UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
C U A U T I T L A N

"OBTENCION DE LIGNINASAS PRODUCIDAS POR *PLEUROTUS OSTREATUS* (SETA) CULTIVADO EN RASTROJO DE MAIZ"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

RAQUEL VELAZQUEZ MEZA

ASESORES: QFB. SUSANA P. MIRANDA CASTRO
IBO. FRANCISCO MONTIEL SOSA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AVENTA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Examenes. nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Obtención de ligninasas producidas por Pleurotus ostreatus (seta) cultivado en rastrojo de maíz,

que presenta la pasante: Raquel Velázquez Meza

con número de cuenta: 8703121-6 para obtener el TITULO de:

Ingeniera en Alimentos .

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de Junio de 199 7

PRESIDENTE	M.en C. Clara Inés Alvarez Manrique	
VOCAL	QFB. Susana P. Miranda Castro	
SECRETARIO	QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda	
1er. SUPLENTE	QFB. Norma L. Delgado Buenrostro	
2do. SUPLENTE	IBQ. Ma. de la Luz Zambrano Zaragoza	

UAE/DEP/VAP/01

GRACIAS.

A mi asesora y amiga por su apoyo incondicional.

QFB. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO.

Al profesor IBQ. Francisco Montiel Sosa.

De igual manera a la

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

y a los profesores que formaron parte de mi educación.

A mi mamá Juana.

por haber permanecido a mi lado a lo largo de este camino y por brindarme la confianza y el apoyo que necesite para poder llegar y que hoy ha concluido.

A mi papá Salvador, y a mis hermanos Jaime, Juana, Martha y Salvador por su apoyo.

Mario, por todo el cariño y comprensión que me haz otorgado y motivandome día con día a superarme.

GRACIAS.

Piensa en grande y tus hechos crecerán.
Piensa en pequeño y quedarán atrás.
Piensa que puedes y podrás.
Todo está en el estado mental.
Rudyard Kipling.

INDICE.

	PAGINA
RESUMEN	1
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	2
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	
CAPITULO 1	
1.1. Residuos agroindustriales	4
1.2. Uso de los residuos agroindustriales	5
1.3. Composición química de desperdicios agrícolas y forestales	8
1.4. Componentes estructurales de una célula vegetal y su localización dentro de ésta	9
1.5. Características de los componentes estructurales en los vegetales	10
CAPITULO 2	
2.1. Clasificación de los hongos en el reino vegetal	13
2.2. Clasificación filogenética de los hongos verdaderos en el reino vegetal	14
2.3. Clasificación de microorganismos degradadores de material orgánico	15
2.4. Morfología de los hongos	17
2.5. Morfología de *Pleurotus ostreatus*	19
2.6. Hongos como microorganismos	20
2.7. Forma de crecimiento	23
2.7.a. Aislamiento	23
2.7.b. Micelio activado	24
2.7.c. Forma de cultivo	25

CAPITULO 3	PAGINA
3.1. Deslignificación con empleo de enzimas	29
3.2. Catálisis enzimática	30
CAPITULO 4	
OBJETIVOS	33
CUADRO METODOLOGICO	34
METODOLOGIA	
1.1. Preparación del agar	35
1.2. Aislamiento	36
1.3. Identificación de la cepa	37
2.1. Preparación del grano para soporte	39
2.2. Primera generación	40
2.3. Segunda generación	41
3.1. Extractos enzimáticos	43
3.2. Medio de evaluación	44
3.3. Evaluación *in vitro*	45
CAPITULO 5	
RESULTADOS Y DISCUSION.	47
CONCLUSIONES.	59
ANEXO 1	61
ANEXO 2	62
GLOSARIO	65
BIBLIOGRAFIA	68

RESUMEN.

Se utilizó un hongo comercial de *Pleurotus ostreatus* para la obtención de la cepa del mismo, para llevar a cabo el estudio de la actividad enzimática de ligninasas en el crecimiento *in vitro*.

La cepa de *Pleurotus ostreatus* fue aislada del tejido interno del sombrero de un hongo comercial (seta). Esta fue identificada por las técnicas de microcultivo y se verificó su fructificación sobre rastrojo de maíz.

El microorganismo fue cultivado *in vitro* para su estudio en relación a la aparición de ligninasas y su actividad enzimática usando como sustrato lignina comercial y lignina estructural en rastrojo de maíz.

Se observó la disminución de la lignina y la aparición de carbohidratos por el método de Klason y el de Nelson y Somogy respectivamente, al poner en contacto extractos enzimáticos crudos en muestras de lignina comercial y de rastrojo de maíz las cuales fueron evaluadas a diferentes días. Se observó que la deslignificación de dichos materiales se da en un porcentaje de reducción del 30 % a los 14 días para la lignina comercial y un 50 % a los 17 días en rastrojo de maíz; dicho comportamiento es semejante para la aparición de carbohidratos. Por lo tanto, la cepa de *Pleurotus ostreatus* produce ligninasas extracelulares que bajo las condiciones estudiadas presentan una disminución de lignina en mucho menor tiempo que la reportada en la literatura que es de un 25 % en 80 días.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS. **PAGINA**

TABLA 1. Aprovechamiento de residuos agrícolas y forestales. 6
TABLA 2. Composición química de materiales lignocelulósicos. 8
TABLA 3. Ejemplos de hongos deslignificadores. 29
TABLA 4. Características morfológicas de *Pleurotus ostreatus.* 39
TABLA 5. Resultados de la evaluación *in vitro* para lignina comercial y rastrojo de maíz. 54

FIGURA 1. Componentes estructurales. 9
FIGURA 2. Estructura de lignina. 11
FIGURA 3. Partes estructurales de *Pleurotus ostreatus.* 18
FIGURA 4. Racimo de *Pleurotus ostreatus.* 20
FIGURA 5. Estado morfológico de *Pleurotus ostreatus.* 21
FIGURA 6. Representación esquemática de la formación de cuerpos fructíferos. 22
FIGURA 7. Ciclo de la producción de *Pleurotus ostreatus.* 28
FIGURA 8. Estructuras resultado de la degradación por hongos de pudrición blanca. 32
FIGURA 9. Obtención de primera generación del micelio activado. 41
FIGURA 10. Obtención de segunda y tercera generación del micelio activado. 42
Gráfica 1. % de lignina aparente VS periodos de incubación del micelio de *Pleurotus ostreatus.* 53
Gráfica 2. Comportamiento de los extractos enzimáticos de diferentes días sobre lignina comercial. 55
Gráfica 3. Comportamiento de los extractos enzimáticos de diferentes días sobre rastrojo de maíz. 57
Gráfica 4. Curva estandar de glucosa 66

INTRODUCCION.

Debido a la gran cantidad de desperdicios lignocelulósicos es de importancia el poder aprovecharlos integralmente ya que de no ser asi, estos representarán una fuente de contaminación , por otro lado se sabe que al dárselos a los animales como fuente de alimento, estos no son capaces de digerirlos totalmente por la cantidad de lignina que poseen los desperdicios en su estructura que es un componente que imparte rigidez a la planta y que además le confiere una resistencia al ataque por microorganismos.

Por lo anterior es muy importante el poder emplear ciertos microorganismos lignoliticos como es el caso del hongo *Pleurotus ostreatus* el cual es capaz de degradar dichos materiales a estructuras mas simples que se pueden aprovechar

Es por esto que el aplicar procesos biotecnológicos para obtener de los residuos lignocelulósicos, alimentos como los hongos comestibles, también se puede obtener alimento para animales y abono através de las compostas lo cual resulta ser aceptable para el aprovechamiento de dichos residuos.

ANTECEDENTES.
CAPITULO 1.

1.1. RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

Durante la fotosintesis, la energia de la radiación solar es fijada por medio de la clorofila para con ello sintetizar los carbohidratos y el agua de los tejidos vegetales. El hombre promueve parte de este desarrollo vegetal realizando dos actividades como son: la agricola y la forestal. Con estas dos actividades se obtienen infinidad de productos junto con una cantidad apreciable de desechos. Por lo tanto la biomasa vegetal representa un importante recurso renovable que es producido regularmente en forma abundante en la naturaleza.(35)

Por lo anterior es muy importante el definir desde este punto que es lo que se considera como un desecho

Un **desecho** es considerado como todo material que ya se le ha dado un uso anterior y lo que queda de él, es considerado ya un material de desecho, o un subproducto que ya no puede ser utilizado directamente, como sucede en el caso de los desechos agricolas los cuales producen granos en primera instancia y posteriormente se tiene el subproducto como lo son las pajas las cuales son consideradas como un producto de desecho o un producto de consumo secundario.

Se tienen desechos de tipo agricola y forestal los cuales se describen a continuación:

RESIDUOS AGRICOLAS

Residuos de granos básicos como: arroz, frijol, maiz y trigo de los más importantes. Su producción es de aproximadamente 16 357 miles de toneladas, de las cuales el 50% se estima son desechos y representa en volumen aproximadamente 8 178.5 miles de toneladas.(39,40)

RESIDUOS FORESTALES

En este tipo de desperdicios se tienen los que provienen de la producción silvícola, de estas se tiene una producción de 6 346 miles de metros cubicos rollo, también proviene de la producción maderable, con una producción de 6 346 miles de metros cubicos rollo.(40)

Los datos anteriores son representativos de las producciones de 1993 para ambos rubros como son la industria agricola y la forestal y su comportamiento es similar para los años posteriores.

Con estos datos se puede observar, que si se cuenta con una producción considerable de productos y a la vez de desperdicios esto representa una buena fuente para ser utilizada en la generación de nuevos productos a través del uso de la biotecnologia.

1.2. USO DE LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

México ha tenido un gran incremento demográfico, el cual ha ocasionado, entre otros resultados,que los mexicanos dispongan de menos tierra cultivable. Esta circunstancia deberia estimular el incremento de la eficiencia productiva y con ello aprovechar mejor los productos orgánicos que se derivan directa o indirectamente del sector agropecuario y forestal.

De esta manera, lo que antes se consideraba desperdicio, ahora debe valorarse como materia prima para su aprovechamiento alimentario o industrial. Por lo que, la utilización de desperdicios agricolas y forestales en los paises en vias de desarrollo, empleando tecnologias que permitan aumentar la producción de alimentos básicos,debe adquirir una importancia cada vez mayor, ya que la productividad agricola de estos paises se caracteriza por ser muy inferior a los rendimientos obtenidos por los paises industrializados.(23,33)

Incluyendo la mayoría de los cultivos agrícolas, el producto cosechado representa solo el 30 % de la biomasa total producida a nivel mundial y las pérdidas de material cosechado en México se calculan alrededor de un 50% que correspondería a los desperdicios. (23)
Con lo anterior se tiene que los residuos agrícolas y forestales integran el mayor volumen de desperdicios generados por la actividad humana. Por lo que la utilización integral de estos desechos a través del empleo de las siguientes tecnologías reviste una gran importancia al tener en estos un gran número de usos potenciales.
Como muestra la tabla 1.

TECNOLOGÍAS PARA EL APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGRÍCOLAS Y FORESTALES	
1. GENERACIÓN DE ENERGÍA	2. APLICACIÓN A LA TIERRA
Combustión directa.	Fertilizantes.
Biogás.	Acondicionadores del suelo.
Etanol	Irrigación
Producción de gas.	Horticultura
3.ALIMENTACIÓN	4 MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN
Alimentación directa.	
Fermentación	5 PAPEL.
Conversión Microbiana	
Piscicultura.	

TABLA 1. Aprovechamiento de residuos agrícolas y forestales.

A pesar de las diversas tecnologías existentes para el aprovechamiento de dichos materiales, su utilización ocasiona un gasto extra con un pequeño retorno a la inversión, por lo que estas tecnologías no se llevan de manera mas extensa.

En México se encuentran en operación los siguientes procesos:

1. Producción de furfural a partir de olotes de maíz o bagazo de caña.
2. Producción de papel de bagazo de caña o paja de trigo.
3. Producción de tableros aglomerados a partir de bagazo de caña.
4. Producción de composta a partir de desperdicios agroindustriales.
5. Producción de alcohol a partir de melaza.

El proceso biotecnológico con aplicación industrial mas desarrollado en México es: la transformación de la composta de pajas o rastrojos, en hongos comestibles del género *Agaricus bisporus*, comúnmente llamados " champiñones "[31]

1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE DESPERDICIOS AGRÍCOLAS Y FORESTALES.

El material de desecho o lignocelulósico, está constituido típicamente por los polisacáridos celulosa, hemicelulosa y lignina. El contenido de celulosa va del 40 al 60 %, el de hemicelulosa de 15 a 20 % y el de lignina de 10 a 30 %. Dependiendo del tipo de vegetal, del tejido, así como de la edad del mismo, se encuentran variaciones en la composición química de los desechos (ver tabla 2) [23].

COMPOSICION QUIMICA DE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS					
ORIGEN AGRICOLA					
	PROTEINA	GRASAS	FIBRAS	LIGNINA	CENIZA
Algodón	2.5	1.0	35.7	5.0	1.3
Hierba	5.3	2.1	36.7	7.4	6.6
Paja de arroz	5.0	2.4	34.4	4.0	17.4
Paja de trigo	2.7	1.3	46.1	8.0	8.4
Paja de maiz	2.6	0.9	37.1	10.4	2.1
ORIGEN FORESTAL					
		CELULOSA	HEMICELULOSA	LIGNINA	
Madera de pino		41.0	27.0	13.0	
Madera de eucalipto		52.8	16.0	19.5	
Madera de otras resinosas		45-50	25-35	25-35	
Madera de otras frondosas		40-55	24-40	18-25	
ORIGEN INDUSTRIAL Y URBANO					
		CELULOSA	HEMICELULOSA	LIGNINA	
Corteza de pino		16.0	13.0	30.0	
Corteza de eucalipto		53.0	12.0	19.0	
Basuras urbanas(1)		61.0	2.0	9.0	

Composición expresada en porcentajes sobre materia seca.
(1) Tras eliminar plásticos y metales. FUENTE. 23
TABLA 2. Composición química de materiales lignocelulósicos.

1.4. COMPONENTES ESTRUCTURALES DE UNA CELULA VEGETAL Y SU LOCALIZACIÓN DENTRO DE ESTA.

Establecida la composición quimica de los diferentes desechos se detalla, como se encuentran constituidos estructuralmente estos desechos.

Pared tipica de un vegetal: está constituida por celulosa , hemicelulosa y lignina los cuales poseen una organización celular regular. Es decir, la pared se encuentra formada por una lamilla media, una pared primaria y otra secundaria Esta última está compuesta a su vez , por las tres capas S1, S2 y S3. Como se observa en la figura 1.

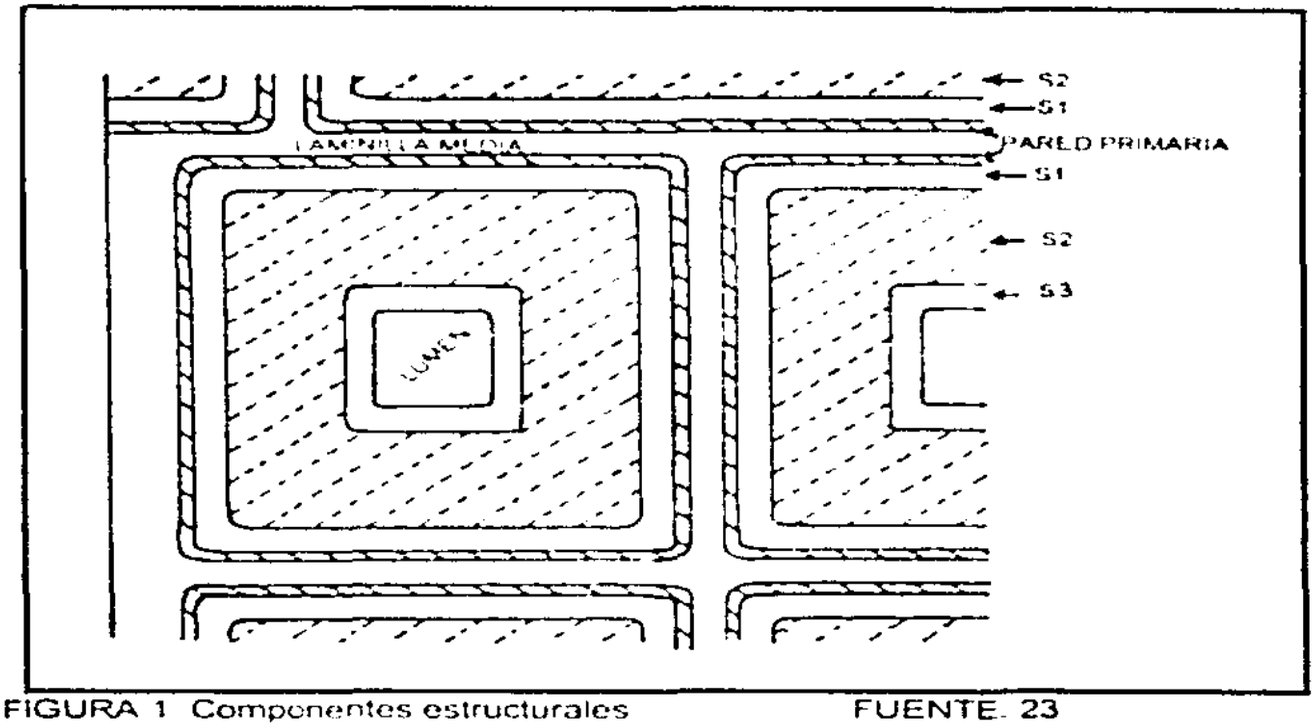


FIGURA 1 Componentes estructurales FUENTE. 23

Por lo general la capa S2 es la de mayor espesor comparada con la pared primaria, la laminilla media y las otras dos capas (S1 y S2).

