



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE GENETICA FORESTAL

Cambios en la actividad enzimática de *Pleurotus* spp.
cultivado en pulpa de café en confrontación con
Trichoderma spp.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE

MAESTRA EN

ECOLOGÍA FORESTAL

PRESENTA

Dulce Ma. Murrieta Hernández

DIRIGIDA POR

Dra. Lourdes G. Iglesias Andreu

Xalapa, Veracruz, México

Agosto, 2002

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	iii
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1. Importancia del cultivo de hongos comestibles	4
3.2. Valor nutricional de los hongos comestibles.....	5
3.3. El género <i>Pleurotus</i> : taxonomía, descripción y ecología.....	6
3.3.1 Descripción taxonómica de las especies de <i>Pleurotus</i> en estudio	7
3.3.1.1. <i>Pleurotus djamor</i> (Fr.) Boedjin	7
3.3.1.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. ex Fr.) Kumm	8
3.3.1.3. <i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Qué.	10
3.4. El género <i>Trichoderma</i> : taxonomía, descripción y ecología	11
3.4.1. Descripción taxonómica de las especies de <i>Trichoderma</i> en estudio	12
3.4.1.1. <i>Trichoderma resei</i> E.G. Simmons.....	12
3.4.1.2. <i>Trichoderma viride</i> Pers. ex S.F. Gray	13
3.5. Ciclos de vida de <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma</i>	14
3.6. Productos lignocelulósicos	16
3.6.1. Celulosa	16
3.6.2. Lignina.....	17
3.7. Degradación de productos lignocelulósicos por hongos	19
3.8. Aspectos enzimáticos	20
3.9. Descripción de las principales enzimas ligninolíticas	21
3.9.1. Lacasa.....	21
3.9.2. Peroxidasa dependiente de manganeso	23
3.9.3. Celulasa	25
3.10. Interacción de <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma</i>	26
4. MATERIAL Y MÉTODOS	28

4.1. Ubicación de los experimentos.....	28
4.2. Selección y mantenimiento de las especies bajo estudio.	28
4.3. Experimento. I. Caracterización bioquímica de las cepas de <i>Pleurotus</i> bajo estudio.....	30
4.3.1. Análisis estadístico.....	31
4.4. Experimento II. Análisis de la cinética de la actividad enzimática.....	32
4.4.1. Preparación de la semilla.....	33
4.4.2. Preparación y siembra del sustrato.....	33
4.4.3. Diseño experimental.....	33
4.4.4. Evaluación.....	34
4.4.5. Preparación del extracto enzimático.....	34
4.4.6. Determinación de la cinética de la actividad enzimática.....	34
4.4.7. Determinación de la concentración de fenoles solubles.....	36
4.4.8. Análisis estadístico.....	37
4.5. Experimento. III. Análisis del antagonismo sobre la producción de lacasa.....	38
4.5.1. Inducción de lacasa.....	39
4.5.1.1. Confrontación de talos.....	39
4.5.1.2. Efecto de los metabolitos extracelulares de <i>Trichoderma</i>	39
4.5.1.3. Efecto de enzimas líticas.....	40
4.5.1.4. Efecto del medio YEM-Indulina.....	40
4.5.2 Análisis estadístico.....	40
4.5.1. Electroforesis.....	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
5.1. Experimento I. Caracterización bioquímica de las cepas bajo estudio.....	42
5.1.1. Análisis multivariado de la composición bioquímica.....	45
5.2. Experimento II. Análisis cuantitativo de la actividad enzimática.....	48
5.3. Experimento III. Análisis del antagonismo sobre la producción de lacasa.....	54
6. CONCLUSIONES.....	58
7. RECOMENDACIONES.....	60
8. LITERATURA CITADA.....	61
ANEXO 1. Artículo publicado como requisito parcial.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. <i>Pleurotus djamor</i>	8
Figura 3. <i>Pleurotus pulmonarius</i>	10
Figura 4. <i>Trichoderma resei</i>	13
Figura 5. <i>Trichoderma viride</i>	14
Figura 6. Ciclo de vida de un basidiomicete.....	15
Figura 7. Fórmula química de la Celulosa (Lucas, <i>et al.</i> , 2001).....	17
Figura 8. Fórmula química de la lignina (Lucas <i>et. al.</i> , 2001).	18
Figura 9. Procedimiento experimental seguido en el estudio.	29
Figura 10. Procedimiento experimental seguido para la caracterización bioquímica de seis cepas de <i>Pleurotus</i>	30
Figura 11. Procedimiento experimental seguido para el estudio de la cinética de la actividad enzimática	32
Figura 12. Protocolo seguido para el estudio de la cinética de la actividad de lacasa	35
Figura 13. Protocolo seguido para la determinación de la cinética de la actividad de peroxidasa dependiente de manganeso.	35
Figura 14. Protocolo seguido para la determinación de la cinética de la actividad enzimática celulasa	36
Figura 15. Procedimiento seguido para la determinación de la concentración de fenoles solubles.....	37
Figura 16. Procedimiento experimental seguido para el análisis del antagonismo sobre la producción de lacasa.	38
Figura 19. Representación gráfica de la distribución de las variantes de proteínas totales y esterases de las seis cepas de <i>Pleurotus</i>	47
Figura 20. Dendrograma del análisis de conglomerado efectuado a los datos bioquímicos obtenidos. Grupo I <i>P. pulmonarius</i> IE-137 e IE-225; Grupo II <i>P. djamor</i> IE-121 e IE-218 y Grupo III <i>P. ostreatus</i> IE-38 e IE-49.....	48
Figura 21. Cinética de la actividad enzimática de lacasa durante el desarrollo vegetativo de seis cepas de <i>Pleurotus</i> (IE-38, IE-49, IE-121, IE-137, IE-218, IE-225), confrontadas con tres cepas de <i>Trichoderma</i> (testigo de <i>Pleurotus</i> , v1= <i>Trichoderma viride</i> IE-637, v2= <i>Trichoderma viride</i> IE-638 y Tr= <i>Trichoderma resei</i> IE-639).....	49

Figura 22. Cinética de la actividad enzimática de peroxidasa dependiente de manganeso durante el desarrollo vegetativo de seis cepas de <i>Pleurotus</i> (IE-38, IE-49, IE-121, IE-137, IE-218, IE-225), confrontadas con tres cepas de <i>Trichoderma</i> (testigo de <i>Pleurotus</i> , v1= <i>Trichoderma viride</i> IE-637, v2= <i>Trichoderma viride</i> IE-638 y Tr= <i>Trichoderma resei</i> IE-639).....	50
Figura 23. Cinética de la actividad enzimática de celulasa durante el desarrollo vegetativo de seis cepas de <i>Pleurotus</i> (IE-38, IE-49, IE-121, IE-137, IE-218, IE-225), confrontadas con tres cepas de <i>Trichoderma</i> (testigo de <i>Pleurotus</i> , v1= <i>Trichoderma viride</i> IE-637, v2= <i>Trichoderma viride</i> IE-638y Tr= <i>Trichoderma resei</i> IE-639).....	51
Figura 24. Degradación de fenoles solubles durante el desarrollo vegetativo de seis cepas de <i>Pleurotus</i> (IE-38, IE-49, IE-121, IE-137, IE-218, IE-225), confrontadas con tres cepas de <i>Trichoderma</i> (testigo de <i>Pleurotus</i> , v1= <i>Trichoderma viride</i> IE-637, v2= <i>Trichoderma viride</i> IE-638 y Tr= <i>Trichoderma resei</i> Tr= <i>Trichoderma resei</i> IE-639).	52
Figura 25. Actividad enzimática de lacasa en medio líquido. (T1= testigo de <i>Pleurotus</i> , T2= testigo de <i>Trichoderma</i> , Ct= confrontación de talos de <i>Pleurotus</i> y <i>Trichoderma</i> , NT= <i>Pleurotus</i> en metabolitos de <i>Trichoderma</i> , MP= <i>Trichoderma</i> en metabolitos de <i>Pleurotus</i> , EL= <i>Pleurotus</i> con enzimas líticas, Ind= <i>Pleurotus</i> en YEM-Indulina, YEM= extracto de malta con levadura). Las letras de las barras corresponden a los grupos formados por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).....	56
Tabla 1. Producción mundial de hongos comestibles en 1986 y 1994, según Chang (1996).....	5
Tabla 2. Especies utilizadas en el estudio.	28
Tabla 3. Clave para la determinación bioquímica de las seis cepas de <i>Pleurotus</i> spp. mediante el empleo de las variantes polimórficas de proteínas totales y esterases detectadas en el estudio.	44
Tabla 4. Porcentaje de la variabilidad explicada según el Análisis Factorial de Correspondencias Múltiples aplicado al polimorfismo isoenzimático.	45
Tabla 5. Análisis de la contribución de los vectores propios a la formación de los ejes 1 y 2 por cada banda de proteínas totales y esterases (los números en negrita son significativos).	46

RESUMEN

Este estudio se realizó con el objetivo de caracterizar bioquímicamente seis cepas de *Pleurotus* (IE-121, IE-218, IE-38, IE-49IE-137, IE-225), para determinar la capacidad para resistir los ataques de mohos antagónicos del género *Trichoderma* (IE-637, IE-638, IE-639) a través de la actividad enzimática. Para ello, *Pleurotus* fue cultivado en pulpa de café estéril con y sin inoculación de *Trichoderma* de donde se obtuvieron las muestras para elaborar el extracto y así determinar la actividad de las enzimas, lacasa, peroxidasa dependiente de manganeso y celulasa. Se estudió el efecto del antagónico sobre la producción de lacasa cultivando *Pleurotus* en medio líquido y por medio de un análisis electroforético. Los resultados mostraron un marcado polimorfismo bioquímico entre las cepas de *Pleurotus* y el análisis estadístico formó tres grupos de dos cepas (cada grupo correspondió con las tres especies de *Pleurotus* estudiadas. La producción de la actividad enzimática de la lacasa y la peroxidasa dependiente de manganeso, aumentaron ante la presencia de *Trichoderma*; también se presentó una modificación en el patrón de producción enzimática; ambas características estuvieron determinadas por la habilidad competitiva de las cepas de *Trichoderma*. El efecto del antagonismo entre *Pleurotus* y *Trichoderma*, sobre la producción de lacasa en medio líquido, fue similar al observado en sustrato, quedando demostrado que presencia de *Trichoderma* no produce isoformas de lacasa, sino que únicamente estimula la producción de ésta. Por otra parte, la presencia de indulina en el medio, induce la producción de lacasa, presentando un patrón similar al observado en las muestras de sustrato; esto podría constituir un método de selección de cepas capaces de resistir mohos antagónicos del género *Trichoderma*.

SUMMARY

The biochemical characterization of six *Pleurotus* strains (IE-121, IE-218, IE-38, IE-49IE-137, IE-225) and to determine the capacity to resist the attacks of antagonistic molds (*Trichoderma*; IE-637, IE-638, IE-639) through the enzymatic activity, were the objectives of this study. *Pleurotus* was cultivated in sterile coffee pulp with and without inoculation of *Trichoderma*. Samples were obtained to elaborate the extract and to determine the activity of the enzymes (laccase, manganese peroxidase and celulase). The effect of the antagonistic on the laccase production of cultivating *Pleurotus* in liquid medium was analyzed by electrophoresis analysis. The results showed a marked biochemical polymorphism of the strains of *Pleurotus*. Three groups of two strains (each one corresponded with species of *Pleurotus* studied) were formed (Correspondence analysis). The production of the enzymatic activity of the laccase and manganese peroxidase, were increased when *Trichoderma* was present in the medium and a modification in the pattern of enzymatic production was also presented; both characteristics were determined by the competitive ability of the strains of *Trichoderma*. The effect of the antagonism between *Pleurotus* and *Trichoderma* on the laccase production in liquid medium, was similar to the one observed in substrate. We showed that *Trichoderma* doesn't produce laccase isoforms and only stimulates the laccase production. On the other hand, the induline in the medium induced the laccasa production, presenting a similar patron to the one observed in the substrate samples. We suggested that it could be a method of strains selection to resist antagonistic molds like *Trichoderma*.

1. INTRODUCCIÓN

México ocupa el quinto lugar a nivel mundial como productor de café (Consejo Mexicano del Café, 2000) y a través del proceso para la obtención del grano se producen más de 100 mil de toneladas anuales de desechos orgánicos conocidos como pulpa de café (Russos *et al.*, 1995). A pesar de que la pulpa posee un alto contenido de hidratos de carbono y proteínas, la presencia de cafeína, taninos y polifenoles representa un problema para su uso como materia prima (Martínez *et al.*, 1984; Zuluaga, 1989). Es por ello que la pulpa no tienen ninguna aplicación comercial, y se considera como el principal agente contaminante de ríos y lagos localizados cerca de regiones productoras de café (Russos *et al.*, 1995). Con los avances de la biotecnología, principalmente en el ámbito enzimológico y tecnología de fermentación, se han abierto nuevas vías para la utilización de desechos como éste (Pandey *et al.*, 2000).

Por otra parte, en la naturaleza existen hongos causantes de la pudrición blanca que pueden crecer en una amplia variedad de desechos lignocelulósicos, tales como paja de cereales, bagazo de caña, aserrín, desechos de algodón, hojas de plátano y pulpa de café, entre otros. Muchos hongos ligninolíticos (por ejemplo el género *Pleurotus*), pueden utilizar estos desechos como sustrato, dependiendo de la producción y secreción de enzimas (celulasas, hemicelulasas, ligninasas). Los basidiomicetes, producen enzimas ligninolíticas como: lacasa, lignina peroxidasa y peroxidasa dependiente de manganeso; la producción de estas enzimas constituye parte importante del proceso de colonización y resulta determinante en la producción de cuerpos fructíferos (Buswell *et al.*, 1996; Giardina *et al.*, 1999, Okamoto *et al.*, 2000; Ohga *et al.*, 2000).

Las especies del género *Pleurotus* producen algunas enzimas oxidasas e hidrolasas, las cuales son responsables de la degradación de materiales lignocelulíticos. Algunos autores han sugerido que los cambios en la actividad extracelular de las enzimas lacasa y celulasa están directamente relacionados con el crecimiento y formación de primordios. Dentro de este contexto caben citar los trabajos llevados a cabo por Kaviyarasan y Natarajan (1997) en *Pleurotus cornicupae* var. *citrinopetalus*; por Mata y Savoie (1998a) con *Lentinula edodes* y por Savoie (1998) con *Agaricus bisporus*.

Mata y Savoie (1998b), han indicado que bajo condiciones no estériles de cultivo de hongos comestibles los competidores (contaminantes) pueden contribuir para elevar los niveles de actividad enzimática. Estos autores al estudiar la acción antagónica entre *Trichoderma* sp. y *Lentinula edodes* por la formación de una línea oscura entre los micelios de los hongos, observaron que *Trichoderma* sp. induce cambios en el patrón de isoenzimas de lacasa secretadas por *L. edodes*. Otros autores (Ohmasa y Cheong, 1999; Mamoun *et al.*, 2000), han realizado estudios sobre *L. edodes* y *Agaricus bisporus* y han evaluado la acción antagónica de las mismas con otras especies del género *Trichoderma*. Sin embargo, no se cuenta en la actualidad con suficiente información sobre el género *Pleurotus* y su producción enzimática en condiciones de confrontación con algún antagonista, que puede ser de utilidad para el control de ésta enfermedad provocada por *Trichoderma* en cultivos comerciales.

La pulpa de café, según Martínez-Carrera (1987), puede ser usada para el cultivo de hongos comestibles; sin embargo, la proliferación de *Trichoderma* constituye una de las causas principales por la cual la pulpa de café no es utilizada a nivel industrial.

Es por ello que se desarrolló del presente trabajo con el propósito de caracterizar bioquímicamente seis cepas de *Pleurotus* y obtener información acerca modificaciones en la producción de enzimas a lo largo del ciclo de cultivo de *Pleurotus*, así como el efecto antagónico de éstas ante la presencia de *Trichoderma*, con la finalidad de seleccionar y mejorar cepas de *Pleurotus*, adaptadas a su cultivo en pulpa de café.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar bioquímicamente seis cepas de *Pleurotus*, y cultivarlas en pulpa de café para determinar la capacidad para resistir los ataques de mohos antagónicos del género *Trichoderma*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar bioquímicamente a través de los sistemas de proteínas totales e isoenzimas esterasas seis cepas de *Pleurotus*.
- Conocer la cinética de la producción de lacasa peroxidasa dependiente de manganeso y celulasa durante el crecimiento vegetativo de *Pleurotus* sp. cultivado en pulpa de café, en condiciones de confrontación con *Trichoderma* sp.
- Establecer un método apropiado para la selección de cepas de *Pleurotus* a través de la inducción de la actividad enzimática de lacasa.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Importancia del cultivo de hongos comestibles

La industria del cultivo de hongos comestibles, se expandió rápidamente a nivel mundial a partir de la década de los noventa. Hasta hace veinte años, la especie *Agaricus bisporus*, más conocido como champiñón, representaba el 70% de la producción mundial de hongos, sin embargo, aproximadamente quince años después este porcentaje disminuyó al 37%, y paralelamente especies como *Lentinula edodes* (shiitake) y *Pleurotus* spp. (seta) llegaron a constituir en conjunto el 33.1 % (Royse, 1997).

Entre los hongos más ampliamente cultivados en el mundo se encuentran los del género *Pleurotus*, cuyas especies se desarrollan y consumen en grandes cantidades en muchos países del sureste de Asia y recientemente en Europa y Norte América (Lo *et al.*, 2001). De acuerdo con Chang (1996), la producción de *Pleurotus* spp. alcanzó en 1994, casi las ochocientas mil toneladas, que representaron el 16 % del total de la producción mundial de hongos comestibles cultivados (Tabla 1).

Agaricus y *Pleurotus* constituyen en la actualidad dos de los géneros de mayor importancia comercial en Latinoamérica, se estima que producen el 95 y 5% respectivamente, mientras que el cultivo de *L. edodes* se está iniciando a nivel comercial (Martínez-Carrera, 2000). Este mismo autor señala que la introducción en México del cultivo de *Pleurotus* fue en 1974; éste se obtuvo de Europa a partir de bolsas de plástico con paja de trigo inoculada con *P. ostreatus*; ya en México se realizó la incubación y el proceso final del cultivo (fructificación). Con el paso del tiempo se desarrolló una tecnología local para la producción comercial, y con la promoción en el mercado local y regional del producto fresco, se logró el auge actual del cultivo de *Pleurotus* en nuestro país. Este auge se hace evidente con el incremento en la producción de *Pleurotus* 209% observado durante el periodo de 1990 a 1997 en que el consumo *per capita* aumentó de 0.12 kg a 0.346 kg (Martínez-Carrera, *op. cit.*).

Tabla 1. Producción mundial de hongos comestibles en 1986 y 1994, según Chang (1996).

Nombre	1986		1994		Incremento (%)
	1000 ton	%	1000 ton	%	
<i>Agaricus bisporus</i>	1,215	55.8	1,846	37.6	51.9
<i>Lentinula edodes</i>	320	14.7	826	16.8	158.1
<i>Pleurotus spp.</i>	169	7.8	797	16.3	371.6
<i>Auricularia spp.</i>	119	5.5	420	8.5	301.0
<i>Volvariella volvacea</i>	178	8.2	299	6.1	68.0
<i>Flamulina velutipes</i>	100	4.6	230	4.7	130.0
<i>Tremella fuciformis</i>	40	1.8	156	3.2	290.0
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	–	–	55	1.1	–
<i>Pholiota nameko</i>	25	1.1	27	0.6	8.0
<i>Grifola frondosa</i>	–	–	14	0.3	–
Otros	10	0.5	239	4.8	2,290
Total	2,176	100.0	4,909	100.0	125.6

3.2. Valor nutricional de los hongos comestibles

Los hongos se consumen por su palatabilidad y valor nutricional. La palatabilidad se juzga por el color, textura, sabor y olor, pero la determinación nutricional requiere de un trabajo preciso de laboratorio.

En relación a su contenido de proteínas, los cuatro hongos comestibles más populares: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp.* y *Volvariella volvacea* presentan un intervalo de 1.75–3.63% de su peso seco (conteniendo los nueve aminoácidos esenciales para el hombre) (Chang, 1980). De acuerdo con Chang, (1989), el contenido de lípidos varía de 1.1-8.3% con base en su peso seco, con un promedio de 4%; en éstos se ha detectado una alta proporción de ácidos grasos insaturados y un alto porcentaje de ácido linoleico por los que se considera a los hongos como un alimento saludable.

En cuanto al contenido de vitaminas, se ha reportado que los hongos comestibles contienen tiamina, riboflavina, niacina, biotina y ácido ascórbico; además se ha indicado que el ergosterol presente en los hongos, puede ser convertido en vitamina D, con irradiación ultravioleta (Yokokawa y Mitsuhash, 1981).

