

00567

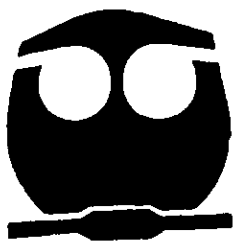
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCION
DE CELULASAS Y ACTIVIDAD CELULOLITICA
DE MUTANTES DE *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.)
Kummer.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICA
(QUIMICA DE ALIMENTOS)
P R E S E N T A ;
Q. F. B. BEATRIZ MONICA PEREZ IBARRA



MEXICO, D.F.

272365

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

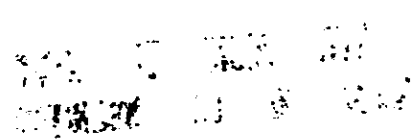


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hermilo Leal Lara darme la oportunidad de realizar el presente trabajo, así como por su ayuda y comprensión.

Al M en C. Rebeca Ramírez Carrillo por su amistad y apoyo.

Al comité revisor por sus valiosas aportaciones.

A mis compañeros por su apoyo y amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que recibí para la realización del presente trabajo.

Dedicatorias

A mis Padres con cariño Francisco Pérez Ruíz y Josefa Ibarra Corona por darme la vida, por sembrar en mi los valores humanos que ahora son mi fortaleza y orgullo.

A Ti Carlos Jesús Román Moreno por todo el amor, apoyo y respeto que me has brindado en los momentos más difíciles de mi vida. Gracias por compartir tú vida con la mía.

A mis hermanos Susana Pérez Ibarra, Francisco Pérez Ibarra y Javier Pérez Ibarra por su cariño y apoyo.

A mis sobrinos con cariño.

Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una persona, aunque estuviera toda ella dedicada al cielo, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta... Por lo tanto este conocimiento sólo se podrá desarrollar a lo largo de sucesivas edades. Llegará una época en la que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoráramos cosas que para ellos son tan claras... Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar... La naturaleza no revela sus misterios de una vez para siempre.

Séneca, Cuestiones naturales.

Libro 7

Siglo I.

CONTENIDO

RESUMEN

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS Y SU APROVECHAMIENTO	1
1.2	LA DEGRADACIÓN DE LIGNOCELULOSA POR LOS HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA	4
1.3	IMPORTANCIA DE <i>Pleurotus ostreatus</i> EN LOS PROCESOS DE BIODELIGNIFICACIÓN	9
2.	OBJETIVO GENERAL	12
	OBJETIVOS ESPECIFICOS	
	HIPÓTESIS	
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.	CEPAS FUNGICAS	13
3.1.1.	CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i>	13
3.2.	MEDIOS DE CULTIVO	13
3.2.1.	MEDIO DE AGAR EXTRACTO DE MALTA	13
3.2.2.	MEDIO DE AGAR AGUA	15
3.2.3.	MEDIO DE AGAR PAPEL FILTRO	15
3.2.4.	MEDIO DE CELULOSA MICROCRISTALINA (TIPO WALSETH)	15
3.2.5.	SOLUCIÓN DE SALES	16
3.2.6.	MEDIO LÍQUIDO DE CELULOSA MICROCRISTALINA TIPO WALSETH TEÑIDA CON AZUL BRILLANTE DE REMAZOL	16
3.2.7.	MEDIOS PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS	17
3.3.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE CEPAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i>	17

3.3.1.	MÉTODO CUANTITATIVO EN PLACAS DE AGAR	17
3.3.1.1.	Preparación de placas	18
3.3.1.2.	Determinación de actividad de celulasas de <i>Aspergillus niger</i>	18
3.3.1.3.	Determinación de la actividad celulolítica en el sobrenadante de los medios de cultivo con micelio	18
3.3.2.	CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR LIBERACIÓN DE COLOR	19
3.3.3.	EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE CELULOSA EN MEDIO SÓLIDO	20
3.3.4.	OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS POR CEPAS SILVESTRES Y ACELULOLÍTICAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i>	21
3.3.4.1.	Preparación del inóculo	21
3.3.4.2.	Optimización de los componentes del medio para inducir la producción de celulasa basado en el Método estadístico de Box Wilson	21
3.3.4.3.	Determinación de la actividad celulolítica por el método de Mandels (1976)	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1.	FORMACIÓN DE HALOS DE CLARIDAD EN PLACAS DE CRISTAL CON AGAR CELULOSA	23
4.2.	LIBERACIÓN DE COLOR EN MEDIO LÍQUIDO CON CELULOSA TEÑIDA	29
4.2.1.	POR CELULASAS DE <i>Aspergillus niger</i>	29
4.2.2.	POR CEPAS SILVESTRES DE <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
4.3.	CUANTIFICACIÓN DEL CONSUMO DE CELULOSA Y DEL CRECIMIENTO MICELIAL EN MEDIO SÓLIDO	35
4.4.	EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS POR CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES ACELULOLÍTICAS DE <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
5.	CONCLUSIONES	67
	RECOMENDACIONES	69
	BIBLIOGRAFÍA	70

RESUMEN

Para el desarrollo de un proceso de biodelignificación selectiva, resulta indispensable contar con un método preciso, sencillo y confiable que permita identificar cepas acelulolíticas capaces de producir una degradación selectiva de lignina. En el presente trabajo se evaluaron distintas alternativas. Una de estas consistió en la detección de halos celulolíticos en placas de agar con celulosa teñida, en donde sólo se observaron halos claros al emplear enzima celulolíticas de *A. niger*. Éstos dependían de la concentración de enzima, del tiempo de incubación y de la concentración de celulosa. En una etapa posterior se evaluó la actividad celulolítica mediante la liberación de color en un medio líquido con celulosa teñida. Con 3 cepas silvestres se observaron muy bajos consumos (2 a 2.6%). Después se decidió determinar el consumo de celulosa en medios sólidos con agar al 1 y 1.5% empleando diferentes membranas para cuantificar la producción de micelio. Con la cepa P18 se detectó un consumo de 60 y 90% de celulosa al emplear estos medios con películas de celofán, mientras que con películas de polipropileno se registro 12 y 37% respectivamente. La producción de biomasa y el crecimiento micelial fueron mayores con películas de polipropileno. No obstante que esta técnica permite cuantificar la capacidad celulolítica, se presentan ciertas dificultades técnicas que la limitan. Por tal motivo y dado los resultados obtenidos en las placas de celulosa teñida así como los reportes de Coutts (1976) y Huitron (1986), se decidió entonces evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo, sobre la producción de las celulasas. Puesto que se consideró que al modificar la composición del medio, podría variar la respuesta de las cepas. La composición del medio fue optimizada en función del tipo de cepas, ya sea acelulolíticas, C(-), o silvestres, C(+). Se incubaron 8 cepas en estos medios hasta por 3 semanas. A los 8 días de incubación, las cuatro cepas clasificadas previamente como C(-) presentaron, en el medio tipo C(-), una mayor liberación de azúcares reductores que en el medio tipo C(+). Por su parte las cuatro cepas clasificadas como C(+) presentaron una mayor liberación de azúcares en el medio tipo C(+) que en el medio tipo C(-). Para evaluar el efecto de los dos medios optimizados sobre las cepas, se realizó un análisis de varianza de los resultados, encontrándose que no había diferencia significativa entre los medios empleados y las diferentes cepas, lo cual indicó que con cualquiera de los medios optimizados se obtiene la misma respuesta. Por otro lado, el análisis de varianza entre las cepas mostró diferencias altamente significativas, y al realizar las pruebas de rango múltiple según Tukey, las cepas fueron agrupadas en tres clases a, b y c. Estos resultados muestran que es posible, proponer criterios más objetivos de clasificación que permitan diferenciar las cepas acelulolítica de las celulolíticas. Las cepas agrupadas en (a) presentan

niveles de producción de azúcares reductores bajos (0.4-0.8 mg/ml) se consideran de baja actividad celulolítica. Las cepas agrupadas en (b) presentan niveles de producción de azúcares reductores de 0.8-1.6 mg/ml considerándose de actividad celulolítica intermedia. Finalmente, las cepas agrupadas en (c) presentan niveles de producción de azúcares reductores altos (1.6-3.0 mg/ml), por lo que se consideran de alta actividad celulolítica. Las cepas clasificadas como de baja actividad serán las más adecuadas para un proceso de mejoramiento genético y para su posterior aplicación directa, cultivándolas en substratos lignocelulósicos.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS Y SU APROVECHAMIENTO

Los materiales lignocelulósicos representan los residuos sólidos de mayor importancia, ya que se generan por medio de la fotosíntesis, estimándose una producción mundial de $2 \times 10^{11} - 10^{12}$ Ton/año (Youn *et al.* 1995) En la mayor parte de los cultivos, en promedio la mitad de la biomasa total producida permanece desaprovechada y acumulándose cantidades considerables de desperdicios vegetales. Debido a que los procesos de biodegradación natural no funcionan a la misma velocidad con que son producidos dichos desperdicios, éstos se acumulan llegando, inclusive, a convertirse en un peligro para el equilibrio ecológico.