En la laminilla media se encuentra casi toda la lignina y su proporción disminuye conforme se acerca al lumen; la pared secundaria contiene muy poca lignina y está constituida principalmente por polisacáridos. A cada capa de la pared secundaria se adhieren la celulosa y cantidades mínimas de otros constituyentes formando estructuras longitudinales llamadas microfibrillas, dentro de cada una de las cuales se encuentran las moléculas lineales de celulosa unidas lateralmente por puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals [21,35]

1.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES EN LOS VEGETALES.

CELULOSA.

La celulosa es un polisacárido de alto peso molecular formado por unidades de D-Glucosa con uniones β1-4 glucosídicas, con las unidades de glucosa en conformación de silla y los grupos hidróxilo en la posición ecuatorial estable, identificándose químicamente tres tipos de celulosa: alfa, beta y delta-celulosa

Los grados de ordenamiento de las moléculas de celulosa difieren y cuando están altamente ordenadas se les conoce como cristalinas, mientras las regiones con menor grado de ordenamiento se denominan amorfas. Dentro de la pared secundaria de los vegetales, la lignina esta concentrada en los espacios localizados entre las microfibrillas y en las regiones amorfas de los cristales de celulosa. Se sugiere que la asociación de la celulosa con la lignina es en gran parte física, formando un sistema de entrecruzamiento de polímeros. Esta íntima asociación física se considera responsable de su resistencia a la degradación biológica.

En las regiones amorfas, entre cristales de celulosa, se encuentran también hemicelulosa, minerales y otros materiales como grasas, ceras, aceites esenciales, taninos, resinas, carbohidratos solubles y proteínas [4,23,24,30]

HEMICELULOSA.

La hemicelulosa está constituída por un grupo de polisacáridos no tan homogeneo como el de la celulosa, a saber: xilanos, beta-mananos, galactanos y L-arabinanos. Los xilanos son los más abundantes en el material lignocelulósico.(30)

LIGNINA.

La lignina es considerada como un material incrustante ya que es el último componente sintetizado por el tejido vegetal. Es un polímero estructural de las plantas vasculares formado por unidades de fenil propano y proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células, además de disminuir la permeabilidad del agua a través de las paredes celulares y protegiéndola de invasiones por microorganismos. La formación de lignina en los tejidos vegetales es sumamente compleja y no totalmente entendida. Ver figura 2.

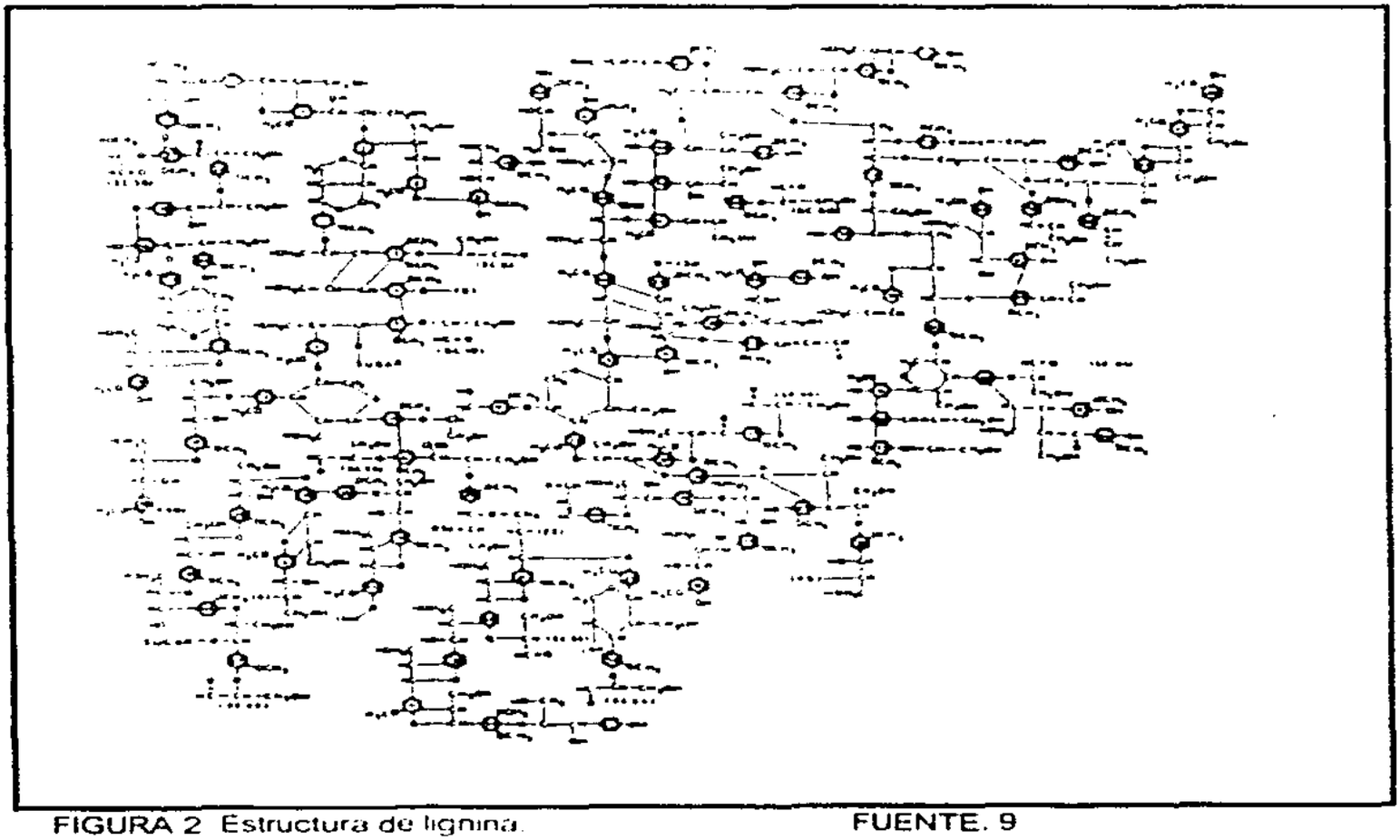


FIGURA 2 Estructura de lignina. FUENTE. 9

Su producción aumenta conforme envejece la planta. Comprende varias etapas, tanto de reacciones puramente químicas como enzimáticas, a partir de tres precursores primarios, todos del tipo alcoholes de fenil propano. En consecuencia, la molécula de la lignina presenta una estructura ramificada e irregular.[4,9,10,23,30]

CAPITULO 2.

2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS EN EL REINO VEGETAL.

Los sistemas de la clasificación pueden ser artificiales, naturales y filogenéticos. **Los artificiales** son sistemas de comodidad, basados en pocos caractéres, y su aplicación es importante pero limitada.

Los sistemas naturales abarcan todos los caractéres posibles y se utilizaron antes de la aceptación de la teoria de la evolución orgánica. **Los sistemas filogenéticos** emplean las semejanzas de estructura y otros caractéres para ordenar a los organismos en series que indican un parentesco evolutivo.(7 35)

CARACTERES EMPLEADOS EN LA CLASIFICACIÓN.

La clasificación se basa en la morfologia externa e interna de los hongos. Los rasgos fisiológicos son importantes, pero su utilización como base de una clasificación consume mucho tiempo.

Los caractéres morfológicos empleados en la clasificación pertenecen a las estructuras vegetativas y a las relacionadas con la reproducción sexual. La constitución interna y la simetria externa del cuerpo, la presencia o ausencia de tejidos vasculares y la naturaleza y disposición de éstos cuando los hay, corresponden a los rasgos vegetativos.

En general, se utilizan más los caractéres reproductivos que los vegetativos. Los órganos de la reproducción están relacionados menos frecuentemente con los caractéres fisicos y por esto son más estables en grandes grupos.

Ninguna clasificación del reino vegetal puede ser definitiva, porque el conocimiento de las plantas va aumentando.

Esta clasificacion, es en gran parte un sistema natural, ya que reune grupos que tienen muchos caractéres en común y es filogenético sólo en cuanto que los grupos menos

avanzados figuran antes que los más avanzados. Las categorías más amplias, o subreinos, son consideradas a menudo. Las categorías inmediatas, según las reglas de la nomenclatura botánica, se llaman divisiones y en esta se encuentran las clases.(35)

2.2. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LOS HONGOS VERDADEROS EN EL REINO VEGETAL.

REINO VEGETAL. *GRUPO I* . Plantas sin tejidos de sostén ni de conducción. El cuerpo de las plantas es pequeño y no llamativo.

SUBREINO 1. Talofitas (plantas con tallo) El cuerpo de la planta no se diferencia en raíz, tallo y hojas; no hay tejido vascular; los gametos están rodeados sólo por una pared celular. El cigoto no se transforma en embrión mientras permanece encerrado en el órgano sexual femenino.

TALOFITAS SIN CLOROFILA.

División 10. Hongos verdaderos (eumicetos). El cuerpo de la planta está generalmente compuesto de hifas.

Clase 3. Hongos con basidios y hongos de maza (basidiomicetos). 15,000 especies Hifas con paredes transversales. Basidiosporas formadas por fusiones sexuales Por lo tanto se le considera un hongo con basidio. Su himenio es una capa formada por la unión de basidios. El cual forma parte del carpóforo, del que existen diferentes formas. Los hongos perfectos y especialmente los de laminillas son los de mayor interés como es el ***Pleurotus ostreatus.*** (35)

Aunada a esta clasificación también se cuenta con otra, está se basa en como los hongos son capaces de degradar el material orgánico, siendo los de mayor interés los residuos agrícolas y forestales.

2.3. CLASIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE MATERIAL ORGÁNICO.

Los microorganismos que degradan materiales orgánicos que contienen celulosa, hemicelulosa y lignina, se han clasificado en cuatro grupos principalmente:

1.Hongos de pudrición blanda.
2.Hongos de pudrición café.
3.Hongos de pudrición blanca.
4.Bacterias.

1. HONGOS DE PUDRICIÓN BLANDA.

El ataque sobre los materiales lignocelulósicos se da en dos formas:

a) La pared celular secundaria de los materiales lignocelulósicos es atacada, formando en ella cavidades cilíndricas con terminaciones cónicas.

b) Las paredes celulares pueden ser erosionadas empezando por las celulas del lúmen.

Se ha visto que los hongos de pudrición blanda pueden degradar lignina hasta cierto punto, especialmente en el caso de maderas duras Estos son capaces de causar una demetilación de la lignina,ya que posiblemente degraden los lados terminales y los anillos aromáticos, aunque esta degradación es lenta.[4]

2. HONGOS DE PUDRICIÓN CAFÉ.

Estos hongos atacan principalmente a los polisacáridos de los materiales lignocelulósicos y pueden causar una ligera disminución de lignina. El cambio que ocasionan es la disminución del contenido de grupos metoxilo, esto se debe a que se produce una demetilacion de la lignina introduciendo a los lados terminales de la cadena de propano de la lignina grupos alfa carbonilos. Estos hongos no son capaces de metabolizar fragmentos de anillos aromáticos ya que carecen de un sistema enzimático eficiente para romper estos anillos. Una de estas enzimas faltantes de la celobiosa es la quinona oxidoreductasa ,por lo que el color café que toman los materiales lignocelulósicos se puede deber a la acumulación de quinonas

El ataque de este tipo de hongos a la pared celular en materiales lignocelulósicos, empieza con la metabolización de las sustancias de la capa S2 de la pared secundaria. La capa S1 formada por la pared primaria y la laminilla media son por el contrario bastante resistentes a la degradación, esto debido a su alto contenido de lignina.[4,31]

3. HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

Estos hongos son capaces por si solos de remover o degradar la mayor cantidad de carbohidratos y lignina simultáneamente de los componentes de los materiales lignocelulósicos hasta CO_2 y agua.

Por la capacidad que presentan para degradar los componentes de los materiales lignocelulósicos, se les ha clasificado en dos diferentes grupos:

a) Los que degradan los tres componentes de los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa, y lignina) simultáneamente.

b) Aquellos organismos en los que la degradación de lignina es mas rápida que la degradación de celulosa y hemicelulosa. Un ejemplo de este tipo es *Pleurotus ostreatus* un basidiomiceto al cual especificamente se hará referencia.[4,25,29,31]

4. BACTERIAS

Existen pocas observaciones que indiquen que las bacterias son capaces de degradar y utilizar la lignina. Ciertos grupos de bacterias poseen habilidad para romper enlaces beta-aril-glicerol; estos representan de 30 a un 50% de uniones entre las unidades de fenil propano que conforman la estructura de la lignina. Un factor que puede ser determinante en la degradacion de los compuestos lignocelulósicos es la falta de movilidad frente a la acción penetrante de las hifas de los hongos.(4 pg)

2.4. MORFOLOGÍA DE LOS HONGOS.

El estudio de la forma del cuerpo del hongo es básico para la identificación de la especie. La morfologia de los hongos es de gran importancia debido a la gran variabilidad en la sistématica de estos organismos. Paralelamente a la morfologia,también el color,el olor y el sabor son caracteristicas de gran valor en la identificación de los hongos.

Con respecto a esto cabe hacer las siguientes aclaraciones: podemos observar que erróneamente se llama hongo, a lo que en realidad es el cuerpo reproductor o cuerpo fructifero de la gran masa algodonosa y blanca, que es el hongo en realidad, es decir, el micelio que se encuentra y vive en el suelo, o sustrato (madera ,estiércol, hojas, etc.). Posteriormente de dicha masa a manera de primordios o botones, nacen los cuerpos fructiferos,ya sea uno o varios, según se trate de los llamados hongos solitarios o de los "gregarios" como es el caso de *Pleurotus otreatus*

Dichos cuerpos sirven al hongo para producir y diseminar sus esporas,o sea las simientes o mejor conocidas como semillas con las cuales se reproduce y perpetúa. La superficie o estructura que produce las esporas se llama himenio y la estructura que la sostiene es el esporóforo o cuerpo fructifero.(7 35)

El esporóforo suele ser simplemente el pie del hongo o estructuras muy complicadas. En los ascomicetos el himenio esta en la superfice superior del cuerpo fructifero, y en los BASIDIOMICETOS en la superficie inferior del sombrero, en estos es donde existe la variabilidad del himenio que es la base para definir a las especies, ya que puede haber hongos con himenio liso, venoso, poroso, dentado o laminar como el caso de *Pleurotus ostreatus*.

Los caractéres antes mencionados son de suma importancia paro lograr una identificación clara del tipo de micoorganismos que se este identificando, las partes que conforman al hongo *Pleurotus ostreatus*. Ver figura 3.

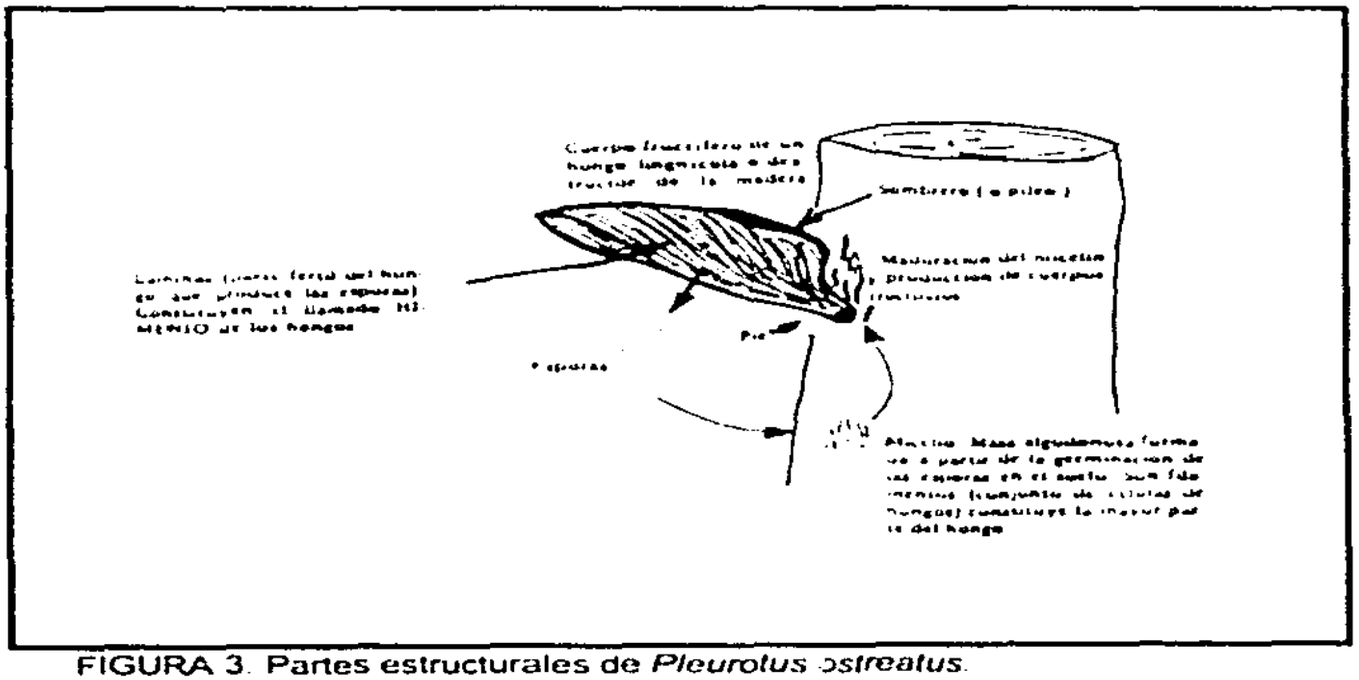


FIGURA 3. Partes estructurales de *Pleurotus ostreatus*.

