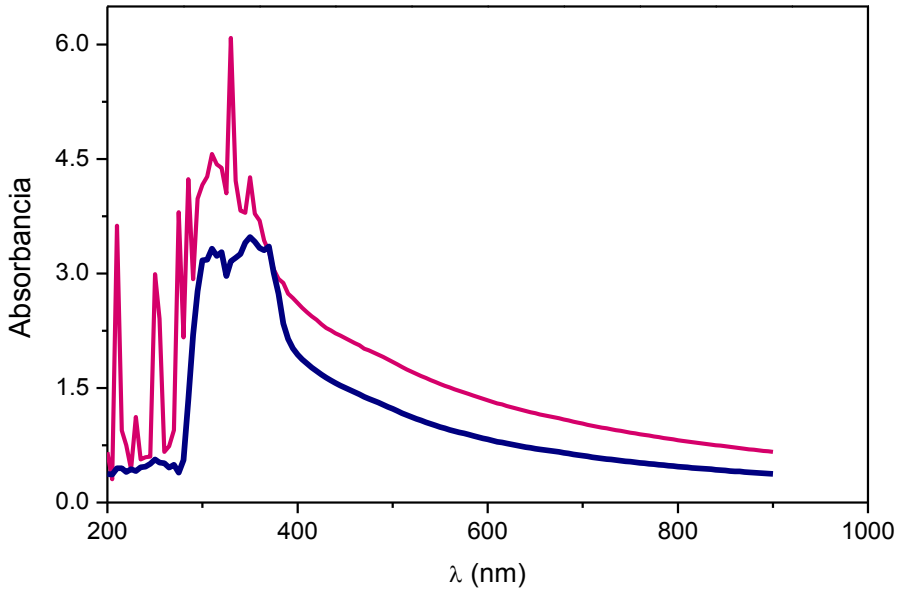


Fig. 11. Espectros de absorbancia de la reacción entre las enzimas extracelulares y el extracto de poda de vid. Extracto de poda de vid antes de la adición de las enzimas extracelulares de *Lentinula edodes* (——); extracto de poda de vid después de la adición de las enzimas extracelulares (——).

No se detectaron diferencias en los espectros de absorción en la segunda etapa del modelo (Fig. 12). Al adicionar el ABTS a la mezcla de reacción resultante de la interacción del extracto de poda de vid con las enzimas extracelulares, no se observó el espectro característico de la formación del radical catiónico ($ABTS^{\cdot+}$), lo que sugiere que posiblemente en la mezcla de reacción las enzimas utilizan como sustrato los componentes del extracto de poda de vid.

