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

Actividad de las enzimas ligninolíticas de *Lentinula edodes* cultivado en medio líquido suplementado con extractos de madera de vid

Por

CITLALLI HARRIS VALLE

Tesis aprobada por la

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como Requisito Parcial para Obtener
el Grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora. Septiembre del 2005

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Citlalli Harris Valle, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Dr. Martín Esqueda Valle
Director de tesis

M. C. Miguel Beltrán García

M. C. José Alfonso Sánchez Villegas

Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández

Elisa M. Valenzuela S.
Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto

DECLARACIÓN DEL AUTOR

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o al Coordinador de la Dirección de Tecnología de Alimentos de origen Vegetal del Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo A. C. Apartado postal 1735, Hermosillo Sonora, 83000, México, para citas o consultas más amplias o para la reproducción íntegra del documento para fines académicos. Bajo cualquier otra circunstancias se deberá solicitar permiso del autor.

Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director Gemeral

DEDICATORIA

A los Zapatistas y a Meredith Gould Chambers, por mostrarme que vale la pena luchar y resistir.

A Marco y a nuestro (a) hij

AGRADECIMIENTOS

Al CIAD y CONACYT

A mis Sinodales y buenos maestros

A mis padres, mis hermanas y por supuesto a la Tia Norma

Al personal Administrativo y de Intendencia del CIAD

A mis compañeros de generación

A Alfonso Sánchez, Amparo Meza, Alberto Sánchez, Olivia Briseño, Jorge Mercado, Aldo Gutiérrez, Javier Ojeda, Antonio Orozco, Adriana Bolaños, René Valenzuela, Karina García, Gracia Gómez, Enrique de la Re

A mi gran amiga Maricela Montalvo

A Francisco Burgoin

Y a todos los que de alguna forma contribuyeron a que este trabajo se realizara

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Composición de la Madera	5
Polisacáridos estructurales	5
Ligninas	6
Biotransformaciones de la Madera	7
Modulación del Crecimiento Fúngico	9
Biodegradación de la Lignina	10
Mecanismo Químico de la Ligninólisis	10
Peroxidasas	16
Lignina peroxidasa	16
Manganeso peroxidasa	17
Peroxidasa versátil	17
Lacasas	17
Oxidasas	18
Cooperaciones Enzimáticas	19
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26

Obtención de Extractos 26
Microorganismo y Condiciones de Cultivo 26
Pruebas de Concentración 27
Cinéticas de Crecimiento 27
Técnicas Analíticas 29
Diseño Experimental 30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 31
Obtención de Extractos 31
Pruebas de Concentración 33
Extracto de madera 33
Lignina 33
Cinéticas de Crecimiento 38
Crecimiento y concentración de proteínas 38
Actividades enzimáticas 45
Extracto etanólico y acuoso 46
Extracto clorofórmico y toluénico 51
Lignina y mezcla de extractos 54
Comparación de tratamientos 60
CONCLUSIONES 71
RECOMENDACIONES 72
BIBLIOGRAFÍA 73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Concentraciones de los extractos de madera suplementados al medio de cultivo	28
2.	Rendimiento de los extractos	32
3.	Cálculo de las concentraciones de los extractos de madera añadidas al medio de cultivo	37
4.	Máximas actividades enzimáticas cuantificadas en cada uno de los tratamientos	61
5.	Orden en que fueron detectados los aumentos y disminuciones de actividad enzimática en los controles de las distintas cinéticas	64
6.	Orden en que fueron detectados los aumentos y disminuciones de actividad enzimática dependiendo del extracto de madera que fue probado	66
7.	Orden en que fueron detectados los aumentos y disminuciones de actividad enzimática al probar la mezcla de extractos y la lignina	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Esquema propuesto para el rompimiento de un modelo dimérico de lignina	12
2.	Degradación de una estructura modelo de lignina	13
3.	Productos del rompimiento del anillo aromático de una estructura modelo de lignina	14
4.	Esquema propuesto para la oxidación aerobia del radical β-hidroxibenzil	15
5.	Modelo general de la ligninólisis enzimática	20
6.	Crecimiento micelial del hongo adicionado los extractos etanólico y acuoso al medio GP	34
7.	Efecto de las distintas concentraciones de lignina sobre el crecimiento micelial de *L. edodes*	35
8.	Biomasa y concentración de proteína extracelular obtenida en C1 con los tratamientos EE, EA y control	39
9.	Biomasa y concentración de proteína extracelular obtenida en C1 con los tratamientos EC, ET y control	42
10.	Biomasa y concentración de proteína extracelular obtenida en C1 con los tratamientos M, L y control	44
11.	Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, adicionando extracto etanólico al medio de cultivo	47

12. Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, adicionando extracto acuoso al medio de cultivo 49

13. Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, del control para la cinética de los extractos etanólico y acuoso 50

14. Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, adicionando extracto clorofórmico al medio de cultivo 52

15. Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, adicionando extracto toluénico al medio de cultivo 53

16. Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, del control para la cinética de los extractos clorofórmico y toluénico 55

17. Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, adicionando la mezcla de extractos al medio de cultivo 56

18. Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, adicionando lignina al medio de cultivo 58

19. Actividad extracelular de cinco enzimas medidas durante 18 días, del control para la cinética de la lignina y mezcla de extractos 59

RESUMEN

La lignina es un compuesto abundante en los tejidos leñosos, considerándose una barrera en la biodegradación de la madera debido a que es un sustrato difícil de degradar. *Lentinula edodes* se desarrolla sobre troncos de árboles muertos, ya que cuenta con las enzimas necesarias para depolimerizar la lignina. Este organismo es utilizado como alimento y se considera una alternativa para degradar desechos agrícolas, por lo que se han realizado diversos estudios para entender la relación que existe entre el crecimiento y composición del sustrato. Sin embargo no se sabe cómo se vincula el desarrollo del organismo y la modulación de la actividad ligninolítica, por lo que en este trabajo se planteó el objetivo de cultivar *L. edodes* en medio líquido suplementado con lignina comercial y extractos de madera de vid (independientemente o como mezcla) obtenidos con solventes de distinta polaridad (agua, etanol, cloroformo y tolueno), para estudiar su efecto en la biomasa y actividad de las principales enzimas ligninolíticas (lignina y manganeso peroxidasa, lacasa y aril alcohol oxidasa). Los cambios se analizaron con respecto al aumento en peso seco, a lo largo de una cinética de crecimiento que duró 18 ó 22 días. Se encontró que la actividad enzimática extracelular se modifica cuantitativamente y en función del extracto de madera de vid añadido al medio de cultivo. Asimismo se observó que la mezcla y la lignina tuvieron mayor influencia sobre la actividad de las enzimas ligninolíticas que los extractos suplementados independientemente, y que hay baja concordancia entre las actividades enzimáticas máximas y la biomasa, en los distintos tratamientos a lo largo de las cinéticas.

INTRODUCCIÓN

Lentinula edodes (conocido comúnmente como shiltake) es un hongo saprobio originario del continente Asiático. Se desarrolla sobre troncos muertos de plantas del grupo de las fagaceas (Chang y Haynes, 1978, en Leatham y Leonard, 1988). Metaboliza polímeros de lignocelulosa, celulosa y hemicelulosa mediante enzimas extracelulares. Por su capacidad para degradar polímeros de lignina, se considera un eslabón importante en la fase de descomposición de compuestos orgánicos complejos dentro de los ciclos biológicos (Morais *et al.*, 2000).

La lignina es un polímero estructural y químicamente complejo, está constituido por unidades guayacil y siryngilpropano unidas por enlaces éter y carbono-carbono, es abundante en las paredes celulares secundarias. La acumulación de este compuesto en los tejidos vegetales, da como resultado la formación de estructuras rígidas características de las maderas. Su presencia en los sustratos de origen leñoso es la limitante para el proceso de biodegradación. Los hongos de pudrición blanca son organismos especializados en la depolimerización de la lignina. Dentro de este grupo, *Lentinula edodes* es una de las especies que la degradan mayoritariamente.

La ligninólisis se lleva a cabo mediante ciclos de oxido-reducción, en los que intervienen diversas enzimas extracelulares. Es un mecanismo enzimático secuencial de dos etapas. En la primera, el H_2O_2 oxida a la lignina o manganeso peroxidasa, la cual cataliza la oxidación de una molécula orgánica denominada mediador químico (como el veratril alcohol o MnIII-quelante, en su forma de radical catiónico) que ataca electrofílicamente a las cadenas de lignina, desestabilizando los enlaces entre las subunidades y originando su ruptura. El rompimiento de la macromolécula produce dos tipos de compuestos, los que

son químicamente estables (considerados productos) y los que están cargados positivamente; estos últimos puede combinarse con otros radicales y dar lugar a la repolimerización. En la segunda etapa, los radicales con carga positiva y capacidad de repolimerización, producidos durante la fragmentación de la lignina, son reducidos por la acción de enzimas como la aril alcohol oxidasa o lacasa, para que los productos no puedan recondensarse.

Como se mencionó anteriormente, el H_2O_2 inicia la ligninólisis al ser el agente oxidante de las peroxidasas. Sin embargo, este compuesto en concentraciones elevadas puede ser citotóxico al inducir otras especies de oxígeno (radical OH y oxígeno en estado de singulete) y alterar la estructura de membranas citoplasmáticas induciendo muerte celular. Se ha considerado que el peróxido de hidrógeno se produce en el sustrato (*in situ*) por actividad de algunas oxidasas extracelulares (lacasa, glucosa y aril alcohol oxidasa), evitando así su acumulación y el efecto nocivo, sin afectar el proceso de depolimerización de lignina por falta del agente oxidante.

El conocimiento de las condiciones ambientales y fuentes alimenticias para el desarrollo de *L. edodes*, ha permitido su estudio con fines agrícolas (reutilización de desechos leñosos), médicos (actividad inmuno-estimulante entre otras) y en la solución de problemas ecológicos (decoloración de pigmentos sintéticos producidos en la industria textil) (Song *et al.*, 1998; Philippoussis *et al.*, 2002; Boer *et al.*, 2004).

Adicionalmente Shiitake es considerado una fuente de metabolitos secundarios útiles para el hombre. Existe información acerca de una amplia gama de productos, obtenidos a partir de este hongo, con actividad inmunológica y antiviral, así como compuestos que activan macrófagos, estimulan la proliferación celular (linfocitos, entre otros) *in vivo*, y la inhiben *in vitro* (Suzuki *et al.*, 1990). Sintetiza sustancias antibacterianas y antifúngicas como la lentionina (Hatvani, 2001). Así mismo, produce inhibidores de

proteinasas farmacéuticamente útiles (Odumi *et al.*, 1999). Por lo anterior shiitake presenta una gran variedad de posibilidades de aplicación en el ámbito médico. Desde el punto de vista nutricional, la fructificación del hongo (también llamada carpóforo) contiene altos porcentajes de carbohidratos y proteínas totales, comparables con los del frijol (Brisko *et al.*, 2002).

Por su capacidad para degradar los tejidos con abundante lignina, así como su potencial aplicación médica y alto valor nutritivo, se propone a *L. edodes* como una alternativa para reciclar desechos agrícolas de origen leñoso. Las hidrolasas y oxidasas de este hongo, depolimerizan los componentes lignocelulósicos presentes en las maderas, biotransforman residuos agrícolas que generalmente son incinerados convirtiéndose en fuentes de contaminación (Morais *et al.*, 1999).

La ligninólisis es catalizada por un conjunto de enzimas cuya actividad debe estar regulada por los distintos compuestos presentes en el sustrato, por lo tanto este trabajo tiene como objetivo conocer cómo los componentes de la madera de vid, separados de acuerdo con su solubilidad, inhiben o estimulan el crecimiento del hongo y además las principales actividades de las enzimas ligninolíticas. La determinación de la actividad ligninolítica puede contribuir en la comprensión de por qué el desarrollo del organismo es muy variable cuando se cultiva en diferentes sustratos con composición química similar.

ANTECEDENTES

La mayor parte de los estudios acerca del cultivo de *L. edodes* se enfocan a su producción, como alimento, utilizando sustratos de origen agrícola. Se sabe que un medio abundante en compuestos lignocelulósicos mejora la calidad nutricional y cantidad de hongo producido. Philippoussis *et al.* (2002) cultivaron shiitake en aserrín de encino, paja de trigo, mazorca y residuos de algodón como sustrato. Con la paja de trigo encontraron altos porcentajes de extensión micelial y fructificación, similar a lo obtenido en aserrín de encino (sustrato natural). El crecimiento se relacionó con el contenido de nitrógeno y la salinidad del sustrato. Estos autores proponen a la paja de trigo como una alternativa viable para el cultivo de shiitake.

Otra posibilidad interesante para aumentar la eficiencia biológica del cultivo de *L. edodes*, es suplementar el aserrín de encino con mijo, fibra de trigo, harina de soya y/o extracto de levadura (Royse, 1985). En una evaluación del crecimiento micelial y biomasa producida, se comprobó que maderas enriquecidas con un 25 a 30% de fibra de arroz, estimulan el crecimiento de *L. edodes* debido a la relación C:N (30:1). Además, la alteración de la estructura física general del sustrato (compactación, ventilación, tamaño de partícula, etc.) incrementa el intercambio gaseoso indispensable para la actividad degradativa de las enzimas. Sin embargo se ha observado que suplementos con alto contenido de celulosa y hemicelulosa, no incrementan el crecimiento del hongo (Rossi *et al.*, 2003). Lo anterior es debido a que cuando shiitake crece en sustratos lignocelulósicos, la degradación de celulosa es menor (14%) que la de lignina (40 y 60 %) (Morais *et al.*, 2000).

Las fuentes de carbono preferenciales para shiitake son glucosa, trehalosa y fructosa, como se demostró en estudios utilizando medios sintéticos.

Al mantener la relación C:N en proporción 30:1, se presenta un crecimiento micelial abundante, teniendo al cloruro de amonio como fuente de nitrógeno inorgánico y los iones fosfato a una concentración de 20 mM (Song y Chow, 1987). Asimismo, la adición de nitrato de amonio, nitrato de calcio y ácido tartárico tiene efectos positivos en el crecimiento (Han *et al.*, 1981).

Composición de la Madera

Las maderas están formadas por componentes estructurales y de reserva. La proporción celulosa-hemicelulosa-lignina-pectina es 4:3:1:0.1, mientras que la reserva está constituida principalmente por almidón y xiloglucanos.

Polisacáridos Estructurales

El soporte de todos los tejidos vegetales es la pared celular, constituida por pectina, hemicelulosa y celulosa. Las partes visibles predominantes son microfibrillas de celulosa cristalina muy ordenadas. Este polímero forma estructuras tubulares insolubles de 5 a 30 nm de diámetro y constituye el 30-40% del tejido. Son cadenas de glucosas unidas por enlaces β-1-4, con un grado de polimerización de alrededor de 10,000 unidades (Grant-Reid, 1997).

Los elementos microfibrilares se encuentran unidos a la pectina y hemicelulosa, formando un entramado que constituye la pared celular primaria. La hemicelulosa es un polisacárido diverso, constituido por polímeros de 4-O-metilglucoronoxilanos y en menor grado galactomananos. Las pectinas son polímeros con altas proporciones de ácidos galacturónicos unidos por enlaces α-1-4, el ácido carboxílico de las subunidades puede encontrarse esterificado con metanol y algunas veces se presentan ramnósidos que se desprenden de la cadena central (Grant-Reid, 1997).

Los troncos leñosos contienen una gran cantidad de células muertas que ya no se dividen, pues han perdido su material citoplasmático. La pared celular primaria se convierte en una pared secundaria a medida que se desarrolla el tejido. En los espacios extracelulares inicia el proceso de acumulación de polímeros fenólicos de lignina que confieren una mayor rigidez. Esto origina la desaparición del contenido citoplásmico y comienza una inercia metabólica intracelular. En el caso del xilema, la lignina se deposita mediante un patrón preciso, generando una estructura espiral y reticular alrededor de los conductos (Grant-Reid, 1997).

Ligninas

Las ligninas que se depositan en la pared celular se distribuyen alrededor de las microfibrillas de celulosa. Al final del proceso de deposición, las células quedan conectadas unas con otras y los tejidos se endurecen. La composición del polímero de lignina determina su dureza. Las maderas blandas están constituidas mayoritariamente de unidades guayacil; mientras que en las maderas duras, las subunidades de guayacil y syringilpropano depositadas están en igual proporción, además de algunos residuos hidroxifenilos. Estos polímeros contienen compuestos aromáticos como las quinonas, unidos a la cadena central con enlaces éter y carbono-carbono (Higuchi, 1990).

La lignificación de los tejidos se inicia con la reducción de aldehídos a unidades guayacil y syringilpropano, las cuales se unen en cadenas denominadas lignoles. Durante el proceso, algunos monosacáridos (principalmente las glucosas) pueden intercalarse a lo largo de la cadena formando complejos lignina-carbohidrato. Estos azúcares reaccionan principalmente con oligómeros de quinonas y lignoles, guayacil y syringil (Higuchi, 1990).

Biotransformaciones de la Madera

Los hongos que se desarrollan sobre sustratos leñosos pueden ser de dos tipos, de pudrición café (degradan principalmente carbohidratos) y blanca (degradan carbohidratos y lignina) (Green III y Highley, 1997; Leonowicz *et al.*, 1999). Por su capacidad para degradar sustratos lignocelulósicos, *L. edodes* se clasifica dentro del grupo de los hongos de pudrición blanca. Se considera que los mecanismos bioquímicos para la ligninólisis, que catalizan las enzimas producidas por este grupo de saprobios, son similares. Sin embargo se han descrito diferencias importantes entre especies filogenéticamente cercanas.

Estudios realizados con dos géneros de hongos de pudrición blanca (*Pleurotus* y *Phanerochaete*) aportaron información relevante sobre los procesos de degradación de sustratos con abundante lignina y celulosa. *Pleurotus ostreatus* degrada selectivamente más lignina que celulosa. Durante la colonización, la actividad de celulasas es baja, mientras que la relacionada con la degradación de lignina (lacasas) es alta. *Phanerochaete chrysosporium* degrada cantidades similares de lignina y celulosa, siendo altos los porcentajes de actividad de celulasas durante los primeros días de crecimiento. La depolimerización por parte de las lacasas, en ambas especies, es alta al inicio de la descomposición de lignina y luego disminuye a un nivel constante (Kerem *et al.*, 1992). Aunque los mecanismos bioquímicos son semejantes en las dos especies, los cambios en composición enzimática difieren cuantitativa y temporalmente.

Lentinula edodes presenta un patrón diferente de depolimerización de sustratos lignocelulósicos, comparado con los géneros *Phanerochaete* y *Pleurotus*. Durante las primeras etapas del crecimiento de shiitake, la celulosa y los xilanos se mantienen como los componentes más abundantes del sustrato, mientras que la lignina se degrada mayoritariamente. Lo anterior se correlaciona

con una actividad baja de celulasas y alta de enzimas ligninolíticas. En etapas avanzadas del cultivo, se observa que hay una reducción de alrededor del 22% en la ligninólisis y se presenta una mayor descomposición de polisacáridos como la hemicelulosa y xiloglucanos (Van *et al.*, 2003).