FUENTE. 7,8

2.5. MORFOLOGÍA DE *Pleurotus ostreatus.*

Los caractéres más importantes usados para la identificación de *Pleurotus ostreatus* y según (Jacq. Exfr. Kummer) son los siguientes:

Nombre sistemático	Nombre vernáculo.
Pleurotus ostreatus	Seta de ostra.
	Oreja blanca.

CARACTERISTICAS FISICAS

Sombrero. Mide de 4 a 14 cm de diamétro,en forma de concha de ostra;con el borde enrrollado y viscoso en tiempo humedo,variable en su coloración.

Color del sombrero. Su color puede ser de gris pardo,blancuzco y hasta azulado.

Laminillas. Estas son decurrentes con laminillas intermedias,estrechas,blancas o cremosas.

Pie. Es corto mide de 1-3 cm ,es excéntrico o lateral y blanquecino con una capa miceliar blancuzca sobre su base.

Esporada. Es de color blanco

Carne. Es blanquecina y tenaz,tiene un sabor y olor agradables.

Posibilidades de confusión. Con *Pleurotus cornucopiae*,que tiene laminillas decurrentes y un olor anisado. También con *Pleurotus pulmonarius* el cual tiene un color pálido casi blanco.

Pleurotus ostreatus es un hongo que se consumo ampliamente en Europa. No es patógeno ni parásito, por lo que no representa un problema de toxicidad en su consumo (7 8)
Ver figura 4.

FIGURA 4 Racimo de *Pleurotus ostreatus* FUENTE 7

2.6. HONGOS COMO MICROORGANISMOS.

Como ya se mencionó se tiene una gran variedad de hongos que son ampliamente conocidos y existen grandes diferencias entre estos.
Estos no pueden ingerir sólidos,como los animales, sino que obtienen sus nutrientes por absorción de materiales orgánicos e inorgánicos solubles.

Posee pared celular como las plantas,pero no son de celulosa verdadera como estas y usualmente contienen algo de quitina. Su forma de vida es única.

Muchos pueden mostrar dos separaciones pero son fenotipos parecidos. Su morfología consiste de dos estados reproductivos:

1. Un estado morfológico completo,reproduciendose sexualmente por producción de esporas (perfectas) como un resultado de la fusión nuclear seguida por una meiosis.
2. Un estado morfológico incompleto,reproduciéndose asexualmente por una producción de esporas imperfectas seguidas de una división mitótica,cada estado así reproduce sus diferentes tipos de esporas. Ver figura 5.

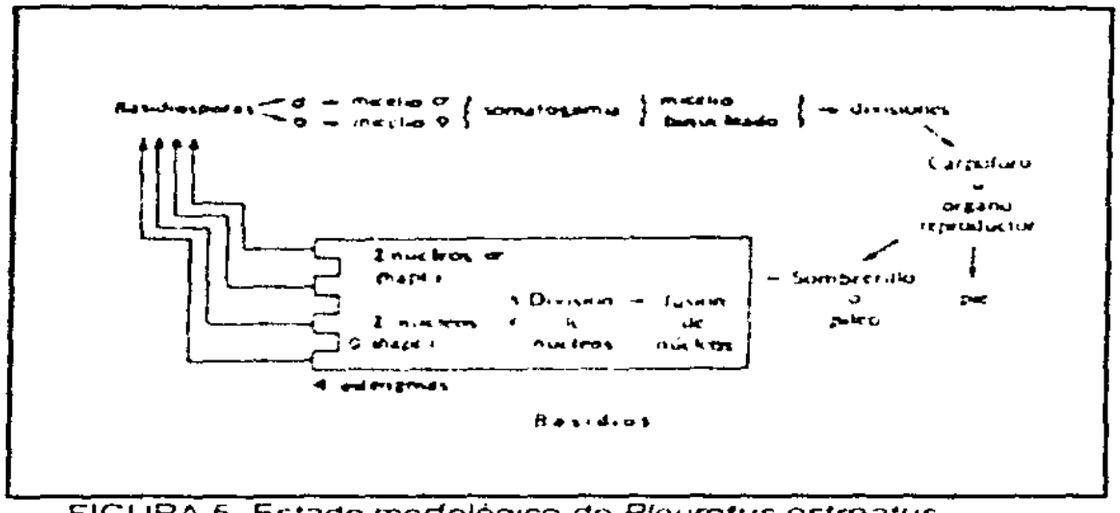


FIGURA 5 Estado morfológico de *Pleurotus ostreatus*.
FUENTE 3.6

Con lo que respecta al micelio, este es el cuerpo del hongo y lo podemos encontrar en dos fases distintas. La primera es el "micelio vegetativo" el cual tiene forma más o menos circular y cuya función es alimentarse, colonizar el sustrato y aumentar el diámetro.

La segunda fase depende obligadamente de la primera y es el arreglo del micelio vegetativo para formar cuerpos más o menos sólidos y erectos sobre el sustrato(cuerpos fructíferos).

Estos producirán las esporas que serán la simiente que dispersará y permitirá que las especies sobrevivan a través del tiempo en la naturaleza. El micelio originado por el arreglo del micelio vegetativo es denominado "micelio reproductivo" esta segunda fase es la fructificación.(35)

Ver figura 6

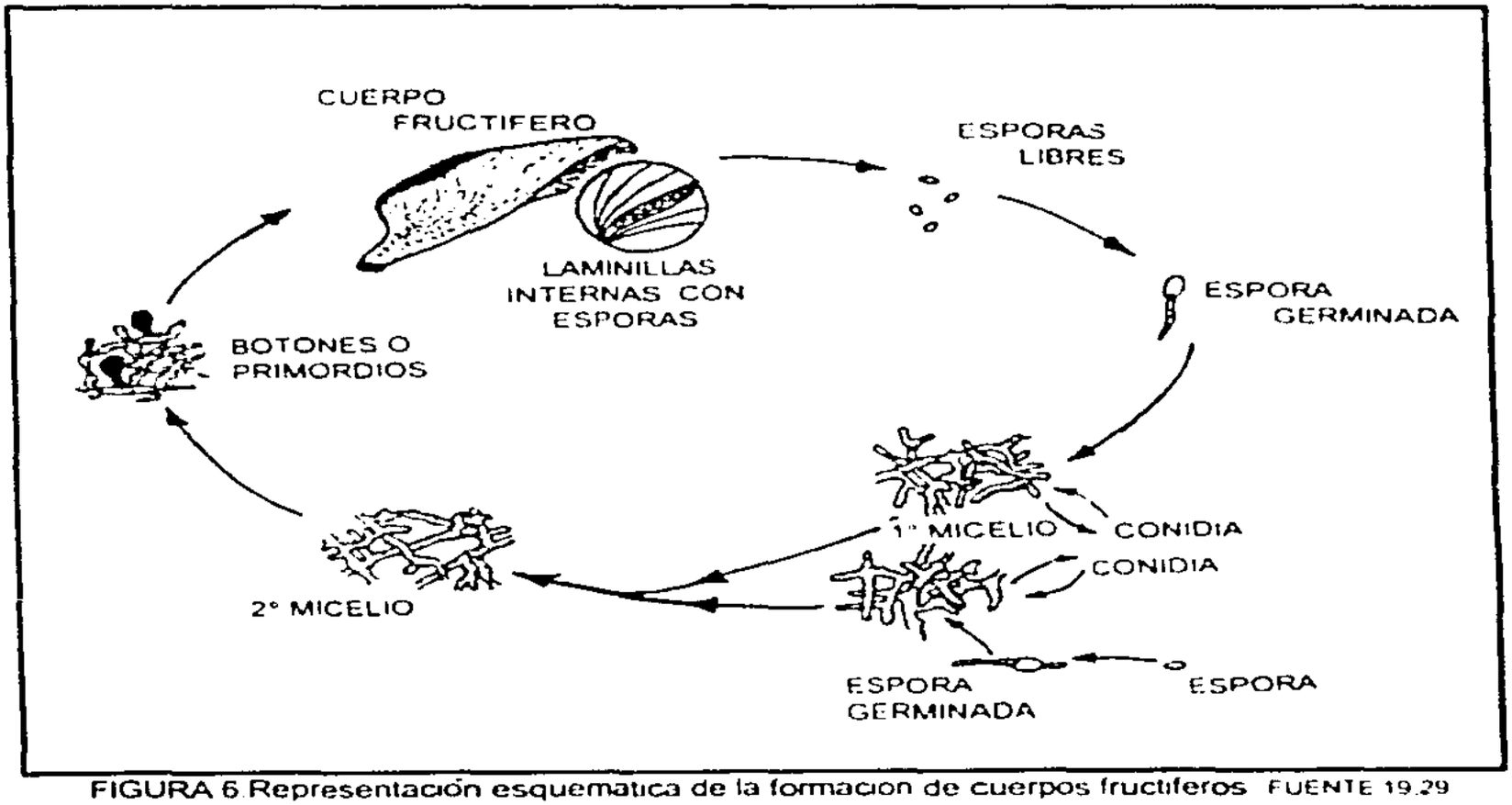


FIGURA 6 Representación esquematica de la formacion de cuerpos fructiferos FUENTE 19,29

2.7. FORMA DE CRECIMIENTO.

Cuando se decide que el hongo se desarrolle artificialmente es necesario especificar, detallar y entender todas las etapas que intervienen para su desarrollo desde la fase vegetativa hasta la fase generativa como se menciona a continuación:

2.7.a. AISLAMIENTO.

Cuando sometemos al micelio de los hongos a condiciones diferentes a las de su medio natural, este puede morir, degenerar o cambiar sus cualidades. Para que el micelio prospere en condiciones de laboratorio, debe adaptarse a tales condiciones, realizando una buena selección del hongo que va a servir para el aislamiento y proporcionarle la mejor alimentación para obtener un máximo desarrollo, esto con ayuda de un medio de cultivo adecuado

Después de haber realizado esto, obtenemos un micelio domesticado a condiciones que no son las de su habitat obteniendo asi lo que comúnmente llamaremos "micelio madre".

Para realizar el aislamiento se hace uso de diferentes medios de cultivo que van desde los simples hasta los medios enriquecidos.(13 18)

TIPOS DE AISLAMIENTO

En cuanto a la manera de realizar el aislamiento se tienen varias opciones, tales como:

1. Empleando una cepa de colección del hongo que se va a trabajar y transferirla al medio de cultivo.

2. Empleando germinación de esporas en la cual se obtiene la esporada y se coloca de manera estéril en el medio de cultivo.
3. Empleando tejido interno del sombrero, esto es obteniendo pequeños cortes del tejido y colocarlo en las cajas petri que contienen el medio de cultivo.
Cualquiera de estas opciones bajo las condiciones establecidas para su mejor desarrollo como son. temperatura de incubación, humedad, sin luz, etc
Así se obtiene la adaptación del hongo al medio de cultivo y con esto el desarrollo inicial de su fase vegetativa obteniendo así el llamado "micelio madre". [19]

2.7.b. MICELIO ACTIVADO.

El desarrollo del micelio madre en granos de diferentes tipos son utilizados para la inoculación de los sustratos preparados. El "micelio activado" o "inoculo" consiste en llevar a cabo la colonización total de los granos empleados, por el micelio madre, con el fin de aumentar el desarrollo de la fase vegetativa y lograr su mejor adaptación. [19,21,33,37]

Esto se puede realizar en los siguientes tipos de granos:
arroz
trigo
sorgo
centeno
La preparación del grano como sustrato es de gran importancia para la obtención de un micelio activado de calidad.

Este se puede obtener de tres formas distintas:

1.- A partir de la cepa de colección o la cepa aislada. Este tipo es originado de la cepa de *Pleurotus ostreatus* que se inocula en el sustrato. Su crecimiento es un tanto lento en un principio.

2.-A partir de una dilución de esporas. En este método las esporas de *Pleurotus ostreatus* son diluidas en agua estéril o hervida, posteriormente son inoculadas en el sustrato y estas presentan un desarrollo vigoroso ya que posee diversos puntos de crecimiento.

3.-A partir de esporada. La esporada de *Pleurotus ostreatus* es inoculada en el sustrato en pequeños fragmentos de papel; la esporada debe hidratarse en el sustrato. Por tal motivo su germinación es un poco lenta

Las condiciones para el desarrollo son de gran importancia en la calidad del micelio.(11,19,27.)

2.7.c. FORMA DE CULTIVO.

Como seta silvestre, el *Pleurotus ostreatus* se encuentra en diversas formas; se desarrolla como saprofita sobre material orgánico. Se desarrolla generalmente en regiones templadas, y necesitan de una temperatura de 15 a 25 C para poder fructificar. Los sombreros pueden alcanzar un tamaño aproximado de unos 15 cm o más, el color varía dependiendo de la especie y de las circunstancias, desde amarillo - anaranjado, pasando hasta gris - negruzco y hasta posiblemente un negro - violáceo.

El *Pleurotus ostreatus* se cultiva desde hace varias decenas de años, en pequeña escala sobre cilindros o tocones de madera al aire libre Y recientemente se cultiva sobre sustrato a base de paja, suros de maiz o mezcla de ambos.

El *Pleurotus ostreatus* es de color gris - negruzco.(2,4)

CARACTERÍSTICAS DEL SUSTRATO.

Normalmente se utilizan residuos de pajas de los cultivos agrícolas ya sean de trigo, cebada o rastrojo de maíz entre otros, los cuales son divididos en elementos de 2 a 7 cm, para con ellos fabricar el sustrato. Posteriormente dichos materiales deberán ser lavados y remojados para logar obtener la humedad de 75 % aproximadamente.

Una vez realizado esto se deberán esterilizar a una temperaura de 121 C por 20 min. o bien a una temperatura de 70 C por un periodo de 30 min para asegurar que quedó libre de microorganismos que puedan causar daño durante el desarrollo del micelio

De una tonelada de paja seca se pueden obtener de 2.5 a 3 toneladas de sustrato listo para ser inoculado. A continuación se enfría el compost hasta alcanzar unos 25 C, para poder efectuar la siembra.

SIEMBRA.

Para realizar la siembra usualmente se utiliza una cantidad de micelio activado de alrededor del 1.5 al 3 % del peso del sustrato.

Debe realizarse en un lugar limpio en donde se mezcla el compost con el micelio activado o semilla.

El sustrato sembrado se coloca en sacos de plástico las cuales deberán cubrir completamente el sustrato, debe ser transparente, perforada y de un espesor aproximado de 0.02 mm.

El utilizar las bolsas de plástico tiene varias razones que son: proporcionar al sustrato un clima adecuado, evitar la desecación, protegerlo contra infecciones entre otras.

Después de la siembra, se sitúa el compost en un lugar donde el crecimiento del micelio pueda empezar y este lugar puede ser el mismo donde se llevó a cabo la pasteurización o esterilización o bien llevar las bolsas al lugar definitivo de la cosecha.

El *Pleurotus ostreatus* requiere de una temperatura de unos 25 C aproximadamente para el desarrollo del micelio. Durante la incubación debe existir un intenso movimiento de aire, para evitar las diferencias de temperatura en el sustrato. Además debe de existir una elevada humedad en el ambiente. La invasión del sustrato habrá terminado pasados 15 o 20 dias. La superficie debe aparecer blanca de micelio, antes de esperar la formación de granos y cuerpos fructíferos.(3 6 17 21 28 33 37)

FORMACIÓN DE CUERPOS FRUCTÍFEROS.

Para que la formación de granos y su posterior crecimiento transcurran sin perturbaciones, es necesaria la luz la cual puede ser natural o artificial .

Se obtendrá una buena fructificación si toda la masa de sustrato se encuentra aproximadamente entre 10 a 12 C. Al cabo de algunos dias, se observará gran cantidad de pequeños puntos blancos en la superficie del micelio estos serán los primeros *primordios*.

Tan pronto como se vean los pequeños botones o primordios en algunas partes es necesario retirar el plastico de la superficie del compost con esto ya se espera el crecimiento de los carpóforos y su subsecuente cosecha Mientras dure la cosecha es conveniente mantener al *Pleurotus ostreatus* a una temperatura de aproximadamente 12 a 14 C y una humedad del aire del 85 % aproximadamente

Dos semanas después de la aparicion del primer botón, se pueden recoger los primeros carpóforos. Con relación a la cosecha se tienen los periodos de oleadas los cuales suelen ser de unos 10 a 14 dias, dependiendo un poco de la temperatura suelen ser de dos a tres por siembra. Los *Pleurotus ostreatus* se cosechan cuando los carpóforos están bien desarrollados y los bordes del sombrero aún no se han enrollado o desgarrado.