En lo referente al contenido de carbohidratos, las especies de *Pleurotus* presentan un amplio intervalo de 46.6–81.9% que contrasta con el 60% de carbohidratos detectados en *A. bisporus* (Chang, 1989). Se ha reportado que los polisacáridos solubles en agua, obtenidos de fructificaciones de hongos, tienen la habilidad de inhibir el crecimiento de tumores (Yoshikoda *et al.*, 1975). El contenido de fibra se ha encontrado que varía de 7.4 a 27.6% para las especies de *Pleurotus*, 10.4% en *A. bisporus* y de 4-20% en *V. volvacea* (Crisan y Sands, 1978).

Los hongos también contienen una importante proporción de minerales, los cuales obtienen directamente del sustrato para el crecimiento del micelio para luego trasladarlos a los esporóforos. Se ha estimado que la concentración de algunos elementos como potasio (K), fósforo (P), sodio (Na), calcio (Ca) y magnesio (Mg) constituye alrededor del 56–70% del contenido total de cenizas, siendo el potasio el elemento más abundante (Li y Chang, 1982). El sodio y el calcio se encuentran presentes en igual concentración en todos los hongos, excepto en *L. edodes* donde el calcio se presenta en mayor cantidad. Así mismo se ha encontrado que el contenido de cobre varía de 12.2 – 21.9 ppm para las especies de *Pleurotus* (Chang y Milles, 1989).

3.3. El género *Pleurotus*: taxonomía, descripción y ecología

El término *Pleurotus* proviene del griego “Pleuro” que significa formado lateralmente o en una posición lateral, esto se refiere a la posición del estípite con respecto al píleo (Stamets, 1993).

La sistemática del género *Pleurotus* resulta algo confusa dado que existen dificultades para la identificación taxonómica de las especies de este género. Esto se debe fundamentalmente a la gran variación y la amplia distribución que presenta este género. Al respecto Guzmán (2000), menciona que las investigaciones taxonómicas que se efectúen en este género deberían estar basados en estudios bioquímicos y moleculares, así como en pruebas de entrecruzamiento basadas en el empleo caracteres macro y microscópicos; además este autor recomienda que se consideren también caracteres como el color del basidioma, la esporada y el tipo de sistema hifal; considera que de las 23 especies de *Pleurotus* que han sido reportadas para México, sólo siete son

taxa válidos y el resto son sinónimos. No obstante, se acepta en la actualidad la clasificación taxonómica propuesta por Herrera y Ulloa (1990) para las especies del género *Pleurotus* en estudio:

División: Eumycota

Subdivisión: Basidiomicotina

Clase : Holobasidiomicetes

Orden: Agaricales

Familia: Tricholomataceae

Genero y especies estudiadas: *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedjin
Pleurotus ostreatus (Jack. ex Fr.) Kumm.
Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quél.

3.3.1 Descripción taxonómica de las especies de *Pleurotus* en estudio

3.3.1.1. *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedjin

Guzmán *et al.*, (1993a) reportan para esta especie un pileo de (10-) 30-80 (-100) mm de diámetro, con forma variable de flabeliforme a espatulado, petaloide, de color blanco con tonos rosas en estado joven a blanco, amarillento, blanco grisáceo o gris claro en adultos, con una superficie lisa a finamente tomentosa o velutinoso hacia la base al madurar. Las laminas son adnadas, con frecuencia decurrentes, no muy separadas, de color blanco a amarillento, con bordes enteros. El estípite puede estar ausente, pero cuando está presente mide (5-) 10-20 x (1-) 4-8 (-10) mm, llegando a ser gradualmente delgado en la base, de posición lateral o excéntrico, por su consistencia puede ser sólido, subcoriáceo, la superficie es fibrilosa o finamente tomentosa, de color blanco a blanquecino. El contexto (carne) es de color blanco a ligeramente amarillento, higrófono, compacto, carnoso, con olor farináceo y sabor que desaparece gradualmente al madurar; tiene seis mm de grosor en el pileo, es fibriloso en el estípite. La esporada es de color blanca, grisácea, o gris-amarillenta llegando a ser amarillo miel claro, en ocasiones gris oliváceo claro. Las esporas miden (6.4-) 7.2-9.6 (-10.4) x (3.2-) 4-4.8 μm tienen forma oblongo-elípticas o subcilíndricas con una apícula bien definida, son de pared delgada, hialinas e inamiloides. Los basidios miden (16.8-) 20-28 (-40) x (3.5-) 4-5.6 (-6.4) μm , tetraesporicos, a veces bi o

trispóricos, subpiriformes o claviformes, ventricosos, hialinos, frecuentemente con una fíbula basal. No presentan pleurocistidios. Los queilocistidios miden (12.8-) 16-32(-36) x (4-) 5-9 (-11) μm , son comunes en especímenes jóvenes; son de forma subcilíndrica, subclaviformes, subventricosos, a veces presentan constricciones irregulares, con pared delgada, son hialinos. El sistema hifal es dimítico (Figura 1).

Esta especie está ampliamente distribuida en el trópico y subtrópico, ha sido reportada de Tailandia, Camboya, Singapur, Vietnam, Ceilán, Malasia, Nueva Guinea, Borneo, Japón, Brasil, las Antillas y México. Prefiere maderas tropicales y subtropicales incluyendo además palmas, árboles de caucho y bambú (Stamets, 1993).



Figura 1. *Pleurotus djamor*.

3.3.1.2. *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kumm

Esta especie se caracteriza por presentar un píleo de (25-) 50-100 (-150) mm de diámetro, higrofano, café-grisáceo oscuro, algunas veces pálido, gris azulado; el color en esta especie es un factor determinado por la luz (Stamets, 1993). Las láminas son de color blanco marfil a crema,

algunas veces con tintes café-grisáceo, decurrentes a subdecurrentes. El estípite varía de 10-30 x 7-18 mm o puede estar ausente; presenta un color blanco a blanco-amarillento, excéntrico, liso a subvelutinoso, viloso hacia la base. El contexto es blanquecino, con olor y sabor ligero o agradablemente fungoide. La esporada puede ser blanca-grisácea o blanca con tintes rosas, gris violáceo o lila, a violeta con tintes grisáceos. Las esporas son elipsoides, hialinas, de pared delgada miden (7.2-) 8-10.4 (-11.2) x 3.2-4 (-4.8) μm . Los basidios miden 16-28 x 4-6.4 μm , son raros, de forma ventricosa o subcilíndrica, pueden ser mucronados o lectiformes, hialinos con una gota mucilaginosa en el ápice; no presentan cistidios. Las hifas del contexto miden 2.4-13.6 μm de ancho, presentan una pared delgada, hialinas con fíbulas. La trama himenial es irregular, con hifas que miden de 3.2-12 μm de diámetro, son hialinas de pared delgada y con fíbulas; tiene sistema hifal monomítico Guzmán *et al.*, (1994) (ver figura 2).

Pleurotus ostreatus es un hongo saprófito o parásito, degradador de madera. Esta especie, que según Guzmán (2000) no se encuentra silvestre en México, habita principalmente en las riberas de los ríos y fructifica en la época de otoño, inicio de invierno y primavera a través de la zona templada de Norteamérica, Europa y Asia (Stamets, 1993).



Figura 2. *Pleurotus ostreatus*.

3.3.1.3. *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél.

Según Guzmán *et al.* (1994), *P. pulmonarius* (figura 3), presenta un píleo de color café grisáceo que adquiere un color blanco marfil, tanto en primordios como en adultos, higrófono, sublucido; presenta un margen débilmente estriado, plano-convexo, ligeramente deprimido en el centro, a veces con una papila central, que mide (8-) 20-100 (-14) mm de diámetro. Las láminas son de color blanco o blanquecino, decurrentes. El estípite mide (3-)8-70(-90) x 2-15 mm, es excéntrico, estriado en el primer tercio y viloso a hirsuto en la base, simple o generalmente ramificado, base de 30 mm de diámetro, de color blanco marfil, higrófono, compacto. El contexto es blanquecino, con olor y sabor fungoide. La esporada es blanca a blanca grisácea, gris rosácea o gris violácea. Las esporas miden 7.2-11 (-12) x 3.2-4 μm , elipsoides, hialinas y de pared delgada. Presenta una trama himenial irregular, hifas de 4.8-10.4 μm de diámetro hialinas, de pared delgada; tiene un sistema hifal monomítico, con presencia de fíbulas.

Esta especie ha sido reportada en Norte América y Europa; en los Estados Unidos se encuentran sobre coníferas (*Abies* y *Picea*) que se desarrollan a elevaciones de 1200-3000 msnm. Fructifica en primavera y verano (Stamets, 1993).



Figura 3. *Pleurotus pulmonarius*.

3.4. El género *Trichoderma*: taxonomía, descripción y ecología

El género *Trichoderma* está compuesto por hongos que se encuentran presentes en forma natural en casi todos los suelos y hábitats del planeta (Rifai, 1969). El desarrollo de *Trichoderma* se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales, son colonizadas rápidamente por este microorganismo. Algunas cepas son componentes importantes de la rizosfera. Además de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Recientemente, han sido demostrados varios mecanismos con los cuales actúa *Trichoderma* como biocontrolador y como colonizador de las raíces (Samuels, 1996).

La mayoría de cepas de *Trichoderma* no poseen etapa sexual, por lo que producen únicamente esporas asexuales (Herrera y Ulloa, 1990). Sin embargo, se conoce la etapa sexual de unas pocas cepas, que no han sido consideradas para propósitos de biocontrol. La etapa sexual, cuando está presente, se encuentra identificadas dentro del grupo de hongos Ascomycetes en el género *Hypocrea* (Samuels, 1996).

Algunas especies de este género tienen la habilidad de producir enzimas y atacar o inhibir otros hongos; es por ello que han sido objeto de investigaciones en otras áreas, que incluyen el control biológico de enfermedades de plantas y producción de enzimas; también se han empleado en estudios de control genético y manipulación de hongos filamentosos (Samuels, 1996).

Las especies de *Trichoderma* que comúnmente causan daños en cultivos de hongos comestibles, durante el crecimiento del micelio o la formación de primordios, son: *T. viride*, *T. harzianum*, y *T. polysporum*. En cultivos de hongos comerciales, donde el sustrato es pasteurizado, existe un riesgo de contaminación durante la etapa de incubación, provocada por *Trichoderma* spp. cuyas esporas son llevadas por el aire, los trabajadores o el material utilizado (Stamets, 1993; Savoie *et al.*, 2000).

Se han empleado métodos taxonómicos tradicionales basados en las diferencias morfológicas, principalmente en el aparato de esporulación asexual de *Trichoderma*; en la

actualidad ya se están empleando técnicas moleculares para la identificación y clasificación de este organismo. Se presenta la clasificación propuesta por Herrera y Ulloa (1990), para las especies de *Trichoderma* en estudio:

Clase: Fungi imperfecti

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género y especies estudiadas: *Trichoderma resei* E.G. Simmons
Trichoderma viride Pers. Ex S.F. Gray

3.4.1. Descripción taxonómica de las especies de *Trichoderma* en estudio

3.4.1.1. *Trichoderma resei* E.G. Simmons

Los conidióforos de esta especie se forman a lo largo del micelio aéreo, a menudo la producción de conidios se dispersa en anillos concéntricos con una tendencia a formar mechones menores de 0.5 mm de diámetro (Figura 4). Cuenta con axilas fértiles que tienen un aspecto plumoso con fialides; éstas son cilíndricas, miden (3.5-) 5.5-9.2 (-16.2) μm de largo, (1.7-) 2.5-3.5 (-50) μm en la parte media, (1.2-) 1.7-2.5 (-4.0) μm en la base. Tiene conidia de forma oblonga a elipsoidal, miden (2.0-) 3.7-5.0 (-7.7) x (2.0-) 2.5-3.4 (-4.0) μm . Las clamidosporas de esta especie generalmente son abundantes, de forma globosas o subglobosas, miden (4.0-) 6.2-9.0 (-11.5) μm , con posición terminal e intercaladas (Rifai, 1969).



Figura 4. *Trichoderma reesei*.

3.4.1.2. *Trichoderma viride* Pers. ex S.F. Gray

Las áreas conidiales maduras de esta especie presentan una coloración verde-azuloso oscuro. Los cultivos viejos emiten un olor típico de coco. El micelio está compuesto de hifas hialinas, lisas, septadas muy ramificadas, con un diámetro de 1.5-12 μm . Estas hifas con frecuencia forman clamidosporas que se levantan en una posición intercalada o a menudo a terminal sobre ramas laterales cortas. Las clamidosporas son en su mayoría globosas o raramente elipsoidales, hialinas, de pared lisa, de aproximadamente 14 μm de diámetro, normalmente sumergidas en el medio. Los conidióforos a menudo se levantan para formar mechones continuos o discontinuos en forma de anillo (Figura 5). Las principales ramas de los conidióforos son de aproximadamente 4.5 μm de diámetro. Las fialides están formadas de falsos verticilos, cada fialide terminal y cada grupo usualmente consiste en dos o tres fialides, son de tamaño variable, largas de 8-14 x 2.4-3 μm , aunque pueden llegar a 6 μm de largo, alguna pueden hasta 20 μm . La

mayoría de las fialosporas son globosas u ovoides, raramente elipsoides, verdes y miden de 3.6-4.5 μm de diámetro o 4.48 x 3.5-4 μm . (Samuels *et al.*, 1998)



Figura 5. *Trichoderma viride*

3.5. Ciclos de vida de *Pleurotus* y *Trichoderma*

En el género *Pleurotus*, las basidiosporas germinan cuando entran en contacto con un sustrato y se encuentran expuestas a una temperatura, pH y humedad adecuados para su crecimiento (Figura 6). Estas dan origen a un micelio primario, conocido como homocarión por tener un solo tipo de núcleo, generalmente haploide. La mayor parte del micelio homocarión no fructifica, pero es capaz de crecer vegetativamente. Para que el cuerpo fructífero se desarrolle, es necesario que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen y por disolución de la pared del punto de contacto, formen compartimentos hifales de citoplasma continuo, con dos tipos de núcleos provenientes de cada uno de los compartimentos que se fusionaron. A este tipo de micelio se le conoce como micelio secundario, en la mayoría de los casos este micelio presenta una estructura lateral conocida como conexión grapa o fíbula (Sánchez & Royse, 2001).

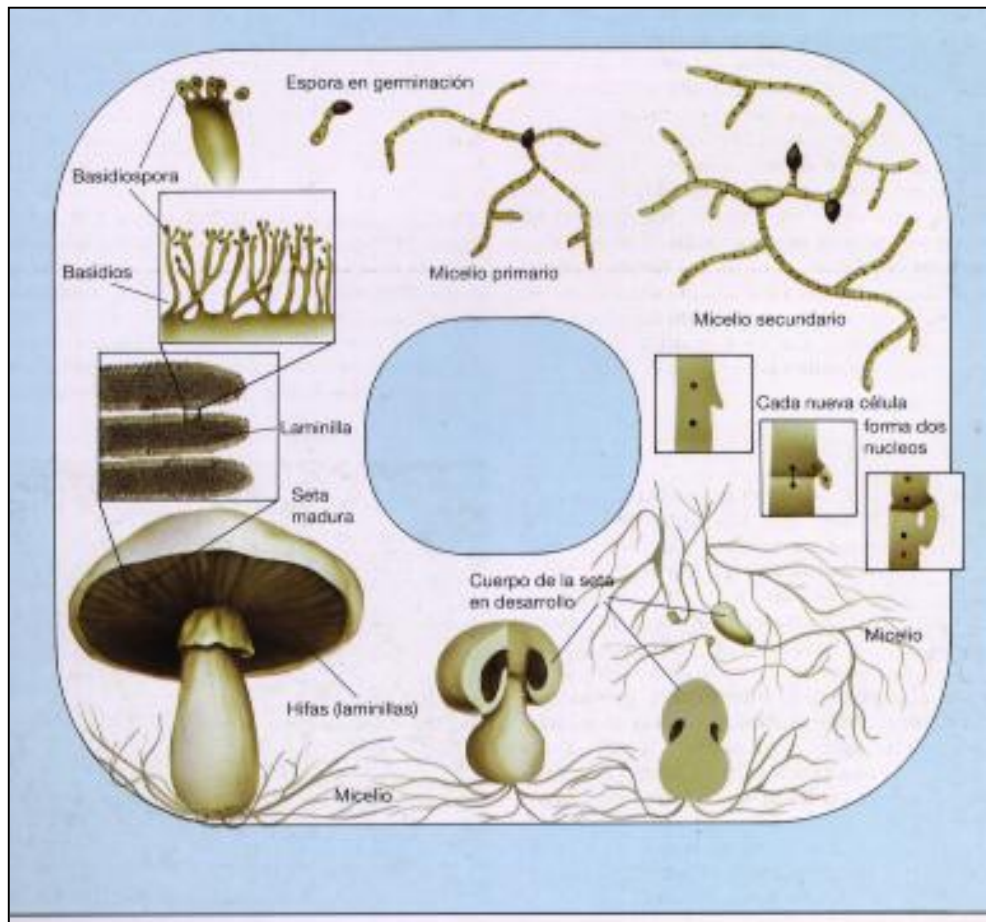


Figura 6. Ciclo de vida de un basidiomicete.

Fuente: (Atlas de Botánica Cultural de Ediciones, S. A.)

Trichoderma, crece y se ramifica desarrollando típicas hifas fungales de 5 a 10 μm de diámetro. La esporulación asexual ocurre en conidios unicelulares (3 a 5 μm de diámetro); usualmente son de color verde y son liberados en grandes cantidades. También se forman clamidosporas de descanso, son unicelulares, pero pueden llegar a fusionarse entre dos o más. Gran parte de las cepas de este género están muy adaptadas al ciclo de vida asexual. En ausencia de la meiosis, se aprecia en estos organismos una alta plasticidad cromosómica; diferentes cepas pueden llegar a tener distintos números y tamaños de cromosomas. La mayoría de las células poseen numerosos núcleos y, en algunas células vegetativas, pueden sobrepasar la cifra de 100. Varios factores genéticos asexuales, como la combinación parasexual, mutación y otros procesos, contribuyen a la variación de los núcleos en un solo organismo (talo). Por todo ello se puede encontrar una gran diversidad genética en las cepas silvestres (Harman y Kubicek 1998).

3.6. Productos lignocelulósicos

3.6.1. Celulosa

La celulosa es un homopolímero de cadena lineal formado por moléculas de glucosa que se encuentran unidas por enlaces 1,4-beta-glucosídicos (Figura 7). Dependiendo de la procedencia de la celulosa y el grado de polimerización, el número de unidades de glucosa por molécula de celulosa varía desde 1000 hasta 10,000 (Lucas *et al.*, 2001).

Toda la celulosa existente en la naturaleza procede fundamentalmente de la actividad biosintética llevada a cabo por las algas y las plantas superiores, pero también puede provenir de ciertas bacterias, invertebrados marinos, hongos, mohos mucosos y amebas. La celulosa se genera mediante complejos biosintéticos situados en la cara externa de la membrana celular; las cadenas de glucosa se unen formando microfibrillas cristalinas (Lucas *et al.*, *op. cit.*).

La diversidad de orígenes que puede tener la celulosa, así como de los tratamientos a que son sujetos los materiales ricos en este polímero para su extracción, hacen que se pueda encontrar en un rango complejo de formas físicas. La descripción de los materiales celulósicos deben incluir aspectos tales como tamaño, forma, porosidad, área superficial, asociación con componentes no celulósicos, conformación molecular y cristalinidad. Estas características son de notable importancia para los procesos de hidrólisis enzimática (Lucas *et al.*, 2001).