Respecto a los cambios en la composición química del sustrato, se conoce que los hongos con actividad ligninolítica poseen enzimas que oxidan las cadenas de lignina. *Pleurotus ostreatus* y *L. edodes* transforman mayoritariamente las regiones denominadas syringil, estas zonas son más susceptibles a la reducción que las regiones guayacil, ya que contienen uniones aril-aril entre subunidades. Los mecanismos oxidativos descritos hasta el momento, involucran rompimientos de la unión entre el carbono alfa y beta ($C\alpha$-$C\beta$) de las subunidades guayacil y siringil. Se considera que la degradación de la lignina por *L. edodes* produce aldehídos que son después oxidados a ácidos carboxílicos (Van *et al.*, 2001; 2003).

Lentinula edodes presenta un patrón general de desarrollo vegetativo correlacionado con los cambios en la composición del sustrato leñoso y con el tipo de actividad enzimática extracelular. En la primera fase hay mayor crecimiento vegetativo y acumulación alta de glucosamina, componente principal de la pared celular. En esta etapa se observa la máxima actividad ligninolítica y disminuye el contenido de almidón por acción de glucoamilasas. Se propone una relación directa entre la biotransformación de almidón y de lignina; es decir, la degradación de glucanos y la ligninólisis presentan un máximo al mismo tiempo, lo que sugiere que el hongo debe utilizar un sustrato alternativo que soporte la biodegradación de lignina. La acción de hemicelulasas sobre polímeros glucurónico-xilanos es constante en el periodo inicial y medio de crecimiento. La actividad de proteinasa se detecta en la fase intermedia y se encuentra alta actividad de poligalacturonasas durante todo el desarrollo. Únicamente al momento de fructificar existe un ligero incremento en las

endoglucanasas y β-glucosidasas, pero en general no se observa una disminución significativa de celulosa, incluso después de que los niveles de almidón se reducen (Leatham, 1985).

Modulación del Crecimiento Fúngico

Al cultivar hongos ligninolíticos sobre sustratos leñosos con alto contenido de lípidos, se presenta inhibición del crecimiento. Algunos de los compuestos que interfieren con el desarrollo de estos organismos son los ácidos grasos, saponinas, gliceroles y esteroles. Su efecto tóxico se estudió extrayéndolos de las maderas con solventes no polares (cloroformo y tolueno). Al parecer, la peroxidación química de los lípidos de origen vegetal (por las especies oxígeno reactivas presentes en el medio) ocasiona daños a las membranas citoplasmáticas (Wardle y Schiler, 1969; Kurtzman, 1976; Sánchez *et al.*, 2002).

Especies de los géneros *Lentinula, Pleurotus* y *Stropharia* muestran un mayor crecimiento cuando el medio de cultivo es suplementado con ácido giberélico, β-adenosina, monómeros fenólicos derivados de la degradación de la lignina (como 4-metoxibenzoato y ácido vainílico) y flavonoides. Estos compuestos son comunes en tejidos vegetales, su carácter estimulante depende directamente de la concentración a la que se encuentren. Su presencia afecta diversos tipos de actividad como lacasa y alcohol oxidasa (Domondon *et al.*, 2004; Jonathan y Fasidi, 2001; Beltrán-García *et al.*, 2001; Ardon *et al.*, 1998; Shuen y Buswell, 1992).

Biodegradación de la Lignina

Aunque el mecanismo de degradación de la lignina es similar, las enzimas que participan en la ligninólisis varían entre una especie y otra. En los géneros *Pleurotus* y *Phanerochaete* se han realizado los estudios más completos acerca de este proceso. La mayor parte de los trabajos publicados describen las características de las enzimas en forma individual. Existe poca información disponible con respecto a la interacción entre las enzimas que intervienen en la ligninólisis. Con los conocimientos obtenidos hasta el momento se han diseñado esquemas o modelos generales que pretenden reconstruir el proceso de degradación de la lignina *in vivo*.

Mecanismo Químico de la Ligninólisis

La mayoría de los estudios sobre la degradación de lignina, sugieren que el mecanismo químico para la ligninólisis es similar en los hongos de pudrición blanca. Existe una correlación importante entre las concentraciones extracelulares altas de especies oxígeno reactivas y la actividad ligninolítica, lo que sugiere que estos compuestos tienen una función importante durante el proceso (Belinky *et al.*, 2003). Debido a que los radicales OH y el H_2O_2 no degradan *per se* a la lignina, se considera que su función es indirecta, al participar en la oxidación de enzimas que inician el rompimiento de enlaces entre las subunidades que forman las cadenas. El proceso general sigue un mecanismo de óxido-reducción y de cooperación enzimática (Faison y Kirk, 1983).

La secuencia de reacciones para la ligninólisis se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, el H_2O_2 oxida una enzima, la cual cataliza la producción

de mediadores catiónicos (compuestos orgánicos o Mn III-quelante) que hacen un ataque electrofílico en los enlaces entre subunidades de lignina, sustrayendo un electrón del sustrato. Después de que el polímero es oxidado, hay una oxigenación del sustrato que origina el rompimiento de enlaces, produciendo dos fragmentos uno de los cuales es un radical (Hammel *et al.*, 1985; Candelas y Harvey, 1995) (Figura 1).

Se conocen tres formas principales de romper los enlaces entre subunidades de lignina. Una es la oxidación de las cadenas laterales propil entre los Cα-Cβ produciendo ácidos benzoicos; otra manera es rompiendo el enlace β-aril éter y la modificación de las cadenas laterales (Figura 2). Un tercer modo de acción (Figura 3) es la degradación de los núcleos aromáticos por la oxidación de los anillos de las subunidades (Higuchi, 1990).

En la segunda etapa de la degradación de lignina, el radical producto de la depolimerización sufre una oxidación enzimática, en la cual el oxígeno molecular se une al radical (Figura 4). Estos radicales oxidados que se descomponen en compuestos sin carga, provocan la formación de superóxido que finalmente se disocia en oxígeno molecular y H_2O_2. Hasta el momento en el que los compuestos no presentan carga, son considerados los productos finales de la ligninólisis, ya que en forma de radicales pueden repolimerizarse (Hammel *et al.*, 1985).

Los enlaces entre el Cα-Cβ de las subunidades de lignina forman el 60% de los enlaces intermonoméricos. La hidroxilación de este enlace se da en el Cβ, produciendo hemiacetales intermediarios que se descomponen espontáneamente en glicoaldehídos y guayacoles. Lo anterior hace que la mayoría de los productos de degradación de lignina sean el ácido syríngico y el guayacol (Hammel *et al.*, 1985; Tien y Kirk, 1984)

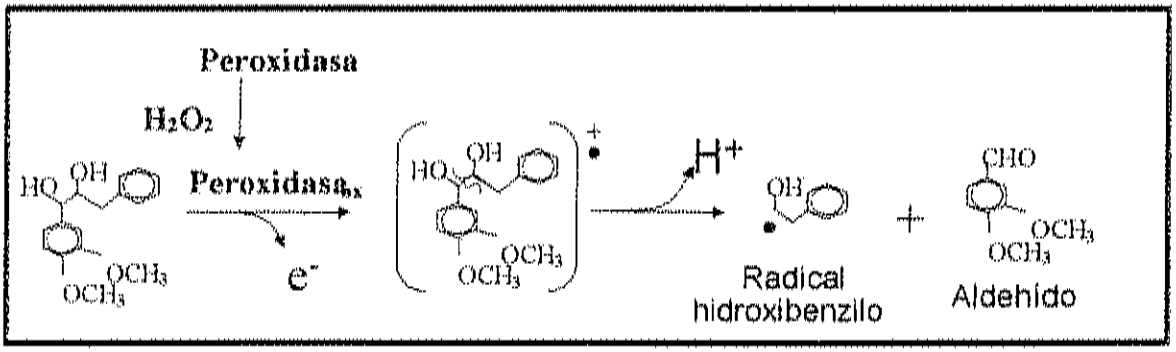

Figura 1. Esquema propuesto para el rompimiento de un modelo dimérico de lignina por la peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Hammel *et al.*, 1985).

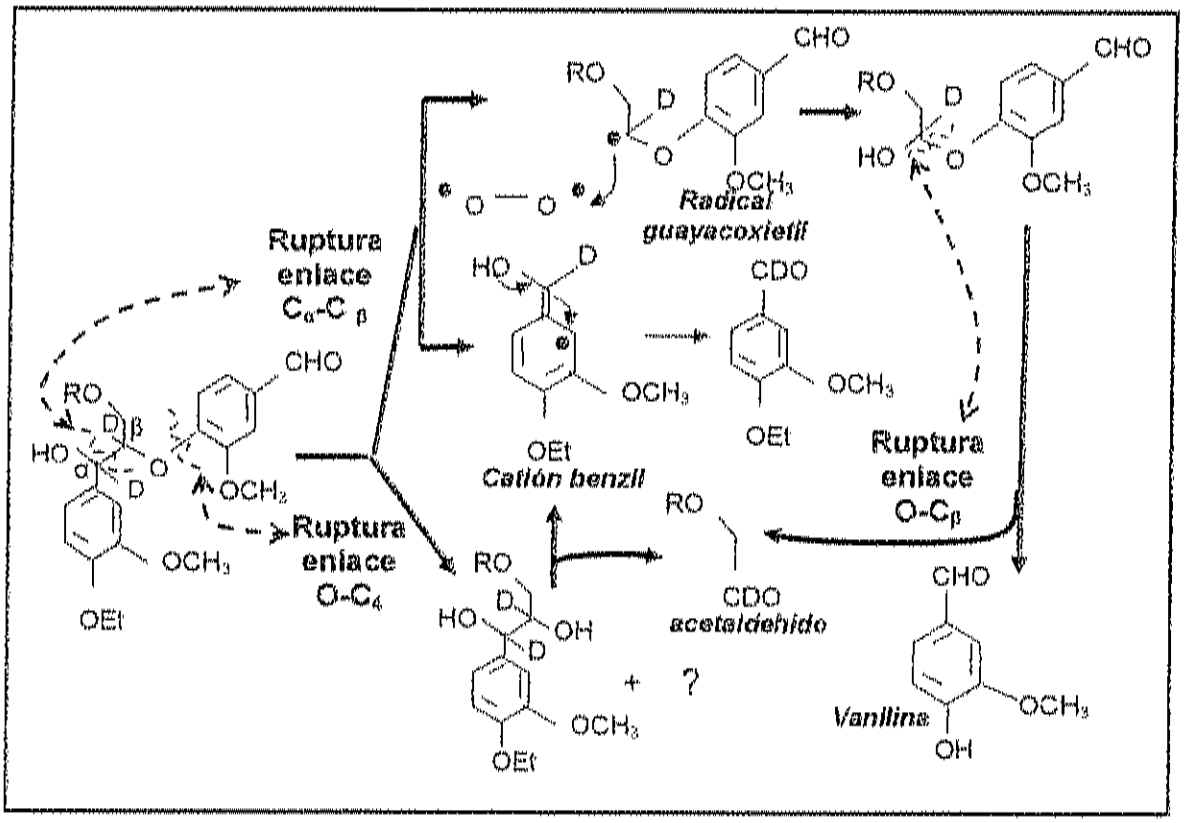

Figura 2. Degradación de una estructura modelo de lignina deuterada (D) arliglicerol-β-aril éter por la lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Higuchi, 1990).

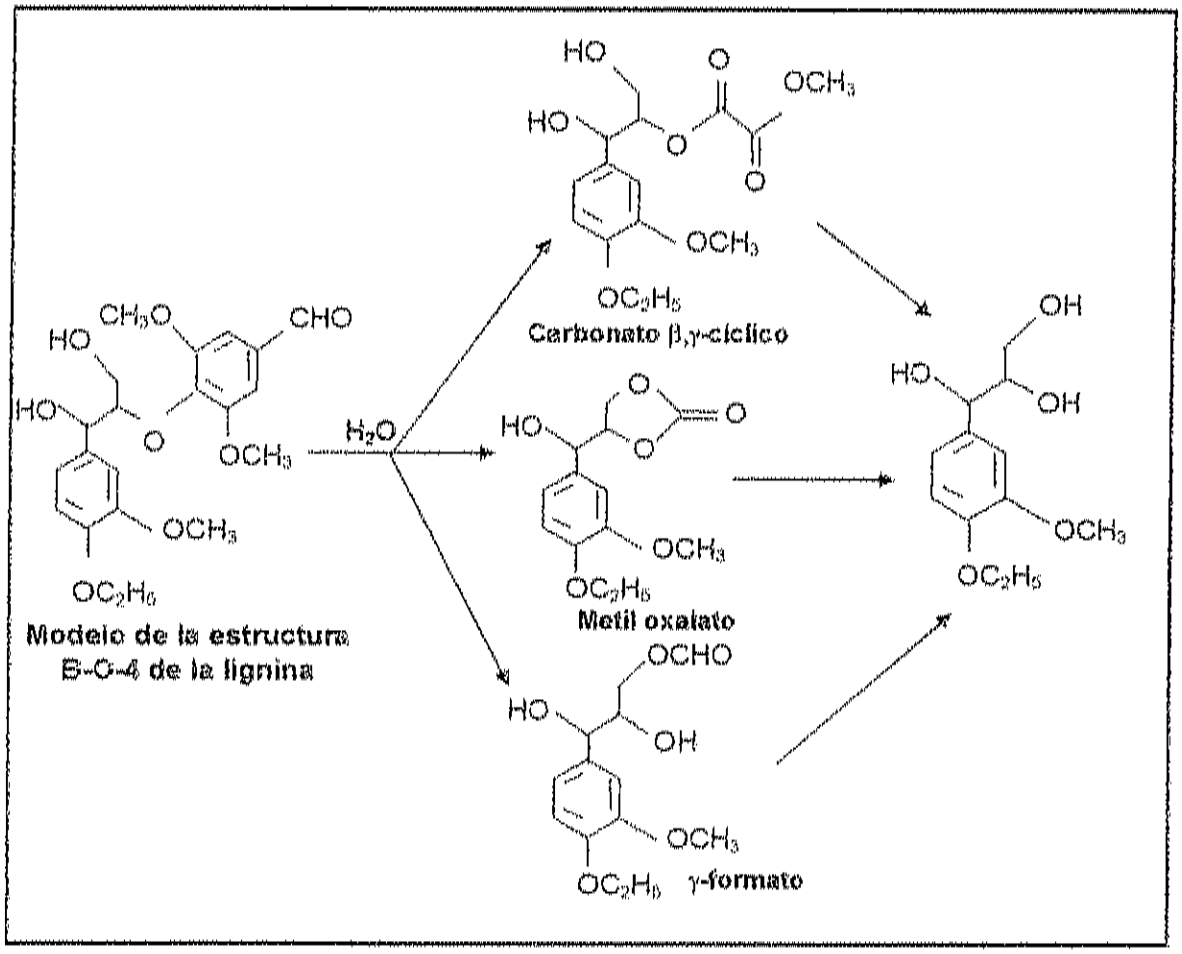

Figura 3. Productos del rompimiento del anillo aromático de una estructura modelo de lignina arilglicerol-β-aril éter, por la lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Higuchi, 1990).

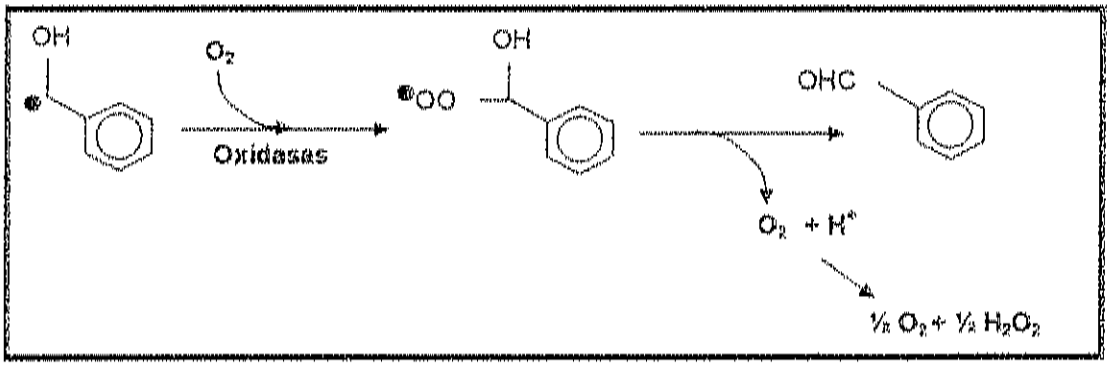

Figura 4. Esquema propuesto para la oxidación aerobia del radical β-hidroxibenzil por una oxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Hammel *et al.*, 1985).

Peroxidasas

La primera fase de la ligninólisis, que involucra el rompimiento de los enlaces, la realizan las peroxidasas y las lacasas. Existen diferentes tipos de peroxidasas dependiendo de los mediadores químicos (compuestos orgánicos o metales oxidados) que realizan la catálisis. La complejidad estructural de la lignina parece impedir que las enzimas catalicen directamente el rompimiento de los enlaces entre subunidades del polímero, por lo que intervienen dichos mediadores que son cationes producidos por las enzimas oxidadas por el peróxido de hidrógeno.

Algunos de los mediadores o cationes que participan en la ligninólisis son compuestos aromáticos o metales. El mecanismo de oxidación se inicia cuando un sustrato (como el veratril alcohol o el Mn) se une a la enzima. Después de que el compuesto aromático o el metal transfieren su electrón al grupo hemo, se forma un catión que funciona como mediador y puede reaccionar con la lignina. El caso más estudiado es el del alcohol veratril que unido a la enzima tiene un mayor potencial de oxidación en comparación con su estado de radical libre, por lo que puede realizar el ataque electrofílico sobre la lignina (Candeias y Harvey, 1995; Kishi *et al.*, 1994; Cancel *et al.*, 1993; Crestini *et al.*, 2000).

Lignina peroxidasa (LiP). Es una enzima extracelular producida por las especies de *Phanerochaete*, para la degradación de lignina. Esta enzima degrada compuestos pobremente hidrolizables; las reacciones que cataliza son diversas, ya que tiene baja especificidad por los sustratos. La oxidación se lleva a cabo sustrayendo un electrón del anillo bencénico de los fenoles, produciendo así mediadores catiónicos aromáticos. Dichos compuestos son los encargados de romper los enlaces entre subunidades fenólicas o no fenólicas de la lignina. El ataque electrofílico a la lignina puede ser en el intradiol de estructuras feniglicol

o en las cadenas laterales propil de las unidades no fenólicas β-1, produciendo benzaldehídos y fenilglicoles (Tien y Kirk, 1984; Forney *et al.*, 1982).

Manganeso peroxidasa (MnP). Es una hemoproteína producida por los hongos pertenecientes al género *Phanerochaete*. Esta proteína cataliza la oxidación de varios fenoles con un mecanismo dependiente de Mn (II) libre en el medio. La catálisis se inicia cuando la MnP oxidada por el H_2O_2, oxida el Mn(II) a Mn(III). A continuación, el Mn (III) se combina con quelantes formando un complejo Mn III-quelante que se encarga de oxidar a las subunidades de lignina. Esta enzima es estimulada por el oxalato que a su vez es capaz de mediar las reacciones de oxidación en ausencia de H_2O_2 (Kishi *et al.*, 1994; Warriishi *et al.*, 1988; Kuan y Tien, 1993).