Los carpóforos crecen frecuentemente agrupados en racimos. En la primera oleada es preciso cortar los más grandes con precaución. Cuando todos los carpóforos de un racimo estan del mismo tamaño se puede cosechar totalmente este racimo a ras del compost o sustrato. Los carpóforos cosechados se colocan en recipientes para proceder a la preparación para su venta [6, 21, 28]

El comportamiento anterior se muestra en la figura 7.

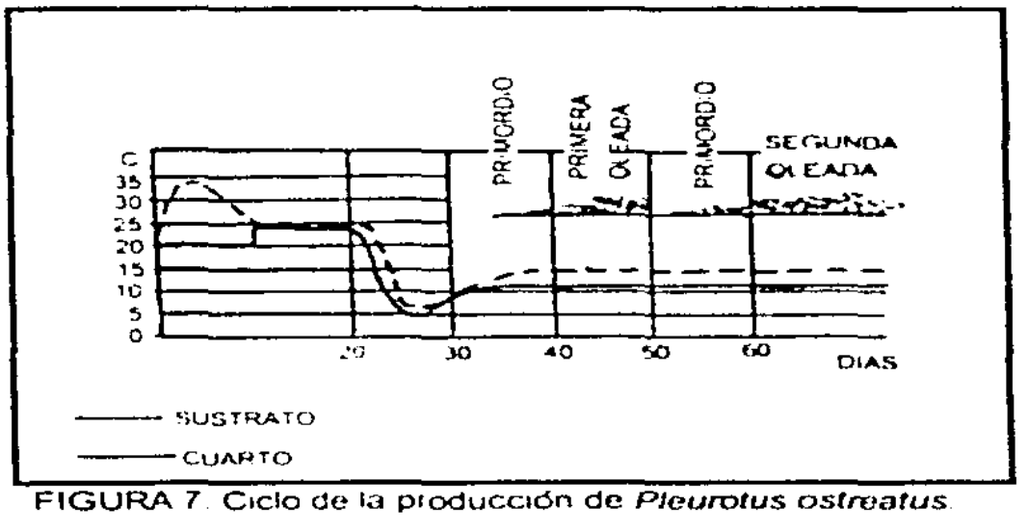


FIGURA 7. Ciclo de la producción de *Pleurotus ostreatus*.

FUENTE 6

CAPITULO 3.
3.1. DESLIGNIFICACIÓN CON EMPLEO DE ENZIMAS.

Como una fuente de reducción de carbono y almacenamiento de energía, la lignina es más abundante que la celulosa

La lignina es muy resistente a la degradación y algunos organismos tienen la habilidad de degradar a la lignina como lo son los hongos y bacterias [4]

Como se sabe, la lignina muestra una barrera física a la descomposición de celulosa y hemicelulosa (Harvey,1985)

El 8% de los hongos asociados con pudriciones café no realizan la reacción satisfactoriamente, mientras que el 96% de los hongos asociados con pudrición blanca tienen una reacción positiva hacia la degradación de la lignina. En los habitantes terrestres los primeros en descomponer la lignina son los basidiomicetos de pudrición blanca, siendo de este tipo el *Pleurotus ostreatus*.como se nos muestra la siguiente tabla 3.,

MICROORGANISMOS DEGRADADORES	
ESPECIE	% DE DISMINUCIÓN DE LIGNINA EN 80 DÍAS
HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA	
Conolus hirsutus	52 + 2
Pleurotus ostreatus	**25 + 2**
HONGOS DE PUDRICIÓN CAFÉ	18 + 5
Fomitopsis pinicola	

TABLA 3 Ejemplos de hongos deslignificadores FUENTE 31

En relación a los diferentes tipos de transformaciones que ocurren durante la degradación de lignina y de la especificidad de la catálisis enzimática, este catabolismo es llevado acabo directamente por las enzimas, siendo la mayoría enzimas extracelulares las que están implicadas mayormente.

Esta reacción positiva de degradar la lignina está asociada con la producción de enzimas extracelulares como ya se mencionó siendo estas,
del GRUPO I. Oxidorreductasas y a estas pertenecen las siguientes,

- Enzimas Fenol oxidasas como la Lacassa
- Peroxidasas
- Tirosinasas

Las enzimas pueden causar cambios en los límites estructurales en la lignina y una cierta disminución en los componentes del peso molecular relacionados con la lignina.(22,36)

3.2. CATÁLISIS ENZIMÁTICA.

Con lo que respecta a la catálisis enzimática es generalmente considerada ya que ofrece algunas ventajas potenciales sobre los procesos químicos, estos son :

- Gran sustrato y reacción especifica.
- Requerimientos de energía mas bajos.
- Generación de contaminantes más baja.
- Alta producción de nuevos productos.
- Oportunidades para transformaciones no fáciles con reactivos químicos.

Dentro de esta tecnología se tienen enzimas que pueden fácilmente separar unas cuantas unidades aromáticas monoméricas de lignina, o alternativamente modificar la macromolécula en una manera que le pueda conferir propiedades útiles para su explotación en el estado macromolecular
Esta es una consideración de las fuentes potenciales de muchas enzimas, la habilidad para degradar o modificar lignina está restringida relativamente a algunos microorganismos como anteriormente se vió.

La biodegradación de la mayoria de los polímeros naturales por microorganismos es hidrolítica. Sin embargo en la lignina no es posible llevar a cabo este tipo de degradación porque la mayoria de estas variedades intermonoméricas enlazadas son no hidrolizables.

Para poder identificar la naturaleza de las reacciones catabólicas involucradas se tiene que hacer lo siguiente

- La examinación de la parcial degradación de lignina y los productos de degradación, o bien el estudio del camino biodegradativo en cultivos lignoliticos usando especificamente ^{14}C- marcado en lignina sintética y modelos diméricos representando las subestructuras de lignina.

Para ambos grupos de hongos como son los de pudrición café y los de pudrición blanca, el modo de ataque es oxidativo, parcialmente degrada o modifica el alto contenido de oxigeno en la lignina por bajos contenidos de metoxilos e hidrógeno comparados con la lignina completa.

Investigaciones quimicas muestran que el grupo de hongos de pudrición blanca tienen envueltos mecanismos por los cuales la demetilación de grupos metoxil en ambos sustratos fenólicos y no fenólicos y la hidrolización de anillos aromáticos

Por lo que los procesos oxidativos resultan en un ataque en las fracciones poliméricas de alto peso molecular correspondientes a la lignina no degradada Es evidente pues que está sujeto a involucar enzimas fenol-oxidasas que remueven radicales fenoxi intermedios. Esto es un proceso de depolimerización y oxidación sucesiva.

Esto esta basado en la identificación de las unidades terminales oxidativas en polimeros degradados de lignina.

La relación extracelular C-C es considerada como el centro importante del mecanismo por el cual el polímero de lignina es fragmentado.

Los hongos de pudrición blanca catalizan las reacciones de oxidación con el resultado de un incremento del contenido de alfa-carbonil de la lignina degradada. La identificación se realiza con el aislamiento de varias moleculas de bajo peso molecular las cuales tienen grupos alfa-carbonil intactos C_{α}-C_{β}. Ver figura 8.

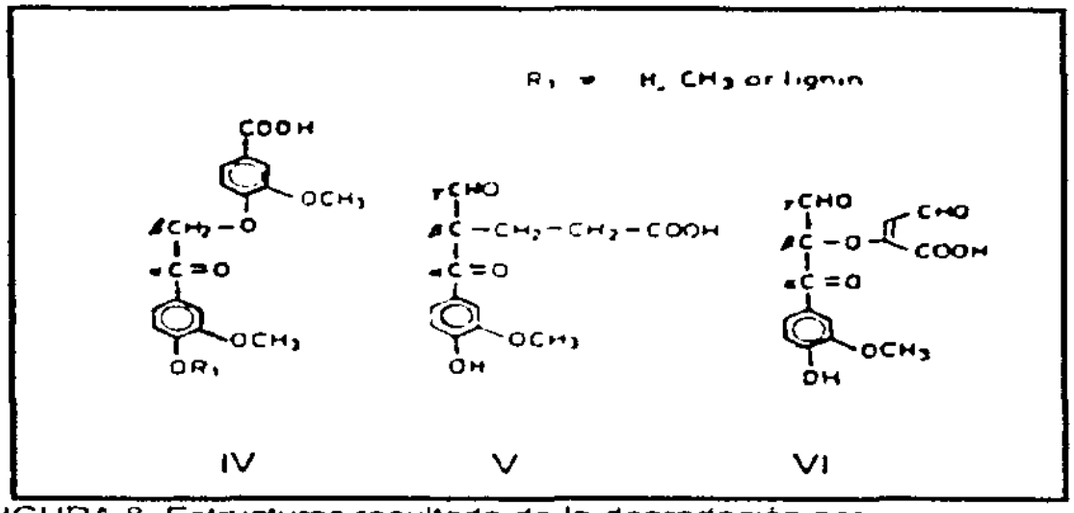


FIGURA 8. Estructuras resultado de la degradación por hongos de pudrición blanca. FUENTE. (4,10,32)

Con lo anterior los procesos biológicos mas viables para utilizar los desechos lignocelulósicos es para producir alimentos en gran escala para ganado con un grado mayor de digestibilidad, o bien para la producción de hongos comestibles

Estos dos procesos (degradación de desechos lignocelulósicos para la producción de alimento para ganado y la explotación de estos desechos para el cultivo de setas), abre nuevas posibilidades a otros subproductos, ya que los estudios dirigidos a la degradación de la lignina, la celulosa y la hemicelulosa dejan dejan ver la obtencion de subproductos como la vainillina, glucosa, etc. (5,16,24,25,36,34)

CAPITULO 4.

OBJETIVO GENERAL.

Obtención de ligninasas producidas por *Pleurotus ostreatus* (seta) cultivado en rastrojo de maíz y su actividad enzimática *in vitro*.

HIPOTESIS.

La utilización de un desecho lignocelulósico (rastrojo de maíz), servirá como sustrato inductor en la producción de ligninasas por *Pleurotus ostreatus*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

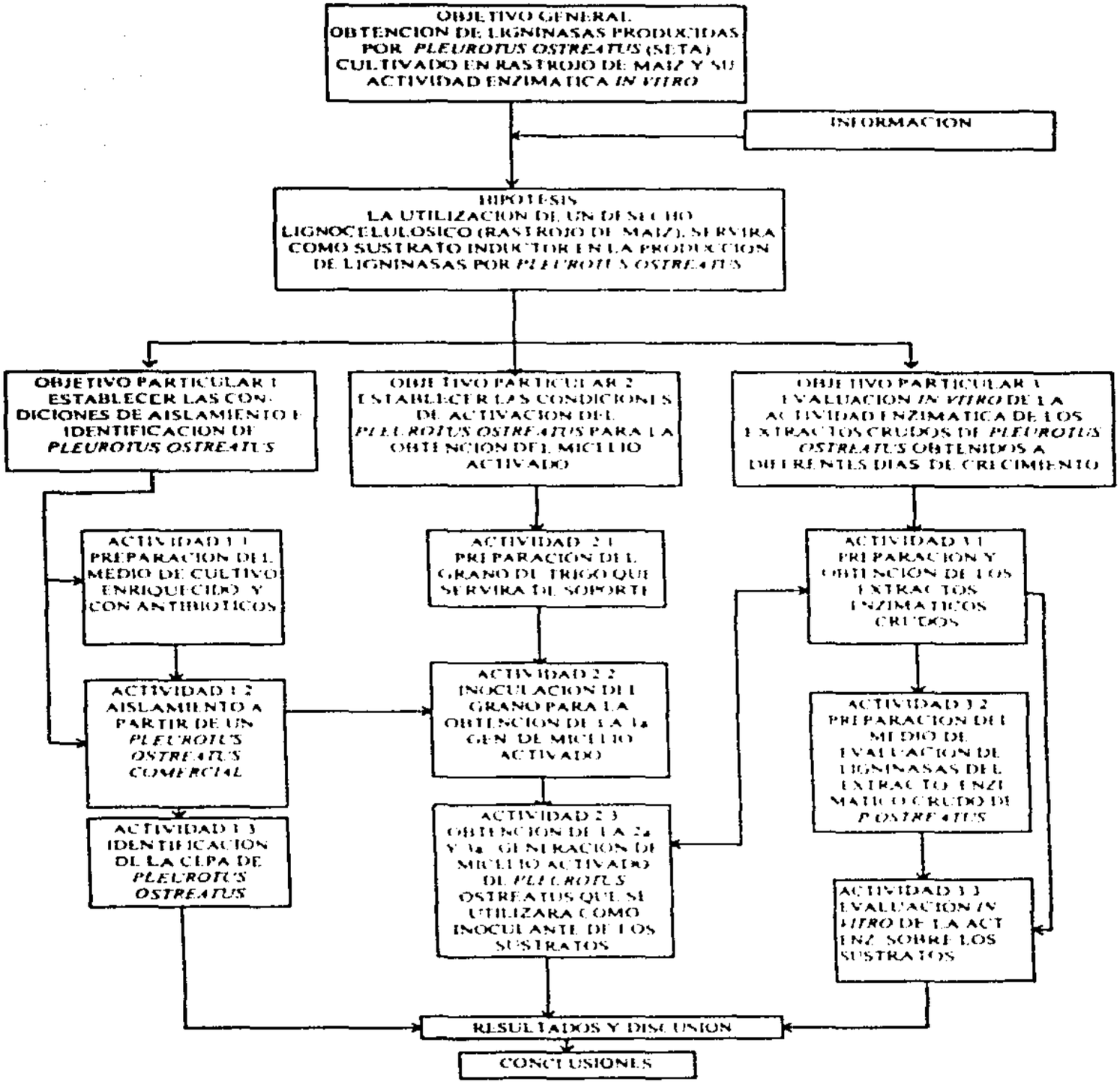
1.- Establecer las condiciones de aislamiento e identificación de *Pleurotus ostreatus* a partir de un hongo comercial.

2.- Establecer las condiciones de activación de *Pleurotus ostreatus* para la obtención del micelio activado para la inoculación del sustrato (rastrojo de maíz).

3.- Evaluación *in vitro* de la actividad enzimática de los extractos crudos de *Pleurotus ostreatus* obtenidos a diferentes días de crecimiento en rastrojo de maíz, usando como sustrato lignina comercial y rastrojo de maíz.

Para el cumplimiento de los objetivos anteriores se planteo la siguiente metodología.

CUADRO METODOLOGICO



DESARROLLO DE LA METODOLOGIA.

1.1. Preparación del agar enriquecido para el desarrollo de la fase vegetativa (micelio madre) de *Pleurotus ostreatus*.

Composición del agar enriquecido el cual servirá para lograr el aislamiento. (13,18)

MEDIO DE CULTIVO EN	UN LITRO
REACTIVO	CANTIDAD
Agar bacteriológico	20 grs.
Peptona	8.0 grs.
Extracto de levadura	0.3 grs.
KH_2PO_4	5.0 grs.
$(NH_4)_2SO_4$	3.0 grs.
$Mg\ SO_4$	0.5 grs.
$CaCl_2\ 2H_2O$	2.0 grs.
Glucosa	3.0 grs.
Solución de minerales	20 ml
$FeSO_4\ 7H_2O$ 1.0 grs. $CuSO_4\ 5H_2O$ 0.2 grs. $MnSO_4\ H_2O$ 0.1 grs $Mo\ (NH_4)_2$ 50 mgrs.	

Cuando se realiza el aislamiento del *Pleurotus ostreatus* se pueden arrastrar contaminaciones de bacterias y algunos actinomicetos, los cuales se pueden eliminar empleando los siguientes antibioticos como complemento de la formulación del agar anteriormente descrito [29].

Estreptomicina 50 ppm
Cloranfenicol 50 ppm

El pH del agar ya enriquecido se ajustó a 4.5 empleando H_2SO_4 e NaOH ambos al 2 %.

Este se esterilizó por 15 min. a 15 lb/in^2 , ó bien 15 min. a 121 C .

Se prepararon cajas de petri de 100x15 mm y fueron incubadas a temperatura ambiente durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

1.2. Aislamiento a partir de tejido vegetal de un *Pleurotus ostreatus* comercial.

Se empleó tejido interno del sombrero de un esporóforo comercial siguiendo la metodologia que a continuación se describe:

1. Se seleccionó un hongo comercial que tuviera un tamaño adecuado es decir de 8 a 10 cm. de diamétro del sombrero aproximadamente y que su tejido se encontrara lo más sano o integro posible.