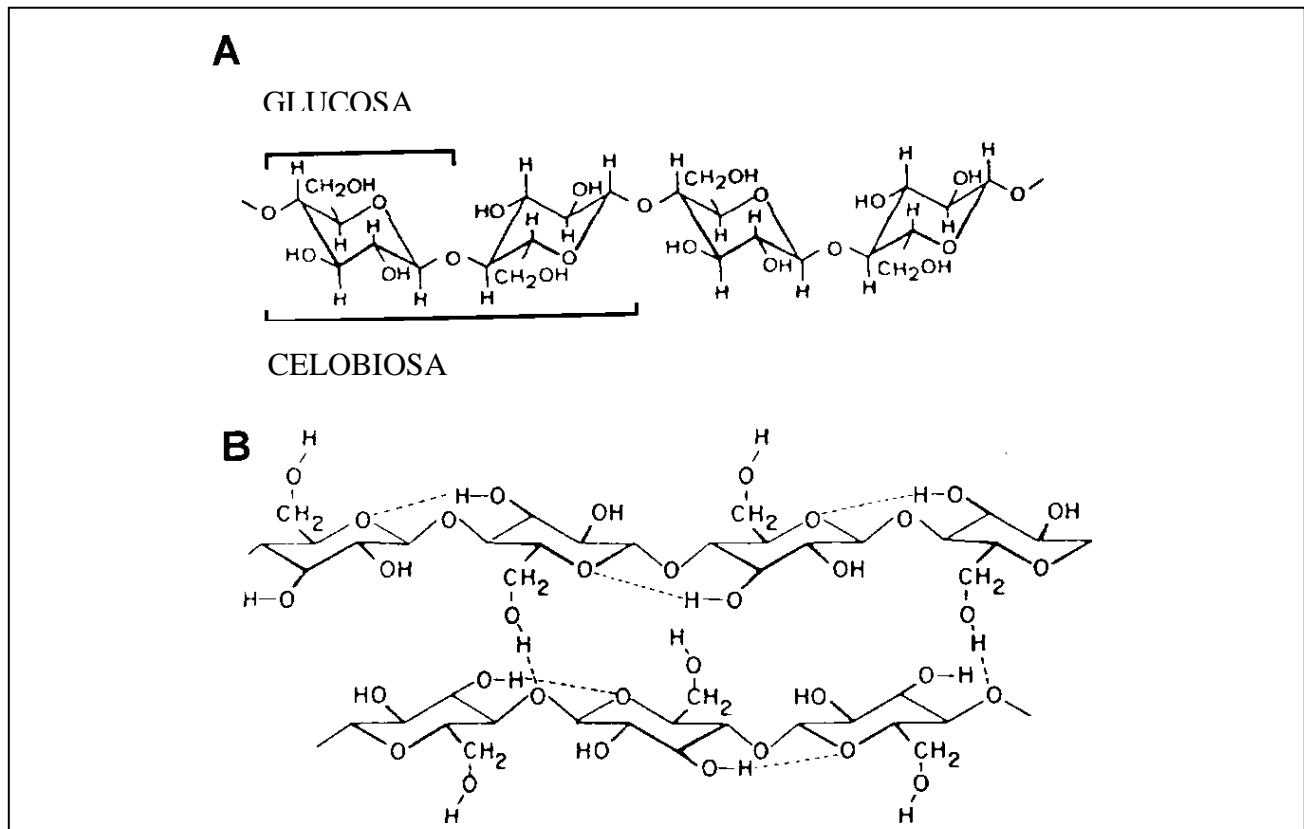


Figura 7. Fórmula química de la Celulosa (Lucas, *et al.*, 2001).

3.6.2. Lignina

El término lignina deriva del latín “lignum”, que significa madera, y define el material cementante presente en las paredes celulares de los tejidos leñosos de los vegetales. La lignina se produce en gran parte por la actividad fotosintética que convierte el anhídrido carbónico en lignina; ésta puede llegar a constituir aproximadamente el 40% de la energía solar acumulada en los tejidos vegetales, por lo que juega un papel destacado en el ciclo del carbono (Lucas *et al.*, 2001).

La lignina es el polímero aromático de origen natural más abundante en la naturaleza; representa una de las reservas importantes de carbono orgánico junto con la celulosa y la hemicelulosa. La lignina constituye entre un 15 y un 36% del contenido de los materiales lignocelulósicos (Lucas *et al.*, *op. cit.*).

A diferencia de la mayoría de los polímeros que constituyen la pared celular, la lignina es un componente aromático heterogéneo; las unidades fenilpropano que la componen están entrelazadas al azar mediante diferentes enlaces, formando una macromolécula amorfa e insoluble en agua. La lignina debe su variabilidad principalmente a la presencia de distintas unidades p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G), y siringilo (S) (Figura 8) (Lucas *et al.*, *op. cit.*).

La lignina de las gimnospermas está formada principalmente por unidades G (alcohol coniferílico), y algunas unidades de alcohol p-cumárico (H); en el caso de las angiospermas está compuesta por igual proporción de unidades G (alcohol coniferílico) y S (alcohol sináptico) y una menor cantidad de unidades p-hidroxifenilpropano derivadas del alcohol p-hidroxifenilpropano que a su vez se deriva del alcohol p-cumárico. La lignina de las gramíneas está formada por una mezcla de tres unidades, formando enlaces tipo ester (Lucas *et al.* *op. cit.*).

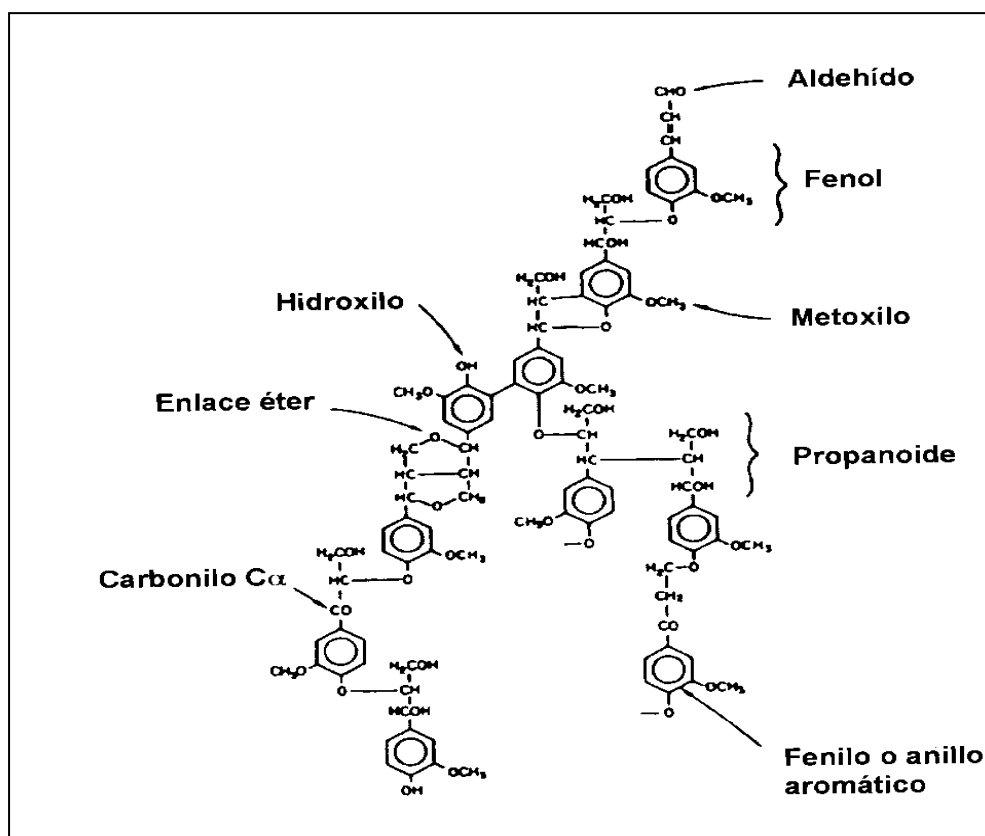


Figura 8. Fórmula química de la lignina (Lucas *et al.*, 2001).

3.7. Degradación de productos lignocelulósicos por hongos

Los principales organismos que descomponen los productos lignocelulósicos pertenecen al reino de los hongos (Lucas *et al.* 2001); estos degradan los polímeros de la madera, incluyendo los componentes de la lignina, mediante la secreción de enzimas extracelulares. Los hongos que presentan esta propiedad pueden provocar tres tipos de degradación del sustrato, podredumbre blanda, podredumbre parda y podredumbre blanca.

Hongos de podredumbre blanda. Algunos géneros de ascomicetos y deuteromicetos como *Aspergillus* y *Fusarium*, provocan reblandecimiento de los tejidos de la madera, acompañado de pérdida significativa de peso. Dichos hongos se desarrollan en las paredes de la células vegetales; generalmente se presentan en angiospermas con alto porcentaje de humedad; estos hongos se caracterizan por degradar a la celulosa y hemicelulosa, y en menor grado a la lignina (Blanchette, 1991).

Hongos de podredumbre parda. En maderas blandas son principalmente los basidiomicetos los que degradan los carbohidratos de la pared celular, dejando la lignina prácticamente intacta, ésta queda como un acumulo pardusco. Estos hongos penetran a través de las traqueidas y se desarrollan principalmente en el lumen, en contacto estrecho con la pared terciaria (Kirk y Farrel, 1987)

Hongos de podredumbre blanca. El 90% de los hongos que son capaces de degradar la madera de un modo eficaz pertenecen a este grupo. La podredumbre blanca implica la degradación de los diferentes polímeros de la madera (celulosa, hemicelulosa y lignina) a la que le confieren consistencia fibrosa o esponjosa (Lucas *et al.*, 2001). Dependiendo de la especie, la degradación de los carbohidratos y la lignina puede ocurrir en forma simultánea como es el caso de *Phanerochaete chrysosporium*, en algunos casos, como ocurre en el género *Pleurotus*, se observa una degradación más temprana de la lignina. La degradación de la lignina implica una serie de cambios oxidativos para producir CO₂ y H₂O, esto conlleva a la acumulación de celulosa y hemicelulosa dando lugar a un color blanco al que debe su nombre (Lucas *et al.*, *op. cit.*).

3.8. Aspectos enzimáticos

La degradación de sustratos ligninocelulósicos, depende de la capacidad de sintetizar enzimas hidrolíticas y oxidativas secretadas principalmente por los hongos de pudrición blanca (Buswell *et al.*, 1996). Estos microorganismos producen varias enzimas lignolíticas (lacasa, peroxidasa dependiente de manganeso y lignina peroxidasa) que catalizan la oxidación de unidades de lignina, produciendo radicales aromáticos (Sklasz *et al.* 1989). Las enzimas lacasa y peroxidasa dependiente de manganeso, son capaces de oxidar solamente residuos fenólicos de lignina, dependiendo de las condiciones del sustrato, mientras que la lignina peroxidasa se ha mostrado más efectiva en la oxidación de residuos no fenólicos del polímero (Kirk y Farrel, 1987)

El crecimiento del micelio y la producción de fructificaciones, constituyen características dependientes de la eficiente utilización de los polímeros de lignocelulosa del sustrato que son degradados por las enzimas extracelulares. Por ello, el incremento en la utilización del sustrato es un objetivo de la manipulación de cepas y podría ser realizado vía regulación del nivel de enzimas extracelulares, usando métodos de selección que incluyan ingeniería genética (Ohga *et al.*, 2000).

Ohga *et al.* (op. cit.) describieron la regulación de la expresión genética de las enzimas en diversas cepas de *L. edodes* cultivadas sobre sustrato de aserrín durante el cultivo de varias cepas bajo diferentes condiciones. De este estudio se concluyó que la expresión genética de la lacasa se maximizaba durante la fase de colonización y declinaba posteriormente durante los estados de fructificación, mientras que la celulasa se expresaba fundamentalmente durante el desarrollo de las fructificaciones. De igual forma, estos autores observaron que este patrón de expresión resultaba muy similar al mostrado por *A. bisporus* cultivado en composta. En un estudio similar, Savoie (1998), describió los cambios en la actividad de enzimas extracelulares durante el crecimiento vegetativo de *A. bisporus*, bajo condiciones de cultivo comercial, con el fin de reducir el ciclo de producción y mejorar la proporción de micelio.

Giardina *et al.* (1995) estudiaron las enzimas involucradas en la biodegradación de lignina producida por *P. ostreatus*, con el propósito de conocer las bases moleculares de la catálisis enzimática y los mecanismos de regulación que controlan la producción de isoformas de lacasa a través de la amplificación de regiones específicas de ADN de monocariones aislados, concluyeron que la síntesis de esta enzima puede ser regulada a diferentes niveles, en respuesta a diferentes estímulos celulares y/o inductores específicos.

Mata y Savoie (1998a) estudiaron el espectro de producción de enzimas ligninolíticas en seis cepas de *L. edodes* cultivadas en paja, con el objetivo de determinar si los niveles de actividad están correlacionados con su habilidad para formar esporóforos. Encontraron que las cepas precoces y con alta producción, fueron capaces de hidrolizar y utilizar los componentes de la pared celular de la paja, inmediatamente después de la inoculación desarrollando una alta actividad metabólica.

El estudio de Leatham (1985), dirigido a lograr una mejor comprensión de la fisiología y bioquímica de la degradación de la madera por *L. edodes*, permitió desarrollar mejores medios de crecimiento, optimizar las técnicas de cultivo, predecir ciclos de fructificación y detectar fallas potenciales en la producción. Asimismo brindó las bases para el desarrollo de futuras investigaciones acerca de las habilidades para degradar, de los hongos de pudrición blanca así como la rentabilidad de su cultivo.

Gutiérrez *et al.* (1996), describieron la formación del complejo lignipolisacárido extracelular durante la degradación de la lignina de la paja, por la acción del género *Pleurotus* y describieron la naturaleza de este complejo.

3.9. Descripción de las principales enzimas ligninolíticas

3.9.1. Lacasa

La lacasa es una enzima oxidoreductasa (p-difenol-oxígeno-óxidoreductasa, EC 1.10.3.2). Se le considera dentro del grupo de las fenoloxidasas ya que utiliza monofenoles como sustrato. Las isoformas de la lacasa poseen similar peso molecular y sustratos específicos similares, aunque presentan considerables diferencias en la secuencia de aminoácidos (Okamoto *et al.*, 2000). Son enzimas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza; se ha reportado su presencia en animales, plantas y microorganismos (Lucas *et al.*, 2001).

La lacasa es secretada por hongos basidiomicetos y resulta de gran importancia para el desarrollo de las fructificaciones y para la pigmentación conidial (Herman *et al.*, 1983). Esta enzima además de ser considerada importante en los procesos degradativos de la lignina, es capaz de oxidar fenoles y aminas aromáticas mediante un proceso de reducción del oxígeno molecular a agua en presencia de cobre, elemento presente en sus moléculas (Hublik y Schinner, 2000).

Palmieri *et al.* (1993), aislaron las fenoloxidasas de *P. ostreatus*, esta proteína fue purificada y su estructura primaria fue determinada por secuenciación, con el propósito de utilizarla como bioreactor para solucionar problemas ambientales como el tratamiento de aguas residuales. Palmieri *et al.* (1997), reportaron la purificación y las propiedades físico-químicas y catalíticas de las diferentes isoenzimas de lacasa aisladas de *P. ostreatus*. Una de estas isoenzimas mostró la existencia de diferencias peculiares con respecto al contenido de cobre. Estudios posteriores mostraron que el cobre constituye uno de los inductores más eficientes para la producción de un patrón específico de isoenzimas de lacasa (Palmieri *et al.*, 2000).

Hublik y Schinner (2000) estudiaron la producción de lacasa por *P. ostreatus*; señalaron las características moleculares y los parámetros que mejoran la actividad y estabilidad de la enzima. Reportaron también un método de inmovilización que prolonga el tiempo de actividad de esta enzima y sugirieron desarrollar estudios donde se tomara en cuenta la especificidad del sustrato y el potencial para detoxificar una variedad de contaminantes fenólicos ambientalmente relevantes.

La lacasa tiene un efecto blanqueador limitado sobre la pulpa para papel, debido a su especificidad sobre subunidades fenólicas de lignina. Bourbonnais *et al.* (1997) encontraron que

el radio de actividad de la lacasa puede ser extendido a subunidades no fenólicas de lignina a través de un mediador como el ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazolinesulphonate).

Con el propósito de desarrollar un método para seleccionar cepas de *L. edodes*, Savoie *et al.* (1995) estudiaron la habilidad de diferentes cepas para producir lacasa, a través de la inducción de esta actividad con derivados de lignina. Sus observaciones sobre la producción de lacasa, confirmaron la adaptación de las cepas a los derivados de la lignina y que la lacasa era necesaria para detoxificar compuestos inhibitorios, sugiriendo el empleo de su metodología para la selección de cepas de *L. edodes*.

Kumaran *et al.* (1997), encontraron que en *Pleurotus sajor-caju* la formación de cuerpos fructíferos necesita de un suplemento adicional de nitrógeno, que almacenado por medio de enzimas extracelulares, entre las que se incluye la lacasa, ésta puede ser degradada y reasimilada como una fuente de nitrógeno. Así, un probable papel de la lacasa es que pueda actuar como un reservorio extracelular de nitrógeno. Estos mismos autores sugieren que el uso de alta densidad de inóculo puede acelerar el crecimiento fungal y agotar los nutrientes del sustrato, sin embargo, no corresponde con el incremento en la producción de enzimas.

Medeiros *et al.* (1999), mencionan que se puede incrementar la producción de lacasa de *P. ostreatus* mediante la reducción del pH inicial, el incremento de la concentración de levadura y la remoción del agente activador.

3.9.2. Peroxidasa dependiente de manganeso

Este tipo de enzima (MnP; EC 1.11.1.13) fue descrita por primera vez por Kuwahara *et al.* (1984), en cultivos lignocelulíticos de *Phanerochaete chrysosporium*. Posteriormente se detectó su presencia en otros hongos de la podredumbre blanca y en diversos basidiomicetos, como *Agaricus bisporus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Clytocybula dusenii*, *Lentinula edodes*, *Naematoloma frowardii*, *Panus tigrinus*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, *Stropharia rugosoannulata* y *Trametes versicolor* (Lucas *et al.*, 2001).

La manganeso peroxidasa es una glicoproteína que cataliza la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} en presencia de H_2O_2 . *P. ostreatus* pertenece a la subclase de hongos de pudrición blanca, que produce lacasa y peroxidasa dependiente de manganeso, pero no lignina peroxidasa (Giardinia *et al.*, 2000). En ausencia de H_2O_2 , la peroxidasa dependiente de manganeso puede utilizar como sustrato al NAD(P)H, funcionando como una oxidasa y generando H_2O_2 (Lucas *et al.*, 2001). Varios hongos causantes de pudrición blanca producen peroxidasa dependiente de manganeso durante la etapa de crecimiento (Zhao *et al.*, 1996). Se ha detectado la producción de H_2O_2 durante el desarrollo y fructificación de *Pleurotus pulmonarius* y *P. ostreatus* cultivado en paja de trigo (Salmones, 2002).

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el uso potencial de la peroxidasa dependiente de manganeso como bi blanqueador en la industria de la pulpa para papel (Paice *et al.*, 1993). El efecto blanqueador de los hongos, es acompañado por la secreción de dos enzimas oxidoreductasas: la lacasa y la peroxidasa dependiente de manganeso. Estas dos enzimas han mostrado un significativo incremento en el brillo de la pulpa cuando se combinan con un subsecuente tratamiento de peróxido alcalino. El movimiento contra el uso del cloro molecular para el blanqueado de la pulpa para papel ha abierto una nueva oportunidad biotecnológica en este campo. La xylanasa fue la primera enzima reportada que facilitaba el blanqueamiento de la pulpa de kraft (Bourbonnais *et al.*, 1997). Los resultados de los estudios de Kerem y Hadar (1997) sugirieron que *P. ostreatus* puede ser un excelente agente bi blanqueador en desechos no maderables, tales como tallos de algodón, degradando lignina, a través de la oxidación de Mn por medio de la enzima peroxidasa dependiente de manganeso.

Hirano *et al.* (2000) investigaron la actividad de *P. ostreatus* en la degradación *in vitro*, de BPA (contaminante ambiental) y concluyeron que podía utilizarse la peroxidasa dependiente de manganeso en la degradación de BPA en sistemas *in vivo*.

Giardinia *et al.* (2000), reportaron las condiciones de crecimiento de *P. ostreatus* en aserrín de álamo, con la producción de dos isoenzimas de peroxidasa dependiente de manganeso, MnP2 y MnP3. Éstas fueron purificadas y luego se estudiaron sus propiedades catalíticas, en relación con otras peroxidasas dependientes de manganeso conocidas en las especies de

Pleurotus; así, se constató la existencia de una gran semejanza entre la MnP2, con la peroxidasa PS1 de *P. eryngi* (cultivado en paja de trigo), purificada por Camarero *et al.* (2000).

3.9.3. Celulasa

Las β -1,4-glucosidasas (EC 3.2.1.21; β -D-glucósido glucohidrolasas) se consideran como uno de los componentes del complejo celulolítico debido al importante papel que juegan en la hidrólisis de la celobiosa a glucosa. Se pueden distinguir dos grupos de aril- β -glucosidasas: aquellas que sólo hidrolizan aril-glucósidos y celobiosa (celobiasas) y aquellas que además pueden hidrolizar oligosacáridos (conocidas como β -glucosidasas). Estas últimas son frecuentes en bacterias y hongos celulolíticos (Lucas *et al.*, 2001).