La crisis del petróleo en los años setenta despertó el interés en el uso de los recursos naturales renovables, como una fuente alternativa de energía. Por otra parte, el surgimiento concomitante de la biotecnología impulsó el interés en el aprovechamiento del material lignocelulolítico proveniente de las poblaciones, de la agricultura y de los bosques para este propósito. Sin embargo, el entusiasmo con que se iniciaron varios proyectos de investigación decayó poco a poco, debido a que la aplicación tecnológica de estos materiales era difícil y su comercialización no había progresado con la rapidez que se desearía, ya que se tenían escasos conocimientos de los mecanismos básicos de la degradación de la madera, otros lignocelulósicos y sus componentes individuales, aunado a esto, la crisis del petróleo fue pasajera. No obstante, los esfuerzos realizados hasta la fecha, no han sido en vano, pues ahora se dispone de una información básica esencial para el aprovechamiento exitoso de la conversión biotecnológica del material lignocelulósico (Eriksson, 1993).

Los materiales lignocelulósicos están constituidos esencialmente por celulosa (35-60%), hemicelulosa (10-30%) y lignina (4-18%), representando los polisacáridos en conjunto casi el 80% del peso total de los mismos. Por ello los residuos lignocelulósicos son una fuente potencial de carbohidratos de bajo costo, que es renovable y puede ser susceptible de ser transformada en alimento para el hombre y los animales. En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones encaminadas a lograr un aprovechamiento de los desperdicios lignocelulósicos, haciendo uso de métodos físicos, químicos o microbiológicos. Los resultados han confirmado que el principal obstáculo que limita el aprovechamiento de la celulosa y los otros polisacáridos presentes en los desperdicios lignocelulósicos es la íntima asociación de éstos con la lignina.

La lignina es un polímero estructural de las plantas vasculares que está formada por unidades de fenil propano, que por su estructura le confiere a las plantas rigidez y unión entre sus células. De acuerdo a Sarkanen y Ludwig (1971), la lignina es un polímero de estructura muy ramificada e irregular, formada por la polimerización aleatoria de tres precursores primarios: los alcoholes trans-para-cumárico, trans-coniferílico y trans-sinápico. Sin embargo recientes observaciones, han dado indicaciones que la estructura de la lignina en las paredes celulares de plantas superiores no es amorfa. Los resultados sugieren un mecanismo, por el cual los polisacáridos de la pared celular pueden influir en la estructura de la lignina (Houtman, 1995).

La principal función de la lignina es proteger a los polisacáridos vegetales contra el ataque microbiano, dejando sólo una pequeña parte de ellos susceptible a la degradación química o biológica. Se sabe que la mayoría de los microorganismos con capacidad para degradar polisacáridos son incapaces de atacar los tejidos vegetales fibrosos a menos que posean cierta actividad ligninolítica (Kirk y Moore, 1972). Sólo un pequeño grupo de hongos puede degradar preferentemente la lignina. El basidiomiceto más estudiado es *Phanerochaete chrysosporium* (Gold *et al.* 1989; Schoemaker and Leisola 1990; Moyson *et al.* 1991). Otro hongo superior es *Pleurotus spp.* (Gujral *et al.* 1987) *Lentinus edodes* (Dare *et al.* 1988) y *Coriolus vesicolor* (Kirkpatrick *et al.* 1989).

La asociación de la lignina con la celulosa representa un obstáculo para la utilización directa de los desechos lignocelulósicos en la alimentación animal, pues a pesar de que la celulosa puede servir como fuente energética para los rumiantes (Adamović *et al.* 1998) la lignina limita la utilización de la celulosa como forraje, porque su digestibilidad disminuye conforme aumenta el contenido de lignina (Kirk y Moore, 1972).

Las consideraciones anteriores subrayan la importancia de la lignina, ya que este polímero no sólo representa una fuente importante de carbono, sino que también se encuentra controlando la degradación de una gran cantidad de polisacáridos vegetales. Los estudios realizados utilizando métodos físicos o químicos, solos o en combinación, señalan que es posible disminuir el contenido de lignina de los desperdicios lignocelulósicos causando un aumento en su digestibilidad, pero presentando la desventaja de no ser económicos debido al excesivo gasto de agua para los lavados, así como la contaminación y el alto consumo de energía (Blazej y Kosik, 1993). Además, su aplicación a escala industrial requiere de plantas con tecnología sumamente

complicada y costosa, razón por la cual, ninguno de estos procesos se ha implantado a nivel industrial (Fan, 1977).

A pesar de la importancia que presenta la biodegradación de la lignina en el reciclaje del carbono orgánico y la utilización de desperdicios vegetales, su estudio ha sido relativamente descuidado hasta fechas recientes, debido en parte a la complicada naturaleza química de la lignina, el reducido número de microorganismos capaces de atacar a la lignina y la lentitud con que se lleva a cabo su biodegradación (Eriksson, 1990). En los últimos años se ha empezado a producir información sobre el tipo de organismos capaces de degradar la lignina y algunos de los factores que controlan este proceso en la naturaleza. Se ha encontrado que únicamente ciertos hongos pueden atacar material lignocelulósico. Clasificándoseles dentro de tres categorías, en función de los cambios físicos causados a la madera, como consecuencia a la acción enzimática de dichos organismos: hongos de pudrición blanca, pudrición oscura o café y blanda.

Los hongos de pudrición blanda son activos sólo en la madera con alto contenido de agua, degradan celulosa y hemicelulosa pero no lignina. La pudrición es limitada y está estrechamente relacionada con las hifas, ya que las celulasas no se difunden libremente en la madera, quedando como resultado un desecho blando.

Los hongos de la pudrición oscura o café degradan celulosa y hemicelulosa, causan ligeras alteraciones en la molécula de la lignina, dejando una capa de color café.

Los hongos de pudrición blanca son capaces de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina más o menos en forma simultánea. La madera adquiere una coloración clara durante la descomposición. Dentro de este grupo los basidiomicetos son los más eficientes con relación a su capacidad delignificante (Coughlan *et al.* 1990). No se conoce cómo estos hongos degradan la madera. Sin embargo, estudios bioquímicos han mostrado que un número de hongos de la pudrición blanca excretan enzimas extracelulares las cuales degradan a los polisacáridos. Generalmente, poseen una o más celulasas, una xilanasas, una mananasas, y una pectinasas. En general las celulasas (Reese, 1963) y mananasas (Reese y Shibata, 1965) son enzimas inducibles.

Las xilanasas parecen ser en gran parte constitutivas (Reese y Mandels, 1963), pero hay varios ejemplos de xilanasas inducibles (King, 1966, Sorensen, 1952 y Varadi, 1972)

1.2 LA DEGRADACIÓN DE LIGNOCELULOSA POR LOS HONGOS DE LA PUDRICIÓN BLANCA

Los hongos de la pudrición blanca tienen en común la capacidad para degradar lignina así como a los polisacáridos de la madera. La cantidad de lignina y celulosa degradada y su utilización por esos hongos varía, de acuerdo con su preferencia de ataque (Eriksson, 1981a). Sin embargo, la degradación de la lignina ocurre durante el metabolismo secundario (Kirk, 1978; Keyser, 1978), mientras la celulosa y hemicelulosa son degradados durante el metabolismo primario. En los hongos filamentosos, la primera fase de crecimiento se ve limitada por la falta de nutrientes esenciales tales como nitrógeno, carbono, sulfatos o fosfatos en el medio.

Sporotrichum pulverulentum (*Phanerochaete chrysosporium*) es un hongo de pudrición blanca cuyo mecanismo de degradación de celulosa ha sido el más estudiado (Figura 1). Este hongo tiene un crecimiento óptimo alrededor de 38-39 °C. La composición del medio y las condiciones para la producción de celulasas fueron reportadas por Eriksson y Pettersson (1975 a). Dicho hongo degrada la celulosa con el patrón usual de enzimas hidrolíticas y produce las siguientes enzimas.

- a) Cinco endo-1,4- β -glucanasas (Eriksson y Pettersson, 1975 a) que atacan las cadenas de celulosa al azar rompiendo el enlace β (1-4) glucosídico.
- b) Una exo-1,4- β -glucanasas (Eriksson y Pettersson, 1975 b) que actúa desde la parte final no reductora de la celulosa dividiendo en celobiosa o glucosa.
- c) Dos 1,4- β -glucosidasas (Deshpande, 1978) que hidroliza celobiosa y otras celodextrinas solubles en agua hasta glucosa.

Todas las enzimas fueron purificadas y caracterizadas en sus propiedades fisicoquímicas (Keyser *et al.* 1978; Eriksson y Pettersson, 1975 a, b) y funcionales (Deshpande *et al.* 1978). La acción sinérgica entre las endoglucanasas y las exoglucanasas fue investigada con algunos detalles (Streamer *et al.* 1975). Una fuerte respuesta sinérgica entre las cinco endoglucanasas y la exoglucanasas fue observada cuando esas enzimas degradaron algodón y Avicel. Sin embargo al emplear celulosa Walseth (una celulosa ácido-hinchada) no se observó sinérgismo.