2. Se dividió el hongo para exponer el tejido interno en fragmentos de aproximadamente un centimetro.
3. Los fragmentos de tejido fueron trasferidos dentro de una caja petri que contian el agar enriquecido estéril
Los dos pasos anteriores se deben realizar bajo un área estéril.
4. Dichas cajas fueron incubadas a una temperatura de 20 a 25 C durante un periodo aproximadamente de 10 dias, hasta apreciar el desarrollo del micelio.
El micelio que sea obtenido en las cajas, es el que corresponde al **micelio madre** (19,27)

1.3. Identificación de la cepa a través del desarrollo de la fase generativa.

Para verificar que durante el aislamiento, la cepa obtenida de *Pleurotus ostreatus* no habia sufrido modificaciones morfológicas durante su adaptación artificial, se llevó a cabo el desarrollo de la fase generativa del hongo en rastrojo de maiz.
El sustrato como ya se mencionó fué ratrojo de maiz, el cual se molió en un molino de martillos hasta obtener una harina Este posteriormente fue lavado y remojado para lograr una humedad de 65 a 80%, y después ser esterilizado a 121 C durante 20 minutos. Inmediatamente que fue enfriado, se inoculó con fragmentos de micelio madre de aproximadamente un cm cuadrado, los cuales representaron alrededor de un 3% del peso del sustrato en base seca.

Este sustrato una vez inoculado fue incubado a una temperatura de 20 a 25 C sin luz hasta que se obtuvieron los esporóforos como resultado de la fase vegetativa y así poder corroborarla con las características bibliográficas descritas.(17,21,28,33,37)

Las características morfológicas que fueron consideradas para la identificación son las siguientes:

CARACTERISTICAS	ATRIBUTOS
Tamaño del pie	De 1-3 cm. localizado en la parte lateral del sombrero
Tamaño y color del sombrero	De 4-14 cm de diamétro y color gris pardo , blancuzco a azulado
Forma de las laminillas	Con laminillas intermedias y blancas
Color de la esporada	De color blanco
Color y Sabor de la carne	Blanquecina y de sabor agradable
Agrupación durante su crecimiento	En racimos

TABLA 4. Características morfológicas de *Pleurotus ostreatus* FUENTE 6.8

2.1. Preparación del grano que servirá al micelio como soporte y sustrato.

La fase vegetativa del micelio madre fué propagada con el fin de obtener micelio activado que posteriormente sería utilizado como inoculante. Esto se llevó a cabo de la siguiente forma :

El grano empleado fue de trigo , éste debió cumplir con las siguientes caracteristicas ;

- libre de particulas extrañas
- preferentemente de un tamaño homogéneo
- sin presencia de granos rotos
- ser un grano jóven

El grano deberia tener una humedad del 54% como especificación aproximadamente y esto se logró empleando la siguiente relación: por cada 100 ml de grano se colocaran 100 ml de agua.

El grano fué esterilizado a 15 lb/in^2 durante 20 min para lograr su esterilidad.[19,27]

2.2. Inoculación en grano para obtención de la primera generación.

Los frascos que contenían un volumen de 150 ml de grano con las características antes mencionadas fueron inoculados en una relación de 1:10 es decir,que cada caja petri que contiene el micelio madre ya puro y domesticado servirá para inocular 10 frascos de trigo lo cual se realizó de la siguiente manera la caja petri fué dividida en 10 fragmentos iguales y estos se colocaron en los frascos que contenían el grano, todo esto se debe realizar bajo una área estéril obteniendose así la primera generación, después de ser incubados durante 10 días o más aproximadamente bajo una temperatura de 20 a 25 C en la obscuridad.

Lo anterior se detalla en el siguiente esquema,

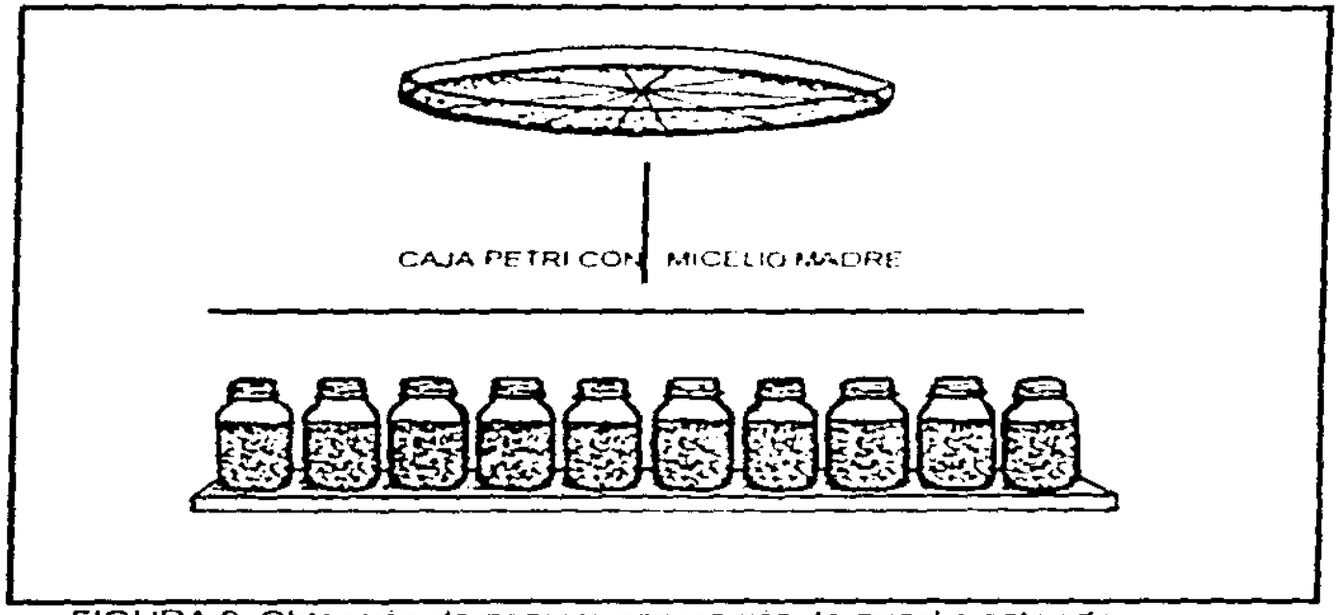


FIGURA 9 Obtención de primera generación de micelio activado.
Frascos de trigo estéril, con 54 % de humedad y 150 ml de grano.
Relación final 1 caja de micelio madre : 10 frascos con trigo estéril.

2.3. Obtención de la segunda generación de micelio activado.

Esto se realizó partiendo de la primera generación que se obtuvo, también en una relación proporcional es decir que cada frasco de primera generación que contenia los 150 ml. de grano ya invadido se dividió en 10 porciones iguales las cuales se utilizarón para inocular 10 frascos de trigo que contenian 150 ml. de grano estéril y con una humedad del 54 %y así se conformaria la segunda generación, es decir que los 10 frascos de primera generación obtenidos inocularon 100 frascos de segunda generación y así sucesivamente para obtener una tercera generación. Lo anterior se observa en el siguiente dibujo.

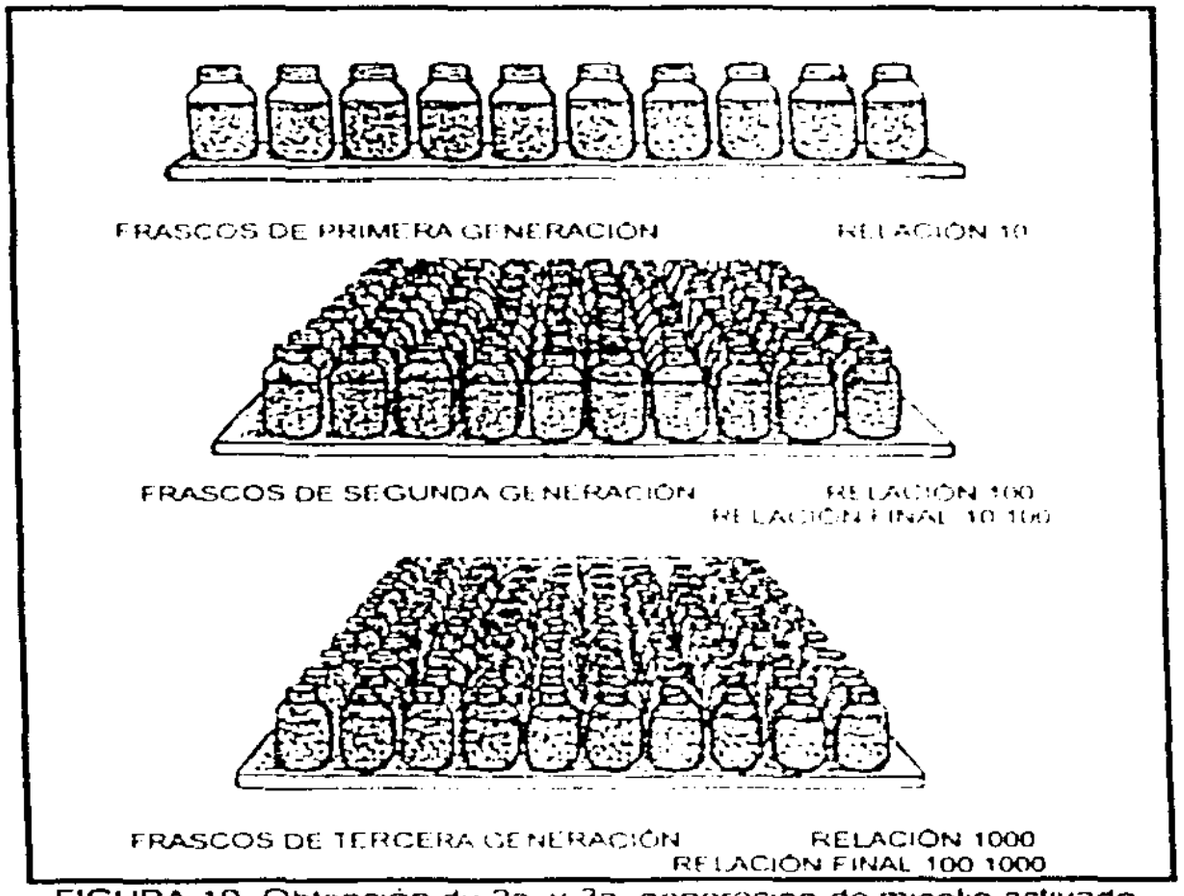


FIGURA 10. Obtención de 2a y 3a generacion de micelio activado.

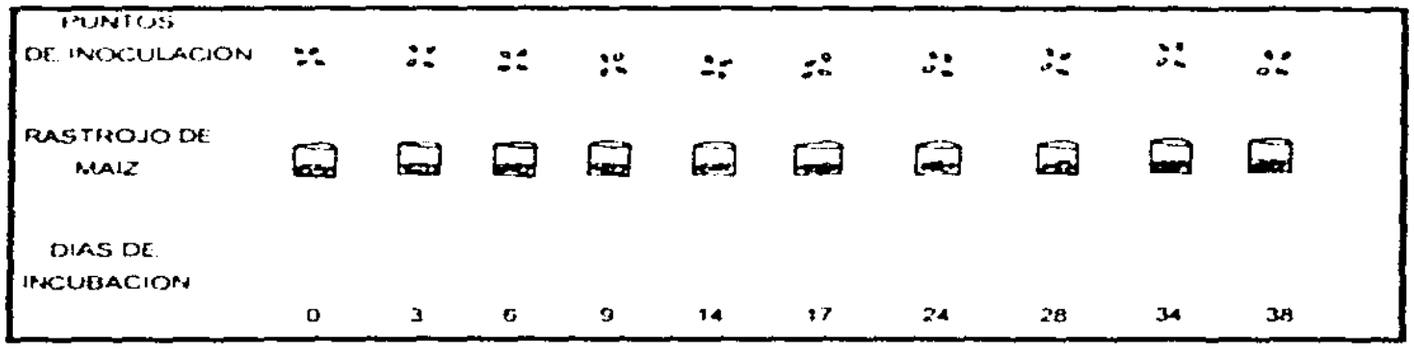
Con lo anterior se obtuvieron las 3 generaciones todas ellas provenientes de un cultivo puro. Considerando también a la tercera generación de buena calidad para la producción de esporóforos.

La segunda generación de micelio activado es la que se recomienda para ser utilizada como inoculante del sustrato o de los sustratos en los cuales se quiera producir esporóforos a una mayor escala y ésta fué la que se utilizó para la producción de ligninasas de *Pleurotus ostreatus* tomando una relación del 3% en peso del sustrato seco que en este caso fué rastrojo de maíz molido.

3.1. Obtención del extracto enzimático crudo y evaluación del medio de cultivo donde se desarrollo el micelio de *Pleurotus ostreatus*.

El rastrojo de maíz fue molido en un Molino de Martillos, la harina obtenida fue lavada y secada. Posteriormente en frascos de 200 ml. de capacidad se colocó un gramo de paja. A esta cantidad se le agregó 10 ml de agua destilada para lograr la humedad de 60 a 75%. Posteriormente se esterilizó por 15 min a 15 lb/in^2 y se dejó enfriar para llevar a cabo su inoculación.

El rastrojo humedo se inoculó con micelio activado, colocando 4 granos de trigo invadido por *Pleurotus ostreatus*. Estos granos correspondieron al 3% del peso del sustrato en base seca. De esta forma se obtuvieron un total de 11 frascos de paja-hongo de los cuales se utilizaron los extractos enzimáticos, aproximadamente en periodos de cada tres dias. Esto se llevó a cabo durante 30 dias de desarrollo del *Pleurotus ostreatus* [13,18,37]. Como se muestra,



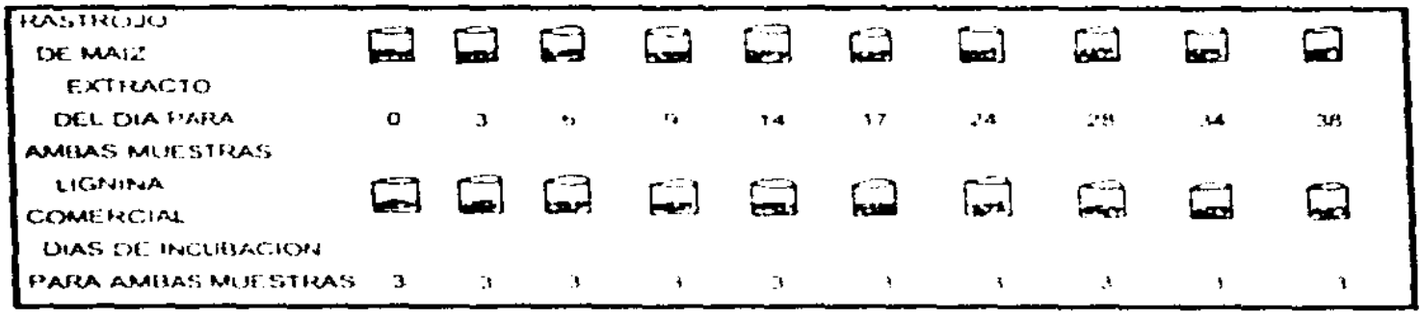
Las enzimas producidas por *Pleurotus ostreatus* son extracelulares por lo que para su obtención será necesario realizar un lavado y un filtrado con buffer de fosfatos de un pH 4.5 utilizando de 20 a 25 ml. del buffer estéril. El filtrado contendra las enzimas producidas por *Pleurotus ostreatus* durante cada período. Estos extractos enzimáticos crudos serán empleados para la prueba de actividad lignocelulolitica sobre lignina comercial (control) y sobre paja de maiz (sustrato real).[14,18,38]
Obteniendo asi un total de 11 extractos enzimáticos crudos de diferentes días.

3.2. Preparación del medio de evaluación de ligninasas del extracto enzimático crudo de *Pleurotus ostreatus*.

Se pesó 0.1406 gr. de lignina comercial (LN de Aldnch Chemical Company, Inc.) la cual corresponde al contenido de lignina en un gramo de rastrojo de maiz. Éste fue colocada en frascos de 200 ml. de capacidad con 10 ml. de agua destilada estéril.
Posteriormente fueron colocados 5 ml. de cada uno de los extractos enzimáticos crudos obtenidos de cada periodo establecido
En el caso de la paja de maiz molida se pesó un gramo de la misma y se colocó en un frasco de 200 ml. de capacidad con 10 ml. de agua destilada estéril. Se agregaron 5 ml. del extracto enzimático crudo de cada periodo.
Los periodos de los extractos crudos que se evaluaron fueron:
0 dias, 3, 6, 9, 14, 17, 20, 24, 28, 34 y 38 dias.

3.3. Evaluación *in vitro* de la actividad enzimática de los extractos crudos a diferentes dias sobre lignina pura y rastrojo de maiz.

Se contó con un total de 11 muestras de lignina comercial y 11 muestras de rastrojo de maiz molida a las cuales se les adicionarón los extractos enzimáticos de cada periodo establecido. Como muestra el siguiente esquema,



Cada una de estas muestras fue analizada después de un periodo de tres dias de estar en contacto con el extracto enzimático crudo a una temperatura de 20 a 25 C; posteriormente se realizarón los análisis de lignina aparente por el metodo de Klason Sidney P. et al. 1988 (anexo 1) y carbohidratos por el método de Nelson y Somogy Sidney P. et al. 1988 (anexo 2). Es importante determinar el nivel de composición de los residuos lignocelulósicos que han sido degradados enzimáticamente al estar en contacto los extractos crudos con los sustratos, en este caso lignina pura y rastrojo de maíz razón por la cual se determinó la cantidad de lignina degradada y la aparición de carbohidratos, que ocurre como resultado de la degradación vía enzimática. (2,9,10,22,25,30,32)

La siguiente tabla sirvió para recabar la información obtendida durante el experimento.