Claydon *et al.* (1988), describieron la producción de endonucleasas extracelulares durante sucesivos ciclos de producción de *A. bisporus*; observaron que el micelio puede absorber compuestos de la composta por acción de la celulasa y convertir los carbohidratos a glucosa para sintetizar trehalosa y glicógeno. Estos autores concuerdan con lo reportado por Sugden y Bhat (1994) para *Sporotrichum thermophile*. Por otra parte Buswell y Chang (1994), pusieron de manifiesto la habilidad de *Lyophillum shimeji*, *Tricholoma lobayense*, *Morchela elata*, *Pleurotus sajor-caju*, *Coriolus versicolor* y *Volvariella volvacea* para generar biomasa y producir celulasas, xylanasas amilasas y proteasas, durante su crecimiento en desechos de soya.

En contraste con la actividad de la lacasa, la actividad de la celulasa permanece baja hasta el inicio de la formación de primordios; luego, durante la fase de fructificación, la actividad de la celulasa se incrementa notablemente; ésta se mantiene alta durante la fructificación y declina después de la cosecha. Cuando las fructificaciones no se cosechan, los niveles de celulasa se mantienen altos durante algunos días; esto ha sido reportado para *P. cornucupiae* var. *citrinopileatus*; Kaviyarasan y Natarajan, (1997) para para *Agaricus bisporus* por Claydon (1988), y para *L. edodes* por Ohga y Royse (2001).

Chrapkowska y Podyma (2000), determinaron la actividad del complejo de celulasas en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes sustratos (paja de trigo, paja más *Reynoutria*

japónica (Houtt)). Los resultados obtenidos por estos autores mostraron que esta especie se desarrolló bien en los dos tipos de sustrato, biosintetizando celulosa.

La importancia de la actividad carbohidratasa y sus cambios durante el desarrollo de *L. edodes* estuvieron en concordancia con su habilidad para efectuar una alta producción de esporóforos y desarrollar un crecimiento más rápido en paja de trigo rica en celulosa que en sustratos más lignificados (Mata y Savoie, 1998a).

La actividad endocelulasa está relacionada con la cantidad de biomasa de las fructificaciones producida durante cada cosecha de champiñón *Agaricus bisporus*. El micelio puede absorber compuestos de la composta por la acción de celulasa y otras enzimas líticas y convertir carbohidratos a glucosa para sintetizar glicógeno (Claydon *et al.*, 1988).

3.10. Interacción de *Pleurotus* y *Trichoderma*.

Se ha observado comúnmente tanto en los cultivos de laboratorio como en los comerciales, la aparición de un pigmento café en la zona de contacto entre los micelios cuando se emplean cepas de *L. edodes* que resisten el ataque de *Trichoderma* (Mata y Savoie, 1998b). Tokimoto (1980 y 1982), ha reportado la existencia de una alta actividad de polifenoloxidasas en esta área de interacción. Al respecto Savoie *et al.* (1998) encontraron que la producción de la enzima lacasa es inducida por metabolitos extracelulares producidos por *Trichoderma*, sin embargo la capacidad de las cepas de *L. edodes* para producir lacasa en los medios de cultivo no correspondía con su aptitud para rechazar el ataque de *Trichoderma*.

Ohmasa y Cheong (1999), describieron como resultado de sus experimentos, el efecto de los ingredientes del sustrato del cultivo de *L. edodes* sobre la resistencia a la enfermedad provocada por el antagonista *T. harzianum*. Estos autores concluyeron que esta enfermedad era fuertemente afectada por las condiciones del cultivo. Mamoun *et al.* (2000), al comparar el desarrollo de varias cepas de *Trichoderma*, aisladas de composta de hongos, tanto en confrontación como en ausencia de *A. bisporus*, mediante la evaluación de su relativa habilidad de germinación y producción de esporas y crecimiento micelial, concluyeron que el contacto

entre las hifas de las dos especies inducía esporulación asociada a la actividad patógena de la enfermedad.

Savoie *et al.* (2001) compararon la formación de la línea café con la actividad de lacasa para determinar si el nuevo biotipo Th2, podría ser responsable de los fracasos durante la fermentación de sustratos utilizados por basidiomicetos entre ellos *A. bisporus*, Estos autores utilizando hongos de pudrición blanca sobre materiales lignocelulósicos evaluaron si todos los basidiomicetos podrían afectar al biotipo Th2 de *T. harzianum* por producción de lacasa, concluyendo que éste biotipo puede ser una fuente potencial de problemas en todos los sustratos fermentados.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Ubicación de los experimentos

Los experimentos realizados en el presente trabajo se realizaron en el laboratorio de Hongos Comestibles, del Instituto de Ecología, A.C. y en el Laboratorio de Marcadores Moleculares, del Instituto de Genética Forestal. de la Universidad Veracruzana.

4.2. Selección y mantenimiento de las especies bajo estudio.

Para el desarrollo del presente trabajo se seleccionaron seis cepas de *Pleurotus* y tres cepas de *Trichoderma* (Tabla 2). Esta selección se realizó con base en los resultados obtenidos por Salmones (2000), quien evaluó *in vitro* el desarrollo micelial, la capacidad de producir lacasa y la formación de una línea amarilla en presencia de *Trichoderma*. Las cepas de *Trichoderma* empleadas en el estudio dos fueron aisladas en muestras de shiitake (*Lentinula edodes*) y de setas (*Pleurotus*) respectivamente cultivados en pulpa de café. Todas las cepas se encuentran depositadas en el cepario del Instituto de Ecología, A.C.

Tabla 2. Especies utilizadas en el estudio.

Especie	No. de cepa	Procedencia
<i>Pleurotus djamor</i>	IE-121	México
	IE-218	México
<i>Pleurotus ostreatus</i>	IE-38	Hong Kong
	IE-49	Guatemala
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	IE-137	Checoslovaquia
	IE-225	México
<i>Trichoderma resei</i>	IE-639	México
<i>Trichoderma viride</i>	IE-637	México
	IE-638	México

Para el mantenimiento de las cepas durante los experimentos, tanto las cepas de *Pleurotus* como la de *Trichoderma*, se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo sólido de Agar Extracto de Malta AEM (Bioxon) en condiciones asépticas y se incubaron a 28 °C. Para la realización de este estudio se siguió el procedimiento experimental que se indica en la figura 9.

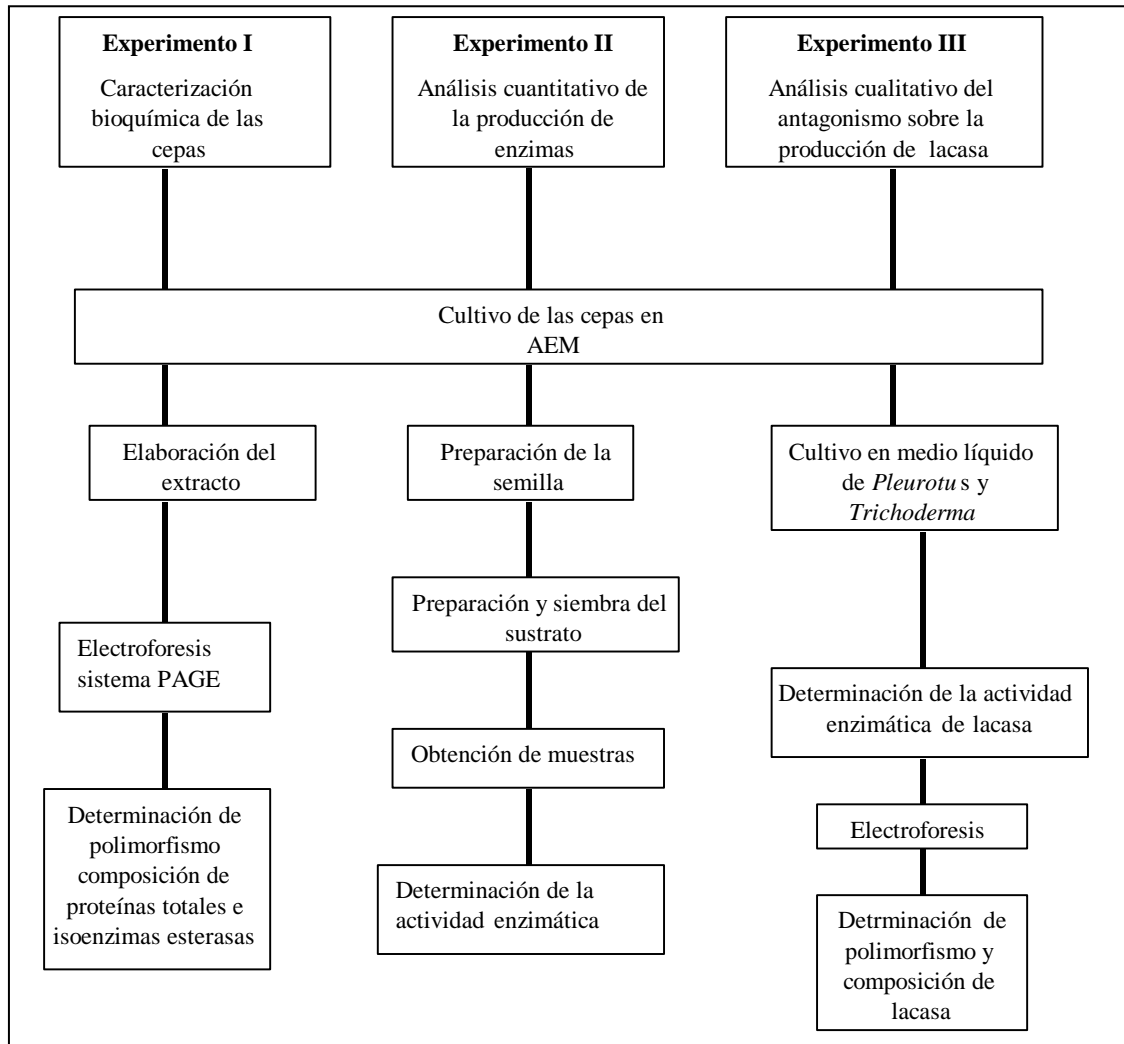


Figura 9. Procedimiento experimental seguido en el estudio.

Una vez seleccionadas las especies bajo estudio, se procedió a realizar tres experimentos; el primero consistió en la caracterización bioquímica de las cepas de *Pleurotus* en estudio, el segundo en la realización de un análisis cuantitativo de la cinética de la actividad enzimática durante el desarrollo vegetativo de las cepas de *Pleurotas*, y el tercero en la inducción de la actividad enzimática de la lacasa.

4.3. Experimento. I. Caracterización bioquímica de las cepas de *Pleurotus* bajo estudio

Para la realización de éste experimento se utilizó micelio de seis cepas de *Pleurotus*, cultivadas durante 10 días en medio agar con extracto de malta (AEM) y se siguió el procedimiento experimental que se indica en la Figura 10.

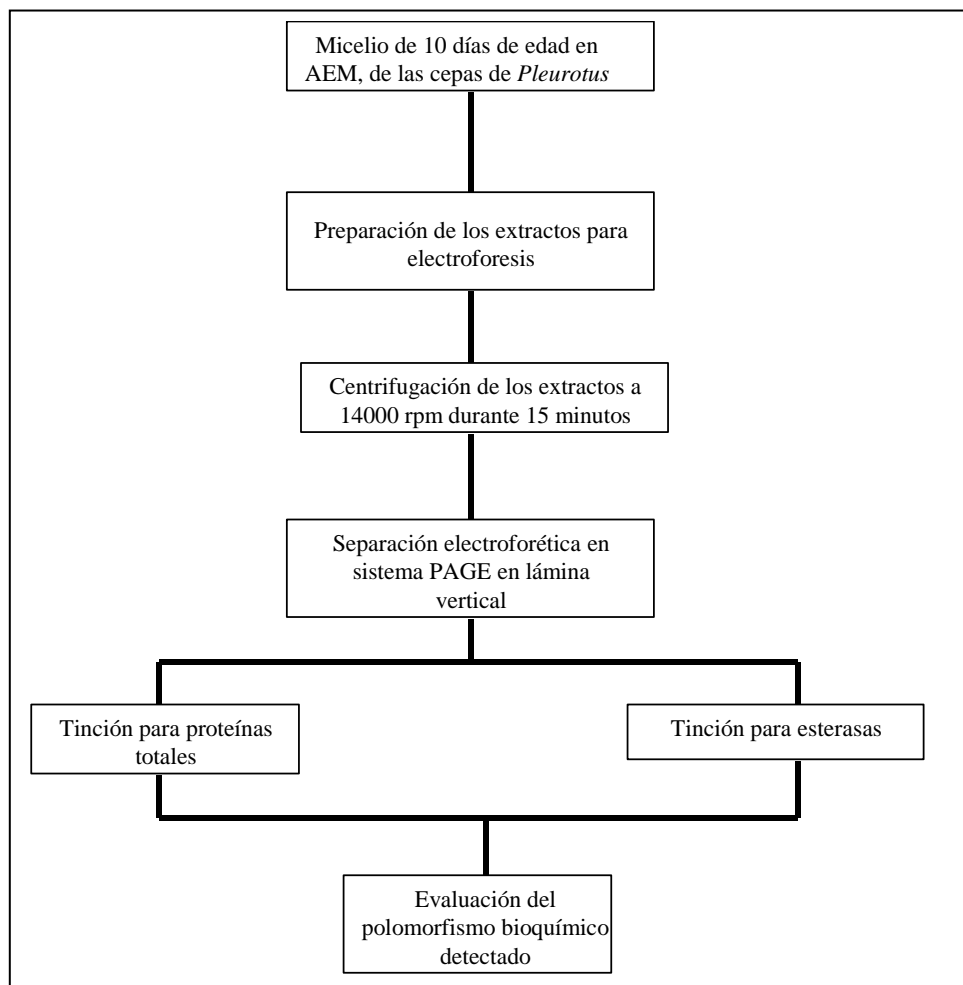


Figura 10. Procedimiento experimental seguido para la caracterización bioquímica de seis cepas de *Pleurotus*.

El micelio de cada cepa de *Pleurotus* en estudio se homogenizó en frío en el tampón de extracción propuesto por Laemmli (1970) y modificado por Iglesias (datos no publicados). Los extractos obtenidos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante de cada una de las muestras en estudio se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Los extractos obtenidos fueron sometidos a análisis electroforéticos en un sistema discontinuo de geles de poliacrilamida (PAGE), siguiendo el procedimiento de electroforesis de disco descrito por Ornstein (1964) y Davis (1964) y adaptado a la técnica de lámina vertical de Chappel *et al.* (1974).

Para el corrimiento electroforético, se emplearon geles de poliacrilamida (PAGE) de 1 mm de grosor. Se emplearon geles de 8.5% para la zona de separación y de 5% para la de compactación. En los electrodos se empleó tampón Tris-Glicina 0.04 M, pH 8.3 (Iglesias, 1986). Las corridas se realizaron a 250 mA durante 5 h, para lo cual se empleó una fuente de poder marca Consort (modelo E863).

Las tinciones para la detección de la composición de proteínas totales e isoenzimas esterasas, se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Iglesias (1986). Para el caso de proteínas totales, se empleó el colorante azul de Coomassie R250 para la tinción de las proteínas totales y los substratos alfa y beta naphthyl acetato para revelar las isoformas esterasas.

Los patrones de bandas se dibujaron sobre papel milimétrico, designando como cero el punto de unión del gel de compactación y separación y como 100 la posición de la banda de más rápida migración anódica.

Se realizaron dos lecturas replicadas por cada una de las cepas de *Pleurotus* y por cada tinción histoquímica efectuada. La caracterización del polimorfismo bioquímico revelado se registró sobre el número de bandas y posición relativa de cada banda” (valor RF). Esta última se determinó al dividir la distancia de migración (centímetros) recorrida por la proteína, entre la distancia total de migración recorrida por la banda de Kolhraüsch.

4.3.1. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron codificados en una matriz donde 0, fue asignado a los casos en los que no hubo presencia de bandas; el valor de 1 se empleó para denotar la presencia de bandas bien marcadas. Se utilizó el programa STATISTICA (versión 6) para el procesamiento estadístico multivariado de los datos obtenidos. Las variantes polimórficas detectadas fueron

procesadas por análisis factorial de correspondencias múltiple. Se realizó un agrupamiento de las cepas sobre la base de la variación bioquímica por análisis de conglomerado jerárquico y de ligamiento simple, empleando la distancia de Jaccard como índice de similitud.

4.4. Experimento II. Análisis de la cinética de la actividad enzimática

Para el desarrollo del análisis de la cinética de la actividad enzimática en las muestras bajo estudio se siguió el procedimiento experimental que se indica en la Figura 11.

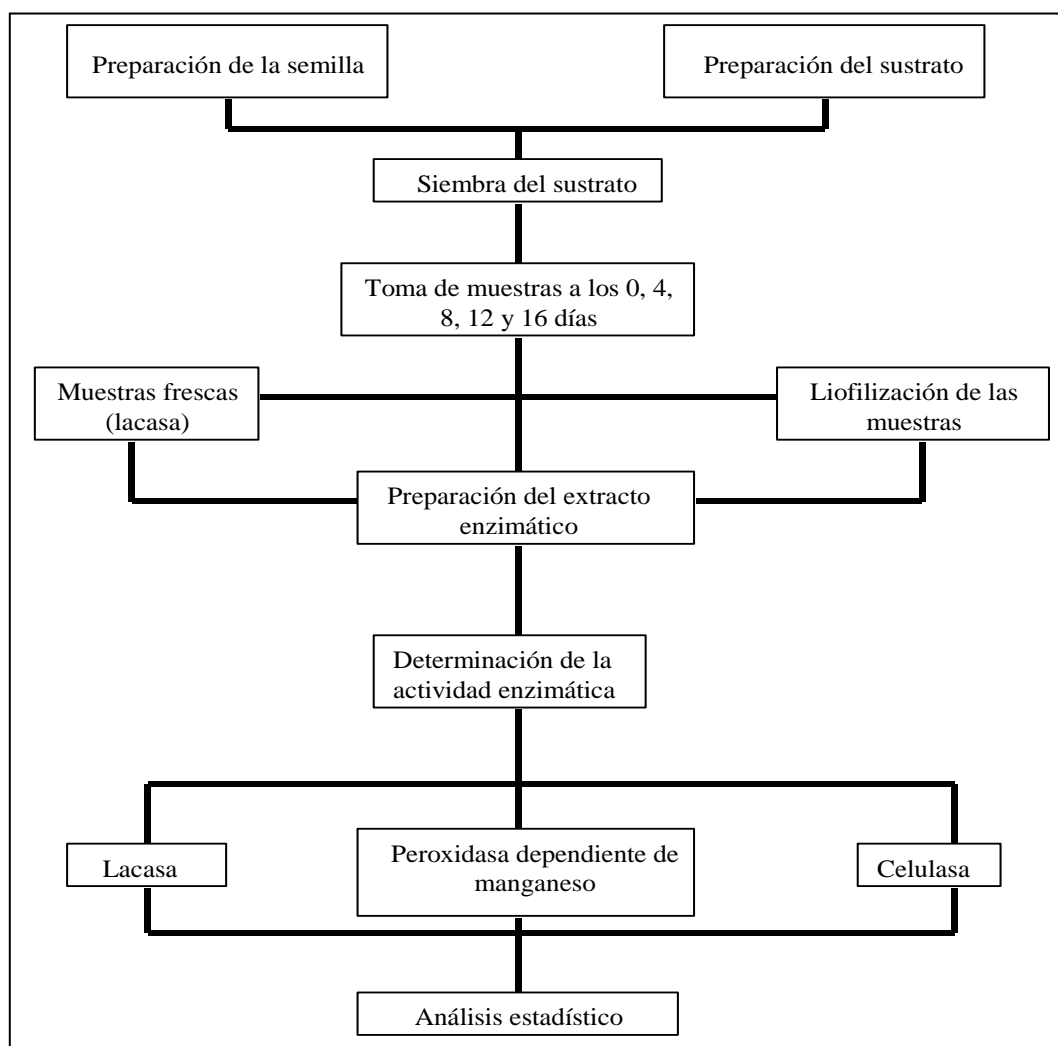


Figura 11. Procedimiento experimental seguido para el estudio de la cinética de la actividad enzimática

4.4.1. Preparación de la semilla

La semilla se preparó de manera convencional de acuerdo con lo reportado por Guzmán *et al.*, (1993b), utilizando granos de sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), mismos que se limpiaron mediante enjuagues continuos con agua corriente. Los granos de sorgo se sumergieron en agua fría durante 24 h para su hidratación y posteriormente se colocaron 100g de éstos en bolsas de polipapel, las cuales se esterilizaron durante 1h a 121 °C . Con la ayuda de un bisturí, se transfirió a cada una de las bolsas aproximadamente 1 cm² del micelio cultivado en la caja de Petri en medio EMA. Las bolsas con el micelio se incubaron a 28 °C durante 15 días en condiciones de oscuridad.