Peroxidasa versátil. Algunas especies del género *Pleurotus* carecen de MnP y LiP, sin embargo producen una peroxidasa versátil (PV) que oxida el Mn II, los fenoles simples y el alcohol veratril. Ésta puede disociar dímeros de subunidades fenólicas y no fenólicas de la lignina (Camarero *et al.*, 1999). Contiene diversos sitios de unión para los sustratos y combina las características de la LiP y MnP. Puede modificar compuestos aromáticos dando lugar a moléculas con alto potencial redox y produce Mn III-quelantes que catalizan el ataque electrofílico del polímero de lignina. Por la versatilidad en sus funciones genera confusión y la clasifican como MnP o LiP (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2001).

Lacasas

Las lacasas son enzimas que participan en la primera fase de la ligninólisis, siendo producidas por hongos de los géneros *Phanerochaete, Pleurotus, Lentinula*, entre otros. Son óxido-reductasas que catalizan la oxidación de

compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones (Reinhammar y Malstrom, 1981, en Muñoz *et al.*, 1997). La catálisis es mediada por dos tipos de mensajeros químicos, los radicales fenoxil y el O_2^-, este último se produce vía la oxidación de hidroquinonas. Las lacasas provocan el rompimiento de los anillos aromáticos de las subunidades fenólicas y no fenólicas de lignina produciendo al mismo tiempo especies oxígeno reactivas (Muñoz *et al.*, 1997). La degradación se da en los compuestos fenólicos rompiendo los enlaces alquil-fenil con unión β-O-4 o bien por la ruptura del enlace fenil-alquil entre el Cα y el grupo aril (Higuchi, 1990).

Oxidasas

En la primera etapa de la ligninólisis, se generan subunidades en forma de radicales que deben ser reducidos, en una segunda etapa del proceso, para evitar su repolimerización. Una de las enzimas que participa en la segunda fase de la depolimerización es la aril alcohol oxidasa (AAO), la cual presenta un rango amplio de especificidad, puede oxidar benzil, cinnamil, naftil y alcoholes primarios alifáticos. La reacción catalizada por la AAO procede por la oxidación de aril alcoholes γ, α y α-β insaturados, con la adicional reducción del O_2 a H_2O_2 (Varela *et al.*, 1999). Otra oxidasa, que también evita la repolimerización, es la veratril alcohol oxidasa (VAO), la cual reduce radicales fenoxi acoplando la oxidación de veratril alcohol a veretraldehído. (Guillén y Evans, 1994; Marzullo *et al.*, 1995).

Una tercera oxidasa que participa en la segunda etapa de la ligninólisis es la glucosa oxidasa por un mecanismo cíclico más complejo que la AAO y la VAO. Esta enzima cataliza el paso de glucosa a gluconolactato. Cuando el oxígeno molecular es utilizado como co-sustrato se produce H_2O_2. Sin embargo, si la concentración de oxígeno es baja, el O_2 es reemplazado por la quinona, o por

los radicales libres de lignol, como aceptor de electrones. La catálisis procede en dos pasos, con la oxidación de glucosa se transfieren dos electrones al grupo prostético flavino de la enzima. Para que la flavoenzima sea oxidada a su estado nativo los dos electrones son transferidos al aceptor de electrones quinona o lignol, el compuesto resultante puede iniciar un proceso de reducción (Kelley y Reddy, 1986; Green, 1977).

Cooperaciones Enzimáticas

Para que la ligninólisis se complete y los productos sean unidades simples sin capacidad de repolimerización, es necesario que se presente coordinación entre los mecanismos catalíticos de las diversas enzimas que participan en el proceso (Figura 5). El conjunto de enzimas puede variar entre especies o dependiendo de las condiciones en las que crezca el hongo. El esquema general descrito de la ligninólisis, propone que la depolimerización de la lignina produce radicales intermediarios inestables que pueden recondensarse, para prevenirlo intervienen ciertas oxidasas. En *Phanerochaete* se sabe que la VAO está asociada con la depolimerización por acción de las lacasas y reduce los radicales fenoxil producidos por lacasas, mediante la oxidación de veratril alcohol a veretraldehído (Marzullo *et al.*, 1995).

En los géneros *Polyporus* y *Trametes* existe una cooperación entre lacasas y la glucosa oxidasa para evitar la repolimerización de la quinona producida durante la ligninólisis. El ciclo se inicia con la oxidación del lignol catalizada por las lacasas, produciendo un compuesto intermediario que puede seguir dos caminos. Una posibilidad es que el intermediario sufra un ataque nucleofílico, en el cual las lacasas reducen la quinona y generan un producto no repolimerizable. Si lo anterior no sucede, entonces el compuesto intermediario

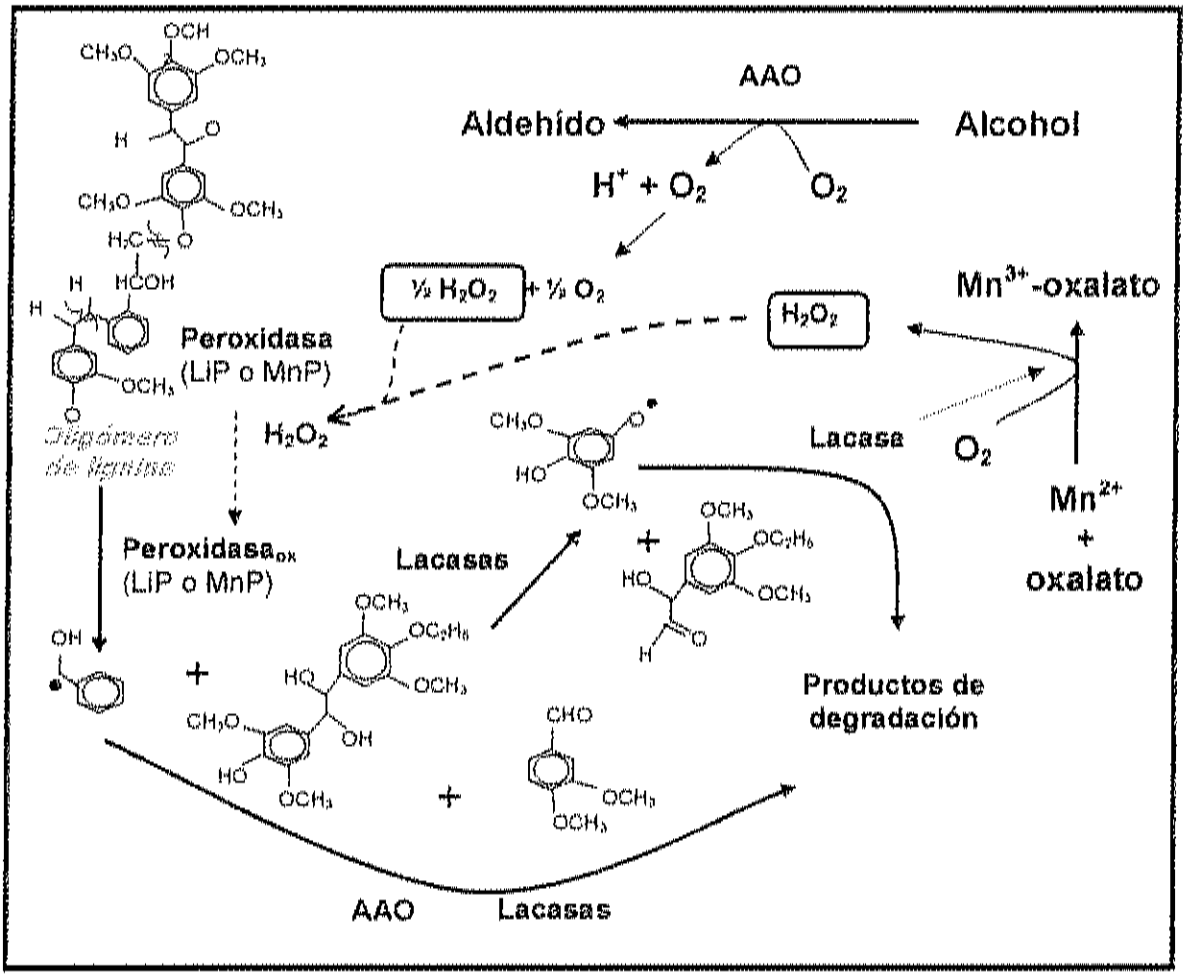

Figura 5. Modelo general de la ligninólisis enzimática, a partir de los esquemas propuestos para diferentes especies de hongos de pudrición blanca planteados por: Green (1977); Hammel *et al.* (1985); Kirk *et al.* (1987); Higuchi (1990); Guillén *et al.* (1992); Schlosser y Höfer (2002).

pierde un protón y se genera una quinona en estado de transición con capacidad de repolimerización. La intervención de la glucosa oxidasa permite que la quinona vuelva a oxidarse para que sea nuevamente un sustrato de la lacasa y siga el camino de la reducción (Green, 1977; Szklarz y Leonowicz, 1986).

Las especies oxígeno reactivas son tóxicas para las células, sin embargo para la degradación de lignina se requiere la participación de estos compuestos. Los hongos que degradan dicho polímero, producen una serie de enzimas encargadas de la producción *in situ* de H_2O_2. En *Pleurotus eringii*, hay un ciclo redox para la producción de H_2O_2. El sistema involucra reacciones de oxidación y reducción de alcoholes benzil, benzaldehídos o ácidos benzoicos. Los benzaldehídos que participan en este ciclo son el veratrialdehído y el anisaldehído (metabolitos aromáticos extracelulares del hongo). El ciclo incluye la reducción de los benzaldehídos por la aril-alcohol deshidrogenasa a sus correspondientes alcoholes, los cuales son oxidados por la aril alcohol oxidasa, produciendo H_2O_2 (Guillén y Evans, 1994).

Otra forma de producir el H_2O_2 *in situ*, para la subsiguiente activación de las peroxidasas, es cuando en el medio de crecimiento del hongo está presente el Mn II y el oxalato (metabolito secundario del hongo). Con estos dos sustratos las lacasas catalizan las formación del complejo Mn-oxalato, el cual inicia una serie de reacciones que culminan en la producción de H_2O_2 (Schlosser y Höfer, 2002). Adicionalmente, otro tipo de oxidasa (glioxal oxidasa) producida por *Phanerochaete*, oxida los metabolitos extracelulares del hongo: metilglioxal y glioxal generando como subproducto H_2O_2 (Kersten y Kirk, 1987). Al parecer, la ausencia de peroxidasas inactiva la glioxal oxidasa de una manera reversible, lo cual previene una acumulación de altas concentraciones de H_2O_2 (Kersten, 1990).

En general la cooperación entre enzimas involucradas en la degradación de lignina es importante en términos de la producción *in situ* de peróxido de hidrógeno, para evitar la repolimerización de los productos de la primera etapa de la ligninólisis.

JUSTIFICACIÓN

Lentinula edodes se considera un eslabón importante en el ciclo biológico del carbono, ya que degrada la lignina de la madera. La eficiencia biológica que se obtiene durante su cultivo sobre diversos tejidos leñosos, depende de su capacidad para biotransformar enzimáticamente el sustrato. Aunque son una alternativa para reciclar desechos agrícolas con altos contenidos de lignina, aún no se conoce cómo los diversos compuestos de origen vegetal afectan el conjunto de enzimas que participan en la ligninólisis y por lo tanto el crecimiento del hongo.

HIPÓTESIS

Las principales enzimas extracelulares de *Lentinula edodes* que catalizan la ligninólisis, difieren en actividad cuando es cultivado en medio líquido con y sin la suplementación de los distintos extractos de madera de vid.

OBJETIVOS

Objetivo General

Cuantificar la actividad enzimática de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, lacasa y aril alcohol oxidasa de *Lentinula edodes* cultivado en medio líquido con y sin la suplementación de los distintos extractos de la madera de vid y lignina comercial.

Objetivos Específicos

Cultivar *Lentinula edodes* en un medio líquido con y sin la suplementación de los extractos de la madera de vid, obtenidos con tolueno, cloroformo, etanol y agua.

Cultivar *Lentinula edodes* en un medio líquido con y sin la suplementación de lignina comercial.

Evaluar el efecto de los diferentes extractos de madera de vid y la lignina comercial, sobre la actividad extracelular de las enzimas lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa y aril alcohol oxidasa, cuando *L. edodes* es cultivado en medio líquido siguiendo una cinética de crecimiento micelial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Extractos

Los extractos se obtuvieron a partir de madera seca proveniente de poda de vid, ésta se molió con triturador, a un tamaño de partícula aproximado de 0.95 cm de longitud. La fibra seca se colocó en un aparato soxhlet con capacidad de 500 g. Se hicieron las extracciones, con el mismo lote de fibra, por reflujo constante durante 3 h utilizando 2 L de cada solvente siguiendo el orden de polaridad: tolueno, cloroformo, etanol y agua. Los extractos se concentraron con un rotaevaporador en baño María a 50-55°C, para después secarlos con corrientes de nitrógeno gaseoso. Una vez eliminado completamente el solvente se pesaron y guardaron a 4°C.

Microorganismo y Condiciones de Cultivo

Se utilizó la cepa 105 donada por el Instituto de Ecología, Unidad Xalapa, Veracruz. El hongo se mantuvo cultivándolo en medio sólido PDA (papa-dextrosa-agar) y refrigerando a 4°C.

Los cultivos se hicieron en 4 mL de medio líquido con formulación básica GP (40 g/L de glucosa y 10 g/L de peptona) ajustando el pH inicial a 4.5, utilizando viales con capacidad de 20 mL, tapados con torundas de algodón para permitir el intercambio gaseoso. El inóculo consistió en un disco de micelio, obtenido de un cultivo de 10 días en medio GPA (40 g/L de glucosa, 10 g/L de peptona y 30 g/L de agar), cortado de la periferia de la caja Petri con un perforador estéril de 1 cm de diámetro. Los viales sembrados se colocaron en la oscuridad a 25°C, con agitación a 180 rpm.

Pruebas de Concentración

Para determinar las cantidades de extractos de madera que fueron adicionados, se hicieron pruebas añadiendo al medio GP los extractos etanólico (EE) y acuoso (EA) en un intervalo de concentraciones de 0-2 mg/mL (0.1, 0.2, 0.3 0.4 0.5 0.75 y 2 mg/mL de EE, y 0.5, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1 y 2 mg/mL de EA). Asimismo se introdujo un tipo de cultivo control suplementado con lignina comercial (Aldrich No. Cat. 37095-9), realizándose pruebas a las concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mg/mL. Se midió el peso seco en mg/mL, después de 12 días de incubación.

Cinéticas de Crecimiento

Las pruebas consistieron en adicionar los extractos etanólico (EE), acuoso (EA), clorofórmico (EC) y toluénico (ET) al medio con formulación básica GP, a las concentraciones que se muestran en el Cuadro 1. Asimismo se hicieron tratamientos con lignina comercial (1 mg/mL) y la mezcla de extractos (M) a las mismas concentraciones presentadas en la Cuadro 1.

Cuadro 1. Concentraciones de los extractos de madera suplementados al medio GP.

Extracto	Concentración (μg/mL)
Etanólico	500
Acuoso	875
Clorofórmico	519
Toluénico	129

Los muestreos para determinar la actividad enzimática se hicieron, con base en una cinética de crecimiento de 18 ó 22 días, cada 2 días a partir del cuarto día de cultivo. Las muestras fueron filtradas a través de un papel secante, previamente pesado, para separar la biomasa y cuantificar el crecimiento micelial como peso seco (mg/mL). Las proteínas extracelulares se precipitaron colocando 3 mL de medio de cultivo en 15 mL de acetona, refrigerando a –20ºC durante 6 h, para después centrifugar a 5,000 rpm durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 300 µL de solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM, KCl 10 mM pH 4 (adicionando 250 µM de fenil-metil-sulfonil-fluoruro como inhibidor de proteasas). Las muestras se guardaron a –80ºC hasta su utilización para el análisis de actividades enzimáticas.

Técnicas Analíticas

La actividad de manganeso peroxidasa se midió con la formación de Mn III-malonato a 270 nm, a partir de $MnSO_4$ pH 4.5 (0.5 mM) y malonato de sodio (50 mM) en presencia de H_2O_2 (0.1 mM), con un coeficiente de extinción de 11590 /M cm (Wariishi *et al.*, 1988). En el caso de la lignina peroxidasa se utilizó la técnica descrita por Tien y Kirk (1984), que consiste en medir a 310 nm con un coeficiente de extinción de 9300 /Mcm, la formación de veratraldehído a partir de veratril alcohol (2 mM) en presencia de H_2O_2 (0.1 mM), en una solución amortiguadora de tartrato de sodio a una concentración de 25 mM y un pH de 3.0.

La actividad de lacasas 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 con un coeficiente de extinción de 36000 /M cm (Zhao *et al.*, 1996).

El método descrito por Guillén *et al.* (1992) se utilizó para la cuantificación de actividad de aril alcohol oxidasa. Las mediciones consisten en monitorear a 310 nm (coeficiente de extinción de 9300 /M cm) la formación de veratraldehído a partir de veratrylalcohol 5 mM en una solución amortiguadora de fosfato de sodio pH 6 (0.1 mM).

La actividad de catalasa se cuantificó de acuerdo con lo descrito por Cohen *et al.* (1970). Se colocaron 10 mM de H_2O_2 en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 100 mM pH 7.8, midiendo la absorbancia a 250 nm y calculando la actividad con la ecuación UI = (abs/0.0355)(50)(100/mg de proteína).

Las mediciones se hicieron en un espectrofotómetro Cari 50 a temperatura ambiente colocando 10 µl de muestra en 990 mL de la mezcla de reacción (solución amortiguadora y sustrato) para cada actividad enzimática. El contenido de proteínas totales se cuantificó con el método de Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina como estándar. Las actividades enzimáticas se registraron como U/mg proteína (U = mM de producto/min/mL).

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño al azar con tres repeticiones por tratamiento. La variable independiente fue el extracto de madera de vid; los controles negativo y positivo consistieron en cultivar el hongo, bajo las mismas condiciones, sin y con los cuatro extractos respectivamente, además de un cultivo adicionando lignina comercial. Las variables dependientes fueron las diferentes actividades enzimáticas específicas (lignina y manganeso peroxidasa, lacasa y aril alcohol oxidasa).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de Extractos

Se realizaron dos extracciones utilizando 500 y 450 g de madera de vid, obteniéndose porcentajes similares de los distintos extractos. El rendimiento se calculó tomando el peso de la madera inicial como el 100% (Cuadro 2).

La cantidad de muestra obtenida con el agua (22.09 g) es aproximadamente el doble de lo extraído con etanol (12.5 g) y siete veces mayor que el peso final del extracto toluénico (3.2 g), siendo el rendimiento del extracto clorofórmico (0.29%) el menor de todos (un 6 % de lo obtenido con el agua). La cantidad de compuestos polares extraíbles es de más del 650% mayor en comparación con los no polares (Cuadro 2).

El proceso utilizado para la obtención de extractos incluye etapas en las que hay un calentamiento elevado de las muestras, por lo que surge la interrogante sobre el estado de oxidación de los compuestos presentes en los extractos finales, así como de su efectividad en la modulación del crecimiento. En un trabajo realizado por Garzillo *et al.* (1992), con fracciones acuosas de tabaco y paja de trigo, se comprobó la termoestabilidad de los compuestos que intervienen en la estimulación del desarrollo de los organismos estudiados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que muchas de las sustancias pudieron haberse modificado químicamente, sobre todo algunas fitohormonas y vitaminas.