	LIGNINA COMERCIAL		RASTROJO DE MAIZ	
DIAS	% LIGNINA APARENTE	% DE CARBOHIDRATOS	% LIGNINA APARENTE	% DE CARBOHIDRATOS
0				
3				
6				
9				
14				
17				
20				
24				
28				
34				
38				

Con los datos que se recopilen resultado de la experimentación se realizará el análisis de resultados adecuado.

CAPITULO 5.

RESULTADOS Y DISCUSION.

La preparación de las cajas de petri con el empleo del agar enriquecido y la adición de antibióticos en cantidades de 50 ppm de estreptomicina y 50 ppm de cloranfenicol resolvió el problema de contaminación.

Se obtuvieron cajas petri con agar enriquecido de un color crema traslúcido y de una consistencia dura.

Se logró el aislamiento del hongo a partir de un fragmento del tejido interno del sombrero de un hongo comercial.

El micelio se obtuvo en las cajas de agar enriquecido, se desarrolló en un periodo de 8 a 10 días de incubación a 25 C con las características morfológicas propias del micelio a evaluar como se propuso en la metodología:

CARACTERISTICA	ATRIBUTO
Apariencia	Pelucilla blanca
Color	Blanco
Reves de la caja	De color blanco
Textura	Algodonosa

Dichas características morfológicas resultaron ser las esperadas para el *Pleurotus ostreatus* .

Con lo anterior se logró obtener el desarrollo de la fase vegetativa y su adaptación a un medio artificial obteniendose así el " micelio madre ".

Una vez que se logró la adaptación del *Plourotus ostreatus* se verificó si sus características no habían sufrido cambios, esto se hizó a través del desarrollo de la fase generativa corroborándose así las características morfológicas del fruto:

CARACTERISTICA	ATRIBUTO
Tamaño del pie	1 a 3 cm.
Tamaño del sombrero y color del mismo	De 6 a 12 cm. de color gris claro a obscuro
Forma de las laminillas	Laminillas continuas al pie (decurrentes)
Color de la esporada	Blanca
Color y sabor de la carne	Blanquecina y dura de un sabor agradable
Agrupación durante su crecimiento	En racimos de 4 o más carpóforos.

La preparación del grano que sirvió como soporte y sustrato para desarrollar el micelio madre fue de suma importancia el haber contado con un grano de trigo de buena calidad, para lo cual los siguientes puntos fuerón determinantes para obtener un micelio activado de alta calidad:

- Libre de partículas extrañas; esto fué quitar granos que no eran de trigo, así como toda basura.
- De un tamaño homogéneo el cual fué de aproximadamente de 4 a 6 mm. de longitud.
- Eliminar todos los granos rotos ya que si estos estan presentes ocasionan que el almidón del grano se gelifique durante su preparación y esterilización y ocasionando además que los granos estén adheridos lo cual no es conveniente.

- Selección de grano joven; esto se logró al obtener un grano, el cual su cutícula no estuviera arrugada ya que de ser así, causaría problemas posteriores como son: el desprendimiento de la cutícula durante su separación y que el grano no se invadiera completamente del micelio.

Lo anterior se realizó con facilidad y no se presentó ningún problema.

En cuanto a la humidificación del grano, la relación más adecuada fué 100 ml. de grano y 80 ml. de agua para después esterilizarse por 20 min. a 15 lb/in^2, para así obtener una humedad del 58 %, la cual resultó apta para el desarrollo del " micelio activado ".

La inoculación del grano ya humidificado con fragmentos de " micelio madre " para la obtención del desarrollo de la primera generación, siguiendo la relación de una caja de petri invadida de micelio que se utilizó para inocular 10 frascos con 100 ml. de grano preparado, se desarrolló después de 15 días aproximadamente en incubación a una temperatura de 20 a 25 C, sin luz, observándose el desarrollo de la fase vegetativa del micelio de *Pleurotus ostreatus* con las siguientes características:

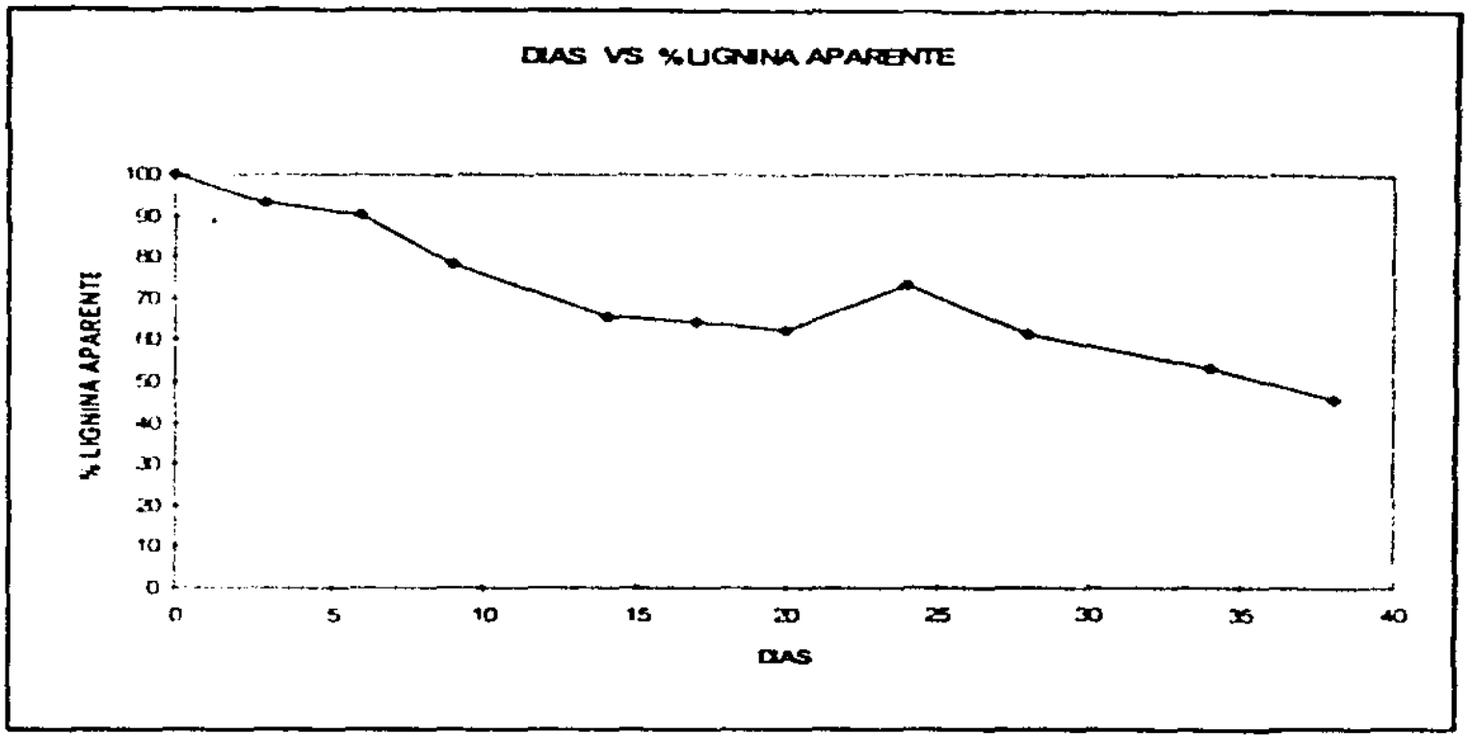
CARACTERISTICA	ATRIBUTO
Apariencia	Crecimiento de las hifas a manera de filamentos entre los granos de trigo
Color	Blanco
Textura	Algodonosa
Desarrollo	Lento y escaso por la nueva adaptación al sustrato (granos de trigo)

La obtención de la primera generación del " micelio activado " sirvió para lograr el desarrollo de la segunda generación, la cual fué utilizada para la inoculación de sustratos para el desarrollo de la fase generativa de *Pleurotus ostreatus*, que fue la que se utilizó para la producción de ligninasas.

Esto se realizó en la relación planteada que fue: un frasco de grano de la primera generación para 10 frascos con 100 ml. de grano preparado obteniendose la invasión completa del grano de trigo en un periodo de 10 días aproximadamente el cual tuvo las siguientes características:

CARACTERISTICA	ATRIBUTO
Apariencia	Granos totalmente invadidos por las hifas del micelio
Color	Blanco
Textura	Algodonosa
Desarrollo	Vigoroso

En relación a la preparación y obtención del extracto enzimático crudo, su extracción resultó fácil ya que se sabe por la bibliografía que las enzimas que forman el complejo enzimático denominado " ligninasas " son extracelulares.
El volumen utilizado finalmente para extraer las enzimas del medio de cultivo del hongo a diferentes días, fué de 25 ml. de buffer de fosfatos.



GRAFICA 1. % de Lignina aparente VS periodos de incubación de *Pleurotus ostreatus* en el medio de cultivo.

En la gràfica 1 se muestra el % de lignina aparente durante el periodo de incubación del micelio de *Pleurotus ostreatus*

Como puede observarse en un periodo de 38 dias la cantidad de lignina aparente disminuyo de un 100 % a un 45. 6 % es decir que de un 19.9 % de lignina aparente que contenía el rastrojo de maiz esté disminuyó a un 9.07 % de lignina aparente cuantificable.

Existen algunos datos de Tanesaka y cols. 1993 en donde se mencionà una disminución de un 25 % de lignina en 80 dias, si realizamos el mismo análisis observamos que de un contenido inicial de 20 % de lignina este idsminuye a un 15 % de lignina aproximadamente, tomando en cuenta que no se pueden comparar dichos resultados ya que la medición de la degradación de lignina fué hecha sobre trozos de madera a diferencia del rastrojo de maiz y debidó a que la estructura de la madera es

madera a diferencia del rastrojo de maíz y debido a que la estructura de la madera es mucho más rígida y compleja la actividad de los extractos enzimáticos pudiera verse más comprometida por la estructura misma.

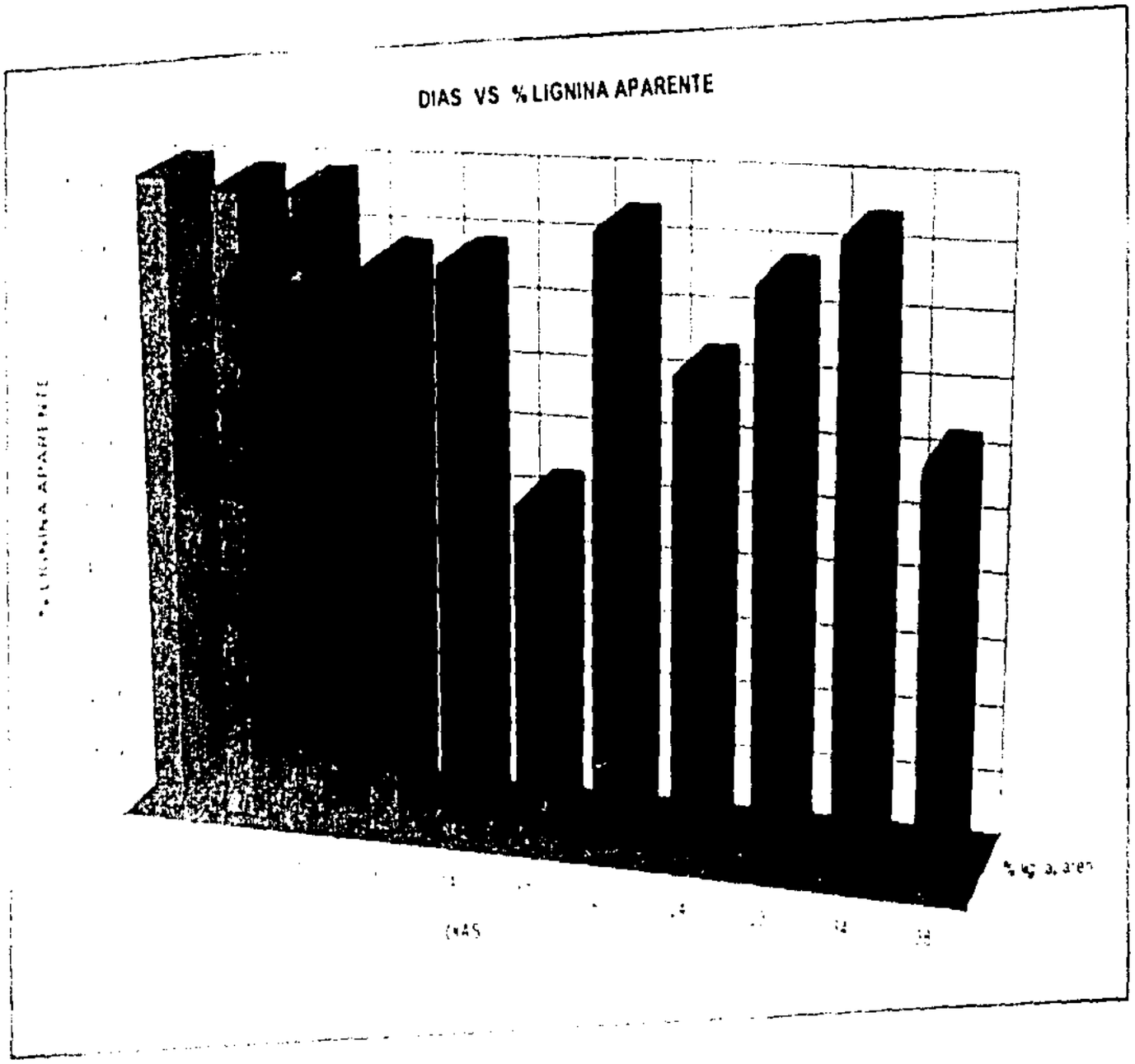
Ahora bien Platt y cols. 1984, encuentran que en la degradación de lignina de paja de algodón se observa que en un periodo de 25 días tienen una disminución del 33 % en el contenido de lignina. Este dato se acerca mucho al obtenido en este trabajo, ya que si se considerara el mismo tiempo (25 días) se hubiera tenido una degradación de lignina del 30 %.

De los extractos enzimáticos crudos obtenidos cada tres días y probados sobre lignina comercial y rastrojo de maíz se tienen los siguientes resultados que se muestran en la tabla 5 y las gráficas 2.a. , 2.b. y 3.a. ,3.b. respectivamente.

	LIGNINA COMERCIAL		RASTROJO DE MAÍZ	
DIAS	% LIGNINA APARENTE	% DE CARBOHIDRATOS	% LIGNINA APARENTE	% DE CARBOHIDRATOS
0	100.00	0.00	99.3617	0.00
3	98.3629	130.00	98.5560	126.73
6	98.2248	110.00	93.2770	151.48
9	87.7712	109.00	87.7667	120.79
14	88.4536	103.00	68.7500	136.63
17	52.9161	100.00	88.9360	140.59
20	94.2800	87.00	96.5933	127.72
24	74.1538	97.00	89.7887	137.62
28	87.7031	96.00	89.5184	120.79
34	94.5325	115.00	92.2640	131.68
38	62.8560	101.00	96.3726	117.82

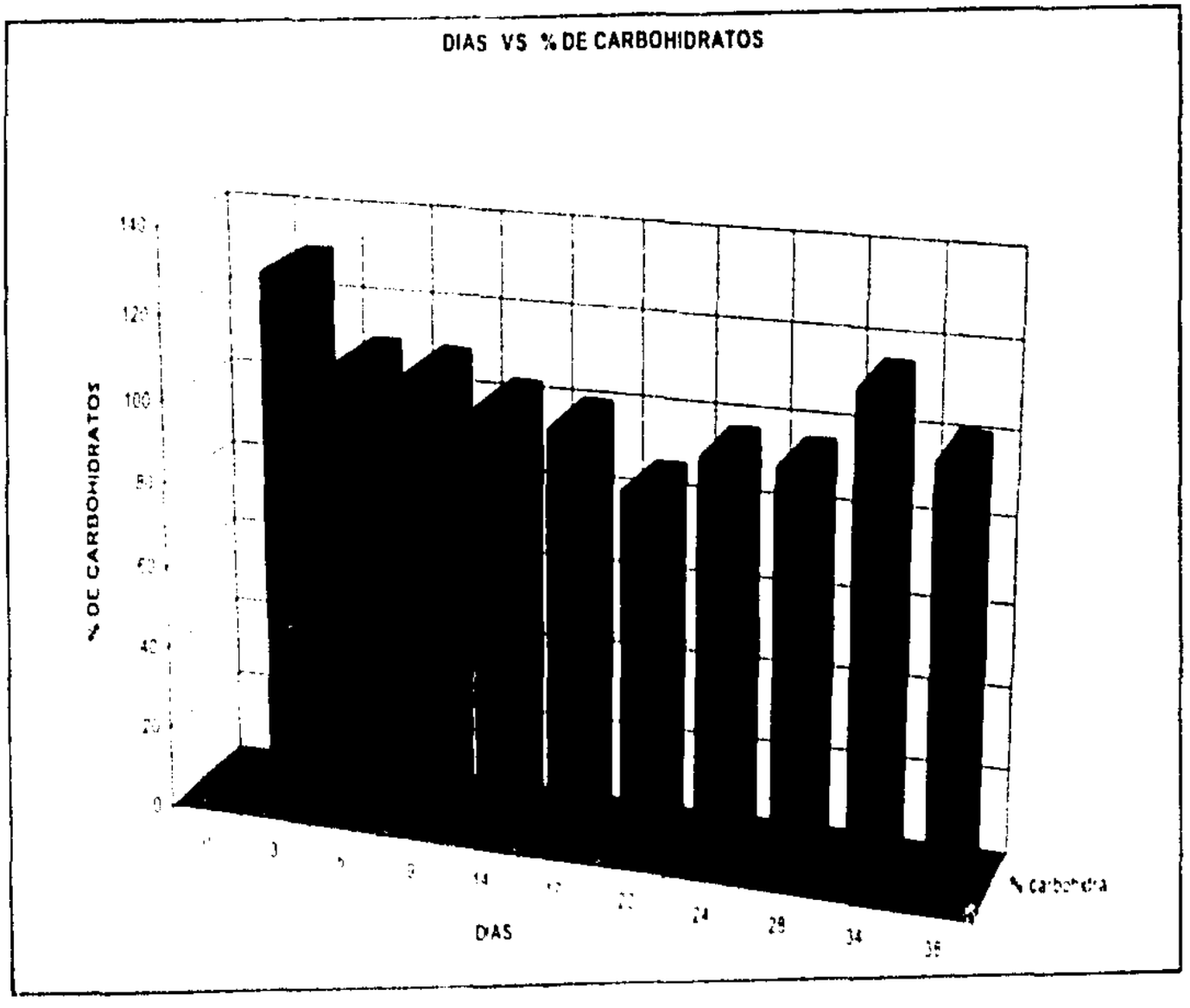
TABLA 5. Resultados de la evaluacion *in vitro* para lignina comercial y rastrojo de maíz

COMPORTAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS DE DIFERENTES DIAS SOBRE LIGNINA COMERCIAL.