Las endoglucanasas presentaron variación en su preferencia al sustrato. La diferencia más sorprendente entre ellas fue, su actividad de transglicosilación (Streamer *et al.* 1975). Las exoglucanasas liberan sus productos, glucosa y celobiosa en la configuración α (Streamer *et al.*

1975). En contraste a las endoglucanasas, cuatro de las cuales eran glicoproteínas, las exoglucanasas no contienen carbohidratos. El peso molecular de las exoglucanasas es más alto que los pesos moleculares de las endoglucanasas, alrededor de 50,000 comparada a 30,000-35,000. Las dos β glucosidasas tienen pesos moleculares mucho más altos (165,000 y 182.000) (Deshpande *et al.* 1978) que las endo y exoglucanasas.

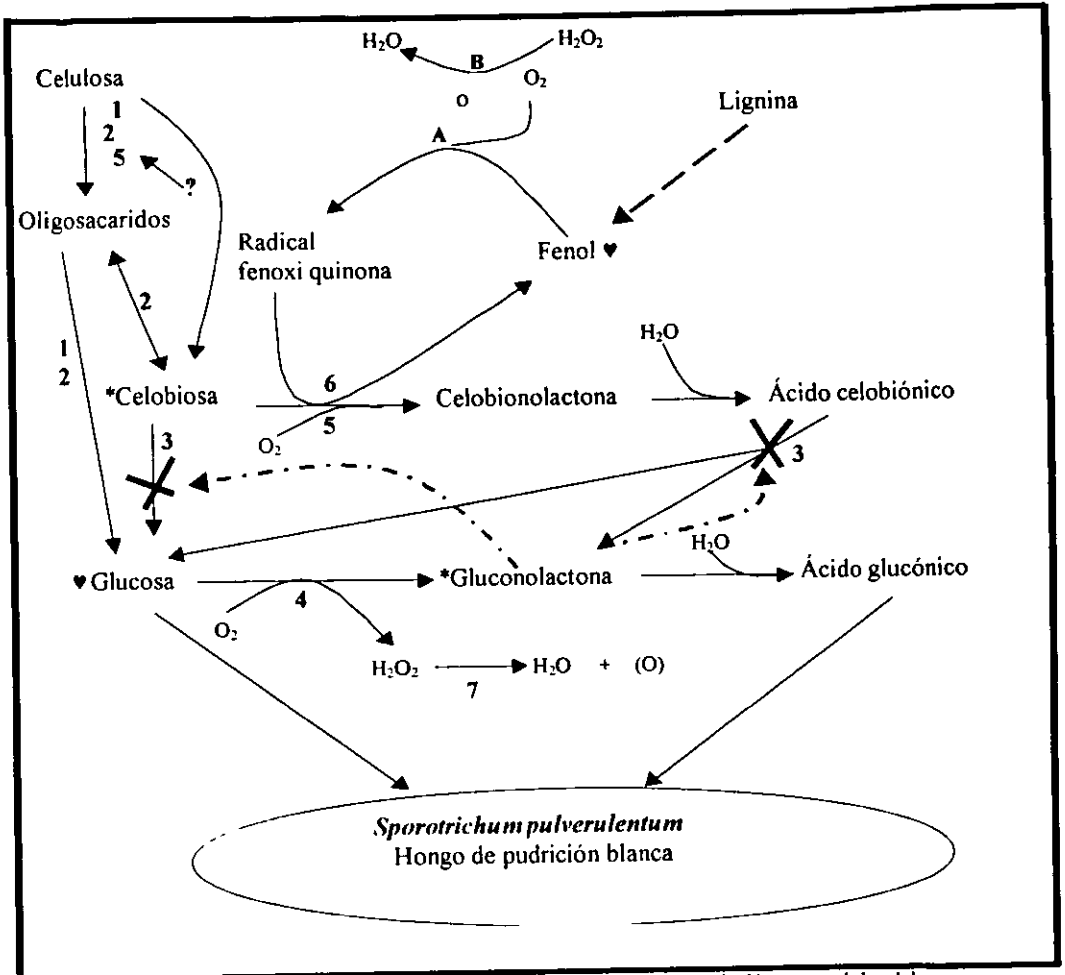


Figura 1. Mecanismos enzimáticos para degradación de celulosa y regulación extracelular del proceso en *Sporotrichum pulverulentum*.

Enzimas involucradas en la degradación de celulosa	
1 endo-1,4-β-glicanasas	5 celobio oxidasa
2 exo-1,4-β-glicanasas	6 celobiosa:quinona oxidoreductasa
3 1,4-β-glicosidasas:	7 catalasa
4 glucosa oxidasas	
Enzimas involucradas en la degradación de la lignina	
A lacasa	B peroxidasa
* Denota productos regulando actividad enzimática:	
Inhibidores gluconolactona 3	Celobiosa incrementa transglicosilaciones
♥ Denota productos regulando síntesis enzimática:	
Glucosa	ácido glucónico → represión catabólica
	fenoles → represión de glicanasas

Ayers *et al.*, (1978) descubrió en *S. pulverulentum* una enzima oxidativa de importancia en la degradación de celulosa. La enzima fue purificada y caracterizada, encontrándose ser una celobiosa oxidasa que oxida celobiosa a su correspondiente ácido iónico, usando oxígeno molecular. La enzima es una hemoproteína y contiene un grupo FAD. No se conoce todavía como esta enzima también oxida el grupo reductor final formado cuando el enlace glucosídico β (1-4) se rompe, por la acción de las endoglucanasas. Por otro lado Vaheri (1982 a) al trabajar con *T. reesei* indicó que dicho organismo también produce una enzima oxidativa involucrada en la degradación de la celulosa y que en el cultivo con celulosa encontró ácido glucónico y ácido celobiónico.

El hongo *S. pulverulentum* tiene dos vías para oxidar celobiosa. La primera es por medio de la enzima celobiosa oxidasa, mientras que la segunda involucra la enzima celobiosa : quinona oxido reductasas (celobiosa dehidrogenasa) (Westermarck y Eriksson, 1974 a, b). La última enzima que reduce quinonas y radicales fenoxi en presencia de celobiosa es de importancia en la degradación, tanto de celulosa como lignina. El modelo de reacción se muestra en la **Figura 2** (Westermarck y Eriksson, 1974 b). La enzima celobiosa dehidrogenasa se ha estudiado en muchos laboratorios y se ha demostrado su presencia en todos los hongos de la pudrición blanca (Ander y Eriksson, 1977; Kellerher, 1981; Hüttermann y Noelle, 1982).

Dos proteasas ácidas proteasa I y proteasa II provenientes de los cultivos de *S. pulverulentum* fueron purificadas y parcialmente caracterizadas por Eriksson y Pettersson (1982). Estas proteasas han demostrado ser de importancia para la degradación de celulosa por los hongos, ya que las proteasas incrementan la actividad de las endoglucanasas. Si un cultivo de *S. pulverulentum* crecido sobre celulosa es tratado con las proteasas individual o una mezcla de ambas proteasas, la actividad de endoglucanasas se incrementa en la solución. El tratamiento con ambas proteasas produce incrementos de diez veces en la actividad de las endoglucanasas. Una posible explicación es que las endoglucanasas son activadas a través de las proteasas o que las proteasas destruyen un inhibidor de endoglucanasas (Eriksson y Pettersson, 1982).

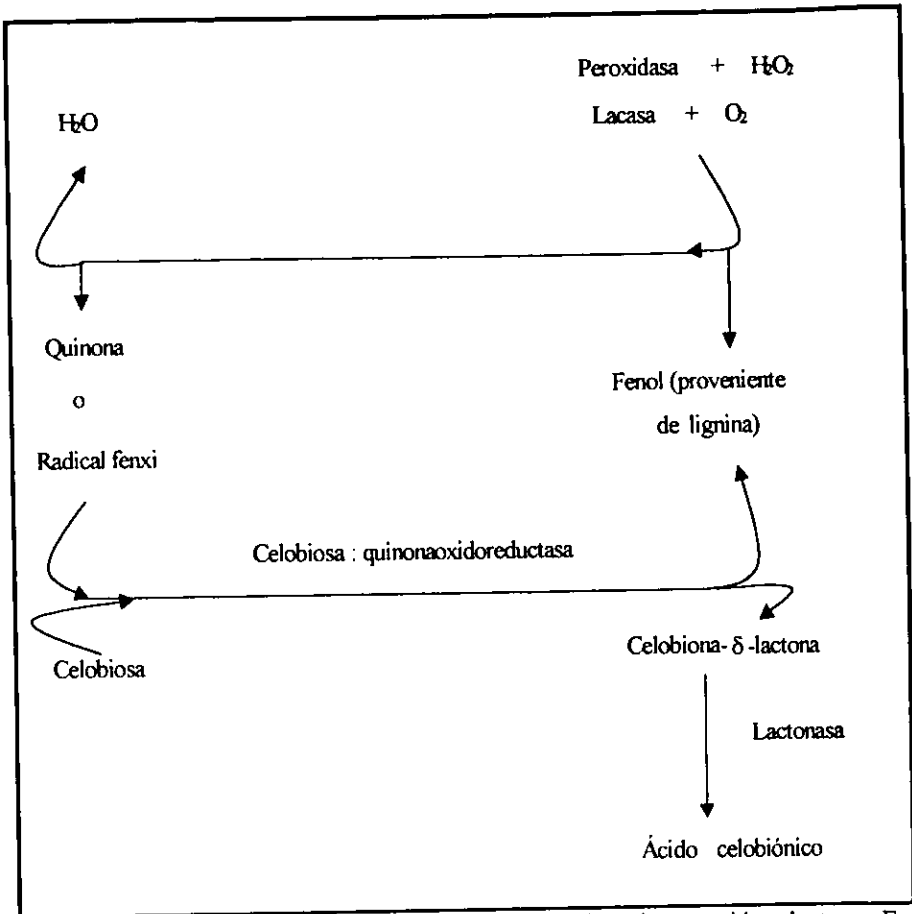


Figura. 2. Mecanismo de reacción de la enzima celobio:quinona oxidoreductasa. Enzima de importancia para la degradación de celulosa y lignina (Westermarck y Eriksson (1974)).