Cuadro 2. Rendimiento de los extractos.

Extracto	Peso promedio (g)	Rendimiento (%)
Madera	450 ± 35	100
Clorofórmico	1.31125 ± 0.07	0.291
Toluénico	3.21965 ± 0.21	0.7154
Etanólico	12.4916 ± 2.22	2.775
Acuoso	22.0868 ± 4.27	4.908

Pruebas de Concentración

Extractos de Madera

Se cultivó *Lentinula edodes* en medio GP adicionando extracto etanólico y acuoso a diferentes concentraciones (0-2 mg/mL), ya que estos extractos son los que estimulan el crecimiento de diferentes especies de hongos de pudrición blanca (Beltrán-García *et al.*, 2001; Baca-Cota, 2003). Se identificó el extracto y la concentración en la que se obtiene mayor crecimiento después de 12 días de incubación.

La Figura 6 muestra que en las concentraciones de 4, 5 y 10 mg/10 mL de extracto etanólico, la biomasa máxima final fue de aproximadamente 2.6 mg/mL, siendo estadísticamente mayor que en el resto de las concentraciones; mientras que con el extracto acuoso no se obtuvieron diferencias significativas a partir de 7 mg/10 mL.

Las concentraciones de 4, 5 y 10 mg/10 mL de EE son las que estimulan mayormente la producción de biomasa comparado con el control y el extracto acuoso; por lo que la concentración de 5 mg/10 mL de extracto etanólico se utilizó como valor de referencia para el cálculo de las concentraciones en los otros tres extractos.

Lignina

Debido a que la lignina se empleó como control, se hicieron pruebas para identificar la concentración que permite obtener mayor biomasa. El hongo tuvo el máximo crecimiento (2-2.1 mg/mL) en las concentraciones de 5, 7.5 y 10 mg/10 mL de lignina, sin diferencias significativas en el intervalo mencionado (Figura 7). Sin embargo el valor máximo se obtuvo a 10 mg/mL, por lo que ésta es la concentración que se utilizó en el tratamiento con lignina comercial.

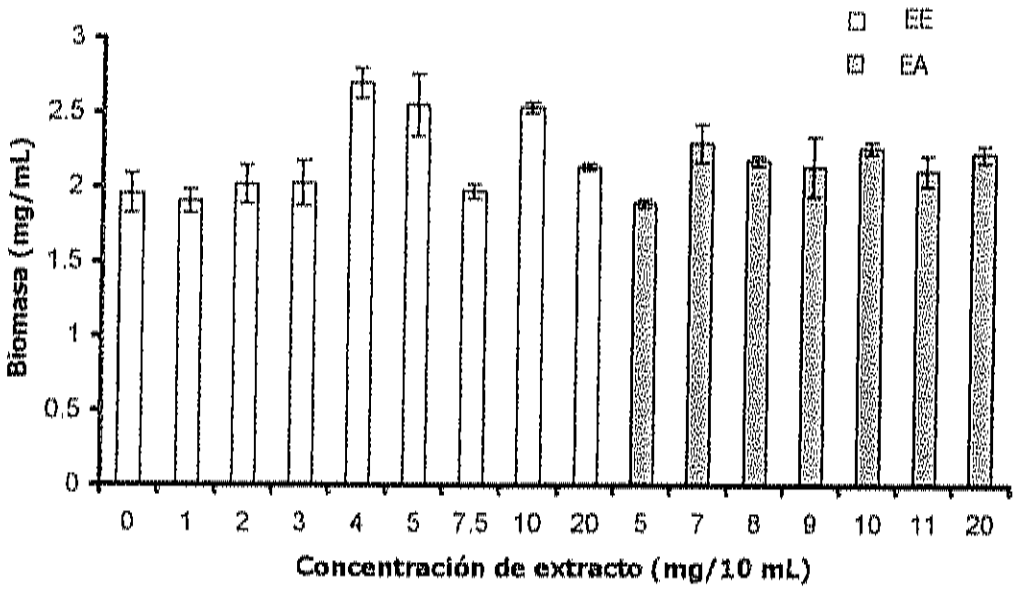

Figura 6. Crecimiento micelial del hongo en un medio líquido GP suplementado con extractos etanólico y acuoso de madera de vid. Los valores son el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

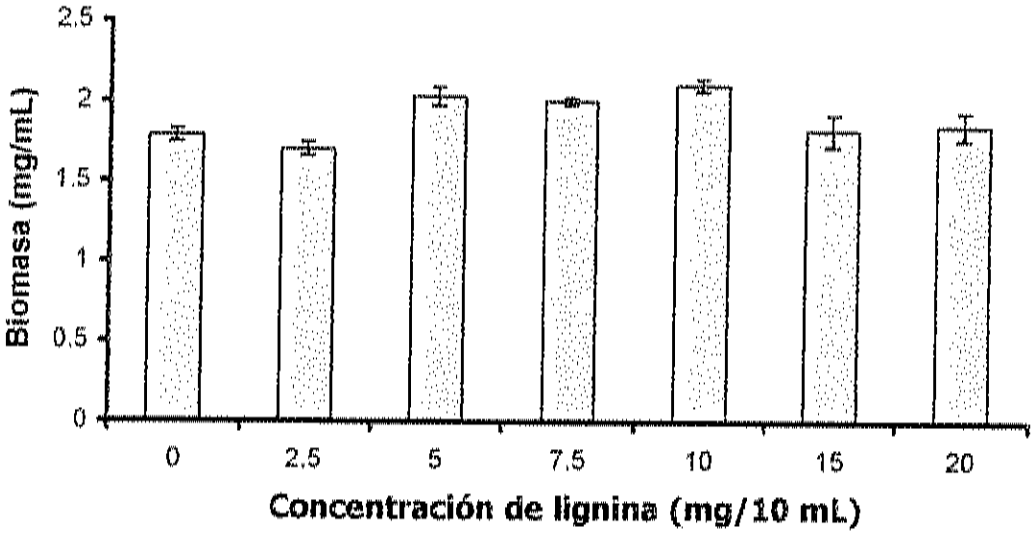

Figura 7. Efecto de las distintas concentraciones de lignina sobre el crecimiento micelial de *Lentinula edodes*. Los valores son el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

La biomasa obtenida con EE a 5 mg/10 mL, es 20% mayor que el valor más alto en las pruebas con lignina, mientras que los tratamientos con EA alcanzaron valores similares a los de biomasa con el polímero comercial usado (*ca* 2.2 mg/mL). En un estudio similar con *Pleurotus ostreatus* se encontraron resultados opuestos, ya que el micelio que se desarrolla en medio sólido suplementado con extracto acuoso de tallos de maíz, es aproximadamente 40% mayor que cuando el hongo crece en un medio suplementado con compuestos fenólicos derivados de la lignina (Beltrán-García *et al.*, 2001). Sin embargo debe tenerse en cuenta que a diferencia de *Pleurotus*, *Lentinula* degrada maderas con altos contenidos de lignina (maderas duras) (Philippoussis *et al.*, 2002), por lo que el efecto del polímero y sus derivados puede variar.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las determinaciones de la concentración con los extractos etanólico y acuoso, se definieron las cantidades adicionadas al medio de cultivo, tomando como referencia la concentración de EE a la que se produjo mayor biomasa. El cálculo para EA, EC y ET se hizo aplicando una regla de tres simple con base en el rendimiento (%) obtenido durante la extracción en madera y a partir del valor de referencia (Cuadro 3). El tratamiento con la mezcla de extractos se realizó adicionando todos los extractos a la misma concentración que se muestra en la Cuadro 3. Para el caso de la lignina se tomó la concentración a la que se logró mayor crecimiento (1 mg/mL).

Cuadro 3. Cálculo de las concentraciones de los extractos de madera añadidas al medio de cultivo.

Extracto	**Rendimiento (%)**	**Concentración* (mg/10 mL)**
Etanólico	2.7	5
Acuosos	4.8	8.75
Clorofórmico	0.29	0.519
Toluénico	0.72	1.29

* Con base en el rendimiento obtenido en la extracción y tomando como referencia 5 mg/10 mL del extracto etanólico.

Cinéticas de Crecimiento

El experimento para evaluar el efecto de los seis tratamientos planteados en este trabajo se dividió en tres fases: En la primera cinética (C1) se probaron los extractos etanólico y acuoso; en la segunda cinética (C2) los extractos clorofórmico y toluénico; por último, en la cinética 3 (C3) se adicionó la lignina comercial (L) y la mezcla de extractos (M) al medio de cultivo; en cada cinética se incluyó un control negativo u X (únicamente medio GP).

Crecimiento y Concentración de Proteínas

En C1 (Figura 8a) se observó que las diferencias estadísticas en biomasa entre EE, EA y el control, se presentaron a partir del día 10; la biomasa se incrementó un 20% con respecto al control. El peso aumentó alrededor de 1 mg/mL los días 10 y 12. Sin embargo las diferencias entre extractos no fueron significativas (3.5-4.5 mg/mL), únicamente se observó una tendencia del EE a estimular el crecimiento los días 16 y 18 (0.8 y 0.2 mg/mL más que el EA, respectivamente). Se ha visto que en hongos de pudrición blanca, los extractos acuosos obtenidos de distintas plantas (*Lolium multiflorium*, cebolla, jugos de tabaco y paja de trigo, y extracto acuoso de tallos de maíz), así como algunas fitohormonas y vitaminas solubles en agua presentes en tejidos vegetales, estimulan el crecimiento de estos organismos (Tan y Chang, 1989; Garzillo *et al.*, 1992; Beltrán-García *et al.*, 2001; Jonhatan y Fasidi, 2001; Domondon *et al.*, 2004; Agha, 1989, en Domondon *et al.*, 2004). Por otro lado, extractos alcohólicos obtenidos de la caña de azúcar y fracciones destiladas a partir de vinagre de encino (*Quercus crispula*) aceleran el crecimiento hasta un 200% (Yoshimura y Hayakawa, 1991; Ferrara *et al.*, 2002).

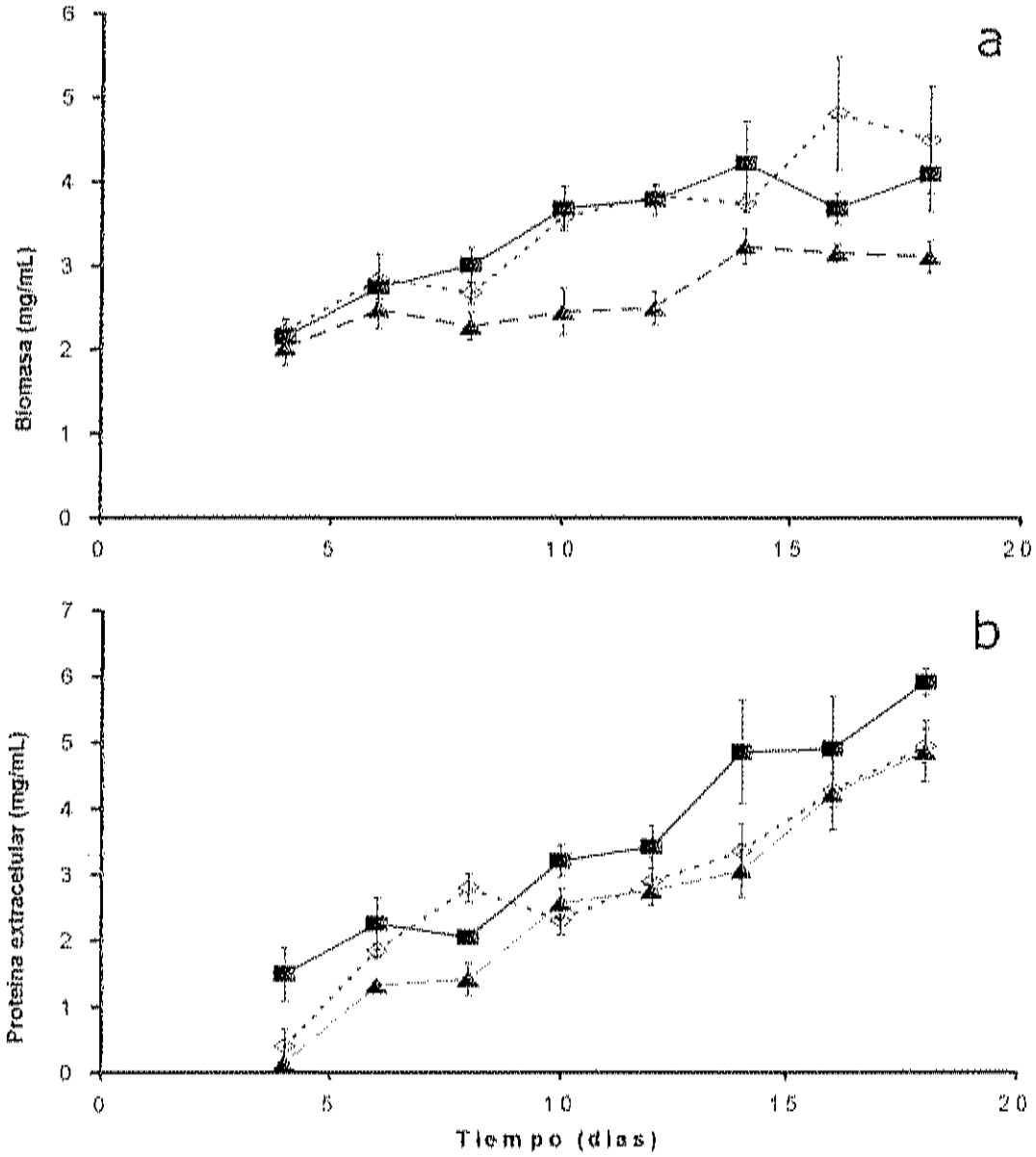

Figura 8. Biomasa (a) y concentración de proteína extracelular (b) obtenida en C1 con los tratamientos EE (- - ◇ - -), EA (—■—) y control (- ▲ - -).
El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

En cuanto a la concentración de proteína el comportamiento es similar en los tratamientos EE, EA y control, ya que los valores aumentaron en el tiempo y a medida que se incrementó la biomasa (Figura 8b). Existen diferencias estadísticas entre EA y X, pero este último no es distinto de EE a partir del día 10. Sin embargo los primeros 8 días de cultivo se vio un incremento significativo con EE *vs.* control, similar a lo descrito en un experimento utilizando extracto etanólico de planta de algodón, donde se encontró que la concentración de proteínas de *P. ostreatus* aumenta y es directamente proporcional a la concentración de extracto que se adiciona, cuando el cultivo dura 10 días. (Ardon *et al.*, 1998). En este artículo se menciona que algunos compuestos de tipo de los flavonoides (fenoles), son los principales inductores del fenómeno pero aún no se ha determinado la naturaleza química de estos componentes.

Con el control y EE se vio que la concentración varía de 0.15 a 5 mg/mL (del día 4 al final del cultivo); mientras en el EA, la cantidad obtenida en el primer y último día de muestreo es más alta (1.5 y 6.5 mg/mL, respectivamente). El efecto estimulante de los compuestos hidrosolubles sobre la concentración de proteínas, también se observó en *P. ostreatus* al adicionar jugos de tabaco y trigo (Garzillo *et al.*, 1992)

Los cambios en los parámetros estudiados siguen el mismo patrón, únicamente se incrementan con el tiempo de incubación y son cuantitativamente mayores que el control, excepto la concentración de proteína de EE (Figura 8).

Con el ET se inhibió el crecimiento del hongo hasta un 25% con respecto al control, a lo largo de toda la cinética (Figura 9a). El extracto clorofórmico permitió obtener valores más altos que el control de 0.2 a 0.4 mg/mL, los primeros días de incubación, pero en los últimos datos cuantificados los pesos fueron muy similares (3.7-4.3 mg/mL). En un estudio realizado con *Pleurotus ostreatus* y *P. pulmonarius* se encontró que su crecimiento radial fue inhibido hasta un 70% por efecto de las sustancias grasas (ácido palmítico principalmente) contenidas en un extracto toluénico obtenido de residuos de vid (Sánchez *et al.*, 2002). El efecto tóxico es atribuido a la peroxidación de lípidos.

La concentración de proteína con EC no cambió con respecto al control los primeros cuatro días y a partir del día 12, las diferencias son significativas por más de 3 mg/mL. Con el ET *vs.* el control, el contenido se incrementó un 100% más a partir del día 8, alcanzándose valores de 8-10 mg/mL los últimos días. Es interesante notar que con EC, los aumentos fueron del doble con respecto al día anterior, siendo hasta un 200% mayor que el control en el día 16 (Figura 9b).

Baca-Cota (2003) encontró que en *Pleurotus* spp., el crecimiento se inhibe cuando son adicionados los extractos clorofórmico y toluénico de madera de vid. Con los extractos de origen no polar el crecimiento es menor o no se afecta (Figura 9a), tomando como referencia el medio de cultivo sin tratamiento; mientras que la concentración de proteínas aumentó drásticamente a partir de la mitad de la cinética realizada, duplicándose o triplicándose con ET y EC, respectivamente. El cambio en la concentración de proteínas, sin afectar el crecimiento del organismo, se ha observado en experimentos realizados con *Phanerochaete crysosporium* (Ferrara *et al.*, 2002).