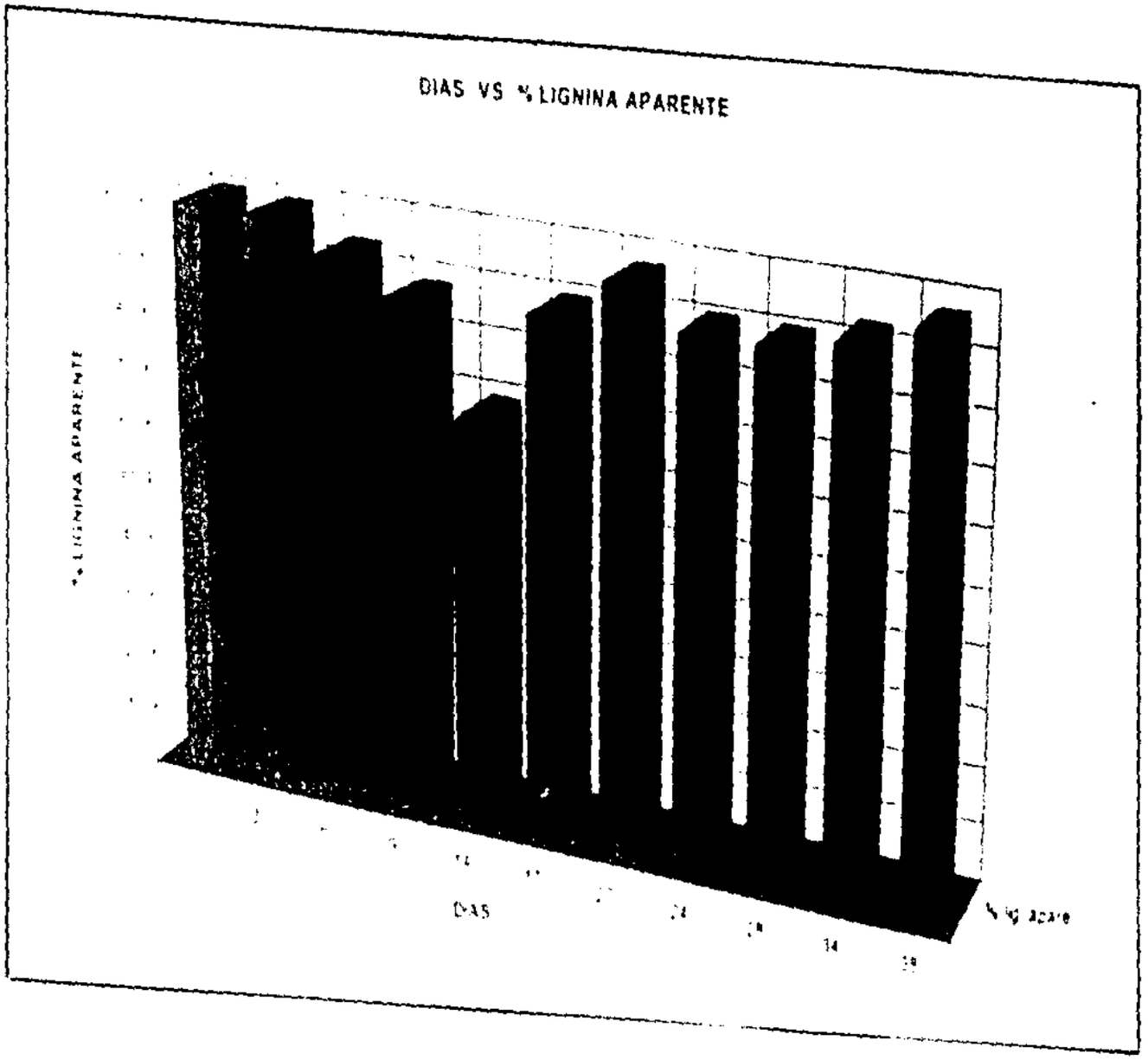
GRAFICA 7a ... de Lignina Aparente

COMPORTAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS DE DIFERENTES DIAS SOBRE LIGNINA COMERCIAL.



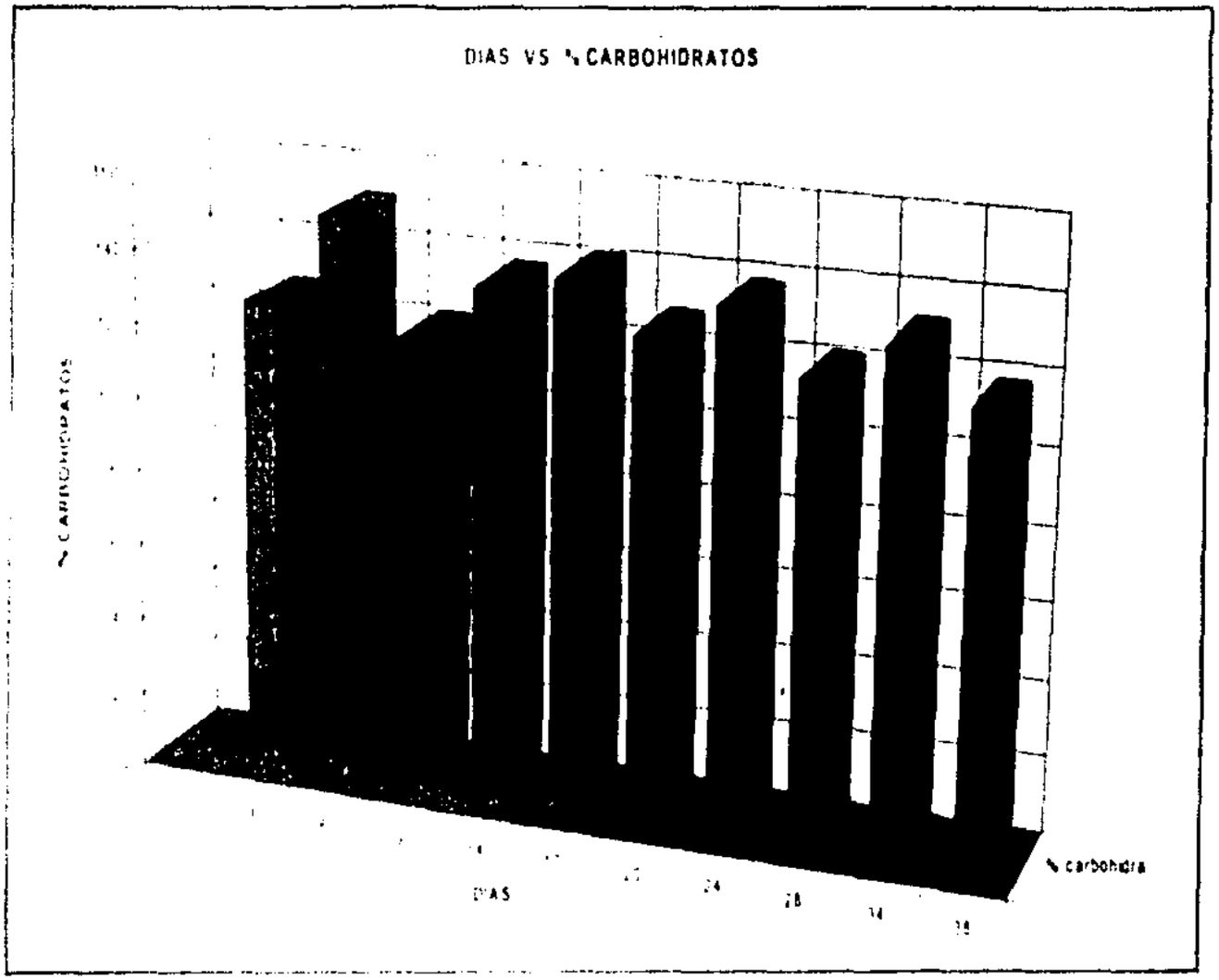
GRAFICA 2.b. % de Carbohidratos.

COMPORTAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS DE DIFERENTES DIAS SOBRE RASTROJO DE MAIZ.



GRAFICA 3 a. % de Lignina Aparente

COMPORTAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS DE DIFERENTES DIAS SOBRE RASTROJO DE MAIZ.



GRAFICA 3 b % de Carbohidratos.

Como se observa en la gráfica de barras 2.a. el porcentaje más bajo de lignina aparente se presentó con un extracto enzimático obtenido de un cultivo de 17 días, medido sobre lignina comercial en donde se considera como 100 % de lignina la cantidad de lignina contenida en 1 gramo de rastrojo de maiz. Por otro lado la gráfica de barras 2 b. también nos muestra el porcentaje de aparición de carbohidratos presentados son valores corregidos es decir, que el valor determinado se le restó el porcentaje de carbohidratos que provienen del medio de cultivo.

Si comparamos los valores de carbohidratos que aparecen conforme transcurre la degradación, prodriamos decir que con un extracto enzimático de tres dias de cultivo se presentan carbohidratos que provienen de la degradación de lignina basicamente (130 % para lignina y si observamos la gráfica de barras 3.b. se tiene un 126 % para rastrojo de maiz), mientras que para un extracto enzimático de 6 dias se presenta la mayor cantidad de carbohidratos en el rastrojo de maiz y esto puede ser debido a la suma de carbohidratos que provienen de la degradación de lignina más los carbohidratos que provienen de la degradación de celulasas y hemicelulasas, ya que en el extracto enzimático es probable que contengan celulasas y hemicelualsas. Es por esto que hubo necesidad de medir la actividad de ligninasas con un control positivo como fue el caso de lignina pura.

En la gráfica de barras 3.a. se observa que el valor más bajo de lignina aparente se presenta con el extracto enzimático de 14 dias de cultivo (68.7 %). Si comparamos en tiempo y en porcentaje de lignina degradada los extractos de los dias 14 y 17 en lignina comercial y rastrojo de maiz, podemos observar qe en rastrojo de maiz se tiene a los 14 dias la máxima degradación pero no en porcentaje degradado , mientras que el extracto de 17 dias sobre lignina comercial, se tiene el porcentaje más bajo de lignina aparente.

Con estos datos podriamos decir, que los extractos enzimáticos producidos en un periodo de 14 - 17 dias de cultivo se tiene la mayor actividad de ligninasas y esto se puede deber a que el extracto enzimático contiene no solo ligninasas sino celulasas y hemicelulasas y que al ser medida su actividad sobre diferentes sustratos (lignina comercial y rastrojo de maiz) dan esa diferencia en días y se podria suponer que esa diferencia en dias en cuanto a actividad de las ligninasas se refiere a que la presencia se otros sustratos inhiba parcialmente la actividad de las ligninasas.

De acuerdo a Crawford 1980 es muy dificil estudiar el mecanismo bioquimico en el cual los microorganismos degradan a la lignina una razón es la complejidad estructural de la molecula de lignina ya que esta es un polimero amorfo tridimensional el cual contiene diferentes enlaces C -C estables y enlaces éter entre unidades monomericas de fenil propanoides.

Usualmente la mejor forma de seguir la degradación es medir alteraciones químicas grandes como por ejemplo la cuantificación de varios grupos funcionales en la lignina antes y después de su degradación

Harvey P. J. et. al. 1985 aseguran que los hongos de pudrición blanca remueven selectivamente lignina ó simultáneamente remueven lignina y polisacáridos por estas razones en este trabajo fué medida tanto la desaparición de lignina como la aparición de carbohidratos respectivamente, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

Harvey P. J. et. al 1985 estudió el modo de ataque de los hongos de pudrición cafe y blanca y encontró que es un ataque oxidativo, ya que ligninas y bajo contenido de hidrógeno y metoxil comparadas con lignina sin degradar.

Además los hongos de pudrición blanca metabolizan la lignina hasta dióxido de carbono y agua, fragmentado extracelularmente el polimero hasta mezclas de bajo peso molecular antes de ser metabolizados intracelularmente.

CONCLUSIONES.

1. Se realizó el aislamiento del hongo *Pleurotus ostreatus* en forma pura a partir de tejido interno del sombrero de una seta comercial.

2. En la preparación del medio se hizo necesario utilizar antibióticos para prevenir la contaminación por bacterias y actinomicetos durante el cultivo de *Pleurotus ostreatus*.

3. El desarrollo del " micelio madre " se obtuvo en un periodo de 8 a 10 dias de incubación a 25 C con las caracteristicas morfológicas propias y corroborando dichas caracteristicas al lograr el desarrollo de la fase generativa obteniendo las características morfológicas esperadas.

4. En cuanto a la preparación del mecelio activado la mejor relación para obtener la humedad deseada del trigo fué de 100 ml. de grano 80 ml. de agua logrando asi una humedad del 58 %.

5. El periodo de desarrollo del " Micelio activado " para la primera generación fué de 15 dias de incubación de 20 - 25 C.

6. El periodo de desarrollo de la segunda generación fué de 10 dias a la temperatura de 20 - 25 C.

7. Durante el periodo de incubación del micelio de *Pleurotus ostreatus* sobre rastrojo de maiz y se tiene una disminución del contenido de lignina de un 54.4 %.

8. Con el extracto enzimático obtenido obtenido a los 14 días de incubación del micelio de *Pleurotus ostreatus*, se obtiene el valor más bajo de lignina aparente (68.7 %) cuando éste es aplicado sobre rastrojo de maíz, o sea que el extracto enzimático crudo degradó 31.3 % del total de lignina en 3 días de incubación.

9. Con el extracto enzimático obtenido a los 17 días de incubación del micelio de *Pleurotus ostreatus*, se obtiene el valor más bajo de lignina aparente (52. 9 %) cuando éste es aplicado sobre lignina comercial, o sea que el extracto enzimático crudo degrado 47.1 % del total de la lignina en 3 días de incubación

10. Es importante el considerar que los tiempos de obtención del micelio madre y del micelio activado disminuyerón en relación a los tiempos reportados bibliograficamente se considera relevante para cuando se desee llevar a cabo el cultivo de *Pleurotus ostreatus* en otra escala, ya que el tiempo de obtención de los esporóforos tenderá a disminuir los tiempos de cultivo.

11. Con el empleo de extractos enzimáticos de *Pleurotus ostreatus* se podrá hacer un mejor aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos para consumo animal, ya que estos extractos deslignifican el material y por lo tanto dejan expuestos más nutrientes aprovechables por el animal.

ANEXO 1.
METODO DE KLASON.

Parece ser que el mejor método de aislar y cuantificar el porcentaje de lignina aparente es el de KLASON ya que este es un tratamiento con ácido sulfúrico el cual consta de:

polisacarido ——HIDROLIZA——→ a ——→ azucares solubles en agua
a ——→ lignina se recupera como solidos insolubles

Es una medición de la lignina como la fracción insoluble acida de muestras lignocelulosicas sujetas a la hidrolisis por un acido fuerte [26]

PROCEDIMIENTO.

- Transferir la muestra a analizar a un matraz erlenmeyer de capacidad suficiente con una exactitud de 0.1 mg.
- Se añade 1 ml de H_2SO_4 al 72 % (1 ml de ácido por cada 100 mg de muestra) a 30 C mas menos 5 C por una hora con un continúo movimiento
- Después de una hora exactamente el eluido es transferido cuantitativamente a un matraz erlenmeyer de 125 ml. usando 28 ml. de agua por cada ml de ácido
- La hidrolisis secundaria se da en un autoclave a 120 C por una hora
- La solución caliente es filtrada a través de un filtro tared gooch y el residuo de lignina de klason es lavado con agua caliente para remover el ácido
- Las muestras son secadas a peso constante a 105 C con una precisión en la pesada de 0.1 mg.
- La lignina es expresada como un porcentaje de la muestra original conforme la siguiente formula,

$$\% \text{ de lignina aparente} = \frac{\text{peso de lignina}}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

ANEXO 2.