1.3 IMPORTANCIA DE *Pleurotus ostreatus* EN LOS PROCESOS DE BIODELIGNIFICACIÓN

Phanaerochaete chrysosporium es uno de los hongos de pudrición blanca que ha sido estudiado más ampliamente. Se caracteriza por presentar un crecimiento micelial muy vigoroso, pero al comparar su capacidad para degradar la lignocelulosa con *Pleurotus ostreatus* se encontró que a pesar de tener un crecimiento más lento, este último produjo una degradación mucho más selectiva de la lignina (Kerem *et al.* 1992). En efecto, los resultados de dicho estudio confirman que dentro de los distintos hongos clasificados como de pudrición blanca, cada uno de ellos presenta complejos enzimáticos diferentes, así como una cierta actividad bioquímica específica que les permite degradar de una manera muy particular a los componentes de la lignocelulosa. Una ventaja adicional de *P. ostreatus* es que produce fructificaciones comestibles. En la naturaleza crece saprofiticamente en la madera, fructificando principalmente sobre troncos de árboles muertos. En la actualidad es cultivado comercialmente sobre distintos sustratos lignocelulósicos, principalmente paja, ocupando el tercer lugar a nivel mundial de acuerdo a su producción. En México sus esporóforos se conocen como "setas", registrándose una producción anual de 2000 toneladas aproximadamente. Por ello, es sumamente interesante el uso de *P. ostreatus* para el procesamiento de los desperdicios lignocelulósicos ya que pueden producirse hongos comestibles para alimentación humana y en forma simultánea un sustrato residual delignificado para alimentación de rumiantes.

Ya con anterioridad se ha investigado la posibilidad de lograr una delignificación selectiva con *P. ostreatus*. Se han utilizado diferentes cepas silvestres, encontrándose que todas ellas, al mismo tiempo que consumen lignina, producen una cierta degradación de los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), razón que ha limitado el desarrollo de un proceso de biodelignificación a nivel comercial. Lo anterior es explicable ya que una cepa silvestre de este hongo no obtendría ninguna ventaja selectiva al presentar una menor capacidad celulolítica. Por ello se considera que la única posibilidad para obtener cepas de *P. ostreatus* con mayor selectividad para consumir lignina es por medio de un programa de hibridación a partir de material mutado genéticamente. De acuerdo a este planteamiento, se han realizado varios estudios para obtener cepas atenuadas en su capacidad para consumir celulosa (cepas acelulolíticas). Esta idea fue probada inicialmente por Eriksson y Goodell (1974), que obtuvieron mutantes acelulolíticos por radiación con luz U.V de esporas del hongo *Polyporus adustus* el

cual, si bien es un hongo de pudrición blanca, no produce fructificaciones. En estos estudios se examinó la regulación de las enzimas celulasas, mananasa y xilanasa cuya inducción esta bajo el control de un gen regulador.

En cuanto a la biología molecular de celulasas fungales se ha tenido importantes avance. *Trichoderma reesei* es otro de los organismos celulósicos más estudiado. Este excreta una gran cantidad de celulasas, las cuales son muy eficientes para solubilizar celulosa microcristalina. Se ha caracterizado en gran detalle tanto fisicoquímicamente y funcionalmente dos endoglucanasas y dos celobiohidrolasas (CBH I y CBH II) de *Trichoderma reesei*. Los correspondientes genes de las dos endoglucanasas y celobiohidrolasas han sido aislados y su completa secuencia nucleotídica determinada (Eriksson *et al*, 1990). Por otro lado, Innis *et al* (1985) lograron expresar el gen de glucoamilasas de *A. awamori* en *S. cerevisiae*.

Otra aplicación potencial a la manipulación genética de hongos es la construcción de levaduras celulolíticas que puedan simultáneamente sacarificar y fermentar celulosa a etanol (Penttila. *et al*, 1984).

Con *P. ostreatus* se han realizado también trabajos para obtener cepas acelulolíticas. Así primeramente de una colección de cepas silvestres se seleccionó una cepa que consume menor cantidad de celulosa (Aguilera *et al*, 1982). A partir de esta cepa se produjeron mutantes acelulolíticos (C-) para obtener cepas atenuadas en su capacidad para consumir celulosa (Avilés, 1988; Ramírez, 1989). Para incrementar el desarrollo vegetativo de las mutantes obtenidas se realizó posteriormente un mejoramiento genético por hibridación con cepas silvestres. De esta manera se ha hecho posible obtener cepas monocarióticas y dicarióticas con carácter acelulolítico (C-) (Ramírez *et al*, 1991; Leal y Ramírez, 1992 y Ramírez *et al*, 1993).

Para la hibridación de cepas acelulolíticas de *P. ostreatus* de aplicación industrial es de suma importancia contar con un método que permita evaluar rápidamente y de manera muy confiable la capacidad celulolítica de una gran cantidad de cepas. Para la caracterización de las mutantes acelulolíticas de *P. ostreatus* (Ramírez, 1989) se utilizaron inicialmente dos métodos cualitativos que al emplearlos de manera complementaria indicaban el carácter acelulolítico. Dichos métodos se diferenciaban uno del otro, en la composición del medio y el tipo de fuente de carbono empleada ya que para un caso se uso carboximetilcelulosa y para el otro se uso papel filtro. Los criterios de clasificación se hicieron con base en la capacidad de formación de halos de claridad por las cepas.

Posteriormente, Camacho (1996) probó la capacidad celulolítica de dichas mutantes en placas de agar con celulosa teñida modificando su composición con el objetivo de desarrollar un método cuantitativo preciso y rápido, que permitiera establecer criterios de clasificación mediante la formación de halos de claridad. Después de una serie de pruebas encontró tres medios donde observó formación de halos. Sin embargo, en el medio que contenía celulosa microcristalina al 0.3% y medio de extracto de malta deproteinado (DPMA) al 1%, la mayoría de las cepas acelulolíticas formaron halo. Mientras que los monocariotes y dicariotes silvestres no presentaron halos Camacho (1996) Estas observaciones no eran consistentes con la clasificación previa de Ramírez (1989), puesto que las cepas silvestres (celulolíticas) deberían de formar un marcado halo de celulólisis. Una posible explicación que se dio a dichos comportamientos fue que, para cepas de rápido desarrollo se dificulta detectar la formación de halos ya que el frente del micelio en crecimiento cubre los halos de celulólisis. No obstante, la detección de un halo bajo estas condiciones indica el desfaseamiento entre el avance del frente micelial y la acción de las celulasas secretadas al medio, más no una medida de la capacidad celulolítica real del organismo. La aplicación de este método al parecer se consideró limitada únicamente a cepas poco vigorosas.

2. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método preciso, sencillo y confiable; que permita la identificación de cepas acelulolíticas con una mayor potencialidad para producir una degradación selectiva de lignina.

Objetivos Específicos

1. Cuantificación de la capacidad celulolítica de cepas de *P. ostreatus* en placas de agar por difusión de las celulasas y cuantificar el consumo de celulosa en medio sólido.
2. Cuantificación de la capacidad celulolítica de cepas de *P. ostreatus* en medio líquido con celulosa teñida.
3. Evaluación del efecto de la composición del medio sobre la producción de celulasas por cepas de *P. ostreatus*.
4. Establecer criterios para la clasificación de las cepas de acuerdo a su capacidad celulolítica.