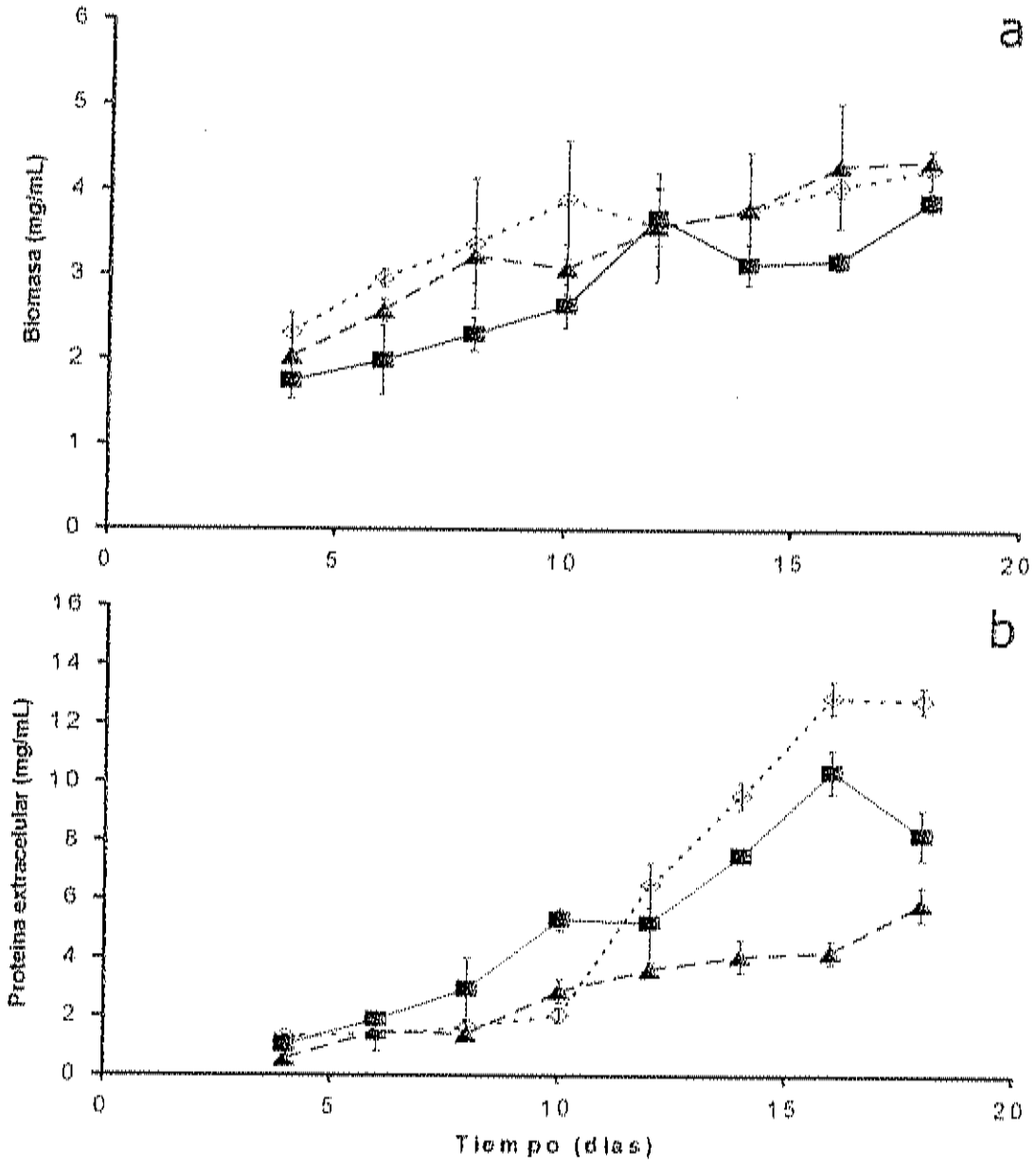

Figura 9. Biomasa (a) y concentración de proteína extracelular (b) obtenida en C2 con los tratamientos EC (- - ◇ - -), ET (—■—) y control (— ▲ — -). El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

Al adicionar la mezcla de extractos al medio de cultivo (Figura 10a), la biomasa del hongo fue 50% mayor con respecto al control. Los primeros 16 días de cultivo, la mezcla estimuló el crecimiento más que los otros cinco tratamientos; sin embargo, en los días 18-22 el incremento en biomasa fue igual a lo obtenido con la lignina comercial (~ 7.5 mg/mL).

Con el tratamiento L se observó que durante los primeros cuatro muestreos, la biomasa fue similar (0.7 mg/mL mayor) o menor que en el control, de 0.2-0.5 menos, pero a medida que se avanza en el tiempo las diferencias son superiores a 2 mg/mL hasta alcanzar valores de 7.8 mg/mL (Figura 10a). Lo anterior puede estar relacionado a que cuando la lignina comienza a degradarse, se liberan subunidades de lignina, *v.g.*, benzoatos, furanal, vanilina, etc., que estimulan el crecimiento (Shuen & Buswell, 1992; Ferrara *et al.*, 2002).

La concentración de proteína tuvo un comportamiento similar a la biomasa; con lignina los valores fueron menores que en el control hasta 0.9 mg/mL en los primeros días y a medida que transcurrió el tiempo, las diferencias superaron el 40%. Por otro lado, con M la concentración no varió considerablemente los primeros 16 días, siendo entre 3.5 y 4.5 mg/mL. De manera que al inicio las diferencias con respecto al control fueron de 300%; en los días 10 a 14 *ca* un 80% y en el día 16 del 1%. Los últimos tres días de muestreo la concentración de proteína de los tratamientos L y M es similar, alrededor de 7.5 mg/mL y 40-70% mayor que el control (Figura 10b).

La Figura 10 muestra cómo los cambios en biomasa y concentración de proteína fueron similares, al adicionar M o L al medio. Con la lignina el estímulo en ambos parámetros se observó al final de la cinética, mientas que con la mezcla desde el inicio se presentó un incremento significativo. Domondo *et al.* (2004) encontraron una influencia marcada en la duración de las distintas etapas de crecimiento de *Pleurotus,* dependiendo de la composición del medio.

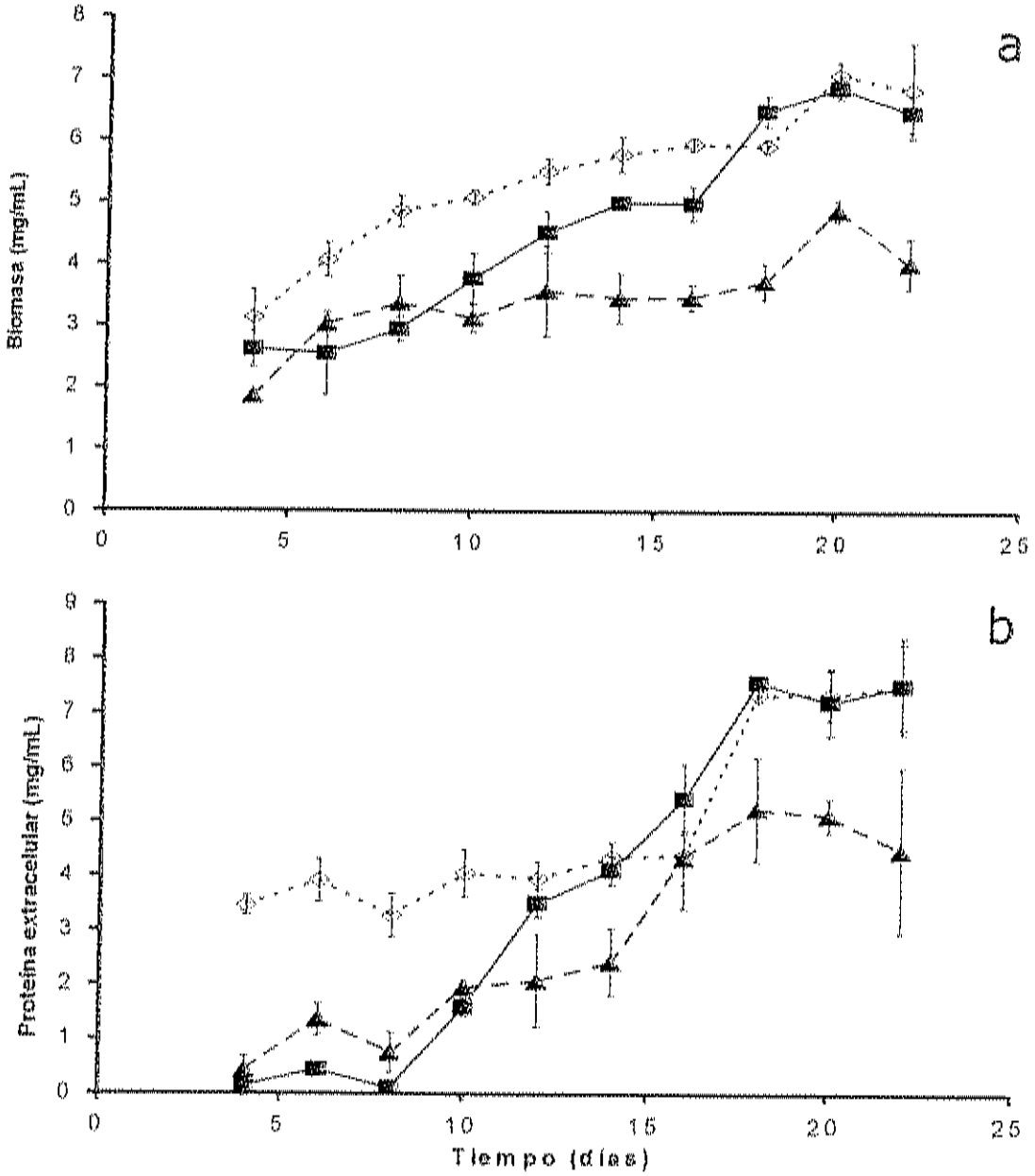

Figura 10. Biomasa (a) y concentración de proteína extracelular (b) obtenida en C3 al adicionar la mezcla (--◇--), la lignina (—■—) y con el control (—▲--). El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

Al comparar las Figuras 8a, 9a y 10a se observa que la estimulación del crecimiento con respecto al control, sigue en orden descendente M, L, EE, EA, EC y ET. En el caso de C3, las diferencias no fueron únicamente cuantitativas, sino también en el patrón de crecimiento a lo largo del cultivo. En el caso de la lignina, inicialmente las diferencias con respecto al control fueron entre 0.5 y 1 mg/mL, pero después del día 16 el incremento fue hasta un 70% más que el control. Sin embargo con la mezcla, las variaciones con respecto al control, superó el 50% (excepto el día 16).

Al igual que lo observado con la biomasa, las diferencias en concentración de proteína entre los tratamientos con respecto al control, en C2 y C3, ocurrieron cuantitativamente y en la forma como se vio a lo largo del experimento. Con los extractos polares, las diferencias fueron mínimas y el aumento similar al control (Figura 8b). Sin embargo en el caso de los extractos no polares, M y L (Figuras 9b y 10b), los cambios más importantes ocurrieron los últimos 4 días. Con EC y ET se obtuvo aproximadamente el doble de concentración que con EE y EA (días 16 y 18) y alrededor del 60% más que con L y M.

Actividades enzimáticas

Al comparar el desarrollo del control en las distintas cinéticas de crecimiento, se observó que existieron diferencias desde el primer valor cuantificado; adicionalmente el incremento en los valores de peso seco no fue progresivo en el tiempo. Por lo anterior se decidió analizar los cambios en la actividad de las cinco enzimas con respecto al aumento en biomasa, con la finalidad de obtener información que permita explicar con mayor certidumbre lo que sucede en este sistema experimental *in vitro*.

Las gráficas muestran los cambios de actividad con respecto a la biomasa tomando los valores como categóricos, ya que de tomar el peso del hongo en escala, la visualización de las variaciones y las comparaciones serían complicadas. Lo anterior debido a que los intervalos son distintos (ver el eje de las ordenadas en las siguientes gráficas). Esto es porque los incrementos en biomasa no son iguales durante todo el cultivo; es decir, entre dos puntos de muestreo en un mismo tratamiento, el incremento puede ser de 0.1 mg/mL o bien de 1 mg/mL.

Extracto etanólico y acuoso. Las variaciones en la actividad de las diferentes enzimas evaluadas, cuando se adiciona EE al medio de cultivo, con respecto al crecimiento del hongo se observan en la Figura 11. La actividad de catalasa fue alta (34 U/mg proteína) con bajos valores de biomasa (2.22 mg/mL) y disminuyó a medida que el hongo aumentó de peso.

De las enzimas involucradas en la ligninólisis, la actividad LiP se detectó cuando la biomasa fue de 2.6 mg/mL y en este punto se alcanzó la actividad más alta (3.5 U/mg proteína). Después tendió a disminuir conforme aumentó el peso del hongo, observándose un segundo incremento a los 3.8 mg/mL (1.1 U/mg proteína). La actividad de lacasa se detectó después de la LiP (a los 3.8 mg/mL) y aumentó conforme fue creciendo el hongo hasta 41.6 U/mg proteína en el peso más alto cuantificado (4.8 mg/mL). Las actividades enzimáticas de AAO y MnP se registraron en el mismo punto y después de observarse la actividad de lacasa, siendo la mayor actividad de MnP a los 3.8 mg/mL y de AAO a los 3.7 (7.6 y 1.7 U/mg proteína, respectivamente).

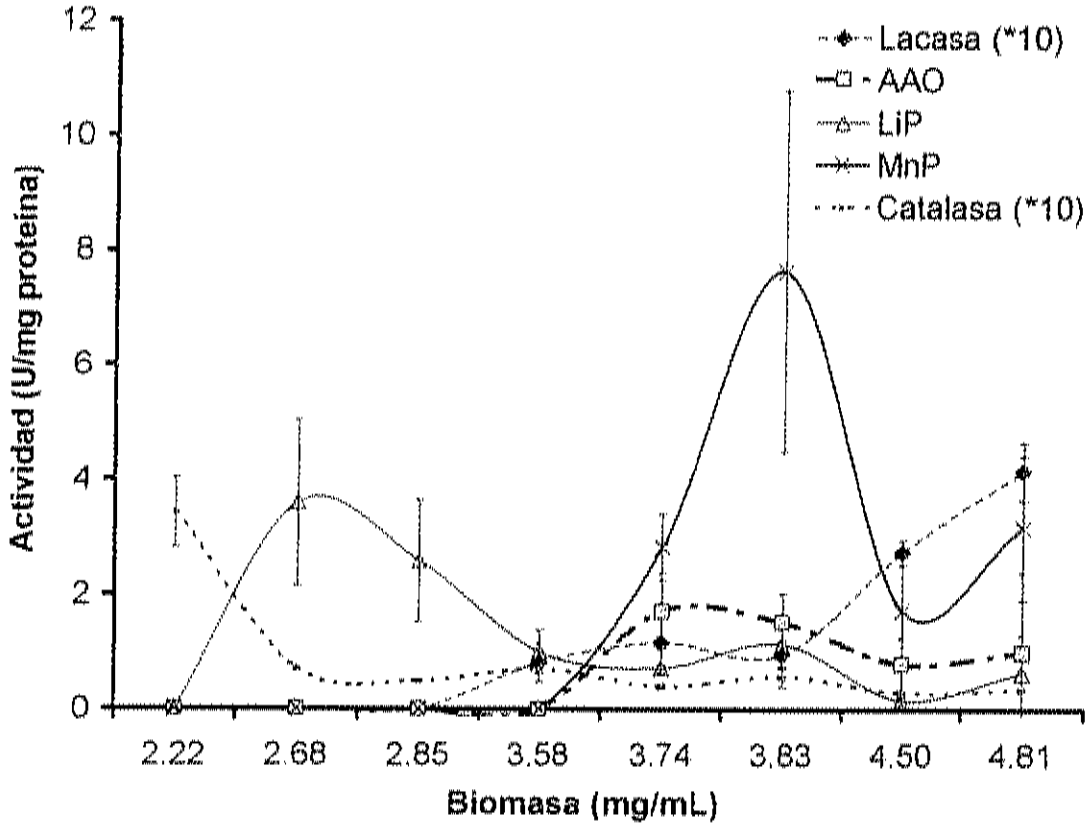

Figura 11. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 18 días, adicionando EE al medio de cultivo donde creció el hongo. El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

En el tratamiento con EA (Figura 12) la actividad de catalasa cambió de 10 a 2.8 U/mg proteína a lo largo del cultivo. La actividad enzimática de LIP se registró cuando el hongo tuvo un peso bajo (2.7 mg/mL) y durante el cultivo se encontraron dos incrementos a los 3 y 4 mg/mL de 6 y 4 U/mg proteína, respectivamente. Las otras tres enzimas ligninolíticas (lacasa, AAO y MnP) se observaron al mismo peso (3.68 mg/mL). La lacasa presentó dos incrementos, a los 3.7 y 4 mg/mL (más de 100 U/mg proteína). La MnP mostró los valores más altos de actividad después de los 4 mg/mL (6 U/mg proteína), mientras que la AAO aumentó conforme subió la biomasa pero en el último punto, cuando la biomasa varió de 4 a 4.22 mg/mL, la actividad decreció de 2.9 a 1.3 U/mg proteína.

En el control para C1, la actividad de catalasa fue alta al inicio (96.7 U/mg proteína) y disminuyó a medida que el hongo creció. Se observaron variaciones de 60 a 20 U/mg proteína en la actividad de lacasa, a lo largo del cultivo, presentándose los valores más altos (60-45 U/mg proteína) cuando la biomasa fue de 2.4-2.7 mg/mL. La LIP tuvo un máximo a los 2.6 mg/mL (16 U/mg proteína) y disminuyó a *ca* 4 U/mg proteína, manteniéndose constante por encima de este peso. Con MnP se detectó un solo pico de actividad a los 2.6 mg/mL; mientras que en la AAO mostró dos aumentos uno a 2.6 mg/ml (2 U/mg proteína) y el otro a 3.7 mg/mL (4 U/mg proteína) (Figura 13).

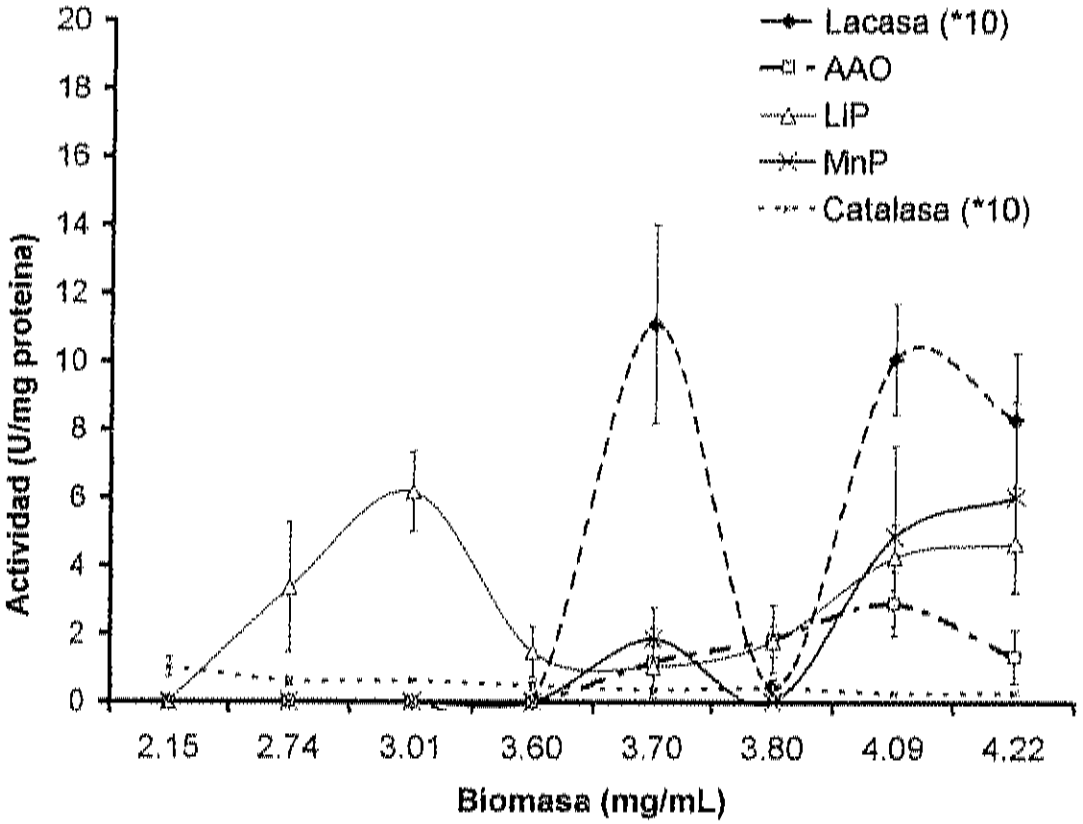

Figura 12. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 18 días adicionando EA al medio de cultivo donde creció el hongo. El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones

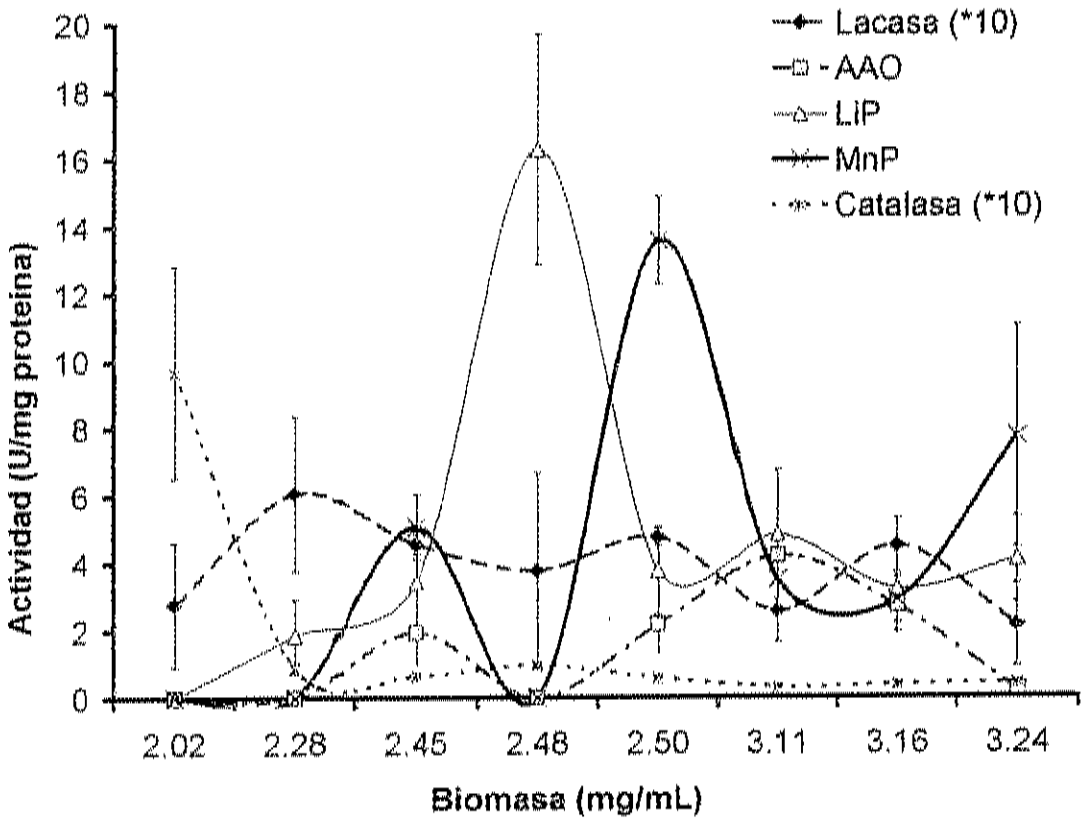

Figura 13. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 18 días en el control negativo para C1 (tratamientos EE y EA). El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

Extracto clorofórmico y toluénico. Al adicionar EC a los cultivos se encontró que la lacasa y la AAO tuvieron un comportamiento similar (Figura 14). Cuando la biomasa fue baja (alrededor de 3 mg/mL), la actividad de lacasa correspondió a 44 U/mg proteína, mientras que en este mismo punto, la AAO fue aproximadamente 10 veces menor (3-3.5 U/mg proteína). Conforme incrementó el peso, se encontró un segundo pico de actividad a los 3.9 mg/ml en ambas enzimas, alcanzando el valor más alto en toda la cinética con 80 y 10 U/mg proteína de lacasa y AAO, respectivamente. En este mismo punto (3.9 mg/mL), la LiP aumentó en su actividad (7 U/mg proteína).

En el caso de la MnP únicamente se observó un pico a los 3.5 mg/mL, ascendiendo la actividad a 4 U/mg proteína, antes y después de este valor de biomasa la actividad fue baja o cero. La actividad de catalasa se registró baja y no cambió considerablemente a lo largo de los días muestreados, oscilando los valores entre 0.5 y 9 U/mg proteína (Figura 14).

En el tratamiento ET la actividad de catalasa se mantuvo baja durante todo el tiempo muestreado (0.5-8 U/mg proteína) al igual que en EC, mientras que en AAO fue alta al inicio del cultivo (7 U/mg proteína) cuando la biomasa fue menor a 2 mg/mL y disminuyó conforme creció el hongo. Después de los 3 mg/mL la actividad no se detectó en la mayoría de los puntos muestreados. La actividad de LiP fue muy baja, cuando el peso del hongo fue menor a 2.5 mg/mL, no pudo cuantificarse y a los 2.5-3.5 mg/mL fue de aproximadamente 1 U/mg proteína. La actividad de lacasa fue constante a lo largo del cultivo, sin oscilaciones considerables entre 20 y 30 U/mg proteína, mientras que la MnP tuvo dos picos de actividad, a los 2 y 3.7 mg/mL de biomasa con 16 y 9.2 U/mg proteína, respectivamente (Figura 15).

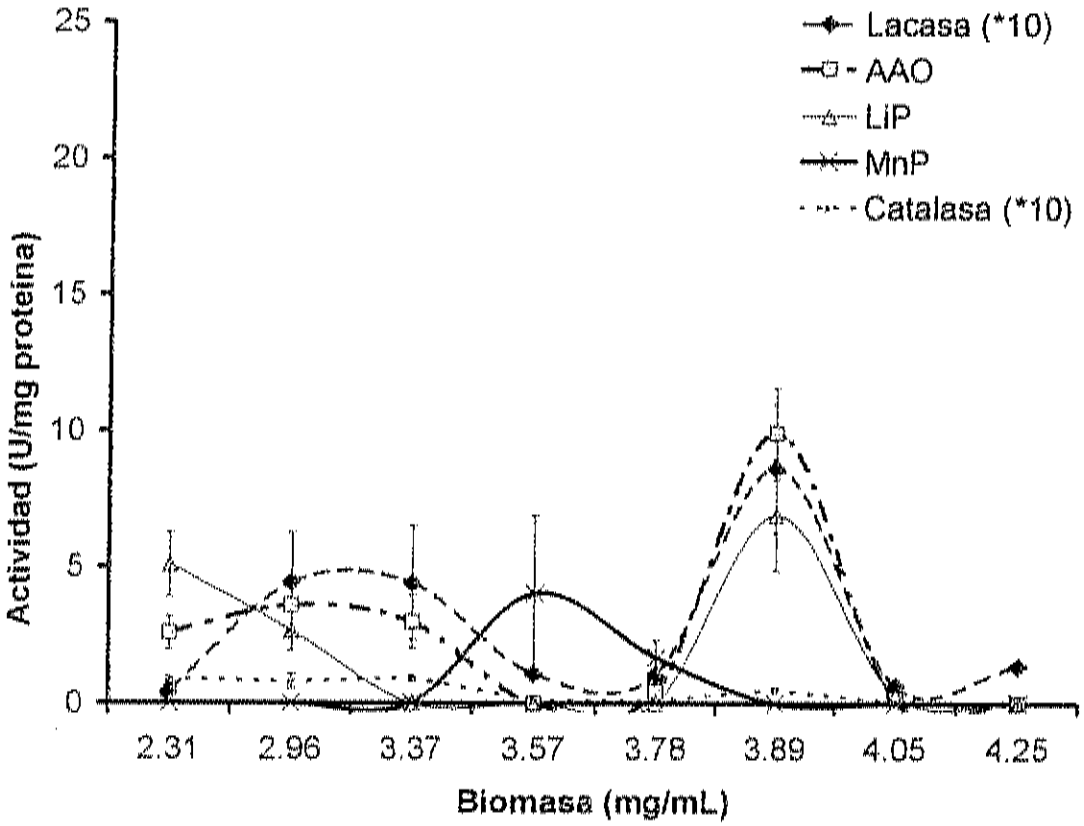

Figura 14. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 18 días adicionando EC al medio de cultivo donde creció el hongo. El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

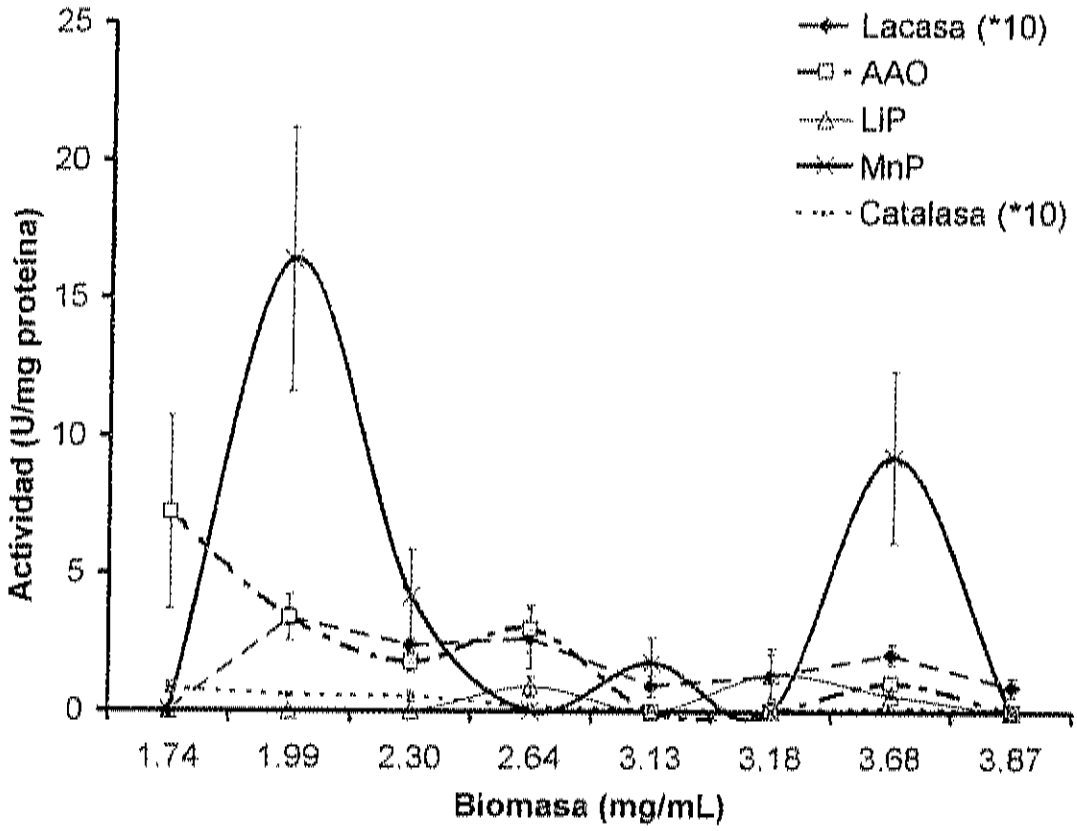

Figura 15. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 18 días adicionando ET al medio de cultivo donde creció el hongo. El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

En la cinética 2 para el control se encontró baja actividad de catalasa (15 U/mg proteína) desde el inicio y disminuyó a 0.1 U/mg proteína conforme aumentó la biomasa (Figura 16). El valor de actividad de LiP más alto (16 U/mg proteína) se detectó con la biomasa más baja y después se observaron oscilaciones, siendo el comportamiento y los valores parecidos al control en C1. La MnP presentó un solo aumento de actividad durante todos los días muestreados, obteniéndose a los 3.2 mg/mL el valor más alto (8 U/mg proteína) y disminuyó a menos de 1 U/mg proteína a una biomasa menor a 4 mg/mL. En el caso de la lacasa se observaron oscilaciones entre 20 y 40 U/mg proteína, a partir de los 3 mg/mL; a menor peso la actividad fue baja, con menos de 10 U/mg proteína. Finalmente la AAO aumentó con un peso de 3 mg/mL para después bajar paulatinamente conforme crecía el hongo, de 0.9 a 0.06 U/mg proteína.

Lignina y mezcla de extractos. La adición de la mezcla de extractos al medio de cultivo originó que la actividad de catalasa se mantuviera constante a lo largo de la cinética, alrededor del 3.5 U/mg proteína, con un ligero aumento al inicio (10 U/mg proteína) cuando la biomasa fue de 4.8 mg/mL. La actividad de lacasa se presentó cuando la biomasa fue de más de 5.5 mg/mL y aumentó hasta 100 U/mg proteína a los 6.8 mg/mL para después bajar a aproximadamente 50 U. La actividad de AAO osciló entre 0 y 5 U/mg proteína presentando dos picos a los 5 y 6.8 mg/mL. La actividad de LiP únicamente se registró en dos puntos de muestreo (a los 5.5 y 6.8 mg/mL); los valores no fueron mayores de 2.5 U/mg proteína. Por último la MnP se observó a lo largo de toda la cinética, con valores altos al inicio (13.3 U/mg proteína) y con el mayor peso (36 U/mg proteína), en los puntos intermedios entre 4 y 6.8 mg/mL la actividad fue de alrededor de 4 U/mg proteína (Figura 17).

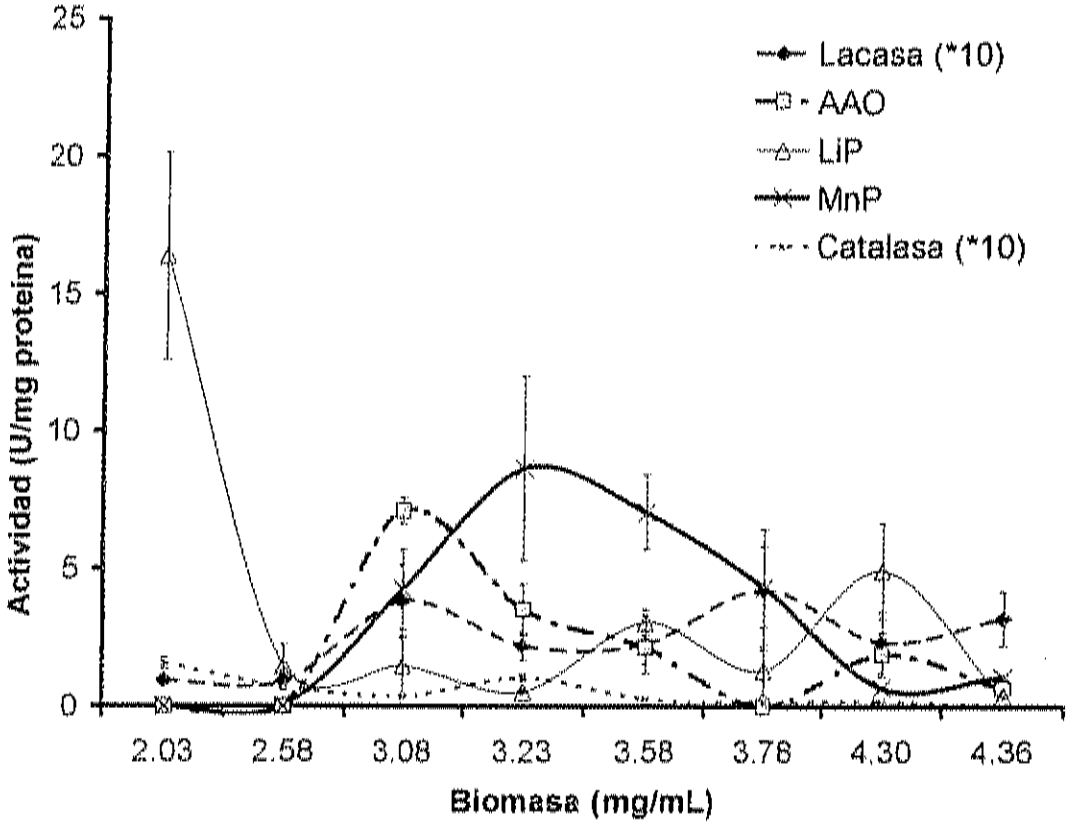

Figura 16. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 18 días en el control negativo de C2 (tratamientos EC y ET). El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

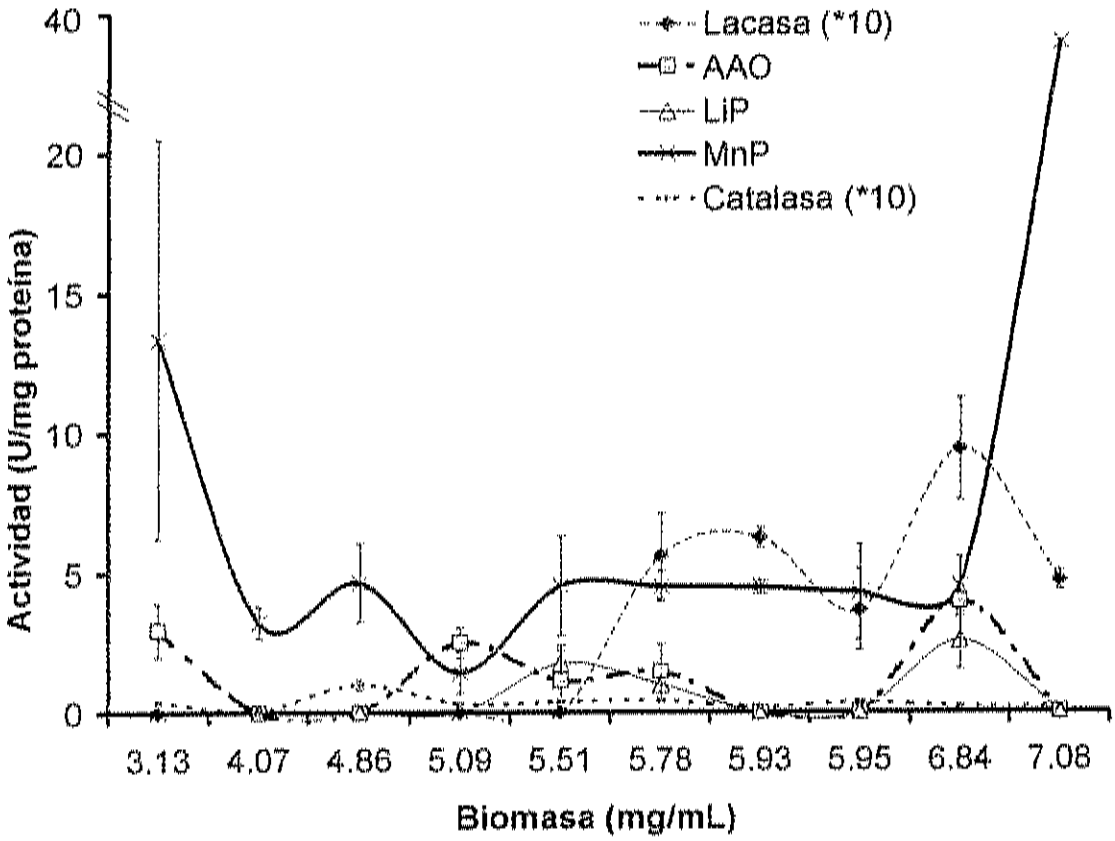

Figura 17. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 22 días adicionando la mezcla al medio de cultivo donde creció el hongo. El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

En el tratamiento con la lignina (Figura 18) se vio que al inicio hubo un incremento de la actividad de catalasa y AAO de 28 a 128 y de 0 a 17 U/mg proteína, respectivamente, cuando la biomasa aumentó de 2.5 a 2.6 mg/mL. Después de lo cual la catalasa bajó, manteniéndose así el resto del tiempo de cultivo; mientras que la AAO tuvo dos pico más de menor magnitud (3.5 y 1.5 U/mg proteína) a los 4.5 y 6.5 mg /mL. La actividad de LiP se registró cuando la biomasa fue mayor a 3 mg/mL y no cambió considerablemente (entre 3 y 6 U/mg proteína). La MnP y lacasa se observaron al final, cuando el hongo pesó 5 y 6.5 mg/mL, respectivamente; existiendo un solo pico: 22 (lacasa) y 18 U/mg proteína (MnP).