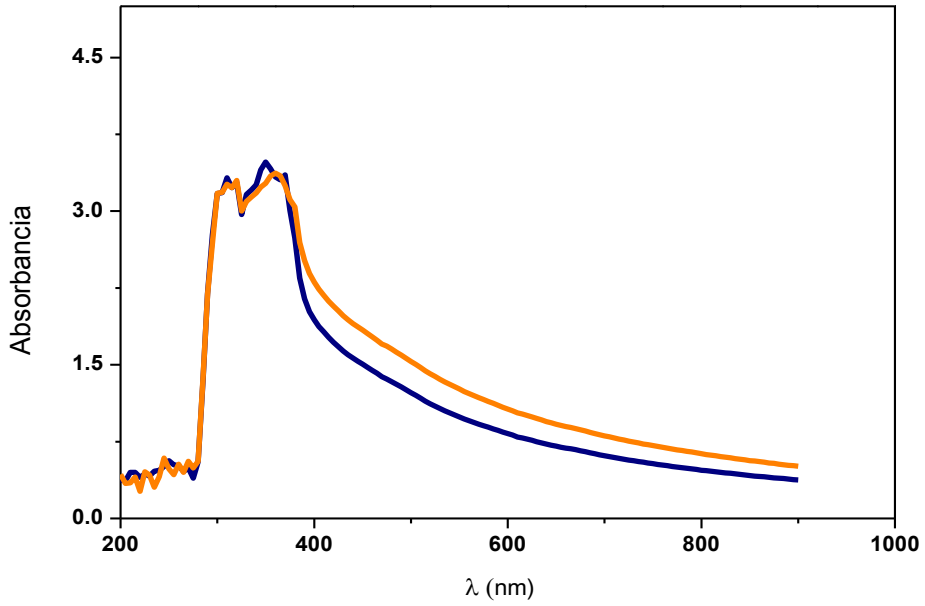


Fig. 12. Espectros de absorbancia de la reacción entre los productos de oxidación del extracto de poda de vid y el ABTS. Productos de oxidación del extracto de poda de vid (——) reacción del extracto poda de vid; reacción del ABTS y los productos de oxidación del extracto (——).

La enzima lacasa sólo puede oxidar directamente compuestos fenólicos derivados de la lignina. La reactividad de la enzima depende del potencial redox de los compuestos que pueda utilizar como sustrato, así se requieren sustratos con alta potencial redox para que la enzima pueda iniciar su ciclo catalítico (d' Acunzo et al., 2002). Las moléculas mediadoras, como el ABTS, tiene como función activar a la enzima iniciando el proceso de oxidación de los residuos no

fenólicos de la lignina y de grupos fenólicos no accesibles para la enzima (Bourbonnais et al., 1998).

Los resultados obtenidos en este experimento sugieren que el extracto poda de vid contiene compuestos con alto potencial redox, quizá superior al del ABTS, por lo que las enzimas excretadas por *L. edodes* pueden oxidar fácilmente estas moléculas, acelerando el proceso del degradación del material lignificado. Por tanto, el color café observado en los cultivos en sólido posiblemente se deba a la formación de productos de oxidación de los componentes del extracto de poda de vid.

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que los componentes presentes en el extracto de poda de vid son susceptibles a rápida oxidación por las enzimas excretadas por *Lentinula edodes*, prescindiendo del uso de mediadores, lo cual es un factor que puede favorecer el incremento en la velocidad de degradación del material lignificado del este sustrato.

PERSPECTIVAS

Este trabajo permitió establecer mediante cinéticas de crecimiento, caracterización del sustrato y estudios de reacción enzimática, que la biodisponibilidad de nutrientes en poda de vid es el factor que convierte a este sustrato en uno de los mejores para el cultivo de *Lentinula edodes*. Sin embargo, un punto pendiente por aclarar es si las enzimas lacasa y MnP excretadas por el hongo son susceptibles de inducción por el sustrato poda de vid. Por lo cual, se plantea como futuro trabajo evaluar si los componentes biodisponibles presentes en la poda de vid estimulan, ya sea la síntesis o la actividad de dichas enzimas en el periodo de crecimiento micelial del *L. edodes*.

BIBLIOGRAFÍA

Ardon, O., Kerem, Z., Hadar, Y. 1998. Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. Can. J. Microbiol. 44, 676–680.

Barceló, A. R., Gómez, R L. V., Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Carrión, J. S., Pedreño, M. A. 2004. Basic peroxidases: The Gateway for lignin evolution?. Phytochem. Rev. 3, 61-78.

Barreto-Xavier, A. M. R., Mora-Tavares, A. P., Ferreira, R., Amado, F. 2007. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. Elect. J. Biotech. 10, 444-451.

Belinky, P .A., Flikshtein, N., Lechenko, S., Gepstein, S., Dosoretz, C.G. 2003. Reactive species and induction of lignin peroxidase in *Phenerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6500-6506.

Beltrán-García, M. J., Orozco, A., Samayoa, I., Ogura, T. 2001. Lignin degradation products from corn stalks enhance notably the radial growth Basidiomycete mushroom mycelial. J. Mex. Chem. Soc. 45, 77-81.

Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M. G. 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. Biochem. Biophys. Acta. 1379, 381-390.

Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulpan lignin model compounds. Appl. Env. Microbiol. 63, 4627-4632.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutiérrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martínez, M.J., Martínez, A.T. 1999. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. Enz. Microb. Technol. 35, 113-120.

Chang, R. 1996. Functional propierties of edible mushrooms. Nutr. Rev. 54, 91-93.

d' Acunzo, F., Galli, C., Masci, B. 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Eur. J. Biochem. 269, 5330-5335.

Domondon, L. D., He, W., De Kimpe, N., Höfte, M., Poppe, J. 2004. β-Adenosine a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. Phytochem. 65, 181-187.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot basidiomycetes. J. Biotech. 144, 37-42.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Penninckx, M. 2008a. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot basidiomycetes. J. Microbiol. Biotech. 35, 1531-1538.

Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G. 2008b. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic waste of different composition. Bioresour. Technol. 99, 457-462.

Gaitán-Hernández, R., Esqueda, M., Gutiérrez, A., Mata, G. 2006. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 432-439.

Gilbertson, R. L. 1980. Wood-rotting fungi of North America. Mycologia. 72, 1–49.

Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M. J., Martínez, A. T. 2000. Production of hydroxyl radical by synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 383, 142-147.

Gutiérrez, A., Martínez, A. T. 1996. Biodegradación de la lignina: Una perspectiva actual. Rev. Iberoam. Micol. 13, 18-23.

Hammel, K. E., Tien, M., Kalyanaram, B., Kirk, T. K. 1985. Mechanism of oxidative Cα-Cβ cleavage of lignin model dimmer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem. 260, 8348-8353.

Harris-Valle, C., Esqueda, M., Sánchez, A., Beltrán-García, M., Valenzuela-Soto, E. M., 2007. Polar vineyard pruning extract increase the activity in *Lentinula edodes* cultures. Can. J. Microbiol. 53, 1150-1157.

Hintze, J. 2006. NCSS, PASS, and GESS. NCSS. Keysville, Utah. www.ncss.com

Higuchi, T. 1990. Lignin biochemestry: biosynthesis and degradation. Wood Sci. Technol. 24, 23-63.

Higuchi, T. 2006. Look back over the studies of lignin biochemistry. J. Wood Sci. 52, 2-8.

INEGI. Anuario Estadístico del Estado de Sonora; INEGI Gobierno de Sonora. 2007. www.inegi.org.mx

Kersten, P. y Cullen, D. 2007. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Fung. Genet. Biol. 44, 77-87.

Kirk, T. K., Connors, W. J., Zeikus, G. 1976. Requirements for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. Appl. Environ. Microbiol. 32, 192–194.

Kirk, T. K., Cullen, D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Environ. Friendly Technol. for the Pulp and Paper lnd. ISBN 0-471-15770-8, 273-307.

Leatham, G. F. 1986. The ligninolytic activities of *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24, 51-58.

Leatham, G. F. 1985. Extracellular enzymes producer by the cultivated mushroom Lentinus edodes during degradation of a lignocellulosic medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 859-867.

Leveau, J. Y. y Bouix, M. 2000. Microbiología industrial. Primera edición. Editorial Acribia, S. A. España. I.S.B.N 84-200-0920-2.

Li, D., Alic, M., Brown, J. A., Gold, M. H. 1995. Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress and molecular oxygen. App. Env. Microbiol. 61, 341-345.

Malherbe, S., Cloete, T. E. 2002. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1, 105-114.

Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas. F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A., Del Rio, J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int. Microb. 8, 195-204.

Marzullo, L., Cannio, R., Giardina, P., Santini, M. T., Sanni, G. 1995. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidazed substrates. J. Biol. Chem. 270, 3823-3827.