HIPÓTESIS

Es posible diseñar un método que permita establecer criterios cuantitativos para la clasificación de las cepas de *P. ostreatus* de acuerdo a su capacidad para degradar la celulosa.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS FUNGICAS

3.1.1. CEPAS DE *Pleurotus ostreatus*

De acuerdo a como se indica en la **Tabla 3.1** se utilizaron tres cepas dicarióticas silvestres, (8x3, IAP y PI8) y un total de ocho cepas monocarióticas. Dentro de éstas se encuentran cuatro monocariotes silvestres de tipo celulolítico Mo. 24, Mo. 36, P403 y P404. Los dos últimos corresponden a los dos componentes monocariotes del dicariote silvestre 8x3. Se emplearon también cuatro monocariotes de tipo acelulolítico. Uno de ellos, el 56H1N1 corresponde al mutante acelulolítico obtenido al tratar con N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina a la cepa P403. La cepa PM4 monocariote acelulolítico se obtuvo de la progenie del apareamiento entre la cepa 56H1N1 con el monocariote silvestre Mo. 24, mientras que los monocariotes acelulolíticos PM204 y PM301 se obtuvieron de la progenie del apareamiento entre el mutante acelulolítico 9H4N2 con la cepa silvestre Mo. 36. Las cepas se encuentran depositadas en el cepario del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM. Donde fueron conservadas por resiembras periódicas en medio de agar extracto de malta.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

3.2.1. MEDIO DE AGAR EXTRACTO DE MALTA

Para preparar el medio agar extracto de malta, se colocó en un matraz Erlenmeyer de un litro, 7.5 g de extracto de malta (1.5%) y 10 g de agar (2%). Después se adicionan 500 ml de agua destilada gradualmente, procurando disolver los reactivos. A continuación se tapa el matraz y después de un reposó de 20 minutos, se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio estéril se vacía en cajas petri de plástico de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio, las cajas petri se guardan en bolsas de polietileno hasta su uso para evitar la contaminación y deshidratación del medio.

TABLA 3.1. CEPAS DE *Pleurotus ostreatus* SU ORIGEN Y CAPACIDAD PARA CONSUMIR CELULOSA.

Cepas	Origen	Capacidad para consumir celulosa
8x3	Dicariote silvestre	C +
IAP	Dicariote silvestre	C +
PI8	Dicariote silvestre	C +
Mo. 36	Monocariote silvestre	C +
Mo. 24	Monocariote silvestre	C +
P 403	Componente monocariotico de la cepa 8x3 [nh1]	C +
P 404	Componente monocariotico de la cepa 8x3 [nh4]	C +
56 H ₁ N ₁	Mutante con carácter acelulolítico obtenido del neohaplonte nh1 (8x3) (Ramírez)	C -
PM4	Progenie acelulolítico de 56H1N1x Mo. 24	C -
PM204	Progenie acelulolítico de 9H4N2 x Mo. 36	C -
PM301	Progenie acelulolítico de 9H4N2 x Mo. 36	C -

3.2.2. MEDIO DE AGAR AGUA

En un matraz erlenmeyer de 1 litro se pesaron 10 g de agar y se adicionaron 500 ml de agua potable. Se tapó el matraz y se dejó reposar durante 20 minutos; después fue esterilizado en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. El medio estéril se colocó en cajas petri de plástico de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio, se guardaron en bolsas de polietileno y se incubaron a 28°C para evaluar el proceso de esterilización.

3.2.3. MEDIO DE AGAR PAPEL FILTRO

El papel filtro empleado fue de la marca Whatman que de acuerdo al proveedor contiene 98% de α celulosa grado 17 chr (0.92mm). Se cortaron en cuadros de 0.5 cm de lado, aproximadamente, y se colocaron en un matraz de 25 ml con 10 ml de agua destilada que fue esterilizado a 121°C durante una hora. Posteriormente, los cuadros de papel estéril se colocaron asépticamente en las cajas petri que contenían el medio de agar agua. Una vez colocado el papel, se incubaron, en una estufa a 28°C durante 24 horas para que el exceso de agua del papel sea absorbido por el medio. Al día siguiente, cada caja fue inoculada con cilindros de agar con micelio de 0.5 cm de diámetro, cortados de la periferia de una colonia en crecimiento y colocados sobre cada cuadro de papel filtro.

3.2.4. MEDIO DE CELULOSA MICROCRISTALINA (TIPO Walseth, (1952))

Para la preparación de este medio, se requiere someter a la celulosa microcristalina a un tratamiento ácido para permitir su hidratación. El procedimiento consistió en dejar enfriar en el refrigerador 4 g de celulosa microcristalina (CMC) y 51 ml de ácido fosfórico durante 30 minutos. Posteriormente, en un vaso de precipitado de 100 ml, colocado en un baño de hielo, se adicionó un poco de ácido fosfórico y un poco de CMC, la celulosa se trató de incorporar con la ayuda de un agitador, esta operación se continuó hasta que toda la CMC se disolvió en forma homogénea en el ácido, evitando la formación de grumos. La mezcla homogénea se dejó enfriar durante 30 minutos, a continuación se licuó con 500 ml de agua destilada y se filtró con vacío para eliminar el exceso de ácido. El precipitado obtenido se lavó de igual forma dos veces más y se dejó en 500 ml de una solución de carbonato de sodio al 1% durante 8 horas para neutralizar el exceso de acidez. Al día siguiente, se lavó nuevamente 3 veces más con agua destilada. A

continuación se determinó la humedad del precipitado obtenido y después se adicionó la cantidad necesaria de solución de sales para obtener una suspensión de CMC al porcentaje deseado.

Para preparar el medio agar CMC al 1%, la solución de CMC se ajustó a un pH de 4.5 con ácido clorhídrico y se le adicionó 0.05% de glucosa y 2% de agar. Se dejó reposar durante 20 minutos y se calentó hasta ebullición. Posteriormente se distribuyó 10 ml del medio en tubos de 0.5 cm x 15 cm y se taparon para esterilizarlos a 121°C por 15 minutos. Al enfriarse a cada tubo se le adicionó 50 µl de solución de desoxicolato de sodio al 0.04% y 10 µl de solución de tiamina al 0.01%, soluciones previamente esterilizadas por filtración. Se agitaron los tubos para homogeneizar su contenido y se vació cada tubo sobre las cajas petri.

3.2.5. SOLUCIÓN DE SALES

Para preparar un litro de la solución de sales minerales en 500 ml de agua destilada se disolvieron las siguientes sales en el orden indicado:

Sales minerales	Cantidad (g)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	4.0
K_2HPO_4	0.2
KH_2PO_4	0.8
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0044
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.0050
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.0010
$\text{FeNH}_4 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0.0050
Aparte en 500 ml de agua destilada se disuelve	
CaCl_2	0.0200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.8900

Posteriormente, ambos volúmenes se integraron para tener un volumen total de 1 litro.

3.2.6. MEDIO LÍQUIDO DE CELULOSA MICROCRISTALINA TIPO WALSETH TEÑIDA CON AZUL BRILLANTE DE REMAZOL

La técnica seguida para la tinción de la celulosa, fue una modificación de la utilizada por Poincelot y Day (1972) para determinar actividades enzimáticas utilizando papel filtro como sustrato. Para teñir la celulosa, 0.5 g de azul brillante remazol se disolvieron en 83 ml de agua

destilada a temperatura de ebullición. Esta solución se adicionó a la celulosa tratada por el método Walseth, se licuó durante 2 minutos y se vació en un vaso de precipitado de 500 ml que se mantuvo en ebullición y con agitación. Cada 2 minutos se adicionaron 6 ml de una solución de Na_2SO_4 (10 g en 33 ml de agua a 92°C) hasta agotar el volumen. Inmediatamente después se adicionaron 5 ml de una solución de Na_3PO_4 al 10%. La celulosa junto con el colorante y los fijadores se dejaron en agitación durante 10 minutos. Finalmente la celulosa teñida se lavó hasta que el agua de lavado fuera incolora y después se adicionó la cantidad necesaria de solución de sales para obtener una suspensión de CMC al porcentaje deseado (Medio LCM).

3.2.7. MEDIOS PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS

De acuerdo a resultados preliminares y a reportes en la literatura (Huitron, 1986) se empleó un medio basal líquido a base de celulosa microcristalina, peptona y tween 80, cuya composición se varió según el método de Box Wilson (Tabla 4.14). Los medios se prepararon por triplicado disolviendo los componentes en solución de sales (ver sección 3.2.5). Cada medio fue ajustado a un pH de 4.5 (Garzillo *et al.*, 1994), se adicionaron 140 ml del medio a matraces de 250 ml que se esterilizaron a 121°C por 15 min y después fueron inoculados con 5 ml del homogeneizado al 0.8% (ver sección 3.3.4.1) se incubaron a 28°C por 8, 16 y 24 días a 170 rpm. De igual manera se procedió para la preparación de los medios optimizados tipo C(-) y C(+)

3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE CEPAS DE *P. ostreatus*

3.3.1. MÉTODO CUANTITATIVO EN PLACAS DE AGAR

Este método cuantitativo correlaciona el diámetro del halo con la actividad enzimática y se basa en la difusión radial de la enzima en el medio de agar celulosa teñida. Al actuar la enzima, rompe los enlaces β 1-4 glucosídicos dejando zonas claras alrededor del pozo. La glucosa obtenida, como resultado de la degradación, se libera para ser asimilada por el hongo permitiendo así su crecimiento. Para evaluar la efectividad de esta técnica se cuantificó la actividad de las celulasas de *A. niger* empleando diferentes diluciones, que fueron inoculadas en placas teñidas. De forma similar se evaluaron posteriormente los sobrenadantes obtenidos de cultivos de cepas celulolíticas tales como 8X3, IAP y PI8 a diferentes tiempos de incubación.

3.3.1.1 Preparación de placas

Sobre placas de vidrio de 17x17 cm, se vaciaron 35 ml de medio de celulosa microcristalina tipo Walseth a diferentes concentraciones (0.4, 0.6, 0.8, y 1%), glucosa 0.05% y agar. Una vez que se solidifica, se tiñeron las placas colocándolas por 30 minutos en colorante para textiles color violeta (Marca mariposa) disuelto en agua. Posteriormente se realizaron las horadaciones con una punta Gilson con 0.7 cm de diámetro a igual distancia entre los pozos (Call, 1983).