4.4.2. Preparación y siembra del sustrato

Se colocaron 250 g de pulpa de café previamente hidratada, mediante inmersión en agua fría durante 24 h, en bolsas de polipapel; posteriormente, éstas se esterilizaron durante 1 h a 121 °C. Cuando el sustrato estuvo frío, se inoculó adicionando al mismo 12.5g (equivalente al 5%) de la semilla previamente preparada (4.4.1). Para los estudios de confrontación, se colocó un implante de agar con micelio de *Trichoderma* (de 5mm de diámetro) dentro de la bolsa con pulpa de café inoculada con *Pleurotus*, este micelio se inoculó en el medio de cultivo un día antes, para evitar la esporulación de este hongo. Las bolsas se incubaron a 28 °C bajo condiciones de oscuridad.

4.4.3. Diseño experimental

Para el desarrollo de este experimento se utilizó un diseño completamente al azar (6X3) en el que se consideraron dos factores: Factor 1, formado por las seis cepas de *Pleurotus* y, Factor 2, formado por las tres cepas de *Trichoderma*. De la combinación de estos factores se obtuvieron 18 tratamientos, más los testigos respectivos de cada factor, formando un total de 27 tratamientos. La unidad experimental fue la bolsa con sustrato inoculado, y se consideró como unidad de

estudio a la cubeta del espectrofotómetro, donde se realizaron en todos los casos tres lecturas como repeticiones.

4.4.4. Evaluación

Para determinar la cinética de la actividad enzimática se tomaron muestras de sustrato con micelio a los 0, 4, 8, 12 y 16 días de cultivo, contándose a partir de la fecha de la siembra. Para la determinación de la actividad lacasa se utilizaron muestras frescas, mientras que para la determinación de las actividades celulasa y peroxidasa dependiente de manganeso, se utilizaron muestras liofilizadas que se mantuvieron en refrigeración, hasta su utilización.

4.4.5. Preparación del extracto enzimático

Para la preparación de los extractos enzimático se utilizaron frascos de 100 ml, conteniendo 0.7 g de sustrato fresco, adicionando 10 ml de agua destilada. Los frascos se colocaron en el roto-torque en posición vertical haciéndolos girar a 45 rpm durante 30 minutos. El líquido recuperado se filtró en una malla fina de nylon (porosidad de 0.37 mm) y finalmente se centrifugó a 3 °C y 8500 rpm (100016 x g) durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió posteriormente a un tubo de ensaye limpio con el fin de evaluar la actividad enzimática.

4.4.6. Determinación de la cinética de la actividad enzimática.

Para la determinación de la actividad de la enzima lacasa (figura 12) en pulpa de café, se siguió el método descrito por Leonowicz y Grzywnowicz (1981), que está basado en la oxidación de siringaldazina utilizando tampón fosfato-citrato 0.1 M pH 5. Se leyó la cinética a 526 nm en el espectrofotómetro (Spectronic Genesis 5).

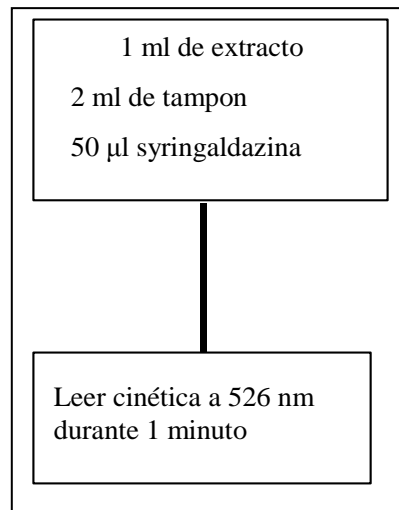


Figura 12. Protocolo seguido para el estudio de la cinética de la actividad de lacasa

Para la determinación de la actividad de la peroxidasa dependiente de manganeso se siguió el procedimiento descrito por Lonergan y Baker (1995), el cual permite determinar esta actividad por la oxidación del ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB), 3metil-2-benzothiazolinone hydrazone hydroclride (MBTH), adicionando sulfato de manganeso (MnSO_4) y peroxido de hidrógeno (H_2O_2) como sustrato (Figura 13). Se leyó la cinética a 590 nm en el espectrofotómetro (Spectronic Genesis 5).

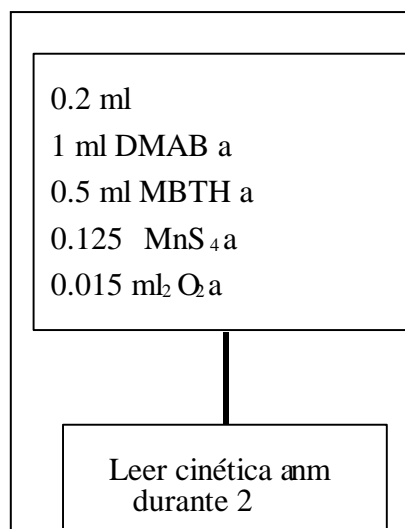


Figura 13. Protocolo seguido para la determinación de la cinética de la actividad de peroxidasa dependiente de manganeso.

La cinética de la actividad de la celulasa se realizó midiendo la liberación de azúcares reductores, utilizando como extracto enzimático carboximetilcelulosa (CMC) al 2%, de acuerdo con el método de Miller (1959) (Figura 14). La densidad óptica se leyó a 550 nm contra la gama de color para el ácido dinitrosalisílico (DNS) en el espectrofotómetro (Spectronic Genesis 5).

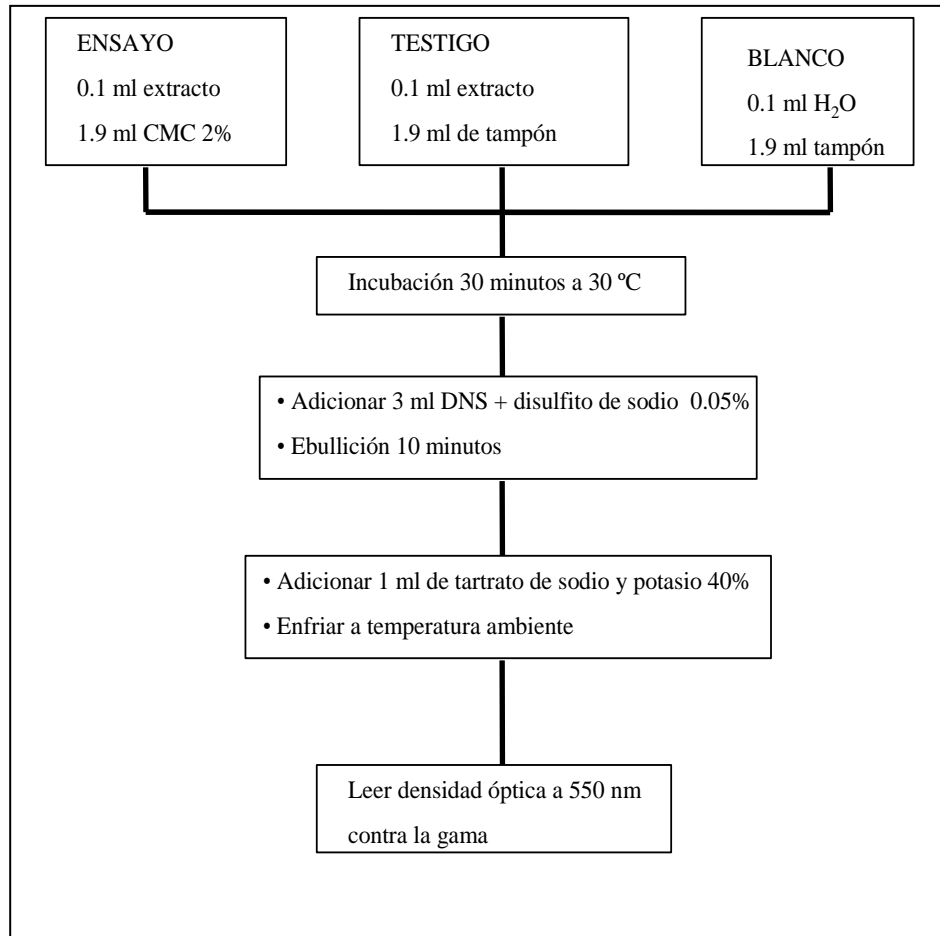


Figura 14. Protocolo seguido para la determinación de la cinética de la actividad enzimática celulasa

4.4.7. Determinación de la concentración de fenoles solubles.

La determinación de la concentración de fenoles solubles en el sustrato se realizó por el método de Box (1983), basado en el uso del reactivo de Folin Ciocalteu`s (Figura 15).

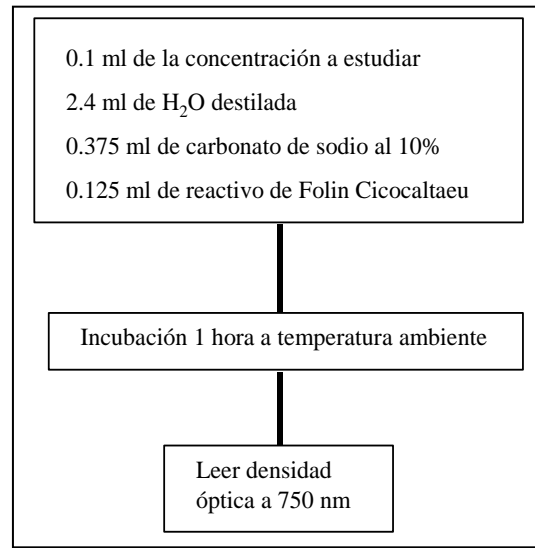


Figura 15. Procedimiento seguido para la determinación de la concentración de fenoles solubles.

4.4.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos por cada variable en estudio fueron procesados mediante el programa STATISTICA (versión 6). Para ello se realizó previamente un análisis exploratorio; un análisis de correlación entre la producción de lacasa y la degradación de fenoles solubles del sustrato; posteriormente se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA), de acuerdo con el siguiente modelo:

$$\begin{bmatrix} y_{1ijkl} \\ y_{2ijkl} \\ y_{3ijkl} \end{bmatrix} = \mu + C_i + T_j + t_k + CT_{ij} + Ct_{ik} + Tt_{jk} + CTt_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde

y_1 = lacasa; y_2 = peroxidasa dependiente de manganeso; y_3 = celulasa

C_i = Cepas de *Pleurotus* $i= 1, 2, \dots, 6$

T_j = Cepas de *Trichoderma* $j= 1, 2, 3$

t_k = Días de cultivo $k= 4, 8, 12, 16$

ε_{ijkl} = error experimental $l= 1, 2,$

4.5. Experimento. III. Análisis del antagonismo sobre la producción de lacasa

Con base en los resultados obtenidos en el experimento anterior se seleccionaron las cepas: IE-225 de *Pleurotus pulmonarius* y la cepa IE-637 de *Trichoderma viride*, para determinar el efecto del antagonismo sobre la producción de lacasa extracelular (figura 16).

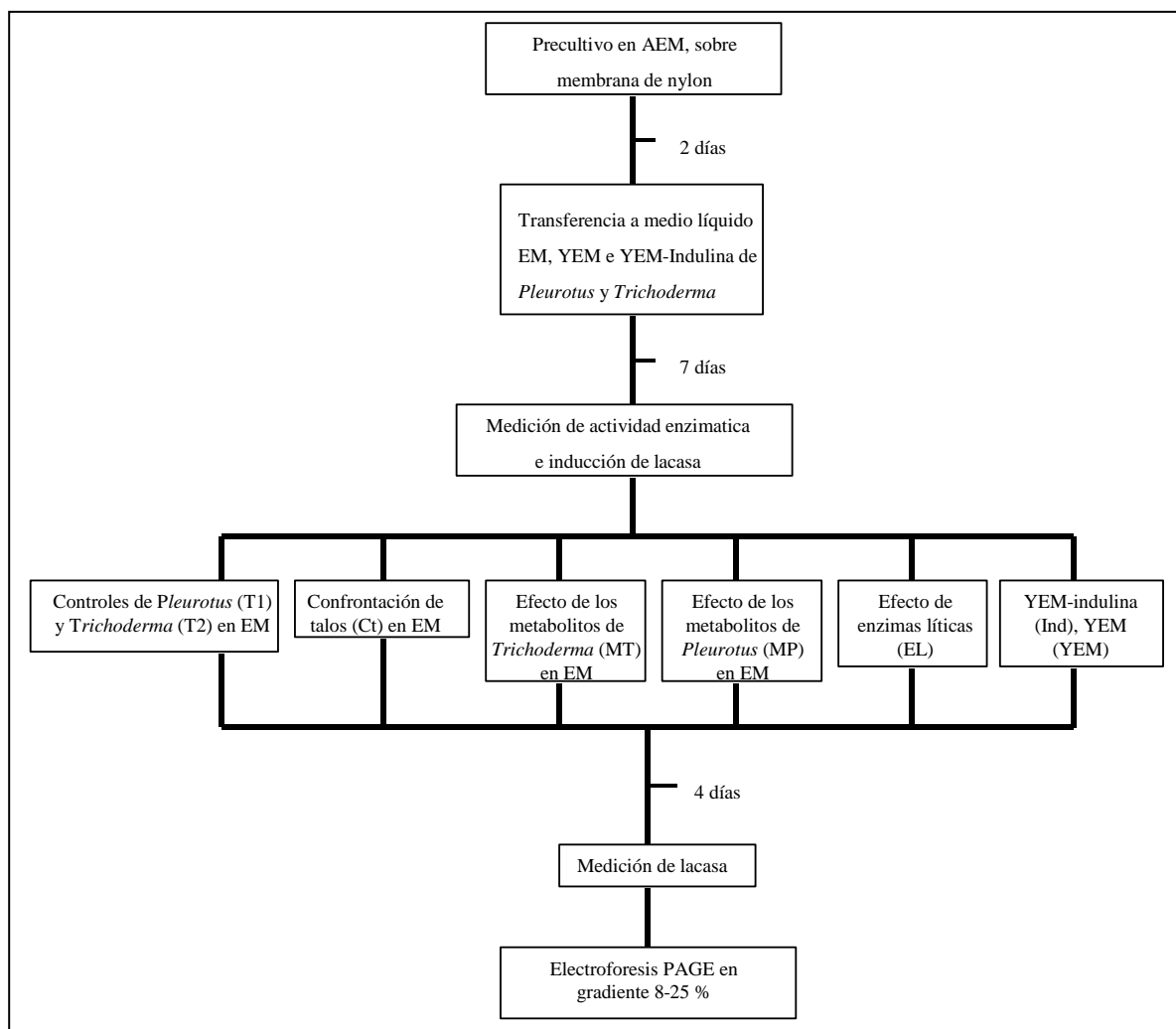


Figura 16. Procedimiento experimental seguido para el análisis del antagonismo sobre la producción de lacasa.

Las cepas de *Pleurotus* y de *Trichoderma*, fueron precltivadas en una membrana de nylon de 2 cm de diámetro durante dos días en medio de cultivo AEM. Las membranas colonizadas por micelio se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de

medio de cultivo líquido, para mantener el micelio en la superficie del medio. Estos cultivos se incubaron durante 11 días a 25 °C. La actividad de lacasa se midió en medio líquido con el método de Leonowicz y Grzywnowicz (1981), a los 7 y 11 días de haber sido inoculado el medio.

El cultivo líquido control de *P. pulmonarius* y de *T. viride* se mantuvieron sin cambios en el cultivo durante todo el experimento, y se denominaron T1 y T2 respectivamente.

4.5.1. Inducción de lacasa

4.5.1.1. Confrontación de talos

Cuando el cultivo de *P. pulmonarius* en EM cumplió siete días, se colocó en el margen del micelio una membrana de nylon con micelio de *T. viride*, cuatro días después se midió la actividad de lacasa, este tratamiento se identificó como Ct.

4.5.1.2. Efecto de los metabolitos extracelulares de *Trichoderma*

Se cultivó *T. viride* en EM; a los siete días se filtro en condiciones asépticas, el medio de cultivo, para dejar este libre de células; para esto, se utilizaron filtros de nylon de 0.2 µm (Wathman). En este medio filtrado, se colocó una membrana de nylon con *P. pulmonarius*. De la misma manera se cultivó *P. pulmonarius* en EM, a los siete días se filtró y se inoculó *T. viride* en las mismas condiciones, en ambos casos se midió la actividad cuatro días después de haber filtrado el medio de cultivo. Estos tratamientos se llamaron MT y MP respectivamente.

4.5.1.3. Efecto de enzimas líticas

Se determinó el efecto de las enzimas líticas de *T. harzianum* (polvo liofilizado conteniendo aproximadamente un 80% de proteína), en la producción de lacasa extracelular. Esto se hizo diluyendo 0.1 g ml^{-1} de enzimas líticas (Sigma) en agua destilada, se filtró utilizando filtro de nylon de $0.2\ \mu\text{m}$ (Wathman), se agregó un mililitro de esta solución a los matraces con cultivos de *P. pulmonarius* en EM de siete días, este tratamiento se denominó EL.

4.5.1.4. Efecto del medio YEM-Indulina

Para la inducción de la actividad de la lacasa al medio de cultivo líquido de *P. pulmonarius* en YEM (extracto de malta y levadura), se adicionaron derivados solubles de lignina (Indulina AT, Sigma), ajustándose la concentración de los fenoles a $0.1\ \text{mM}$, de acuerdo con la técnica propuesta por Mata *et al.* (1997). Otro tratamiento se formó con el mismo medio pero sin indulina; estos tratamientos se identificaron como Ind y YEM respectivamente.

4.5.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática de la lacasa, evaluada en cada uno de los tratamientos examinados, fueron procesados a través del programa STATISTICA (versión 6). Se realizó un análisis de varianza (ANVA), completamente al azar y una comparación de medias de Tukey.

4.5.1. Electroforesis

Para la preparación de los extractos para la electroforesis, se tomó de cada uno de estos tratamientos $1\ \text{ml}$ del extracto enzimático; estos se filtraron por centrifugación a $13\ \text{rpm}$ durante $90\ \text{minutos}$ a $3\ ^\circ\text{C}$ en filtros (Millipore Ultrafree-MC), el botón obtenido fue lavado con $20\ \mu\text{l}$ de

tampón Tris-HCl, pH 6.8 y se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizado para la electroforesis. Este mismo procedimiento se realizó con muestras de cultivo de *P. pulmonarius* en pulpa de café con y sin *T. viride* (obtenidas del experimentoII).

La electroforesis se realizó utilizando de geles de poliacrilamida (PAGE) de gradiente 8-25% (Pharmacia), con tampón de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). La corrida se realizó en un sistema de electroforesis Phast (Pharmacia Biotech). Para la tinción de las bandas de lacasa se utilizó como sustrato una solución de 0.09% de 4-Cloro-1-naphtol en tampón 0.1M de acetato de sodio, pH 5, posteriormente los geles se fijaron en solución de ácido acético al 7%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Experimento I. Caracterización bioquímica de las cepas bajo estudio

Los resultados de los análisis electroforéticos realizados a las seis cepas de *Pleurotus* en estudio permitieron detectar un total de 41 bandas. Para el sistema de proteínas totales se encontró que las 23 bandas polimórficas detectadas, se agruparon en tres zona electroforéticas de movilidad aniónica: Pt1, Pt2, y Pt3. La zona Pt1 estuvo conformada por siete bandas de menor movilidad anódica que mostraron valores Rf entre 0.09-0.30. La zona Pt2 estuvo formada por nueve bandas con valores de Rf que oscilaron entre de 0.36-0.59. Mientras que la zona Pt3 estuvo formada por siete bandas cuyos valores de Rf variaron de 0.66-0.81 (Figura 17).

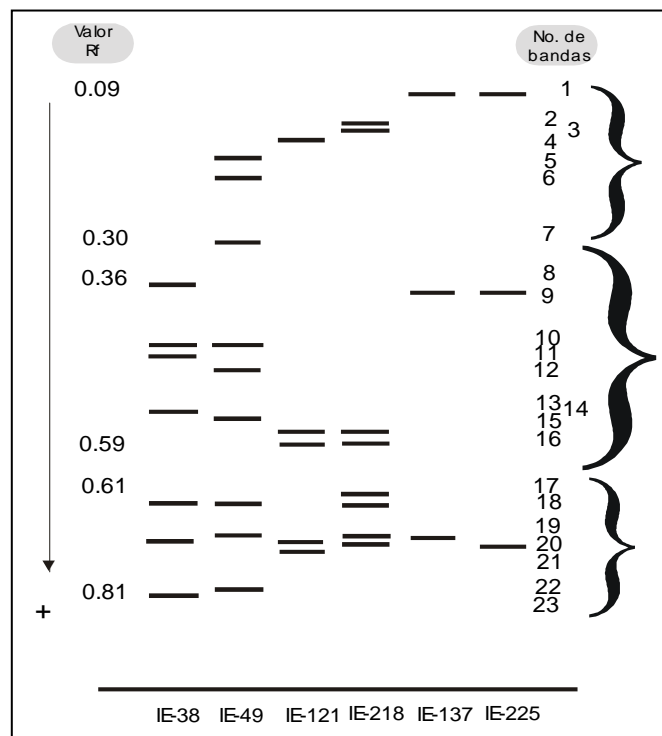


Figura 17. Proteinograma de las seis cepas de *Pleurotus* (IE-38, IE-49, IE-121, IE-218, IE-137 e IE-225). La flecha indica la dirección de migración de las bandas proteicas detectadas. Pt1, Pt2, Pt3: zonas electroforéticas.