METODO SOMOGY - NELSON.

Los carbohidratos contenidos de los residuos lignocelulosicos son determinados por la medición de los azúcares reductores contendidos de los filtrados de klason usando una modificación al procedimiento de Somogy-Nelson. Los filtrados de klason retenidos de los ensayos contiene los monosacridos compuestos de azúcar producidos por la hidrolisis ácida de los polisacarido originalmente presentes en las muestras a analizar.(26)

Siendo este el método a utilizar.

PROCEDIMIENTO.

- Para neutralizar cada solución emplear 18 o más ml de NaOH al 2N.
- Tomar 1 ml. del filtrado neutralizado el cual es transferido a un tubo de ensaye de 150 mm. de longitua y 15 mm de diamétro y se le colocan 3 ml. de la **solución C*** posteriormente se le coloca una canica en la boca del tubo y se coloca en un baño de agua hirviendo por una hora.
- Terminado el tiempo se enfria a 4 C.
- Se le adicionan 3 ml. del reactivo de **NELSON**** y se homogeniza perfectamente.
- Se le adicionan posteriormente 10 ml. de agua y se homogeniza.
- Se determina la densidad optica a 500 nm.
- La cantidad de azúcares son determinados usando una curva estandar de glucosa siguiendo el procedimiento anterior.

*** SOLUCIÓN C.**

Es preparada mezclando 4 partres de la solución A y 1 parte de la solución B.

La solución A contiene:

180 gr. de $Na_2 SO_4$

15 gr. de Sal de Rochelle

30 gr. de $Na_2 CO_3$

20 gr de $NaHCO_3$

La solución B contiene:

180 gr. de $Na_2 SO_4$

20 gr de $CuSO_4 .5H_2O$

Las soluciones anteriores para un litro de agua cada una.

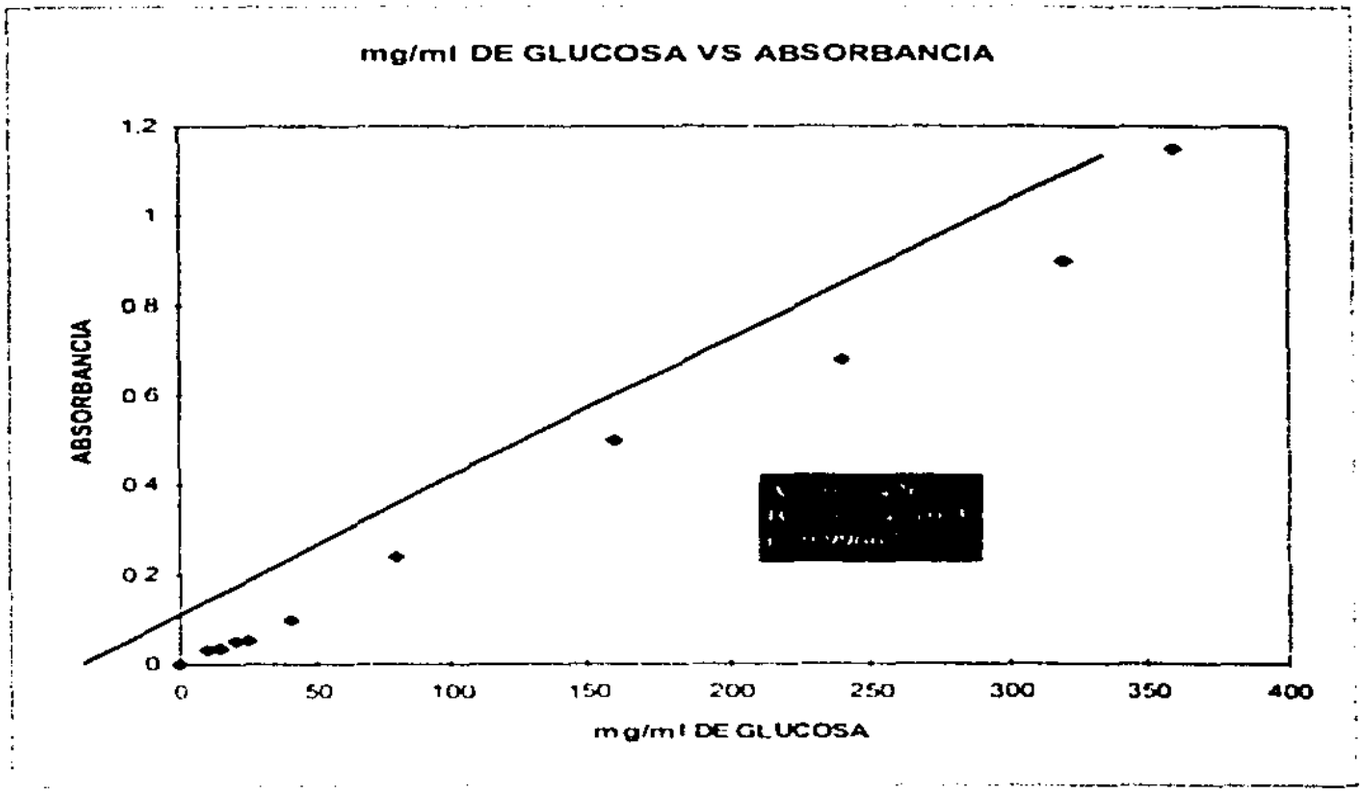
**REACTIVO DE NELSON.

50 gr. de $(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} .4H_2O$ en 42 ml. de H_2SO_4 concentrado y estos se añaden a 900 ml. de agua. En 50 ml. de agua se añaden 6 gr. de $Na_2 HAsO_4.7H_2O$ y se mezcla con el volumón anterior y se afora a un litro. Posteriormente incubar el reactivo nelson a 37 C por 24 - 48 horas para su posterior uso.

Datos obtenidos para la construcción de la gráfica estandar de glucosa siguiendo los pasos anteriores.

MUESTRA	GLUCOSA mg/ml	ABSORBANCIA
1	0	0.0
2	10	0.03
3	15	0.035
4	20	0.05
5	25	0.056
6	40	0.1
7	80	0.24
8	160	0.5
9	240	0.68
10	320	0.9
11	360	1.15

Con los datos anteriores se construyó la siguiente gráfica,



GRAFICA 4. Curva estandar de glucosa.

GLOSARIO.

Basidiocarpo. Cuerpo fructífero de los hongos del grupo de los Basidiomicetos.

Basidiomiceto. Grupo de hongos caracterizados por producir sus esporar sobre estructuras microscópicas llamadas basidios.

Basidiospora. Espora de basidiomiceto producida por un proceso sexual; espora de la etapa perfecta.

Botón. Hongo inmaduro antes de la expansión del pileo o sombrero.

Carne del hongo. Término usado para designar la parte interna del cuerpo del hongo. Equivale técnicamente al llamdo contexto de la parte interna del hongo. Puede ser blando, compacto, gelatinoso, leñoso, correoso, etc.

Composta. Es la fermentación que se lleva acabo del conjunto de los materiales orgánicos por la flora misma o por la presencia de otros organismos.

Conidia. Espora asexual de los hongos que no está dentro de un esporangio Se produce sola o en cadena.

Cuerpo fructífero o carpóforo. Se llama asi al cuerpo reproductor del hongo, el cual nace de la masa algodonosa o micelio, que crece en el suelo o sustrato. Equivale al llamado hongo que se colecta del campo.

Espora. Constituye la semilla de los hongos. Son corpúsculos sumamente pequeños, visibles solamente al microscopio.

Esporada. Depósito de esporas del hongo sobre una hoja de papel. Es muy útil tener esporadas de los hongos, para conocer el color de las esporas en masa.

Estructura. Se le llama así a cualquier parte u órgano del hongo. Sombrero, láminas, pie, anillo, copa del pie, etc., son estructuras del cuerpo fructífero de los hongos.

Fase vegetativa. Dícese del crecimiento, tejidos o procesos relativos al mantenimiento del cuerpo vegetal, en contraste con los tejidos o actividades implicados en la reproducción sexual.

Himenio. Superficie fértil del hongo. Corresponde a la parte del cuerpo fructífero o reproductor de un hongo que produce las esporas. Es la parte de abajo del sombrero de un *Pleurotus ostreatus*.

Lámina. Estructuras delgadas a manera de hojas, que se desarrollan debajo del sombrero de algunos hongos. Las láminas forman las esporas del hongo. El color y posición de las láminas respecto al pie es muy importante en la identificación de los hongos.

Micelio. Conjunto de filamentos del hongo que crecen en el suelo, madera o estiércol y producen los cuerpos fructíferos. Generalmente el micelio es blanco, rara vez amarillo o verde. el micelio representa el verdadero hongo. Lo que se colecta en el campo o bosque y se le llama hongo, es en realidad un cuerpo reproductos o fructífero del hongo.

Pie. Parte que sostiene al sombrero de los hongos. Suele llamársele estípite. Generalemente el central o cilíndrico, aunque también puede ser excéntrico o lateral, largo o corto y bulboso y sencillo.

Saprofito. Organismo que obtiene su alimento de la materia orgánica muerta.

Simbiosis. Asociación de dos individuos para vivir juntos en colaboración mutua. La asociación de los filamentos de los hongos (micelio) con las raíces de los árboles (pinos y encinos) es una simbiosis.

Sombrero. Parte superior del cuerpo del hongo. Generalmente debajo del sombrero se desarrollan las láminas, poros, dientes, venas, etc.; es en este lugar donde se forman las esporas que reproducen al hongo. Al sombrero se le llama técnicamente pileo.

Sustrato. Lugar donde crece el hongo. Ejemplo, tierra, mantillo, madera, estiércol, etc.

BIBLIOGRAFIA.

1. Asther Marcel, Bellon - Fontaine Marie - Noelle, Capdevila Cecile and Corieu Georges, 1990, *A thermodynamic model to predict Phenerochaete chysosporium INA - 12 adhesion to varios solid carriers in relation to lignin peroxidase production,* Biotechnology and Bioengineering, 35, 447 - 482.

2. Bresinsky A., Fischer M., Meixer B. and Paulus W., 1987, *Speciation in Pleurotus ostreatus* , Mycologia, 79 (2), 234 - 245.

3. Chang Philip Sho-ting, Miles G., *Edible Mushrooms and their Cultivation*, edit. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, 1982, 265 - 275.

4. Crawford Don L., 1980, *Microbial degradation of lignin,* Enzyme Microb Technol., 2, 11- 22.

5. Donnison A.M., 1989, *Brockelsby C.M., Morgan H.W. and Daniel R.M., The degradation of lignocellulosics by extremely thermofilic microorganisms,* Biotechnology and Bioengineering, 33, 1495 -1499.

6. Eger G. , Chang S.T., Hayes W.A., *Edible mushrooms*, Academic Press, New york San francisco, 1980, 497 - 518.

7. Gúzman Gastón, *Identificación de los hongos comestibles , venenosos y alucinantes,* Limusa, México, 1990, 412 - 431.

8. Gúzman Huerta Gastón, *Hongos identificacion*, Limusa, México, 1978, 110.

9. Hall L.Philip, 1990, *Enzymatic transformations of lignin : 2*, Enzyme Microb. Technol., 2, 170 - 175.

10.Harvey P.J., Fuller K.W., and Gallon J.R., 1985, *Plant products and the new techonology*, Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 26, 249 - 265.

11.Herrera Teofilo, Ulloa Miguel, *El reino de los hongos, Biologia básica aplicada*, UNAM, Fondo de Cultura Economica, México, 1990, 443 - 460.

12.Kamra D.N. and Zadrazil F., 1986, *Influence of gaseous phase, light and substrate preteatment on fruit-body formation, lignin degradation and in vitro degestibility of wheat straw fermented with Pleurotus spp.*, Agricultural wastes, 18, 1 - 17.

13.Kaneshiro T., 1980, *Lignocellulosic agricultural wastes degraded by Pleurotus ostreatus*, Dev. in Microbiol. , 18, 591 - 598.

14.Kay Eric and Vilgalys Rytas, 1992, *Spatial distribution genetic relationship among individuals in a natural population of the oyster mushroom Pleurotus ostreatus*, Mycologia, 84 (2), 173 - 182.

15.Kirk Kent T., R. Burgues Richard and Koning W. John, *Use of fungi in pulping wood: an overview of biopulping research, Frontiers in industrial mycology*, Leatham Gary F., Gran Bretaña, 1992, 99 - 111.

16.Lamar t. Richard, Glaser A. John and Kirk Kent, *White rot fungi in the treatment of hazardous chemicals and wastes, Frontiers in industrial mycology*, Leatham Gary F., Gran Bretaña, 1992, 127 - 143.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

17.Leonard Thomas J. and Volk J. Thomas, *Production of specialty mushrooms in North America: Shiitake and Morels, Frontiers in industrial mycology,* Leatham Gary F., Gran Bretaña, 1992, 1 - 23.

18.Lindenfelser R.W., Detroy J M. and Worden R. A., 1987, *Biological modification of the lignin and cellulosics component of wheat straw by Pleurotus ostreatus,* Dev. in Microbiol., 51, 541 - 552.

19.López Ramirez Armando, *Como elaborar " Micelio activado " para cultivo doméstico y semi-industrial de hongos comestibles,* Universidad Veracruzana, Veracruz, 1993, 9 - 48.

20.Martínez Carrera Daniel, Leben Rodolfo, Morales Porfirio, Sobal Mercedes y Larque-Saavedra Alfonso, *Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México,* Ciencia y Desarrollo, XVI (96), 33 - 43.

21.Martínez Carrera Daniel y Larque-Saavedra Alfonso, *Biotecnologia en la producción de hongos comestibles,* Ciencia y Desarrollo, XVI (96), 53 - 64.

22.Plantt W. Mark, Hadar Yitzhak y Chet Ilan, 1984, *Fungal activities involved in lignocellulose degradation by Pleurotus ostreatus,* Applied Microbiology and Biotechnology, 20, 150 - 154.

23.Quintero Ramiréz, Leal Lara Hermilo, *Prospectiva de la biotecnologia en México,* CONACYT, México, 1980, 93 - 113, 220 - 233.

24.Reid D. Ian y Paice G. Michael, *Biological bleaching of kraft paper pulp, Frontiers in industrial mycology,* Leatham Gary F., Gran Bretaña, 1992, 112 - 125.

25.Shajahan Beg, Saeed Iqbal Zafar y F.H. Shah, 1986, *Rice husk biodegradation by Pleurotus ostreatus to produce a ruminant feed*, Agricultural Wastes, 17, 15 - 21.

26.Sidney P. Colowick and Nathan D. Kaplan, *Methods in enzymology, Vol. 161 Biomass Part. B, Lignin, Pectin and Chitin*, Willis A. Wood, Scott T Kellogg, Academic Press INC, 1988, 249 - 281.

27.Statements Paul y Chilton J S., *The mushrooms cultivator A Practical guide to growing mushrooms at home*, Agarikon Press, Olympia Washinton, 1983, 23 - 69.

28.Steineck, Hellmont, *Cultivo comercial del champiñon*, Acribia, Zaragoza España, 1987, 20 - 35.

29.Streeter C.L., Conway K.E. y Horn G.W., 1981, *Effect of Pleurotus ostreatus and Erwinia caratovora on wheat straw digestibility*, Mycologia, 73, 1041 - 1048.

30.Tanaka Mitsuo y Matsuno Ryuchi, 1985, *Conversion of lignocellulosic materials to single-cell protein (SCP): recent developments and problems*, Enzyme Microb. Technol., 7, 197 - 206.

31.Tanesaka Eiji, Masuda Hiroshi and Kinuguawa Kenjiro, 1993, *Wood degrading ability of basidiomycetes that are wood decomposers, litter descomposers or mycorrhizar symbionts*, Mycologia, 85 (3), 347 - 354.

32.Vallander Lars, 1991, *Enzymic hidrolysis of lignocellulosic material : 1. Models for the hidrolysis process- A theorical study*, Biotecnology and bioenngineering, 38, 135 - 138.

33.Viniegra G. y Monrroy H.O. , *Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos*, AGT, México, 1990, 157 - 174.

34.Wicklow D.T., Detriy R.W. y Adams S., 1980, *Diferential modification of the lignin and cellulose components of ruminant dung: ecological implications*, Mycologia, 72, 1065 - 1076.

35.Wilson Carl. L., Loomis Walter E., *Botánica*, Limusa, México, 1992, 135 - 145.

36.Wood D.A., 1985, *Useful biodegradation of lignocellulose*, Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur., 26, 295 - 309.

37.Zadrazil F., *Cultivation of Pleurotus, The biology and Cultivation of edible mushrooms*. Academic Press, 1980, 521 - 557.

38.Zare-Maivan H. y Sheares C.A., 1988, *Extracellular enzyme production and cell degradation by freshwater lignocolous fungi*, Mycologia, 80(3), 365 - 375.

39.INEGI, *El sector alimentario en México*, CONAL, 1996, 51 - 64.

40.INEGI, *Agenda estadística* 1994, Estados Unidos Mexicanos, 58 - 63.