3.3.1.2 Determinación de actividad de celulasas de *A. niger*

De acuerdo a las especificaciones del proveedor (sigma), el extracto de celulasas de *A. niger* tenía 5000 U en 12.9 g de sólido es decir, 0.39 u/mg, asumiendo que una unidad de enzima libera 1 μ mol de glucosa proveniente de la celulosa en 1h a un pH de 5.00 a 37°C.

Empleando un buffer de acetatos a un pH de 5.0 se prepararon varias diluciones del extracto enzimático para lograr concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 390 U/ml. Se tomaron después alícuotas de 25 μ l que se colocaron en los pozos de las placas previamente preparadas, las que se colocaron en el fondo de una charola conteniendo cloruro de benzalconio para evitar la contaminación y se incubaron a 28°C. Se midieron diariamente los diámetros de los halos de claridad hasta los 21 días.

3.3.1.3 Determinación de la actividad celulolítica en el sobrenadante de los medios de cultivo con micelio

Del frente micelial de las colonias con 7 días de crecimiento a 28°C en agar extracto de malta, se cortaron cubos de agar (0.5 x 0.5 cm) para inocular cajas con medio ACMC (ver sección 3.2.4). Después de incubar 7 días a 28°C. Se corto el agar cubierto con micelio de 3 cajas por cada cepa, colocándolo en el vaso de un homogeneizador junto con 30 ml de agua estéril. Después se inocularon matraces conteniendo medio líquido de celulosa microcristalina al 1% con y sin glucosa se incubaron a 28°C. A los 8, 16 y 24 días de incubación se tomaron alícuotas de 25 μ l del sobrenadante para depositarlas en los pozos de las placas. Las placas se colocaron en una charola conteniendo en el fondo cloruro de benzalconio para evitar la contaminación y se incubó a 28°C, diariamente se midieron los diámetros de los halos de claridad hasta 21 días.

3.3.2. CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR LIBERACIÓN DE COLOR.

Se planteó correlacionar la capacidad celulolítica con la liberación de color debida a la acción enzimática sobre celulosa microcristalina teñida con azul brillante de remazol. Para ello se emplearon cepas silvestres celulolíticas y una fuente estandarizada de celulasas de *Aspergillus niger* en diluciones de 20-400 U/ml.

Se prepararon matraces con 250 ml del medio líquido de celulosa microcristalina (LCM) tipo Walseth, teñida con azul brillante de remazol y disuelta al 1 % en una solución con sales minerales y 0.05% de glucosa a pH 4.5.

Del frente micelial de colonias en crecimiento sobre agar extracto de malta, se cortaron cubos de (0.5 x 0.5 cm), con 7 días de incubación a 28°C, para inocular cajas con medio ACMC. A los 7 días incubación a 28°C, de 3 cajas de cada cepa se tomó el agar con micelio que fue después homogeneizado con 30 ml de agua estéril. Con 5 ml de esta suspensión se inocularon los matraces con medio LCM y se incubaron a 28°C hasta 21 días. Se tomaron muestras de 3 ml que fueron centrifugados a 300 rpm por 15 minutos. Al sobrenadante se le midió la absorbancia obteniéndose indirectamente la celulosa consumida (mg/ml) al interpolar la cantidad de colorante liberado en una curva patrón del mismo.

Para complementar con el ensayo anterior se realizó paralelamente una determinación de la actividad celulolítica en el sobrenadante para lo cual en un tubo de 15 ml se colocó 1 ml del sobrenadante con 3 ml de medio (LCM). Después de incubar a 28°C por 30, 60, y 150 min se midió la absorbancia a 595 nm, la que se corrigió con la producida por tubos preparados bajo las mismas condiciones pero con 0.2 ml de ácido tricloroacético para desnaturizar la enzima.

Para evaluar la celulólisis en el medio líquido con celulosa teñida se debe correlacionar el color liberado, con el consumo de celulosa. Por ello fue indispensable conocer la cantidad de color retenido por gramo de celulosa seca. Para encontrar el rango de medición con una correlación lineal entre la concentración del colorante y la densidad óptica de la solución de colorante se prepararon diluciones de colorante desde 0.01 hasta 0.1 mg/ml. De esta manera fue posible definir la cantidad de color retenido por unidad de peso de celulosa al determinar la cantidad del color no fijado y que se encuentra presente en las aguas de lavado.

3.3.3. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE CELULOSA EN MEDIO SÓLIDO

Se prepararon 4 medios ACM, variando el contenido de agar (1 y 1.5%) y de celulosa Walseth (0 y 1%) como se muestra en la **Tabla 4.8**. En algunas placas se colocó una película de celofán o de polipropileno perforado sobre la superficie para intentar cuantificar la biomasa. Los medios fueron inoculados con la cepa PI8, determinándose para cada medio (por triplicado) el cambio en la cantidad total de glucanos por el método de Klein-Weissman (1953). Con este método las hexosas son oxidadas por el ácido sulfúrico para dar origen al formaldehído, el cual en presencia de ácido cromotrópico produce una coloración violeta proporcional al contenido de hexosas. La eficiencia del método analítico seleccionado y de los factores estudiados que interfieren en el desarrollo del color fueron estudiados en un trabajo previo de Aguilera *et al.* (1982) Considerando los resultados obtenidos en dicho estudio, las condiciones óptimas para la cuantificación de hexosas son las siguientes:

- Tiempo de calentamiento: 50 minutos
- Absorbancia máxima: 570 nm.
- Concentración de ácido cromotrópico: 0.5 g en 205 ml de ácido sulfúrico 15 M.

Con estas condiciones se realizó una curva patrón de glucosa en agua. Esta siguió la ley de Lambert-Beer hasta una concentración de 0.40 mg/ml que corresponde a una absorbancia de 1.40. La cuantificación de las hexosas se llevo acabo colocando 1 ml de la solución problema en un tubo de ensaye y añadiendo a continuación 5 ml del reactivo de Klein-Weissman. Los tubos de ensaye se tapan y colocan en un baño de agua a temperatura de ebullición durante 50 minutos. A continuación se enfrían los tubos inmediatamente y se leen a 570 nm contra un blanco de agua.

Para preparar el reactivo de Klein-Weissman se disuelven 0.5 g de ácido cromotrópico en 5 ml de agua destilada y se adicionan 205 ml de ácido sulfúrico 15 M. El reactivo se debe de preparar al momento, de lo contrario se requiere guardarlo en refrigeración por un máximo de dos semanas.

La biomasa se determinó por diferencia de peso seco y el crecimiento micelial se obtuvo midiendo el diámetro de la colonia diariamente.

3.3.4. OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS POR CEPAS SILVESTRES Y ACELULOLITICAS DE *Pleurotus ostreatus*

3.3.4.1 Preparación del inóculo

De cultivos de *P. ostreatus* conservados en medio de extracto de malta a 2°C, se cortaron cuadros de 0.5x 0.5 cm y se colocaron en cajas petri con medio de extracto de malta (ver sección 3.2.1). Las cajas se incubaron a 28°C durante 7 días en el caso de las cepas dicarióticas silvestres y 14 días en el caso de monocariotes. Posteriormente, de la periferia de la colonia miceliar en crecimiento se cortaron cilindros de 0.5 cm de diámetro y se colocaron sobre el papel filtro colocando al centro de las cajas petri con medio de agar agua. Dicho medio fue empleado para evitar que cualquier otra fuente de carbono interfiriera con los nutrientes presentes en los medios experimentales. Las cajas fueron incubadas a 28°C por 7 ó 16 días según el tipo de cepa luego, se midió el diámetro de la colonia, se cortó el crecimiento, se pesó en condiciones estériles. Un cilindro (colonia en crecimiento) pesa 1.74 g y se colocó en un homogeneizador con 120 ml de agua destilada estéril. Enseguida, se tomó 5 ml del homogeneizado y se colocó en un volumen de 140 ml del medio líquido indicado **Tabla 4.24**, por lo tanto cada matraz fue inoculado con micelio al 0.8%. Los matraces fueron incubados a 28°C por 8, 16 y 24 días a 170 rpm.

3.3.4.2 Optimización de los componentes del medio para inducir la producción de celulasa basado en el Método estadístico de Box Wilson.

Como se muestra en la **Tabla 4.14** se fijaron unidades de variación para cada componente de acuerdo al método estadístico de Box Wilson (Cochran, 1997), el cual es una modificación del diseño factorial empleado para optimizar medios de cultivo en la producción de metabolitos. Los resultados del diseño se utilizan para encontrar los componentes o condiciones que más afectan y así proponer una nueva serie de experimentos en donde el valor de cada parámetro es modificado, ya sea incrementándose ó disminuyéndose hasta llegar al nivel óptimo para cada uno de los componentes evaluados. Una vez que se establecieron los niveles inferior y superior para cada uno de los elementos, se prepararon 8 medios correspondientes a todas las combinaciones posibles (ver **Tabla 4.15**). Después fueron inoculados con 5 ml del homogeneizado al 0.8% y se incubaron a 28°C. A los 8, 16 y 24 días de incubación, se determinó la actividad celulolítica de acuerdo al método propuesto por Mandels (1976).