Matsumura, E., Yamamoto, E., Numata, A., Kawano, T., Shin, S., Murao, S. 1986. Structures of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxybenzoic acids in the presence of ABTS [2, 2'-Azinodi-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid]. Agric. Biol. Chem. 50, 1355-1357.

Mester, T., Field, J. A. 1997. Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus Bjerkandera sp. strain BOS55. FEMS Microbiol. Lett. 155, 161–168.

Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T., Martínez, M. J. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eringii*: characterization, catalytic propierties and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{+2} oxidation. Appl. Env. Microbiol. 63, 2166-2174.

Nazareno-Saparrat, M. C., Bucsinszky, A. M. M., Tournier, H. A., Cabello, M. N., Arambarri, A. M. 2000. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. Rev. Iberoam. Micol. 17, 64-68.

Ohga, S. y Royse, D. J. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growtn and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. FEMS Microbiol. Lett. 201, 111-115.

Rajarathnam, S., Bano, Z. 1989. *Pleurotus* Mushrooms. Part III. Biotransformation of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. Crit. Rev. Food Sci. Nut. 28, 31-113.

Rosales, E., Rodríguez-Couto, S., Sanromán, M. A. 2005. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsute*. J. Food Eng. 66, 419-423.

Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán- García, M. J. Esqueda, M. 2002. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. J. Agric. Food Chem. 50, 2537-2542.

Sánchez, J. E. y Royse, D. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp*. Editorial Limusa, S. A. de C. V. Primera edición. México, D. F. ISBN 968-18-6357-7.

Sato, S., Liu, F., Koc, H., Tien, M. 2007. Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates. Microbiology. 153, 3023-3033.

Scheel, T., Höfer, M., Ludwig, S., Hölker, U. 2000. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 686-691.

Silva, E. M., Machuca, A., Milagres, A. M. F. 2005. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. Lett. Appl. Microbiol. 40, 283-288.

Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V. M., González, I., Viniegra-González, G. 2005. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by inmobilized laccase. J. Elect Chem. 579, 59-66.

Straatsma, G., Gerrits, J. P. C., Gerrits, T. M., Op den Camp, H. J. M., van Griensven, L. J. L. D. 1991. Growth kinetics of *Agaricus bisporus* mycelium on solid substrate (mushroom compost). J. Gen. Microbiol. 137, 1471-1477.

Sun, X., Zhang, R., Zhang, Y. 2004. Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. J. Basic Microbiol. 44, 220-232.

Tengerdy, R. P. y Szakacs, G. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. Biochem. Eng. J. 13, 169-179.

Tien, M., Kirk, T. K. 1984. Lignin-degrading enzymes from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2.-requering oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 2280-2284.

Valli, K., Wariishi, H., Gold, M. 1990. Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: Role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. Biochem. J. 29, 8535–8539.

Vane, C .H., Drage, T. C., Snape, C. 2003. E. Biodegradation of oak (*Quercus alba*) wood during grown of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): a molecular approach. J Agric. Food Chem. 51, 947-956.

Varela, E., Martínez, A. T., Martínez, M. J. 1999. Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from the fungus Pleurotus eryngii, an enzyme in lignin degradation. Biochem. J. 341, 113-117.

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Agilar, C. N., Romero-Gómez, S. J., Díaz-Godínez, G., Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzymes production in solid state over liquid fermentation systems. Biochem. Eng. J. 13, 157-167.

Wariishi, H., Valli, K., Gold, M. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidasa from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: kinetic mechanism and role of chelator. J. Biol. Chem. 267, 23688-23695.

Wong, W. S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. Appl. Biochem. Biotechnol. 157, 174-209.

Youn, H. D., Hah, Y. C., Kang, S. O. 1995. Role of laccase in lignin degradation by white-rod fungi. FEMS Microbiol. Lett. 132, 183-188.

Zhao, J., de Koper, T. H., Janse, B. J. 1996. Comparative studies of lignin peroxidase and manganese dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. FEMS Microbiol. Lett. 145, 393-399.