En la cinética 3 para el control, la catalasa se comportó de la misma manera que en el control de C2, alta al principio (~120 U/mg proteína) y bajó conforme aumentó la biomasa. La lacasa se registró a los 3 mg/mL y continuó manteniéndose alrededor de 35 U/mg proteína, con un pico de 66 U/mg proteína a los 3.4 mg/mL. La actividad de AAO, el valor más alto se obtuvo a los 3.1 mg/mL (5.2 U/mg proteína) y luego bajó paulatinamente, presentando un nuevo incremento a los 3.5 mg/mL (de 3.3 U/mg proteína). La actividad de LiP fue de 13 U/mg proteína al inicio y se mantuvo alrededor de los 4 U/mg proteína hasta que alcanzó un peso de 4 mg/mL, momento en el cual se registró el valor más alto (36 U/mg proteína). Finalmente la MnP presentó aumentos y disminuciones a lo largo del cultivo, a los 3.1 y 3.4 mg/mL existieron picos de actividad de igual magnitud (12 U/mg proteína), y en la mayor biomasa cuantificada (4.8 mg/mL) la actividad ascendió a 47.6 U/mg proteína (Figura 19).

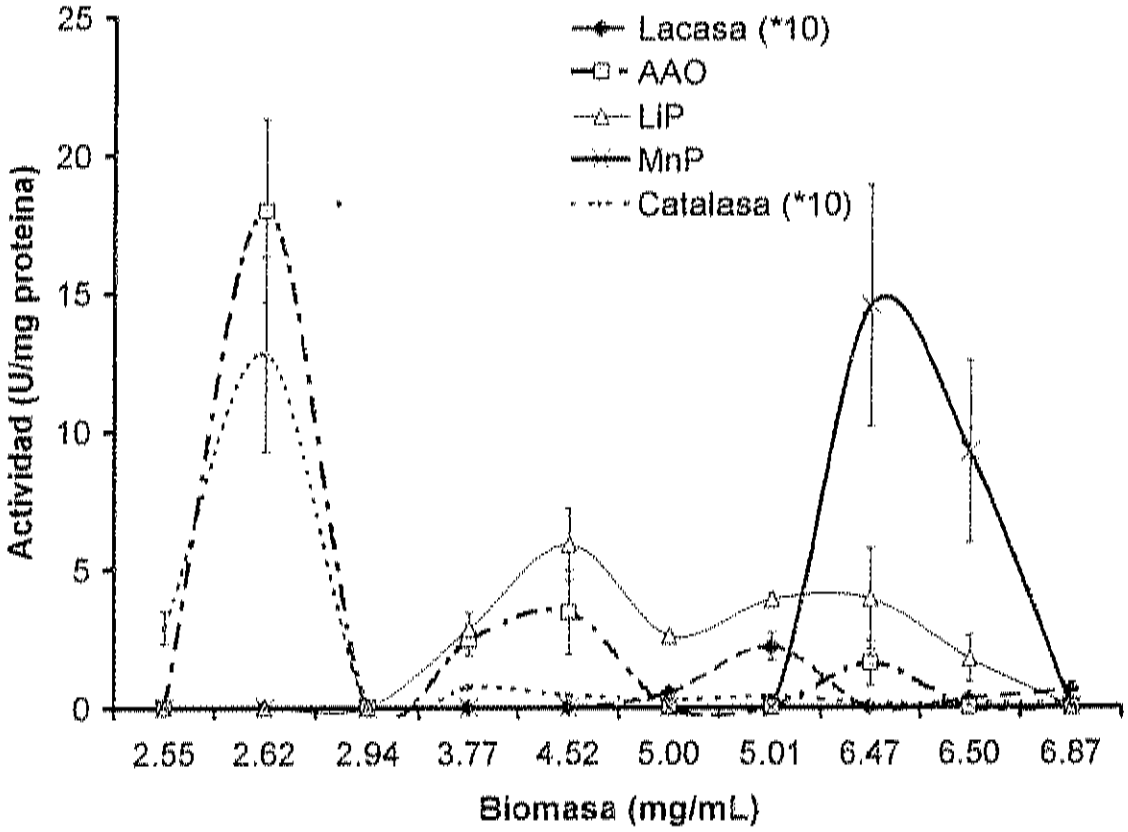

Figura 18. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 22 días adicionando lignina al medio de cultivo donde creció el hongo. El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones.

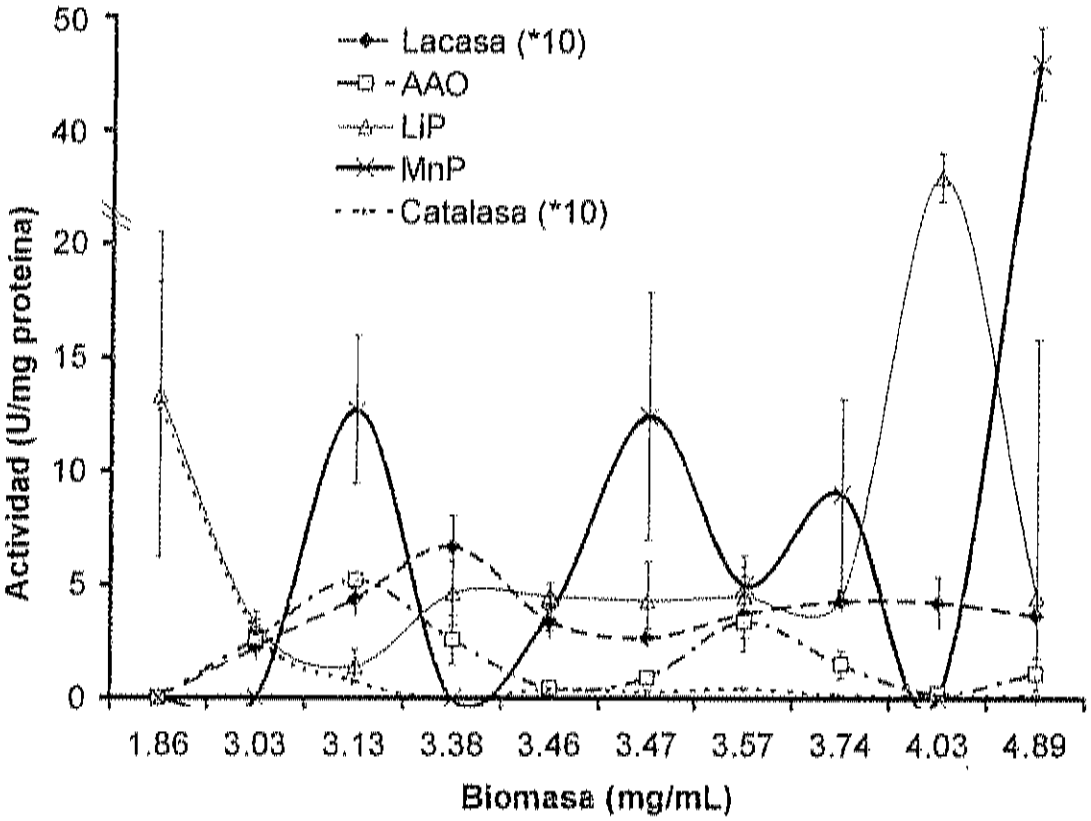

Figura 19. Actividad extracelular de las enzimas medidas durante 22 días en el control negativo de C3 (tratamientos M y L). El promedio y la desviación estándar son el resultado de tres repeticiones

Comparación de tratamientos. La relación entre producción de biomasa y aumento en las actividades de las distintas enzimas ligninolíticas no es directa. Es decir, los valores de actividad más altos de las distintas enzimas, no se encontraron necesariamente en donde se cuantificó el mayor peso seco. Lo anterior también ha sido descrito para el género *Pleurotus*, donde las actividades altas de MnP, lacasa y AAO no se obtiene en los cultivos donde el crecimiento es mayor (Curreli *et al.*, 2001; Ha *et al.*, 2001).

En el cuadro 4 se puede observar que los tratamientos EA y M son los que estimularon mayormente la actividad de lacasa (111 y 94 U/mg proteína, respectivamente), mientras que L presentó los valores máximos de actividad comparativamente más bajos (~40 U menos que el máximo del control). Al adicionar los extractos de origen no polar se obtuvieron los mayores valores de actividad de AAO (7-10 U/mg proteína), y las fracciones con compuestos polares presentaron máximas actividades aproximadamente 1 U/mg proteína menores que el control.

En *Pleurotus ostreatus* se observó que la actividad de lacasa es estimulada cuando se adiciona jugo de paja de trigo o tabaco a un medio de cultivo formulado con glucosa y sales minerales. El caso contrario se observó con la AAO, siendo mayor en el medio sintético que en el suplementado (Garzillo *et al.*, 1992).

Ardon *et al.* (1998) encontraron que la adición de la fracción etanólica obtenida de algodón, al medio donde crece *Pleurotus ostreatus*, hace que la actividad de lacasa sea mayor que en un control, incrementándose a medida que aumenta la cantidad de extracto. Lo anterior no concuerda con lo observado en este estudio, pues con EE la actividad de lacasa fue menor al control.

Cuadro 4. Máximas actividades enzimáticas cuantificadas en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Actividad máxima cuantificada U/mg proteína (biomasa*)				
	Lacasa	**AAO**	**LiP**	**MnP**	**Catalasa**
EE	42±5 (4.8)	1.7±0.6 (3.7)	3.6±1.4 (2.8)	7.6±3 (3.8)	34±6 (2.2)
EA	111±29 (3.6)	2.9±0.9 (4)	6.1±1.1 (3)	6±3 (4.2)	10±3 (2.1)
EC	44±18 (3)	10±3.6 (3.9)	5±1.1 (2.3)	4±2 (3.5)	9.3±1 (3.3)
ET	34±8 (2)	7.2±3.5 (1.7)	1.3±0.9 (3.17)	16±5 (2)	8±2 (1.7)
M	94±18 (6.8)	4±0.5 (6.8)	2.5±1.2 (6.8)	4.6 (5-6)	4.2±0.3 (5.7)
L	22±5 (5)	3.4±1.5 (4.5)	6±2 (4.5)	14.5±4 (6.4)	128±25 (2.6)
C1	60±23 (2.7)	4.2±0.8 (3.3)	16.2±3 (2.6)	13±1.3 (2.7)	96±31 (2)
C2	42±22 (3.4)	7.1±0.4 (3)	16.3±4.5 (2)	8.6±3 (3.2)	15±2 (2)
C3	67±13 (3.4)	3.4±1.2 (3.5)	13±3.7 (1.9)	12±3 (3.13)	128±55 (1.9)

* el número entre paréntesis indica el valor de peso (mg/ml) al que fue detectada la actividad.

Es interesante notar que en el caso de la LiP, la mezcla de extractos no estimula la actividad tanto como EA, EE y EC pero si más que ET (1.2 U/mg proteína). Sin embargo las actividades más altas se observaron en los controles. El efecto positivo del EA coincide con el trabajo realizado por Faison y Kirk (1985) donde se explica la inducción de actividad de LiP por sus sustratos o por productos hidrosolubles de la degradación de lignina.

En el tratamiento con ET se registraron valores de actividad de MnP mayores que en la mezcla (~11 U/mg proteína), mientras que con los otros tres extractos los máximos valores son cercanos a M (4 o 7 U/mg proteína). La actividad de esta peroxidasa es regulada por el estrés oxidativo y la fuente de nitrógeno presente en el medio (Sarkar *et al.*, 1997; Ruiz-Dueñas, 1999). Zhao *et al.* (1996) describieron para *L. edodes,* el efecto inhibitorio o estimulante de las bajas y altas concentraciones de nitrógeno, respectivamente.

En la mayoría de los tratamientos, la máxima actividad de catalasa (4 a 15 U/mg proteína en EA, EC y ET, y 34 en EE) se registró al inicio de las cinéticas, cuando la biomasa fue de 2-3 mg/mL (excepto en M). Los valores más altos se cuantificaron en dos controles y en L (96-128 U/mg proteína) seguido de los extractos polares.

En general, las máximas actividades se registraron al inicio de la cinética, siendo la biomasa menor a 4 mg/mL y cuando se añadieron los extractos independientemente, mientras que en los controles se detectaron cuando el peso fue inferior a 3.5 m/mL. Para el caso de L y M, los valores más altos se cuantificaron con un crecimiento mayor de 4.5 y 6 mg/mL, respectivamente; con excepción de la actividad de catalasa. Lo anterior puede deberse a que los tratamientos L y M simulan algunas características que ocurren durante el cultivo del hongo sobre sustratos maderables y se sabe que *in vivo* la actividad ligninolítica se presenta durante el metabolismo secundario, (Chen *et al.*, 2000; Van *et al.*, 2003); es decir, durante los procesos metabólicos peculiares de

determinados grupos taxonómicos y considerados no esenciales de todas las células (Piñon y Palazón, 1993).

En el Cuadro 5 se muestra que el orden en que aumentan y disminuyen las actividades enzimáticas en los diferentes controles es distinto. Lo mismo fue observado en los controles utilizados para medir el efecto de metales pesados en la actividad de MnP (Baldrian *et al.*, 2000). Tomando el patrón más repetitivo, se tiene que la actividad de catalasa se registró en el peso más bajo cuantificado y disminuyó hasta valores constantes después de 3 mg/mL.

Una característica que se menciona en diversos estudios con especies de los géneros *Phanerochaete* y *Pleurotus,* cuando se utilizan medios sintéticos, es la detección de actividad de LiP antes que MnP (Berlinki *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 1990). Lo mismo se observó en este estudio, la LiP aumentó al principio y cuando disminuyó, se incrementó la actividad de MnP, Lac y AAO, manteniéndose constante la lacasa después de este punto. Con los muestreos realizados en este trabajo, las tres últimas actividades mencionadas se detectaron en el mismo peso, lo cual difirió con el orden de las actividades enzimáticas, cuando *Pleurotus pulmonarius* se cultivó en un medio de glucosa, peptona y extracto de levadura: primero lacasa, después MnP y al final AAO (Bockle *et al.*, 1999).

La AAO, LiP y MnP parecen tener incrementos y disminuciones coordinadas cuando la LiP aumenta, la MnP y AAO disminuyen, y viceversa; mientras la lacasa no varía después de la primer subida. En *Pleurotus ostreatus* se observó que la lacasa se mantiene constante una vez que se incrementa, mientras que la AAO presenta oscilaciones (Garzillo *et al.*, 1992).

Cuadro 5. Orden en el que fueron detectados los aumentos (↑) y disminuciones (↓) de actividad enzimática en los controles de las distintas cinéticas.

B* (mg/mL)	2	2.5	2.7-3	3.3	3.5	3.7-4	4.3-4.9
Control C1	↑ Lac, Cat	↑ LiP	↑ AAO, MnP		↑ AAO		
		↓ Cat	↓ LiP	↓ AAO, MnP			
		Lac	*Lac, Cat*	*Lac, LiP, Cat*	*Lac, LiP, MnP, Cat*		
Control C2	↑ LiP		↑ AAO, MnP Lac,			↑ LiP	
			↓ LiP			↓ AAO, MnP	↓ LiP
	Cat		*Cat*			*Lac, Cat*	Lac, AAO, MnP, *Cat*
Control C3	↑ LiP, Cat		↑ AAO, MnP Lac,		↑ AAO, MnP	↑ LiP	↑ MnP
			↓ LiP, Cat	↓ AAO, MnP		↓ AAO, MnP,	↓ LiP
				Lac, LiP, *Cat*	Lac, AAO, Cat	Lac, *Cat*	Lac, AAO, *Cat*

* La biomasa (B) es el peso al cual fue detectado el cambio. En el área sombreada se indican las actividades que no cambiaron.

En el caso de los extractos (Cuadro 6) se encontró que en EE, la actividad de catalasa fue alta al inicio y disminuyó a medida que aumentó la biomasa (igual que en los controles). Con los otros tres extractos dicha actividad se mantuvo baja y constante durante todos los días muestreados.

En las actividades de las enzimas ligninolíticas se observó que en los extractos polares, el patrón es muy similar a los controles durante la primera parte de la cinética (aunque los valores de biomasa son distintos). En EE solamente se observa una disminución de actividad de MnP y un subsiguiente aumento; también la lacasa se incrementó a partir de los 4 mg/mL. Con EA disminuyeron Lac y MnP para después registrarse un aumento en las cuatro actividades enzimáticas, seguido de un decremento en Lac y AAO, únicamente.

Los extractos de origen no polar fueron distintos entre ellos y con respecto al control. En ambos la actividad de AAO se detectó al principio y presentó oscilaciones a lo largo del cultivo. Garzillo *et al.* (1992) demostraron que en medios con menor cantidad de nutrientes, la actividad de AAO se presenta más temprano durante el cultivo, a diferencia de lo obtenido con medios nutritivos, *v.g.*, EE y EA.

La lacasa y la AAO cooperan para la deshidrogenación de compuestos aromáticos, prevención de la repolimerización de compuestos fenólicos, así como en la reducción de lignosulfonatos solubles (Bourbonnaise y Paige, 1988; Guillén *et al.*, 2000; Marzullo *et al.*, 1995). Lo anterior podría estar relacionado con que la lacasa y la AAO aumentan y disminuyen al mismo tiempo en los tratamientos EE, EA y EC.

Cuadro 6. Orden en el que fueron detectados los aumentos (↑) y disminuciones (↓) de actividad enzimática dependiendo del extracto de madera que fue probado.

B* (mg/mL)	2.2	2.6	3.8	4.5	4.8
EE	↑ **Cat**	↑ **LiP**	↑ **Lac, AAO, MnP,**		↑ **Lac, MnP**
		↓ **Cat**	↓ **LiP**	↓ **MnP,**	
			Cat	*Lac, AAO, LiP, Cat*	*AAO LiP, Cat*

B* (mg/mL)	2.1	3	3.6	3.8	4	4.2
EA		↑ **LiP**	↑ **Lac, AAO, MnP**		↑ **Lac, AAO, LiP, MnP**	
			↓ **LiP**	↓ **Lac, MnP**		↓ **Lac, AAO**
	Cat	*Cat*	*Cat*	AAO, LiP, *Cat*	*Cat*	LiP, MnP, *Cat*

B* (mg/mL)	2.3	3	3.5	3.8	4	4.2
EC	↑ **AAO, LiP**	↑ **Lac**	↑ **MnP**	↑ **Lac, AAO, LiP,**		
		↓ **LiP**	↓ **Lac, AAO**	↓ **MnP**	↓ **Lac, AAO, LiP,**	
	Cat	AAO *Cat*	LiP, *Cat*		MnP, *Cat*	Lac, AAO, MnP,LiP, *Cat*

B* (mg/mL)	1.7	2	2.6	3.1		3.6	3.8
ET	↑ **AAO**	↑ **Lac, MnP**	↑ **LiP**	↑ **MnP**	↑ **LiP**	↑ **AAO, MnP**	
		↓ **AAO**	↓ **MnP**	↓ **AAO, LiP**	↓ **MnP**	↓ **LiP**	↓ **MnP**
	Cat	*Cat*	*Lac, AAO, Cat*	*Lac, Cat*	*Lac, cat, AAO*	*Lac, Cat*	*Lac, AAO, LiP, Cat*

* La biomasa (B) es el peso al cual fue detectado el cambio. En el área sombreada se indican las actividades que no cambiaron.