3.3.4.3 Determinación de la actividad celulolítica por el método de Mandels (1976)

De los matraces, se tomaron alicuotas de 5 ml. Se centrifugaron a 200 rpm, tomándose 0.5 ml del sobrenadante que se colocó en tubos a los que se les adiciono 1 ml de buffer 0.05 M de citrato de sodio a pH de 4.8. A cada tubo se colocó papel filtro enrollado (1 x 6 cm), se incubaron por 1h a 50°C. Enseguida se adicionaron 3 ml de reactivo de coloración para detener la reacción. Después los tubos se colocaron en un baño maria a ebullición por 5 min. Posteriormente se adiciono 10 ml de agua desionizada para diluir el color y así determinar los azúcares reductores midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Se incluyó un blanco sin papel filtro para corregir la presencia de azúcares provenientes en la preparación de la enzima.

Para preparar el DNS se pesaron 10 g de ácido 3, 5 dinitrosalicílico y se disolvieron en 300 ml de agua desionizada, a los que posteriormente se les adicionó 200 ml de una solución de hidróxido de sodio 2 N. Después que todo el material se ha disuelto, se adicionó 300 g de tartrato doble de sodio y potasio, una vez disuelta la mezcla se lleva a 1 litro con agua desionizada. La cantidad de azúcares reductores se calculan a partir de una curva patrón preparada con glucosa en concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/ml tratada de la misma manera que las muestras ver **Fig. 4.7**.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objeto de aumentar la eficacia de un programa de mejoramiento genético dirigido a la obtención de cepas de *P. ostreatus* para un proceso de biodelignificación industrial, resulta indispensable contar con un método preciso, sencillo y confiable; que permita la identificación de cepas acelulolíticas capaces de producir una degradación selectiva de lignina, así como también ayude a planear hibridaciones para obtener cepas mejoradas. En estudios previos, Ramírez (1989) y Camacho (1996) utilizaron diferentes métodos para la identificación de cepas acelulolíticas de *P. ostreatus* obteniéndose resultados que difieren para una misma cepa con cada uno los distintos métodos empleados. Aunado a esto cabe considerar que los basidiomicetos son, por naturaleza, de crecimiento lento y las cepas acelulolíticas son mutantes aún más débiles por lo que resultaba necesario evaluar nuevos procedimientos que permitieran caracterizarlas de una forma eficaz y consistente.

4.1. FORMACIÓN DE HALOS DE CLARIDAD EN PLACAS DE CRISTAL CON AGAR CELULOSA

La formación de halos de clarificación en medios de agar con distintos tipos de sustratos ha sido uno de los procedimientos más ampliamente utilizados para detectar diferentes actividades enzimáticas (Call y Emeis, 1983). Se ha empleado un medio con celulosa teñida para evaluar la capacidad para degradar dicho sustrato, tanto por cepas bacterianas como fúngicas (Saddle, 1980; Raymond, 1976). Dado que éste es un procedimiento sencillo y rápido, se consideró conveniente usar celulosa teñida para intentar correlacionar la formación de halos de clarificación con la actividad celulolítica y, de esta manera, desarrollar criterios cuantitativos para la clasificación de las cepas acelulolíticas de *P. ostreatus* obtenidas en un programa de mejoramiento genético.

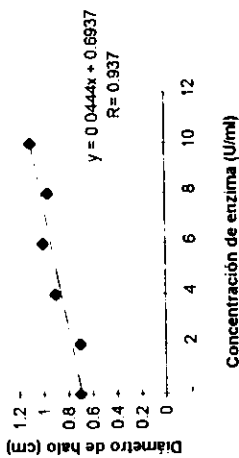
Para lograr este objetivo, primero resultaba necesario cuantificar las dimensiones de los halos producidos con una fuente conocida y estandarizada de enzimas celulolíticas. Se decidió, en consecuencia, utilizar un concentrado de celulasas de *A. niger* (Sigma) para preparar diluciones con diferentes concentraciones de enzima (sección 3.3.1.2) que se colocaron en pozos perforados en placas de agar con celulosa teñida a concentraciones de 0.4 a 1% (sección 3.3.1.1). Se

midieron diariamente las dimensiones de los halos producidos hasta los 7 días de incubación, ya que al dejar más tiempo las placas, además de no presentar cambio alguno, se contaminaban con hongos del medio ambiente. En la **Figura 4.1** y en la **Tabla 4.1** se muestran los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de celulosa, observándose una alta correlación entre la concentración de celulasas con el tamaño de los halos, expresado ya sea en términos del diámetro total del halo resultante o bien de la extensión o ancho de la banda de clarificación.

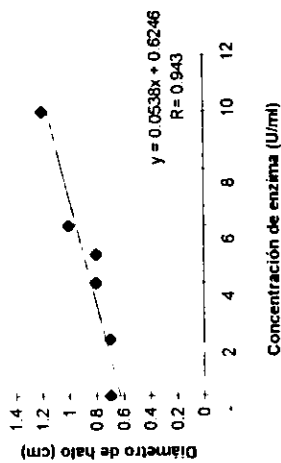
Con base en estos resultados preliminares, se decidió evaluar el uso de este procedimiento para cuantificar la capacidad celololítica de cepas de *P. ostreatus*. Se midió la formación de halos por los sobrenadantes obtenidos al cultivar 3 cepas silvestres (8x3, P18 y IAP) en un medio líquido con celulosa microcristalina como fuente de carbono (sección 3.2.5). A los 8, 16 y 24 días de incubación, se tomaron 25 µl del sobrenadante que se colocaron en los pozos de placas preparadas con diferentes concentraciones de celulosa teñida, midiéndose la formación de halos diariamente. Los resultados mostrados en las **Tablas 4.2, 4.3 y 4.4** indican que en el caso de la cepa 8X3 la mayor actividad celololítica ocurrió en la primera semana de incubación a una concentración de celulosa del 0.6 %. Con la cepa P18 se observa también una mayor actividad en la primera semana de incubación, aunque en este caso, ocurre a la mayor concentración de celulosa, 1%. Con la cepa IAP, el mayor tamaño de halo se observa a la segunda semana y a la menor concentración de celulosa, 0.4%. Estos resultados muestran una gran desviación estándar, lo que no permite asegurar que la cepa IAP se comporta de manera diferente respecto a las dos cepas anteriores. Es de hacerse notar que las dimensiones de los halos producidos por dichas cepas fueron, en términos generales, muy pequeños, contrariamente a lo esperado ya que se trataba de cepas silvestres.

Por otro lado, en la literatura se encuentra reportado que al aumentar la concentración de celulosa es posible inhibir marcadamente su degradación (Coutts y Smith, 1976, Tah-Mun, 1976). Se ha propuesto que esto puede ser resultado de la absorción en el substrato de las enzimas excretadas, o bien que a medida que aumenta la cantidad de celulosa se produce una mayor cantidad de azúcares que puede reprimir la síntesis de la enzima o su acción, como se ha reportado para *T. viride*, *T. konongii* y *S. pulvurentum* (Enari y Markkanen, 1977). En el presente estudio se observó un comportamiento semejante al utilizar las celulasas de *A. niger*, ya que la mayor actividad celololítica se presentó a la más baja concentración de celulosa (0.4%) como se muestra en la **Figura 4.2**; al aumentar la concentración de celulosa disminuyó la tasa de

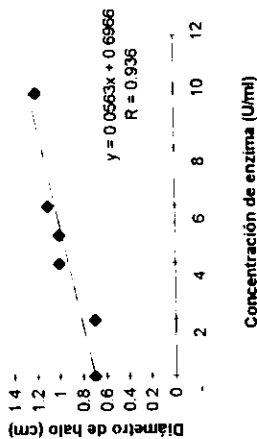
Figura 4.1. FORMACIÓN DE HALO* POR CELULASAS DE *A. niger* EN PLACAS DE AGAR CON CELULOSA AL 1.0%, 0.8%, 0.6% Y 0.4%.



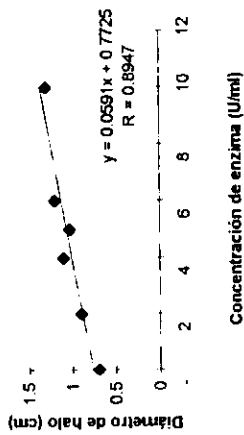
Celulosa al 1%.



Celulosa al 0.8%.



Celulosa al 0.6%.



Celulosa al 0.4%.

* Se indica el diámetro del margen externo del halo formado entorno al pozo de 0.7 cm

TABLA 4.1. FORMACIÓN DE HALO POR CELULASAS DE *Aspergillus niger* EN PLACAS DE AGAR CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CELULOSA.