Por otra parte, el análisis de la composición esterasa de las seis cepas de *Pleurotus* en estudio (Figura 18) reveló la presencia de 18 bandas polimórficas. Las isoformas esterasas detectadas se distribuyeron en cuatro zonas electroforéticas (Est1, Est2, Est3, Est4), en un intervalo de movilidad anódica (Rf) entre 0.09 a 0.89. La zona Est1 de menor movilidad aniónica estuvo conformada por una banda cuyo valor de Rf fue de 0.9. En la zona Est2 se apreció la presencia de siete bandas con valores Rf entre 0.24 –0.47. La región Est3 por su parte estuvo formada por cinco bandas con valores Rf entre 0.61-0.68. Por último, en la zona de mayor migración anódica Est4 se aprecian cuatro bandas con valores Rf entre 0.80-0.89. Cabe destacar que todas las bandas detectadas fueron polimórficas.

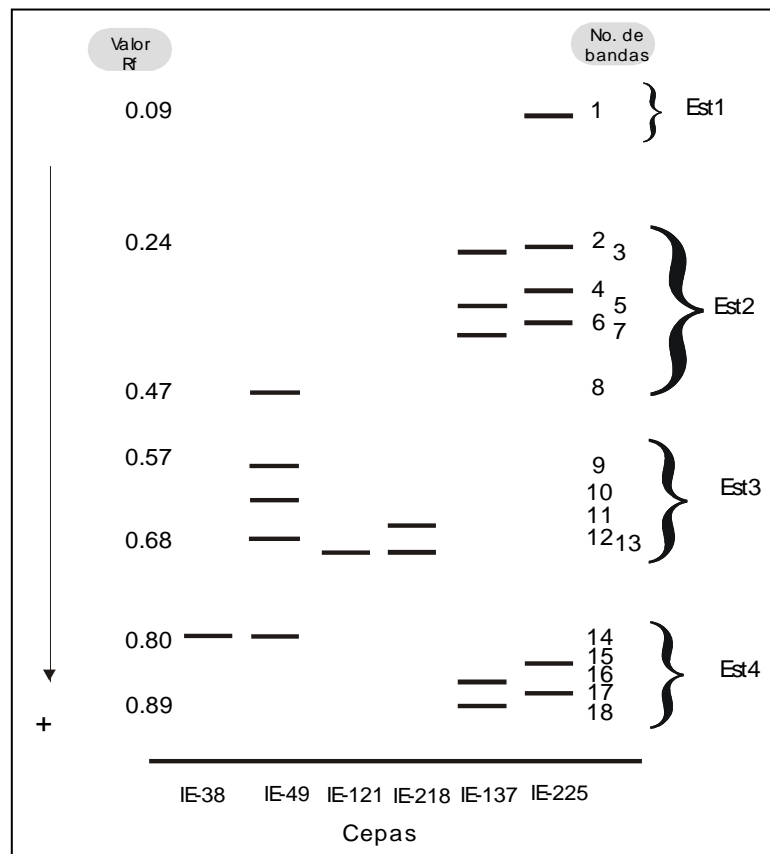


Figura 18. Zimograma esterasa de las seis cepas de *Pleurotus* (IE-38, IE-49, IE-121, IE-218, IE-137 e IE-225). La flecha indica la dirección de migración de las isoformas esterasas detectadas. Est1, Est2, Est3, Est4: zonas electroforéticas.

Estos resultados muestran la existencia de una marcada variación electroforética en las seis cepas de *Pleurotus* en estudio y concuerda con lo esperado, dada la variación en las

características morfológicas de las especies a las que pertenecen las cepas *P. djamor*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius*.

Por otra parte, el alto polimorfismo detectado en este estudio confirma lo planteado por Zervakis y Labaréré (1992), en relación con la utilidad de incluir a los marcadores bioquímicos para la identificación taxonómica y registro de las cepas comerciales de *Pleurotus*.

Con base en el polimorfismo detectado, se elaboró una clave para la identificación de las seis cepas de *Pleurotus* en estudio (Tabla 3). De acuerdo con estos resultados las variantes electroforéticas de proteínas totales y esterasas detectadas permitieron distinguir de manera específica a cada cepa en estudio.

Tabla 3. Clave para la determinación bioquímica de las seis cepas de *Pleurotus* spp. mediante el empleo de las variantes polimórficas de proteínas totales y esterasas detectadas en el estudio.

<ul style="list-style-type: none"> ■ Presencia de Pt8 y Pt1..... <ul style="list-style-type: none"> ● Presencia de E1, E2, E4, E6, E15, E17.....Cepa IE-225 ● Presencia de E3, E5, E7, E16, e18Cepa IE-137 □ Ausencia de Pt8 y Pt1..... <ul style="list-style-type: none"> ● Presencia de Pt2, P3 y E11.....IE-218 <ul style="list-style-type: none"> ○ Ausencia de P2, P3 t E11..... <ul style="list-style-type: none"> ▪ Presencia de Pt19.....Cepa IE-121

Es evidente de acuerdo con estos resultados las variantes bioquímicas detectadas pueden considerarse una herramienta útil para estudios taxonómicos que se realicen en el género *Pleurotus*.

5.1.1. Análisis multivariado de la composición bioquímica

Los resultados del análisis de correspondencias múltiples efectuado a la matriz de datos conformados por las seis cepas y las 41 bandas polimórficas detectadas, permitió constatar que los dos primeros ejes explicaron el 50.04 % de la variación detectada (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de la variabilidad explicada según el Análisis Factorial de Correspondencias Múltiples aplicado al polimorfismo isoenzimático.

Ejes	Valores propios	Porcentaje acumulado	Chi cuadrado
1	.941553	26.1115	48.75874
2	.901469	50.0471	44.69551

Por otra parte, el análisis de los vectores propios permitió constatar que las bandas 1, 9, 15 y 16 de proteínas totales (PT) y la de Esterasa 36 (EST) fueron las que más contribuyeron a la formación de los ejes 1 y 2 respectivamente (Tabla 5). Cabe mencionar que dichas bandas sólo las reportaron 4 de las 6 cepas estudiadas.

En la figura 19 se puede apreciar la representación gráfica de la distribución de las variantes polimórficas de proteínas totales e isoenzimas esterazas de las seis cepas de *Pleurotus* examinadas. De acuerdo con estos resultados las cepas fueron clasificadas en tres grupos. El primer grupo estuvo formado por las cepas IE38 e IE49 que pertenecen a *P. ostreatus*. En el segundo grupo se encuentran las cepas IE 121 e IE 218 que corresponden a *P. djamor*. Y en el tercer grupo quedaron las cepas IE-137 e IE225 de *P. pulmonarius*.

Tabla 5. Análisis de la contribución de los vectores propios a la formación de los ejes 1 y 2 por cada banda de proteínas totales y esterasas (los números en negrita son significativos).

AUTOVECTORES	CALIDAD DE REPRESENTACIÓN	EJE 1	EJE 2
PT 1	.996622	.082940	.009706
PT 2	.358935	.001326	.034692
PT 3	.358935	.001326	.034692
PT 4	.418874	.000628	.075850
PT 5	.702292	.021470	.022594
PT 6	.702292	.021470	.022594
PT 7	.702292	.021470	.022594
PT 8	.114090	.012735	.001103
PT 9	.996622	.082940	.009706
PT 10	.703429	.033638	.016842
PT 11	.114090	.012735	.001103
PT 12	.702292	.021470	.022594
PT 13	.114090	.012735	.001103
PT 14	.702292	.021470	.022594
PT 15	.910360	.001890	.106568
PT 16	.910360	.001890	.106568
PT 17	.358935	.001326	.034692
PT 18	.584129	.029163	.000002
PT 19	.034003	.000065	.001781
PT 20	.613532	.000325	.039634
PT 21	.418874	.000628	.075850
PT 22	.702292	.021470	.022594
PT 23	.114090	.012735	.001103
EST 24	.430289	.044264	.000917
EST 25	.430289	.044264	.000917
EST 26	.412205	.038767	.011891
EST 27	.430289	.044264	.000917
EST 28	.412205	.038767	.011891
EST 29	.430289	.044264	.000917
EST 30	.412205	.038767	.011891
EST 31	.702292	.021470	.022594
EST 32	.702292	.021470	.022594
EST 33	.702292	.021470	.022594
EST 34	.358935	.001326	.034692
EST 35	.702292	.021470	.022594
EST 36	.910360	.001890	.106568
EST 37	.703429	.033638	.016842
EST 38	.430289	.044264	.000917
EST 39	.412205	.038767	.011891
EST 40	.430289	.044264	.000917
EST 41	.412205	.038767	.011891

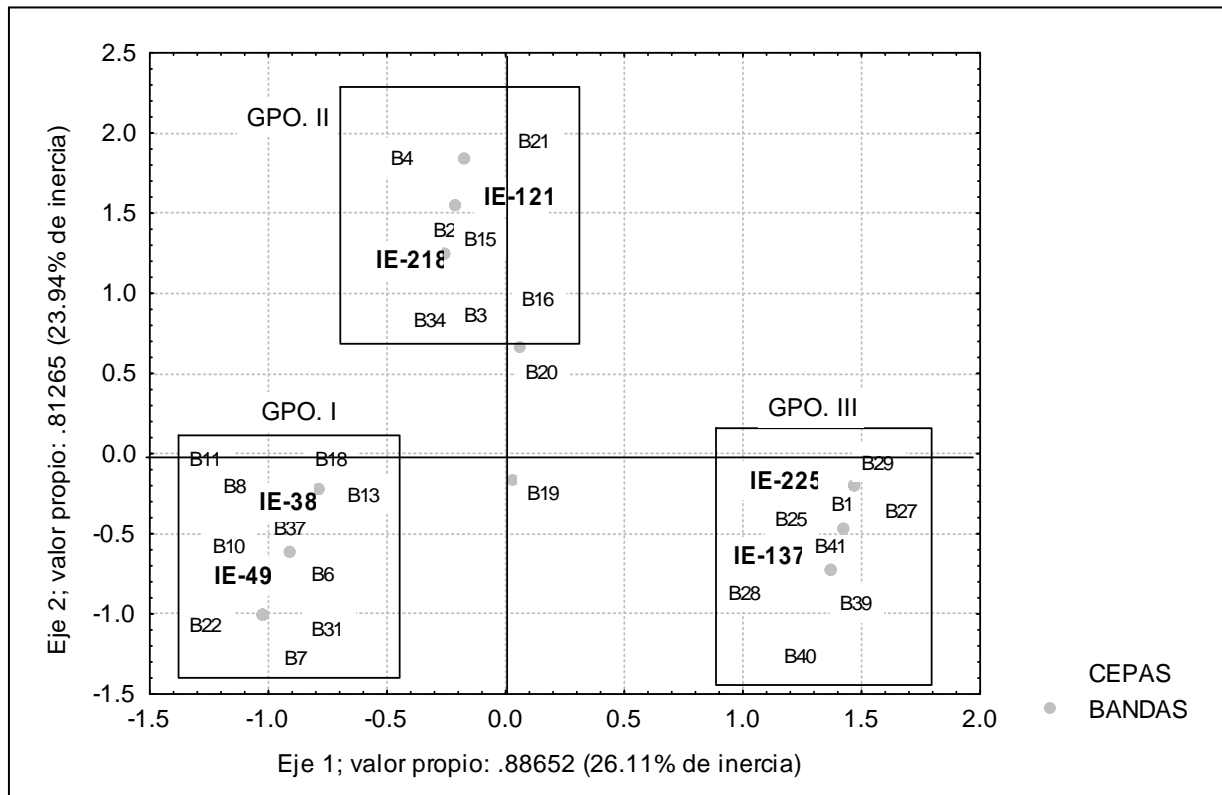


Figura 19. Representación gráfica de la distribución de las variantes de proteínas totales y estererasas de las seis cepas de *Pleurotus*.

La clasificación anterior de las cepas de *Pleurotus*, fue confirmada mediante un análisis de conglomerado (Figura 20) empleando como índice de similitud el coeficiente de similitud de Jaccard y el algoritmo de ligamiento simple. Se pudo constatar la formación de tres grupos, cada uno consistente de dos cepas, lo cual tiene una concordancia con la clasificación taxonómica establecida sobre la base de las características morfológicas de las cepas.

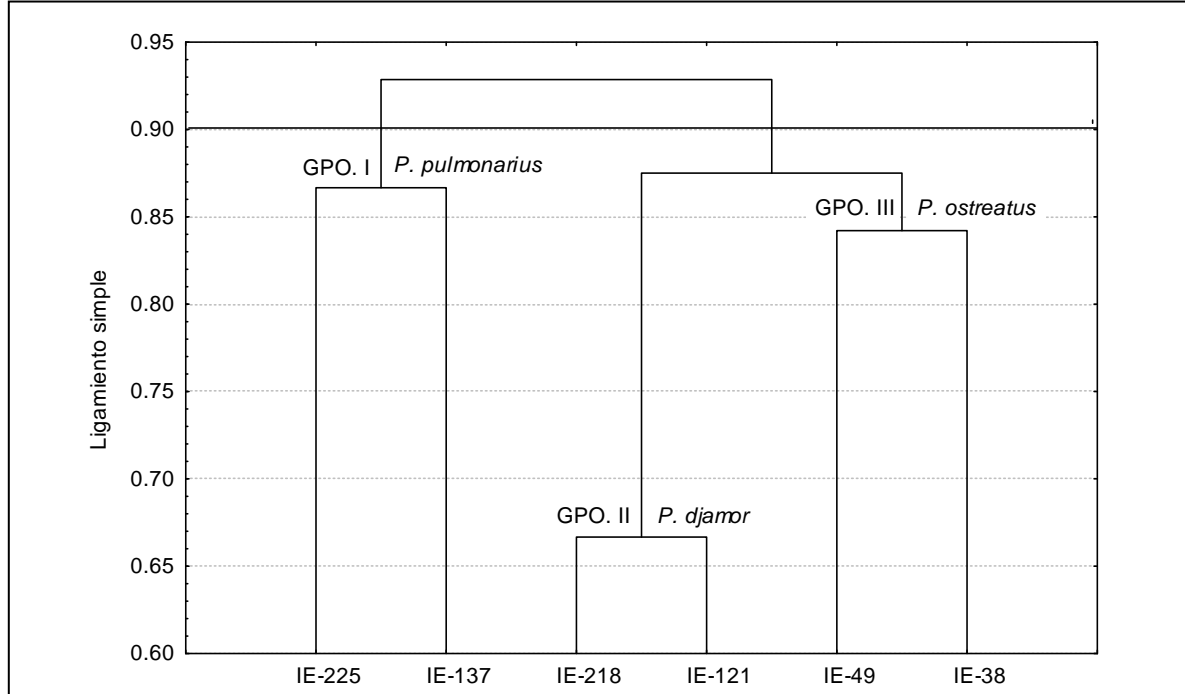


Figura 20. Dendrograma del análisis de conglomerado efectuado a los datos bioquímicos obtenidos. Grupo I *P. pulmonarius* IE-137 e IE-225; Grupo II *P. djamor* IE-121 e IE-218 y Grupo III *P. ostreatus* IE-38 e IE-49.

De acuerdo con estos resultados se aprecia una mayor similitud entre las cepas IE-121 e IE-218 de *P. djamor*. Estas cepas a su vez estuvieron más relacionadas con las cepas del grupo conformado por la especie *P. ostreatus* (Figura 20).

Levanon *et al.*, (1993) realizaron un estudio similar se han realizado para la selección de cepas comerciales de *L. edodes*, y encontraron que las isoenzimas esterasas constituían un buen indicador de la variabilidad genética, existente entre las cepas estudiadas.

5.2. Experimento II. Análisis cuantitativo de la actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasa producida durante el crecimiento vegetativo de las seis cepas de *Pleurotus* en confrontación con tres cepas de *Trichoderma*, se muestra en la Figura 21.

La lacasa incrementó su actividad en el día 8, obteniendo su máximo a los 12 días y decreciendo en la mayoría de las cepas para el día 16, cuando el micelio cubrió el sustrato por completo, excepto en la confrontación con *T. resei*, donde se mantuvo la actividad al mismo nivel hasta el día 16. Los valores más altos correspondieron a las cepas IE-137 e IE 225 de *P. pulmonarius*, presentándose un incremento significativo en la actividad de la lacasa en la confrontación con *T. viride* 1 con respecto al testigo (MANOVA $p < 0.001$).

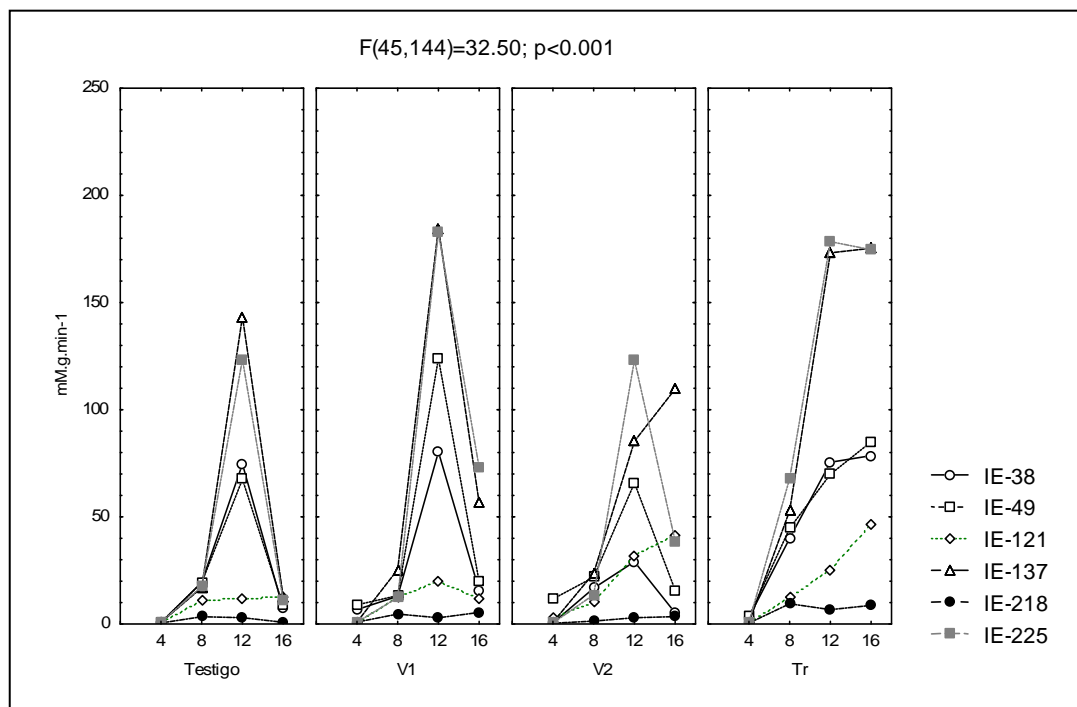


Figura 21. Cinética de la actividad enzimática de lacasa durante el desarrollo vegetativo de seis cepas de *Pleurotus* (IE-38, IE-49, IE-121, IE-137, IE-218, IE-225), confrontadas con tres cepas de *Trichoderma* (testigo de *Pleurotus*, v1= *Trichoderma viride* IE-637, v2= *Trichoderma viride* IE-638 y Tr= *Trichoderma resei* IE-639).

De igual forma la actividad de la peroxidasa dependiente de manganeso mostró un patrón similar al de la lacasa, es decir, alcanzó su máxima actividad para el día 12 en la mayoría de las cepas, decreciendo en el día 16, excepto en la confrontación con *T. resei*, donde continuó su incremento hasta el día 16 (Figura 22). Los valores más altos detectados en todas las confrontaciones examinadas correspondieron a las dos cepas de *P. pulmonarius*, (IE-137 y la IE-225). Se presentó un incremento significativo en la actividad de la MnP en la confrontación con

T. resei, la cual continuó incrementándose en el día 16, lo mismo ocurre para la cepa IE-225 con *T viride* 2 (MANOVA $p < 0.001$).