En un estudio realizado con esteroles provenientes de maderas, se vio que la presencia de estos compuestos provocan un aumento considerable de MnP al principio y la actividad de lacasa no varía durante la incubación (Saparrat *et al.*, 2004). El tratamiento con ET es el único en donde se presentó actividad de MnP desde el principio y la de lacasa se mantuvo constante a partir del primer incremento. Es probable que el extracto toluénico contuvo una gran cantidad de sustancias liposolubles.

Cuando se suplementó la mezcla de extractos a los cultivos, se vio que el orden en que se presentaron los cambios en las actividades enzimáticas fue distinto a lo encontrado con los extractos probados de manera independiente. La actividad de MnP se detectó desde el principio junto con la AAO, seguidas de la LiP. La lacasa se cuantificó a una biomasa mayor de 6 mg/mL, encontrándose un solo pico. Las actividades de LiP y MnP no oscilaron coordinadamente, sino hasta el final cuando el peso fue de 7 mg/ml (Cuadro 7).

Al cultivar *Pleurotus eryngii* en presencia o ausencia de compuestos aromáticos, se demostró que la actividad de AAO se presenta durante todo el crecimiento activo del hongo (Guillén y Evans, 1994). Lo anterior se relaciona con el hecho de que la actividad enzimática de AAO fue la única que aumentó y disminuyó durante el tiempo de crecimiento, en todos los tratamientos evaluados.

Con la lignina comercial se obtuvo lo siguiente: la catalasa se comporta igual que en el control; la primera actividad ligninolítica detectada fue la de AAO, seguida de la LiP, MnP y Lac. En estas tres últimas se detectó un solo pico de actividad, disminuyendo la de lacasa y se mantuvo constante cuando se incrementó la MnP, mientras que MnP, LiP y AAO bajaron en el peso más alto (6.8 mg/mL).

Cuadro 7. Orden en el que fueron detectados los aumentos (↑) y disminuciones (↓) de actividad enzimática al probar la mezcla de extractos y la lignina comercial.

B* (mg/mL)	3.1	4	5		5.5	6	7	
M	↑ **AAO, MnP,**		↑ **MnP, Cat**	↑ **AAO**	↑ **MnP, LiP**	↑ **Lac**	↑ **Lac, AAO, LiP**	↑ **MnP**
		↓ **AAO, MnP,**		↓ **MnP**	↓ **AAO**	↓ **LiP**		↓ **Lac, AAO, LiP**
	Cat	*Cat*	AAO	*Cat*	*Cat*	MnP, *Cat*	MnP, Cat	*Cat*

B (mg/mL)	2.5		2.7	4.5	5	6	6.8
L	↑ **Cat**	↑ **AAO Cat,**		↑ **AAO, LiP**	↑ **Lac**	↑ **AAO, MnP**	
			↓ **AAO, Cat**		↓ **AAO**	↓ **Lac**	↓ **AAO, LiP, MnP**
				Cat	LiP, *Cat*	LiP, *Cat*	Lac, *Cat*

* La biomasa (B) es el peso al cual fue detectado el cambio. En el área sombreada se indican las actividades que no cambiaron.

La detección de lacasa en etapas avanzadas del cultivo se relaciona con el hecho de que esta enzima en presencia de la lignina, participa principalmente en la oxidación de unidades fenólicas y no fenólicas, producto de la degradación de la lignina como fue descrito para *P. eryngii* (Muñoz *et al.*, 1997). La AAO funciona como productora de especies de oxígeno reactivas a partir de la oxidación de alcoholes aromáticos (Guillén *et al.*, 1992) razón por la cual se presentan valores altos al inicio del cultivo.

En los tratamientos con EE, EA, EC y L, así como en el control, la actividad de LiP se detectó antes que la de MnP, lo que podría estar relacionado con su participación en los pasos iniciales de la degradación de la lignina, ya que actúa sobre subunidades no fenólicas, las cuales conforman el mayor porcentaje del polímero y tiene un potencial redox mayor que la MnP (Faison y Kirk, 1985; Bonnaime y Jeffries 1990; Higuchi 1990; Martínez *et al.*, 1996, en Camarero *et al.*, 1999; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2001).

En el control y los extractos probados de forma independiente, se observaron oscilaciones coordinadas de MnP y LiP; cuando la LiP disminuyó, la MnP aumenta y viceversa. Este mismo efecto se ha visto en especies de *Pleurotus* y *Phanerochaete*, cuando son sometidos a tratamientos para estudiar el efecto del nitrógeno y la oxigenación del cultivo (Bonnaime y Jeffries 1990; Zhao *et al.*, 1996).

En *P. chrysosporium* se encontró que la actividad de catalasa es alta al inicio y su disminución coincide con un aumento en la actividad de LiP (Baldrian *et al.*, 1995; Bourbonnais & Paice, 1998; Berlinki *et al.*, 2003) al igual que en este estudio, cuando se probó el efecto de L, EA, así como en el control.

En este trabajo se encontró que las distintas enzimas cambian cuantitativa y cualitativamente, orden con el cual aumentan y disminuyen a lo largo del cultivo, dependiendo de la composición del medio. Se sabe que los cambios en actividad y expresión de las distintas enzimas ligninolíticas están

regulados por nutrientes. Además se ha comprobado que la expresión diferencial a nivel de ARNm depende de los cambios en el sustrato, la especie y las condiciones de cultivo (Faison y Kirk, 1985; Orth *et al.*, 1993; Sarkar *et al.*, 1997). El presente estudio comprueba que los distintos componentes de la madera, separados de acuerdo con su solubilidad, afectan el crecimiento y el patrón de actividad de las enzimas ligninolíticas de *Lentinula edodes* en un sistema *in vitro*.

CONCLUSIONES

La actividad extracelular de las principales enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, lacasa y AAO) y la biomasa del hongo *Lentinula edodes* cambiaron cuantitativamente y en función del extracto de madera de vid añadido al medio de cultivo.

La mezcla de extracto y la lignina tuvieron mayor influencia sobre la actividad de las enzimas ligninolíticas que los extractos suplementados independientemente.

Las actividades enzimáticas máximas y la biomasa mostraron baja concordancia a lo largo de las cinéticas en los distintos tratamientos.

RECOMENDACIONES

Realizar un análisis exhaustivo para determinar la composición de cada uno de los extractos de madera, con la finalidad de saber qué compuestos específicamente son los que provocan las respuestas observadas en este trabajo.

Evaluar las combinaciones de extractos, ya que con la mezcla se obtuvieron resultados diferentes a lo observado con los suplementos aplicados de forma independiente.

BIBLIOGRAFÍA

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

Baca-Cota, A.M. 2003. Efecto del extracto de madera de vid sobre el crecimiento del hongo comestible *Pleurotus* spp. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 21. Bacum, Sonora.

Baldrian, P., C. In Der Wiesche, J. Gabriel, F. Nerud, F. Zadrazil. 2000. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. App. Env. Microbiol. 66: 2471-2478.

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

Beltrán-García, M.J., A. Orozco, I. Samayoa, T. Oruga. 2001. Lignin degradation products from corn stalks enhance notable the radial growth of basidiomycete mushroom mycelia. Rev. Soc. Quím. Méx. 45: 77-81.

Böckle, B., M.J. Martínez, F. Guillén, A.T. Martínez. 1999. Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. Appl. Env. Microbiol. 65: 923-928.

Boer, C.G., L. Obici, C.G. Marques de Souza, R.M. Peralta. 2004. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzume. Biores. Technol. 94: 107-112.

Bonnarme, P., W.T. Jeffries. 1990. Mn (II) regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidases from ligin-degrading white rot fungi. Appl. Env. Microbiol. 56: 210-217.

Bourbonnais, R., M.G. Paige. 1988. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. Biochem J. 255: 445-450.

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

Brisko, N. A., B.G. Babitskay, B.R. Bilay, N.Y. Mitropolskaya. 2002. Biological active substances from *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*. In: Sánchez, J. E., G. Huerta, E. Montiel (eds.). *Proceedings of the Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. pp. 383-389.

Camarero, S., S. Sarkar, F.J. Ruiz-Dueñas, M.J. Martínez, A.T. Martínez. 1999. Description of versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. App. Env. Microbiol. 274: 10324-10330.

Cancel, A.M., A.B. Orth, M. Tien. 1993. Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the lignlinolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Env. Microbiol. 59: 2909-2913.

Candeias, L.P., P.J. Harvey. 1995. Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation. J. Biol. Chem. 270: 16745-16748.

Chen, Y., B. Chefetz, R. Rosario, J.D.H. van Heemst, C.P. Romaine, P.G. Hatcher. 2000. Chemical nature and composition of compost during mushroom growth. Compost Sci. and Utiliz. 8:347-359.

Cohen, G., D. Dembiec, J. Marcus. 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. Anal. Biochem. 34: 30-38.

Crestini, C., A.D´annibale, G.G. Sermanni, R. Saladino. 2000. The reactivity of phenolic and non-phenolic residual kraft lignin model compounds with Mn(II)-peroxidase from *Lentinula edodes*. Bioorg & Med. Chem. 8: 433-438.

Curreli, N., F. Sollai, L. Massa, O. Comandini, A. Rufo, E. Sanjust, A. Ronaldi, A.C. Rinaldi. 2001. Effects of plant-derived naphtoquinones on the growth of *Pleurotus sajor-caju* and degradation of the compounds by fungal cultures. J. Basic Microbiol. 41: 253-259.

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

Faison, B.D., T.K. Kirk. 1983. Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. App. Env. Microbiol. 4: 1140-1145.

Ferrara, M.A., E.P.S. Bon, J.S.A. Neto. 2002. Use of steam liquor from sugar cane sugar bagasse for lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium*. App. Biochem. Biotechnol. 98: 289-299.

Forney, L.J., C.A. Reddy, M. Tien, S.D. Aust. 1982. The involvement of hydroxyl radial derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 257: 11445-11462.

Garzillo, A.M.V., S.D. Paolo, G. Buria, V. Bounocore. 1992. Differently-induced extracellular phenol oxidases from *Pleurotus ostreatus*. Phytochemistry. 31: 3685-3690.

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

Guillén, F., C.S. Evans. 1994. Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H_2O_2 production by *Pleurotus eryngii*. Appl. Env. Microbiol. 60: 2811-2817.

Guillén, F., A.T. Martínez, M.J. Martínez. 1992. Substrate specificity and properties of the aril alcohol oxydase from the lignolitic fungus *Pleurotus eringii*. Eur. J. Biochem. 209: 603-611.

Green, T. R. 1977. Significance of glucose oxidase in lignin degradation. Nature 268: 78-80.

Grant-Reid, J.S. 1997. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrate. In: P. Dey, M., J.B. Harbone (eds.). *Plant Biochemistry*. Academic Press. Londres, Inglaterra. pp. 205-235.

Green III, F., T.L. Highley. 1997. Mechanism of brown-rot decay: paradigm or paradox. Int. Biodet. Biodeg. 39: 113-124.

Ha, H.C., Y. Honda, M. Kuwahara. 2001. Production of manganese peroxidase by pellets culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. App. Microbiol. Biotechnol. 55: 704-711.

Hammel, K.E., M. Tien, B. Kalyanaraman, T.K. Kirk. 1985. Mechanism of oxidative $C\alpha$-$C\beta$ cleavage of lignin model dimmer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem. 260: 8348-8353.

Han, Y.H., W.T. Weng, L.C. Chen, S. Cheng. 1981. Physiology and ecology of *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. In: N. G. Nair y A. D. Clift (eds.). *Mushroom Science XI. Proceedings of the Eleventh International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi*. Sydney, Australia. pp. 623-657.

Hatvani, N. 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. Int. J. Antimicrob. Ag. 17: 71-74.

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

Jonathan, S.G., I.O. Fasidi. 2001. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *Schizophyllum commune* (Fr. Ex. Fr.) from Nigeria. Food Chem. 75: 303-307.

Kelley, R.L., C.A. Reddy. 1986. Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 166: 269-274.

Kerem, Z., D. Friesem, Y. Hadar. 1992. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysisporium*. App. Env. Microbiol. 58: 1121-1127.

Kersten, P.J. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2936-2940.

Kersten, P.J., T.K. Kirk. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H_2O_2 production by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 169: 2195-2201.

Kishi, K., H. Wariishi, L. Marquez, H.B. Dunford, M.H. Gold. 1994. Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. Biochemistry. 33: 8694-8701.

Kuan, I.C., M. Tien. 1993. Estimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1242-1246.

Kurtzman, R.H. 1976. Nutrition of *Pleurotus sapidus*, effect of lipids. Mycologia. 68: 286-295.

Leatham, G.F. 1985. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinula edodes* during degradation of lignocellulosic medium. App. Env. Microbiol. 50: 859-867.

Leatham, G.F. y T.J. Leonard. 1988. Biology and physiology of shiitake mushroom cultivation. USDA, USA.

Leonowicz, A., A. Matuszewaska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojtas-Wasilewska, N.S. Cho, M. Hofrichter. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi (review). Fungal Gen. and Biol. 27:175-185.

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

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

Morais, M.H., A.C. Ramos, M. Matos, E.J. Santos-Oliveira. 1999. Production of shiitake mushroom (*Lentinula edades*) on lignocellulosic residues. Food. Sci. Technol. 6: 123-128.

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

Odumi, S., K. Tominaga, S. Kundou, H. Hori, T. Koide, S. Hara, M. Isemura, S. Tsunasuawa. 1999. The inhibitory properties and primary structure of novel serine proteinase form the fruiting body of basidiomycete, *Lentinus edodes*. Eur. J. Biochem. 262: 915-923.

Orth, A.B., D.J. Royse, M. Tien. 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. Appl. Env. Microbiol. 59 :4017-4023.

Philippoussis, A., P. Diamantopoulou, G. Zervakis. 2002. Monitoring of mycelial growth and fructification of *Lentinula edodes* on several agricultural

residues. In: Sánchez, J. E., G. Huerta, E. Montiel (eds.). *Proceedings of the Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. 279-287.

Piñol, M.T., J. Palazón. 1993. Metabolismo secundario. In: J. Azcó-Bieto y M. Talón (eds.). *Fisiología y Biogímica Vegetal.* Interamericana-McGraw-Hill. Madrid, España. pp. 237-284.

Rossi, I.H., A.C. Monteiro, J.O. Machado, J.C. Barbosa. 2003. Supplementation of sugarcane bagasse with rice bran and sugarcane molasses from shiitake (*Lentinula edodes*) spawn production. Braz. J. Microbiol. 34: 32-37.

Royse, D. J. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. Mycologia 77: 756-762.

Ruiz-Dueñas, F.J., S. Caramero, M. Pérez-Boada, M.J. Martínez, A.T. Martínez. 2001. A new versatile peroxidase from *Pleurotus.* Biochem. Soc. Trans. 29: 116-122.

Ruiz-Dueñas, F.J., F. Guillén, S. Caramero, M. Pérez-Boada, M.J. Martínez, A.T. Martínez. 1999. Regulation of peroxidase transcripts levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii.* Appl. Env. Microbiol. 65: 4458-4463.

Sánchez, A., F. Ysunza, M.J. Beltrán-García, M. Esqueda. 2002. Degradation 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.

Saparrat, M.C.N., M.J. Martínez, A.T. Martínez, A.M. Arambarri. 2004. Degradación de B-sitosterol por basidiomycetes lignívoros en cultivo líquido y su relación con la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares. Rev. Mex. Micol. 19.

Sarkar, S., A.T. Martínez, M.J. Martínez. 1997. Biochemical and molecular characterization of manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. Biochem. Biophys. Acta. 1339: 23-330.

Schlosser, D. y C. Höfer. 2002. Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. Appl. Env. Microbiol. 68: 3514-3521.

Shuen, S.K., J.A. Buswell. 1992. Effect of lignin derived phenols and their methylated derivatives on the growth of *Lentinula* spp. Lett. App. Microbiol. 15: 12-14

Song, C.H., K.Y. Chow. 1987. A synthetic medium from the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. Mycologia. 79: 866-876.

Suzuki, H., K. Iiyama, O. Yushida, S. Yamasaki, N. Yamamoto, S. Toda. 1990. Structural characterization of the inmunoactive and antiviral water-solubilized lignin and extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). Agric. Biol. Chem. 54: 479-487.

Szklarz, G., A. Leonowicz. 1986. Cooperation between fungal laccase and glucose oxidase in the degradation of lignin derivatives. Phytochemistry 25: 2537-2539.

Tan, Y.H. y S.T. Chang. 1989. Effect of growth regulators, enzyme inhibitors and stimulatory additives on the vegetative development and fructification of *Lentinula edodes*. In: K. Grabbe and O. Hilber (eds.) *Mushroom Science XII, Proceedings of Twelfth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi*. Braunschweig, Alemania. pp. 267-277.

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

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

Van, C.H., S.C Martin, C. Snape, D.G. Abbott. 2001. Degradation of lignin in wheat straw during growth of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) using off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide and solid state ^{13}C NMR. J. Agric. Food Chem. 49: 2709-2716.

Varela, E., A.T. Martínez, M.J. Martínez. 1999. Molecular cloning of aril-alcohol oxydase from the fungus *Pleurotus eringii*, an enzyme involved in lignin degradation. Biochem. J. 341: 113-117.

Wardle, K.E., L.C. Schiler. 1969. The effects of various lipids on growth of mycelium of *Agariucs bisporus*. Mycologia 61: 305-310.

Warishii, H., M.H. Gold. 1990. Lignin peroxidase conpound III: Mechanism of formation and decomposition. J. Biol. Chem. 265: 2070-2077.

Wariishi, H., L. Akileswaran, M.H. Gold. 1988. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxydase states and the catalytic cycle. Biochemistry. 27: 5365-5370.

Yoshimura, H., T. Hayakawa. 1991. Acceleration effect of wood vinegar from *Quercus crispula* on the micelial growth of some basidiomycetes. Trans. Mycol. Soc. Japan. 32: 55-64.

Zhao, J., T.H. de Koper, B.J. Janse. 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.

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

Van, C.H., S.C Martin, C. Snape, D.G. Abbott. 2001. Degradation of lignin in wheat straw during growth of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) using off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide and solid state ^{13}C NMR. J. Agric. Food Chem. 49: 2709-2716.

Varela, E., A.T. Martinez, M.J. Martinez. 1999. Molecular cloning of aril-alcohol oxydase from the fungus *Pleurotus eringii*, an enzyme involved in lignin degradation. Biochem. J. 341: 113-117.

Wardle, K.E., L.C. Schiler. 1969. The effects of various lipids on growth of mycelium of *Agaricus bisporus*. Mycologia 61: 305-310.

Warishii, H., M.H. Gold. 1990. Lignin peroxidase conpound III: Mechanism of formation and decomposition. J. Biol. Chem. 265: 2070-2077.

Wariishi, H., L. Akileswaran, M.H. Gold. 1988. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxydase states and the catalytic cycle. Biochemistry. 27: 5365-5370.

Yoshimura, H., T. Hayakawa. 1991. Acceleration effect of wood vinegar from *Quercus crispula* on the micelial growth of some basidiomycetes. Trans. Mycol. Soc. Japan. 32: 55-64.

Zhao, J., T.H. de Koper, B.J. Janse. 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.