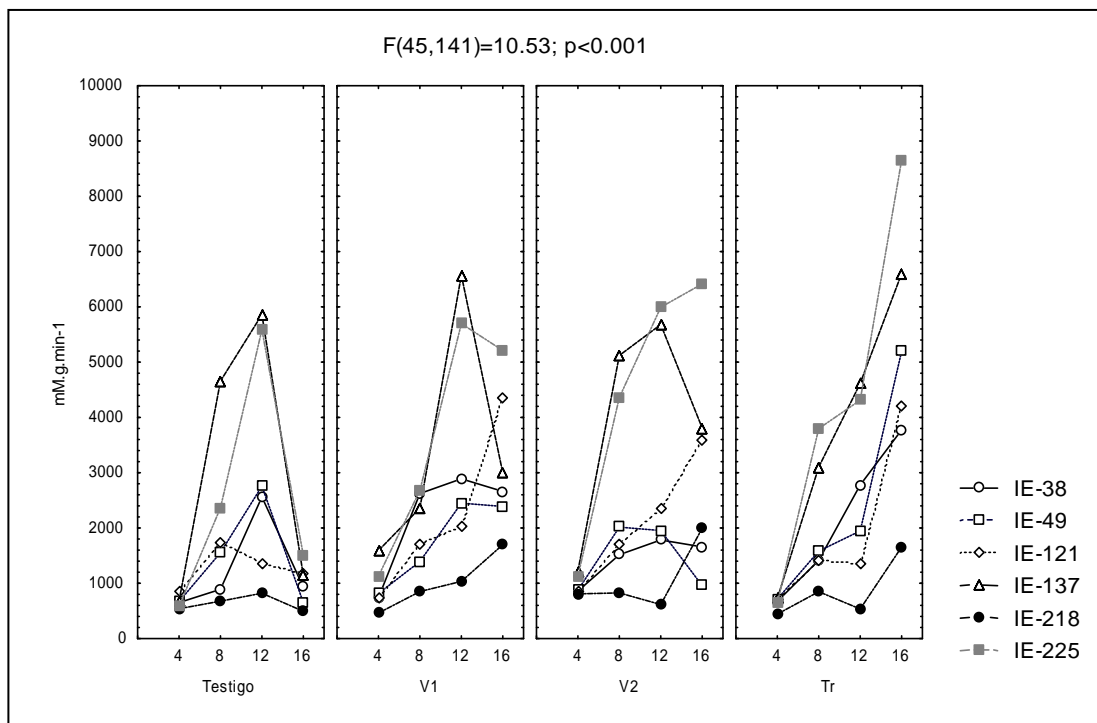


Figura 22. Cinética de la actividad enzimática de peroxidasa dependiente de manganeso durante el desarrollo vegetativo de seis cepas de *Pleurotus* (IE-38, IE-49, IE-121, IE-137, IE-218, IE-225), confrontadas con tres cepas de *Trichoderma* (testigo de *Pleurotus*, v1= *Trichoderma viride* IE-637, v2= *Trichoderma viride* IE-638 y Tr= *Trichoderma resei* IE-639).

La actividad de la celulasa por su parte se mantuvo a un nivel bajo durante el desarrollo vegetativo de *Pleurotus* (Figura 23). Algunos autores (Kaviyarasan y Natarajan, 1997; Mata y Savoie, 1998a), han indicado que la celulasa se incrementa durante la formación de primordios a más de 50 UAE y en ocasiones se mantiene durante la fructificación para luego declinar en la cosecha.

En la confrontación con *T. resei*, se apreció un incremento significativo en la actividad celulasa a los 16 días (MANOVA $p < 0.001$) para las cepas IE-121 e IE-218 de *P. djamor*, lo cual puede constituir un indicador de un estado previo a la fructificación, debido a la precocidad de estas cepas.

La actividad de la celulasa no se incrementó porque únicamente se estudio el desarrollo vegetativo, debido a que es en el periodo en que mas problemas existen en el cultivo por la contaminación con *Trichoderma*. A pesar de que *Trichoderma* produce polisacaridasas, en el cultivo de *Pleurotus* la actividad de celulasa fue relativamente baja durante el periodo de incubación en que se mantuvieron las seis cepas de *Pleurotus* bajo estudio, lo cual concuerda con lo reportado por Savoie y Mata (1999).

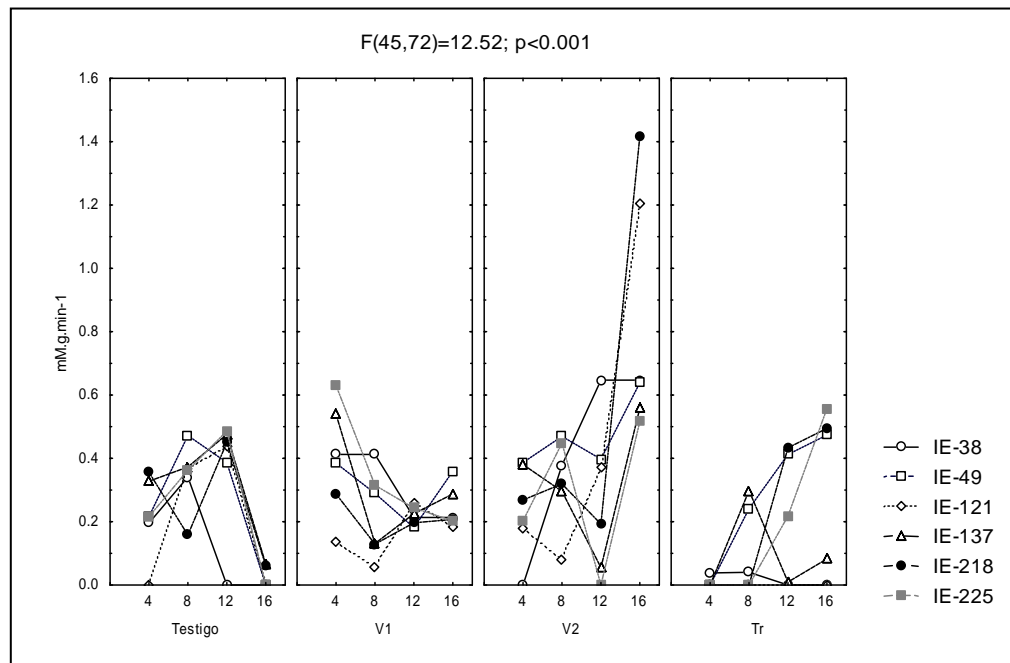


Figura 23. Cinética de la actividad enzimática de celulasa durante el desarrollo vegetativo de seis cepas de *Pleurotus* (IE-38, IE-49, IE-121, IE-137, IE-218, IE-225), confrontadas con tres cepas de *Trichoderma* (testigo de *Pleurotus*, v1= *Trichoderma viride* IE-637, v2= *Trichoderma viride* IE-638 y Tr= *Trichoderma resei* IE-639).

Se observó la degradación de fenoles para las seis cepas de *Pleurotus* independientemente de las confrontaciones (Figura 24). En todos los casos, la cantidad de fenoles disminuyó a menos de 5 $\mu\text{mol}/\text{ml}^{-1}$. Una diferencia apreciable fue que en el testigo y en la confrontación con *T. viride* 2 el valor más bajo de fenoles en el sustrato ocurrió en el día 8, mientras que para las confrontaciones con *T. viride* 1 y *T. resei* ocurrió hasta el día 12 (MANOVA

$p < 0.001$). Esto posiblemente se debió a que en esta última el área ocupada por *Pleurotus* era menor que en el testigo y en la confrontación con *T. viride* 2.

En las muestras que sólo contenían *Trichoderma*, no se observó degradación de fenoles (datos no presentados), debido a que este moho no produce lacasa ni peroxidasa dependiente de manganeso, por ser un hongo celulolítico. Esto coincide con lo reportado por Velásquez-Cedeño *et al.* (2002), en un estudio similar de cultivo de *Pleurotus* spp. en pulpa de café, donde no hubo degradación de fenoles en las muestras testigo.

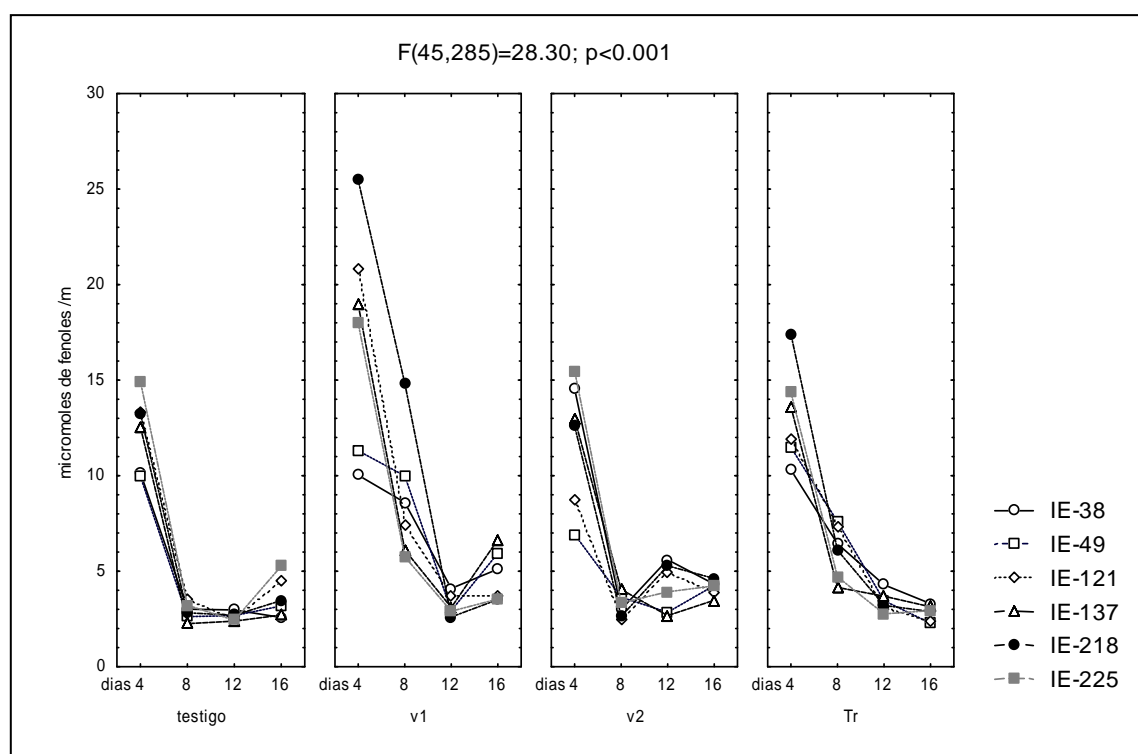


Figura 24. Degradación de fenoles solubles durante el desarrollo vegetativo de seis cepas de *Pleurotus* (IE-38, IE-49, IE-121, IE-137, IE-218, IE-225), confrontadas con tres cepas de *Trichoderma* (testigo de *Pleurotus*, v1= *Trichoderma viride* IE-637, v2= *Trichoderma viride* IE-638 y Tr= *Trichoderma resei* IE-639).

La lacasa, además de ser considerada importante en la degradación de lignina, actúa en la detoxificación de compuestos fenólicos (Medeiros *et al.*, 1999; Hublik y Schinner, 2000; Lucas *et al.*, 2001). Para cada cepa, la actividad de lacasa y degradación de fenoles estuvieron correlacionadas negativamente ($r = -0.61$); es decir, a mayor actividad de lacasa menor

concentración de fenoles, excepto en las cepa IE-121 e IE-218 de *P. djamor* ($r = -0.41$), donde la actividad de lacasa fue muy baja, sin embargo, los fenoles son degradados. Esto sugiere que en esta especie existe otro sistema enzimático diferente al estudiado en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos de la cinética enzimática muestran que las cepas de *Pleurotus* spp. presentan un patrón similar de secreción de enzimas. La actividad de las oxidasas coincidió con lo reportado por Mata y Savoie (1998a) para *L. edodes*, por Savoie (1998) para *Agaricus bisporus* y por Velásquez-Cedeño *et al.* (2002) para *Pleurotus* spp. Los cambios observados durante el desarrollo vegetativo entre la actividad enzimática y la concentración de fenoles, según Buswell *et al.* (1996) sugieren que la actividad de la MnP puede estar involucrada en la despolimerización del sustrato, mientras que la actividad de la lacasa podría estar relacionada con la detoxificación de compuestos fenólicos solubles.

Savoie y Mata (1999), reportaron que las consecuencias de la contaminación del sustrato de *L. edodes* por *Trichoderma* sp., fueron las siguientes: un incremento en la actividad de la lacasa como un mecanismo de reacción de *L. edodes*; un incremento de polisacaridasas producidas por *Trichoderma*; un decremento en la actividad de peroxidasa dependiente de manganeso y; un menor crecimiento de *L. edodes*. En el presente estudio, la actividad de la lacasa fue similar a lo reportado por estos autores, sin embargo, la actividad de la peroxidasa dependiente de manganeso, se incrementó y no disminuyó como en *L. edodes*, posiblemente porque éste fue cultivado en paja; de tal manera que el contenido de fenoles en la pulpa de café, puede ser el responsable del incremento de la peroxidasa dependiente de manganeso, la cual, según Salmones (2002), puede estar involucrada con la formación de biomasa, mientras que la lacasa se encarga de la detoxificación del sustrato y de inhibir el desarrollo de *Trichoderma*.

En la utilización de sustratos pasteurizados para el cultivo de *Pleurotus*, generalmente la inoculación no se realiza en condiciones de esterilidad, lo que trae como consecuencia un alto riesgo de contaminación del sustrato por esporas de mohos contaminantes, como los del género *Trichoderma*, durante la siembra. Sin embargo los síntomas de contaminación se pueden observar claramente dos semanas después en la superficie de las bolsas inoculadas, cuando el sustrato ha

sido cubierto por ambos antagonistas y las esporas verdes están presentes en la zona invadida por *Trichoderma*.

Las tres cepas de *Trichoderma* utilizadas en este estudio, mostraron diferente habilidad competitiva, lo que probablemente se deba a diferencias en agresividad y susceptibilidad a metabolitos producidos por *Pleurotus*, como lo mencionan Savoie *et al.* (2001) para *T. harzianum*. A este respecto Lupo *et al.* (2002), encontraron que las cepas de *Trichoderma* tienen diferente habilidad saprofitica, esto explicaría las diferencias observadas en las confrontaciones con las diferentes cepas de *Trichoderma*.

Es importante mencionar que el comportamiento mostrado por las cepas en cuanto a la actividad enzimática, corresponde con su clasificación taxonómica al igual que los grupos formados en el análisis multivariado efectuado a los datos bioquímicos.

5.3. Experimento III. Análisis del antagonismo sobre la producción de lacasa

Los resultados de la actividad enzimática de lacasa en medio líquido por la cepa IE-225 de *Pleurotus pulmonarius* y la cepa IE-637 de *Trichoderma viride*, se presentan en la Figura 25.

En el testigo de *Pleurotus* se observó un incremento de la actividad de la lacasa entre los siete y once días de cultivo. En los testigos de *Trichoderma*, no se observa actividad, lo que muestra que *Trichoderma* a diferencia de *Pleurotus*, no es capaz de producir lacasa (Figura 25). Resultados similares fueron reportados por Savoie *et al.* (1998), para *Trichoderma* en un estudio del antagonismo con *Lentinula edodes*.

En la confrontación de talos se observó que al agregar *Trichoderma viride* a los siete días de cultivo *P. pulmonarius*, se produjo un incremento significativo (ANVA $p < 0.001$). en la producción de lacasa cuatro días después (Figura 25), tal como ocurrió en la confrontación entre estas especies realizada en pulpa de café. El aumento en la producción de lacasa fue debido a *Pleurotus*, pues como se mencionó *Trichoderma* no produce lacasa.

Para el caso de *P. pulmonarius* creciendo en metabolitos de *T. viride*, no se presentó actividad de lacasa (Figura 25), debido a que los efectos tóxicos de los metabolitos de *Trichoderma* no permitieron el desarrollo de *Pleurotus*. Mientras que cuando *Trichoderma* crece en metabolitos de *Pleurotus*, el nivel de la actividad de lacasa producida previamente por *Pleurotus* decreció, debido posiblemente a que *Trichoderma* degradó la lacasa presente en el medio.

Con la adición de enzimas líticas en el medio, se observó un incremento significativo (ANVA $p < 0.001$), de la actividad de lacasa (Figura 25), lo cual reafirma que no es necesaria la presencia del micelio de *Trichoderma* para producir efectos tóxicos. En la producción de lacasa por *Pleurotus*, Savoie *et al.* (2001) mencionan que las enzimas producidas por *Trichoderma harzianum* que degradan la pared celular, son importantes elementos en la antibiosis y parasitismo ejercida por esta especie contra patógenos de plantas, sin embargo, no se descarta la presencia en la solución de enzimas líticas o en cultivos líquidos de otros metabolitos, que pudieran ser responsables de la inducción de lacasa.

La presencia de indulina en el medio, incrementó significativamente la actividad enzimática de la lacasa de *P. pulmonarius* a los siete días (ANVA $p < 0.001$), aunque ésta disminuyó para el día once (Figura 25). En el tratamiento con YEM, se presentó un comportamiento similar al testigo de *Pleurotus* en EM, aunque en este caso, se produjo una cantidad ligeramente mayor a la observada en EM.

Lo antes mencionado confirma lo reportado por Savoie *et al.* (1995) para *L. edodes*, en relación a que la actividad de lacasa se induce por la presencia de compuestos como la indulina. Estos autores mencionan que la adaptación de este hongo a los derivados de la lignina, implica la producción de enzimas como la lacasa, para detoxificar compuestos inhibitorios.

El aumento en la producción extracelular de lacasa, puede ser usado para mejorar el proceso de producción de la misma, ya sea con propósitos biotecnológicos o para la

detoxificación de sustratos con alto contenido de fenoles como la pulpa de café, reduciendo así el efecto contaminante de estos compuestos.

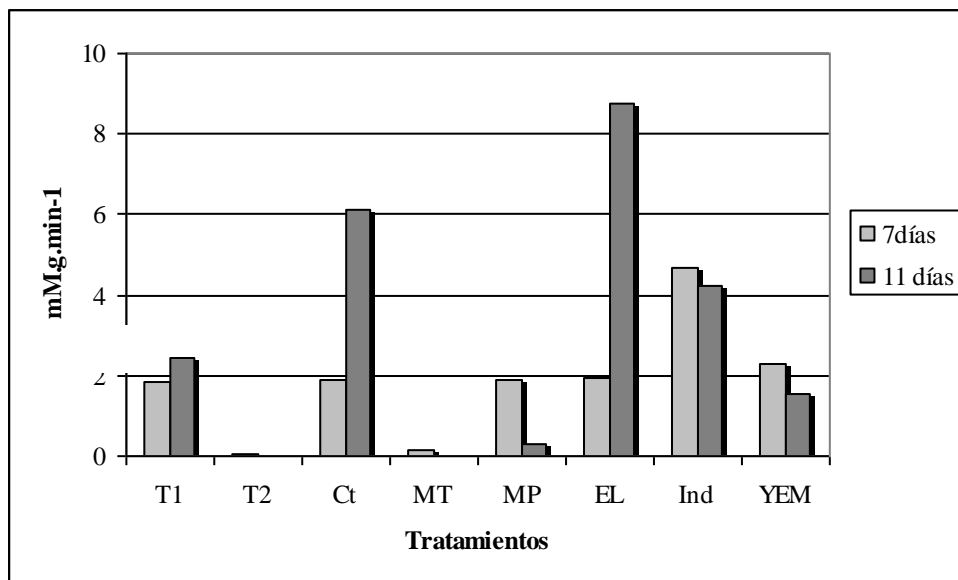


Figura 25. Actividad enzimática de lacasa en medio líquido. (T1= testigo de *Pleurotus*, T2= testigo de *Trichoderma*, Ct= confrontación de talos de *Pleurotus* y *Trichoderma*, NT= *Pleurotus* en metabolitos de *Trichoderma*, MP= *Trichoderma* en metabolitos de *Pleurotus*, EL= *Pleurotus* con enzimas líticas, Ind= *Pleurotus* en YEM-Indulina, YEM= extracto de malta con levadura). Las letras de las barras corresponden a los grupos formados por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Los resultados de los análisis electroforéticos se presentan en la figura 26. Se observan, en general, dos patrones de bandas principales; el primero estuvo formado por los tratamientos con *Pleurotus* en medio de cultivo líquido y; el segundo, por los cultivos en pulpa de café con y sin *Trichoderma*. Sin embargo el tratamiento con indulina presentó un patrón de bandas similar al observado en sustrato. La presencia de *Trichoderma*, no parece inducir la formación de nuevas isoformas de lacasa (Figura 26), sino únicamente estimula la producción extracelular de lacasas.

Palmieri *et al.* reportaron cinco isoformas de lacasa para *P. ostreatus*. De la misma manera Lo *et al.*, (2001), reportaron cinco isoformas de lacasa para *P. sajor-caju*, el hecho especie, o a que las condiciones experimentales son diferentes.

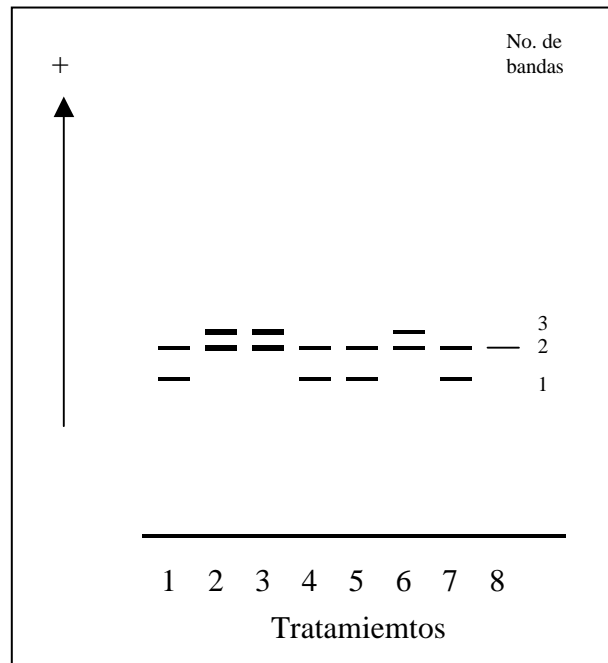


Figura 26. Zimograma de lacasa. 1= *Pleurotus* y *Trichoderma* EM, 2= *Pleurotus* y *Trichoderma* en pulpa de café, 3= *Pleurotus* en pulpa de café, 4= *Pleurotus* en EM, 5= 1, 6= *Pleurotus* en YEM-Indulina, 7= *Pleurotus* YEM, 8= *Pleurotus* con enzimas líticas. La flecha indica la migración de las proteínas.

Al observarse el mismo comportamiento de la actividad de lacasa tanto en sustrato como en medio líquido con indulina, se podría inferir que las cepas cultivadas en medio con indulina, son capaces de producir gran cantidad de lacasa y pueden resistir la presencia de *Trichoderma* en el sustrato. Por ello, podría considerarse que este método sería una forma sencilla de seleccionar cepas, con capacidad de resistir mohos antagónicos del género *Trichoderma*.

6. CONCLUSIONES

- Se detectó un marcado polimorfismo bioquímico en la composición de esterasas y proteínas totales en las seis cepas de *Pleurotus* examinadas, que permitió el establecimiento de una clave para la identificación taxonómica de las mismas.
- Los resultados de los análisis multivariados efectuados a los datos bioquímicos obtenidos confirman la clasificación taxonómica de las cepas de *Pleurotus* examinadas establecida a partir de características morfológicas.
- Se constató que de las tres actividades enzimáticas evaluadas las oxidasas fueron las que resultaron más eficiente para la degradación de la pulpa de café durante el desarrollo vegetativo.
- Existe una relación entre la capacidad de producción enzimática de las cepas de *Pleurotus* examinadas con su identificación taxonómica. Las cepas de *P. djamor* presentaron menor actividad enzimática, las cepas de *P. ostreatus* con actividad intermedia y las cepas de *P. pulmonarius* fueron las de mayor actividad de oxidasas, así como la más eficiente en la degradación de fenoles.
- La celulosa no juega un papel determinante en el desarrollo vegetativo de *Pleurotus*, aún en presencia de *Trichoderma*.
- *P. djamor* presentó menor actividad enzimática, sin embargo, se observó degradación de fenoles en la pulpa de café, por lo que se considera que otras oxidasas diferentes a la lacasa y peroxidasa dependiente de manganeso, son las responsables de la degradación del sustrato.
- El aumento y las modificaciones en el patrón de producción enzimática de las cepas de *Pleurotus*, está determinado por la habilidad competitiva de las cepas de *Trichoderma*.

- Las confrontaciones con *Trichoderma*, en sustrato y medio de cultivo, no producen nuevas isoformas de lacasa, únicamente estimulan la producción de ésta.

La variación en la actividad de lacasa producida por *P. pulmonarius* en presencia de indulina, es similar a la que se observa en pulpa de café, por lo que la presencia de esta sustancia en el medio de cultivo, constituye un método de selección de cepas capaces de resistir mohos antagónicos del género *Trichoderma*.

7. RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, se proponen las siguientes recomendaciones, con el propósito de obtener mayor información sobre la fisiología de *Pleurotus* para mejorar las condiciones de cultivo de este hongo.

- Utilizar la clave de determinación de bandas en las variantes polimórficas de proteínas totales y esterasas detectadas en este estudio, para complementar los trabajos de identificación taxonómica del género *Pleurotus*.
- Ampliar este estudio evaluando confrontaciones entre *Pleurotus* y *Trichoderma*, en otros sustratos empleados en el cultivo de *Pleurotus*, como pajas de cereales, bagazo de caña, etc.
- Utilizar las enzimas oxidasas detectadas en este estudio, como una herramienta para evaluar la utilidad del cultivo de otras cepas de *Pleurotus* en pulpa de café.
- Desarrollar estudios tendientes a examinar el comportamiento de diferentes cepas de *Trichoderma*, bajo estas mismas condiciones.
- Se recomienda el empleo de la metodología propuesta para la selección de cepas de *Pleurotus*, para resistir la presencia de mohos antagónicos del género *Trichoderma*.
- Efectuar otros estudios para detectar la presencia de isoformas de lacasa y peroxidasas dependientes de manganeso, en otras cepas de *Pleurotus*.
- Analizar la presencia de otras enzimas oxidasas en *P. djamor*, que produzca para la degradación de lignina, de tal manera que se permita explicar la baja actividad detectada para lacasa y peroxidasa dependiente de manganeso en esta especie.

8. LITERATURA CITADA

- BLANCHETTE, R.A. 1991. Delignification by wood-decay fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 381-398.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; FREIERMUTH, B.; BODIE, E. & BORNEMAN, S. 1997. Reactivities of various mediators and laccase with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology.* 63(12): 4627-4632.
- BOX, J.D. 1983. Investigation of the Folin Ciocalteu's reagent for determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research.* 17: 501-525.
- BUSWELL, J.A. & CHANG, S. 1994. Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushrooms species grown on soybean waste. *Biotechnology letters* 6(12): 1317-1322.
- BUSWELL, J.A.; CAI, Y.J. & CHANG, S. 1996. Lignolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. *Mushroom Biology and Mushroom Products.* Royse (Ed.). pp. 113-122.
- CAMARERO, S.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; SARKAR, S.; MARTINEZ, M. J. & MARTINEZ, A. T. 2000. The cloning of a new preoxidase found in lignocelluloses cultures of *Pleurotus eryngi* and sequence comparison with other fungal preoxidases. *FEMS Microbiology Letters* 191: 37-43.
- CHANG, S.T. 1980. Mushrooms as human food, *BioScience.* 30: 399.
- CHANG, S.T. 1996. Mushroom research and development equality and mutual benefit. In *Mushroom biology and mushrooms products*, (Ed.) Royse, D.J. State college: The Pennsylvania State University. pp. 1-10.

- CHANG, S.T. & MILES, P.G. 1989. Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- CHAPPEL, T.; IGLESIAS, L.; BARRETO, A.; BAISRE, F. & SIMON, J.P. 1974. A simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrylamide gel. Lab. Practice. 23: 311-312.
- CHRAPKOWSKA, K.J. & PODYMA, W. 2000. Effect of culture conditions of *Pleurotus ostreatus* (Fr.)Kumm. on celluloses complexes activity in post-cultivated substrates. Acta Microbiológica Polonica. 49(2): 149-156.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M. & WOOD, D.A. 1988. Fruit body biomass regulated production of extracellular endocellulase during periodic fruiting by *Agaricus bisporus*. Trans. Br. Mycol. Soc. 90(1) 85-90.
- CONSEJO MEXICANO DEL CAFÉ, 2000. <http://www.sagar.gob.mx/cmc/cafe015p.htm>. (Consultado en septiembre, 2001).
- CRISAN, E.V. & SANDS, A. 1978. Nutritional value. The biology and cultivation of edible mushrooms. Chang & Hayes Eds. Academic Press. New York. 137.
- DAVIS, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. Annal. N.Y. acad. Sci. 121:321-349
- GIARDINIA, P.; CANNIO, R.; MARIANI, L.; MARZULLO, L.; PALMIERI, G. & SANNIA, G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 61(6): 2408-2413.

- GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; SCALONI, A.; FONTANELLA, B. & FARACO, V. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J.* 341: 655-663.
- GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; FONTANELLA, B.; RIVIECCIO, V. & SANNIA, G. 2000. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 376(1):171-179.
- GUTIERREZ, A.; BOCCHINI, P.; GALLETI, G.C.; & MARTINEZ, A.T. 1996. Analysis de lignin-polysaccharide complexes formed during grass lignin degradation by cultures of *Pleurotus* species. *Applied and Environmental Microbiology.* 62(6): 1928-1934.
- GUZMÁN, G., MONTOYA, L., SALMONES, D. & BANDALA, V.M. 1993a. Studies of the genus *Pleurotus* (Basidiomycotina), II. *P. djamour* in Mexico and in other Latin-American countries, taxonomic confusions, distribution and semi-industrial culture. *Cryptogamic Botanic.* 3: 213-220.
- GUZMÁN, G.; MATA, G.; SALMONES, D.; SOTO-VELAZCO, C. & GUZMÁN-DÁVALOS, L. 1993b. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. IPN. 245 pp.
- GUZMÁN, G., MONTOYA, L. MATA, G. & SALMONES D. 1994. Studies on the genus *Pleurotus*, III. The varieties of *P. ostreatus*-complex based in the interbreeding strains and in the study of basidiomata obtained in culture. *Micotaxon L:* 365-378.
- HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2 Taylor & Francis, London.
- HERMAN, T.E.; KURTZ, M. B. & CHAMPE, S.P. 1983. Laccase localized in hülle cells and cleistothecial primordial of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 154: 955-964.

- HERRERA, T. & ULLOA, M. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 552pp.
- HIRANO, T.; HONDA, Y.; WATANABE, T. & KUWAHARA, M. 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Biosci. Biotechnol. Biochem 64(9): 1958-1962.
- HUBLIK, G. & SCHINNER, F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. Enzyme and microbial technology 27:330-336.
- IGLESIAS, L. 1986. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* (L.) Merrill). Tesis para optar por el grado de Dr. Ciencias Agrícolas. Ministerio de Educación Superior. La Habana, Cuba, 232pp.
- KAVIYARASAN, V. & NATARAJAN, K. 1997. Changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting of *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*. Advances in Mushroom Biology and Production. (Eds.) Rai, Dhar & Verna. pp: 309-319.
- KEREM, Z. & HADAR, Y. 1997. The role of manganese in enhanced lignin degradation by *Pleurotus ostreatus*. Biological Science Symposium. San Francisco, CA. pp: 29-32.
- KIRK, T. K. & FARRELL, R.L. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. 41: 465-505.
- KUMARAN, S.; SASTRY, C.A. & VIKINESWARY, S. 1997. Laccase, cellulase, and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 12:43-49.

- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M.A. & GOLD, M. H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ –dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 169: 247-250.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly at the head of bacteriophage T4. Nature. 27: 680-685.
- LI, G.S. & CHANG, S.T. 1982. Nutritive value of *Volvariella volvacea*. In Tropical Mushrooms-Biological Nature and Cultivation Methods. (Eds.) Chang & Quimio. The Chinese University Press, Hong Kong 199.
- LEATHAM, G. 1985. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinula edodes* during degradation on a lignocellulosic medium. Applied and environmental microbiology. 50(4):859-867.
- LEONOWICZ, A. & GRZYWNOWICZ, K. 1981. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. Enzyme Microb. Technol. 3: 55-58.
- LEVANON, D.; ROTHSCHILD, N.; DANAI, O. & MASAPHY, F. 1993. strain selection for cultivation of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on straw. Bioresource Technology 45: 9-12.
- LO, S. C; HO, Y. S. & BUSWELL, J.A. 2001. Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase component. Mycologia 93(3): 413-421.
- LONERGAN, G. & BAKER, W.L. 1995. Comparative study of substrates of fungal laccase. Lett. Appl. Microbiol. 21: 31-33.

- LUCAS, L.R.; ROBLES GOMEZ, A. M.; GALVEZ DEL POSTIGO RUÍZ, A.; GARCÍA GUTIERREZ, T; PÉREZ PULIDO, R.; & ALVAREZ DE CIENFUEGOS LOPEZ, G. 2001. Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaén. pp. 148 .
- LUPPO, S.; DUPONT, J. & BETTUCCI, L. 2002. Ecofisiology and saprophytic ability of *Trichoderma* spp. *Cryptogamie, Mycologie*. 23 (1): 71-80.
- MAMOUN, M. L.; SAVOIE, J. M. & OLIVIER, J. M. 2000. Interactions between the pathogen *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost. *Mycologia*. 92(2): 233-240.
- MARTÍNEZ, D.; QUIRARTE, M.; SOTO, C.; SALMONES, D. & GUZMÁN G. 1984. Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agroindustriales en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. 19: 207-219.
- MARTÍNEZ-CARRERA, D. 1987. Design of a mushroom farm for growing *Pleurotus* on coffee pulp. *Mushroom Journal of the Tropics*. 7: 13-23.
- MARTINEZ-CARRERA, D. 2000. Mushroom biotechnology in Tropical America. *The International Journal of Mushroom Sciences*. 3(1):9-20.
- MATA, G.; SAVOIE, J.M. & DELPECH, P. 1997. Variability in laccase production by mycelia of *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* in presence of soluble lignin derivates in solid media. *Material und Organismen*. 31: 109-122.
- MATA, G. & SAVOIE, J. M. 1998a. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 14: 513-519.
- MATA, G. & SAVOIE, J. M. 1998b. Screening of *Lentinula edodes* strains by laccase induction and resistance to *Trichoderma* sp. *Revista Mexicana de Micología*. 14: 29-32.

- MEDEIROS, M.B.; BENETO, A.V.; NUNES, A.L.L. & OLIVEIRA S. C. 1999. Optimization of some variables that affect the synthesis of laccase by *Pleurotus ostreatus*. *Bioprocess Engineering*. 21:483-487.
- MILLER, G.L. 1959. User of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31: 424-426.
- OHGA, S.; CHO, N.; THURSTON, C.F. & WOOD, D.A. 2000. Transcriptional regulation of laccase and cellulase in relation to fruit body formation in the mycelium of *Lentinula edodes* on a sawdust-based substrate. *Mycoscience*. 41: 149-153.
- OHGA, S. & ROYSE, D.J. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiology Letters*. 201: 11-115.
- OKAMOTO, K.; YANAGI, S.O. & SAKAI, T. 2000. Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience*. 41: 7-13.
- OHMASA, M. & CHEONG, M.L. 1999. Effects of culture conditions of *Lentinula edodes*, "Shiitake mushroom", on the disease resistance of *Lentinula edodes* against *Trichoderma harzianum* in the sawdust cultures. 3rd. International Conference on Mushroom Products. Broderick, A. & T. Nair eds. Sydney, Australia.
- ORNSTEIN, L. 1964. Disc electrophoresis. background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121:321-349.
- PAICE, M.G.; REID, I.D.; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD, F.S. & JURASE, K.L. 1993. *Appl. Environ. Microbiol* 59(1): 260-265.

- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; MARZULLO, L.; DESIDERIO, B.; NITTI, G.; CANNIO, R. & SANNIA, G. 1993. Stability and activity of a phenol oxidase from the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 39: 632-636.
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; SCALONI, A.; CAPASSO, A. & SANNIA G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(50): 31301-31307.
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B. & SANNIA, G. 2000. Cooper induction of laccasa isoenzymes in the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(3): 920-924.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAN, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. & ROUSSOS, S. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 6:153-162.
- RIFAI, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56.
- ROUSSOS, S.; AQUIÁHUATL, M. DE LOS A.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. DEL R.; GAIME PERRAUD, I.; FAVELA, E.; RAMAKRISHNA, M.; RAIMBULT, M. & VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. 1995. Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp an husk. *Appl. Microbial Biotechnol.* 42:756-762.
- ROYSE, D.J. 1997. Specialty mushroom: consumption, production and cultivation. *Revista Mexican de Micología*. 13: 1-11.
- SALMONES, D.; MATA, G. & WALIZEWSKI, C. 2000. Selección y adaptación de cepas de *Pleurotus* spp. a la pulpa de café. *Memorias del VII Congreso Mexicano de Micología*. Querétaro, Qro., México. pp: 43.

- SALMONES, D. & MATA, G. 2002. Detection of extracellular enzymes produced by *Pleurotus* spp. Grown on coffee pulp. Mushroom Biology and Mushroom Products. (Eds.) Sánchez et al. 213-219.
- SALMONES, D.; MATA, G.; SAVOIE, J.M. & WALISZEWSKI, K.N. 2002. Cuantificación de peróxido de hidrógeno durante el crecimiento y fructificación de *Pleurotus* spp. cultivado en paja de trigo. In Estudio sobre los hongos latinoamericanos Nanacatepec. (Eds.) Guzmán y Mata. 575 pp.
- SÁNCHEZ, J.E. & ROYSE, D. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Limusa, D. F. 290 pp.
- SAMUELS, G.J. 1996. Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research. 100: 923-935.
- SAMUELS, G.J.; PETRINI, O.; KUHLS, K.; LIECKFELDT, E. & KUBICEK, C. P. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. Longibrachiatum. Studies in Mycology. 41: 54 pp.
- SAVOIE, J.M.; CESBRON V. & DELPECH, P. 1995. Induction of polyphenol-oxidases in the mycelium of *Lentinula edodes*. Science and Cultivation of Edible Fungi. Elliot (Ed.). 787-793 pp.
- SAVOIE, J.M. 1998. Changes in enzyme activities during early growth of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*, in compost. Mycological Research. 102(9): 1113-1118
- SAVOIE, J.M.; MATA, G. & BILLETE, C. 1998. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* spp. and shiitake, *Lentinula edodes*. Appl Microbial Biotechnol. 49: 589-593.

- SAVOIE, J.M. & MATA, G. 1999. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. *World J. Microbial. Biotechnol.* 15: 369-373.
- SAVOIE, J.M.; DELPECH, P.; BILLETE, C. & MATA, G. 2000. Inoculum adaptation changes the outcome of the competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. During shiitake cultivation on pasteurized wheat straw. *Science and cultivation of Edible Fungi.* (Ed.) Van Griensven. 667-674.
- SAVOIE, J.M.; MATA, G. & MAMOUN, M. 2001. Variability in brown line formation and extracellular laccase production during interaction between white-rot basidiomycetes and *Trichoderma harzarium* biotype Th2. *Mycologia.* 93 (2):243-248.
- SKLARZ, G., ANTIBUS, R. K., SINSABAUGH, R. L. & LINKINS, A. E. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia.* 81(2): 234-240.
- STAMETS, P. 1993. *Growing gourmet & medical mushrooms.* Ten Speed Press, Berkeley, 552 pp.
- SUDGEN, C & BHAT, M.K. 1994. Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell-wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile*. *World Journal of Microbiology.* 10: 444-451.
- TOKIMOTO, K. 1980. Poliphenoloxidase activation of *Lentinus edodes* (Berk.)Sing. Induced by *Trichoderma* invasion. *Proc. Jpn. Acad.* 56B:221-225.
- TOKIMOTO, K. 1982. Lysis of the mycelium of *Lentinus edodes* caused by mycolitic enzymes of *Trichoderma harzianum* when the two fungi were in an antagonistic state. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 23: 13-20.

- VELÁZQUEZ-CEDENO, M.A.; MATA, G. & SAVOIE, J.M. 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology*. 18: 201-207.
- YOKOKAWA, H. & MITSUHASHI, T. 1981. The sterol composition of mushrooms. *Phytochemistry*. 20: 1349.
- YOSHIOKA, K.; EMORI, M.; IKEKAWA, J. & FUKODA, F. 1975. Isolation, purification and structure of components from acidic polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel., *Carbohydrates Res.* 43: 305.
- ZERVAKIS, G. & LABARÈRE, J. 1992. Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. *Journal of General Microbiology*. 138: 635-645.
- ZHAO, J.; DE KOKER, T.H. & JANSE, B.J.H. 1996. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by select white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiology Letters*. 145: 393-399.
- ZULUAGA, V.J. 1989. Utilización integral de los subproductos del café. *Memorias I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera*. INMECAFE. Xalapa. 63-76 pp.

ANEXO 1. Artículo publicado como requisito parcial.