Concentración de Celulosa (g/100ml)	EXTENSIÓN DE HALO* (cm) $\bar{x} \pm \sigma$				
	Concentración de celulasas (U/ml)				
	20	40	60	80	100
1	0	0.20 ± 0.0	0.30 ± 0.0	0.26 ± 0.0	0.40 ± 0.0
0.8	0	0.10 ± 0.0	0.10 ± 0.0	0.30 ± 0.0	0.50 ± 0.0
0.6	0	0.30 ± 0.0	0.30 ± 0.0	0.40 ± 0.0	0.50 ± 0.0
0.4	0.20 ± 0.0	0.40 ± .05	0.33 ± .05	0.50 ± 0.0	0.60 ± 0.0

* Placa a 7 días de incubación

TABLA 4.2. FORMACIÓN DE HALO POR LA *CEPA 8X3* EN PLACAS DE AGAR CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CELULOSA.

Concentración de Celulosa (g/100ml)	EXTENSIÓN DE HALO* (cm) $\bar{x} \pm \sigma$		
	Tiempo de incubación (días)		
	8	16	24
1.0	0.08 ± 0.04	0	0
0.8	0.10 ± 0.00	0	0
0.6	0.15 ± 0.081	0	0
0.4	0	0	0

* Placa a 7 días de incubación

TABLA 4.3. FORMACIÓN DE HALO POR LA *CEPA PIB* EN PLACAS DE AGAR CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CELULOSA.

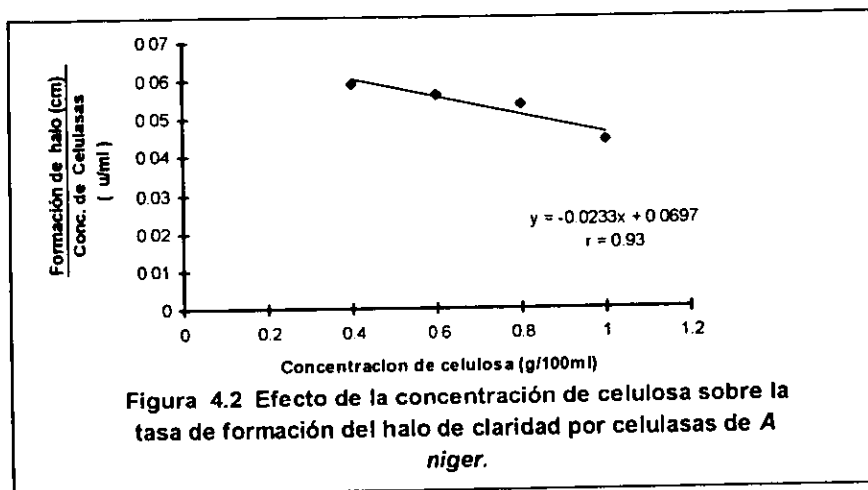
Concentración de Celulosa (g/100ml)	EXTENSIÓN DE HALO* (cm) $\bar{x} \pm \sigma$		
	Tiempo de incubación del medio (días)		
	8	16	24
1.0	0.20 \pm 0.00	0.05 \pm 0.12	0.03 \pm 0.05
0.8	0	0.10 \pm 0.16	0.01 \pm 0.04
0.6	0	0	0
0.4	0	0	0

* Placa a 7 días de incubación

TABLA 4.4. FORMACIÓN DE HALO POR LA *CEPA IAP* EN PLACAS DE AGAR CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CELULOSA.

Concentración de Celulosa (g/100ml)	EXTENSIÓN DE HALO* (cm) $\bar{x} \pm \sigma$		
	Tiempo de incubación del medio (días)		
	8	16	24
1.0	0	0.05 \pm 0.05	0.08 \pm 0.09
0.8	0.1 \pm 0.08	0.05 \pm 0.08	0
0.6	0	0	0
0.4	0	0.18 \pm 0.32	0

* Placa a 7 días de incubación



formación de halo celulolítico, expresada como el halo formado por unidades de celulosa. Este efecto se observó también con la cepa IAP y 8X3 mas no con la cepa PI8 ya que con ésta, la mayor extensión de halo ocurrió a la mayor concentración de celulosa utilizada (1%). Dadas las discrepancias encontradas, este procedimiento no resultó adecuado para cuantificar la capacidad celulolítica del sobrenadante. Para intentar resolver estas dificultades, se consideró utilizar una modificación del método de Raymond y Day (1972) que emplea papel filtro teñido como fuente de carbono, utilizando ahora celulosa teñida en un medio líquido para seguir la liberación de color como un indicador de la capacidad celulolítica de la cepa.

4.2. LIBERACIÓN DE COLOR EN MEDIO LÍQUIDO CON CELULOSA TEÑIDA

4.2.1. POR CELULASAS DE *A. niger*

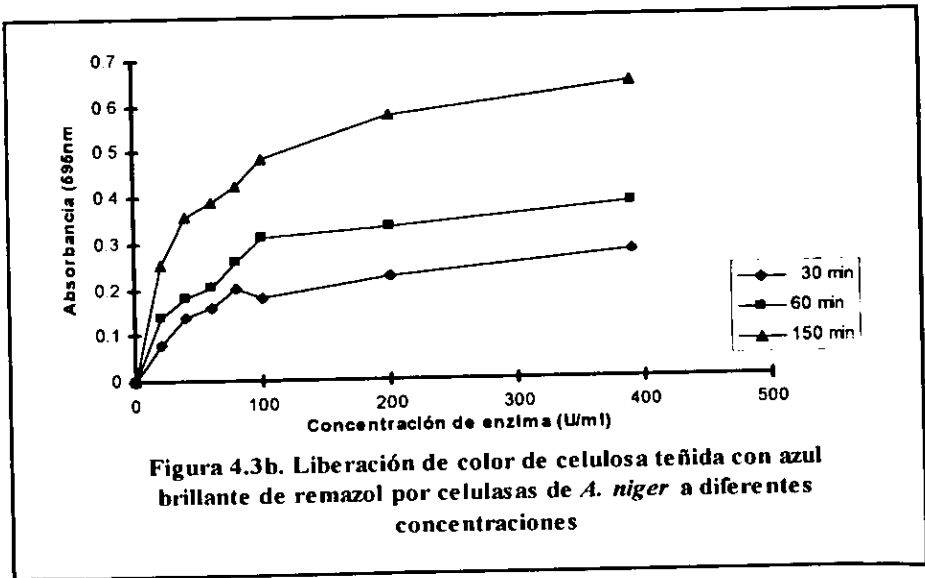
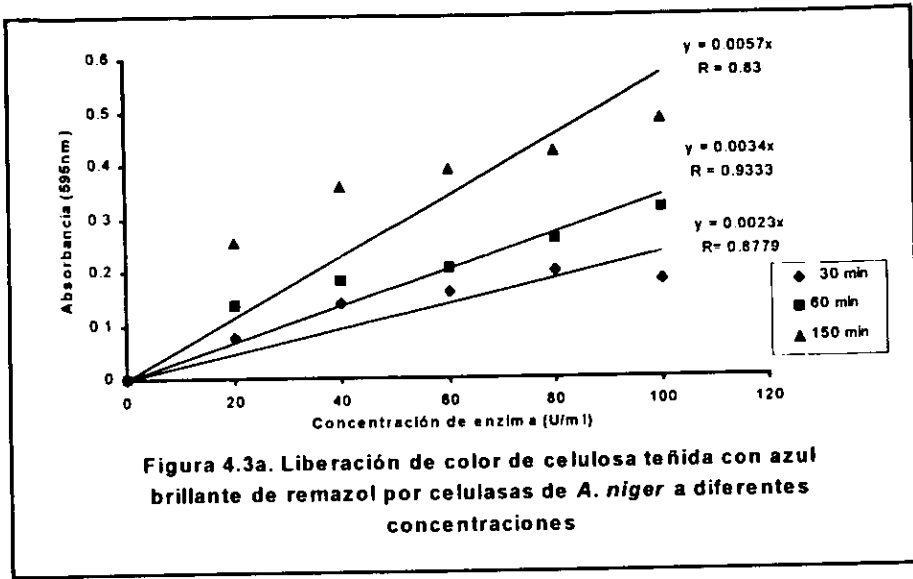
Para evaluar la efectividad de este método y eventualmente darle un carácter cuantitativo, resultaba necesario determinar la liberación de color por una fuente estandarizada de celulasas (sección 3.3.2.). Se prepararon diluciones con diferentes concentraciones de celulasas (de 20 a 400 unidades por mililitro) que se colocaron en tubos con 3 ml de medio líquido de celulosa microcristalina teñida con azul brillante de remazol (sección 3.2.6.). Después de incubar a 37°C por 30, 60 y 150 min se midió la absorbancia a 595 nm. En la **Figura 4.3a** se presentan los resultados obtenidos observándose una correlación entre la liberación de color, medida como absorbancia en el sobrenadante, con la cantidad de enzimas presente en el rango de 0 a 100 U/ml. Esta correlación es mayor ($r = 0.9333$) a los 60 min de incubación con la enzima. A mayores concentraciones de enzima se pierde la linealidad observándose un comportamiento asintótico como se muestra en la **Figura 4.3b**.

4.2.2. POR CEPAS SILVESTRES DE *P. ostreatus*

Con base en los resultados anteriores, se cultivaron las tres cepas silvestres de *P. ostreatus* en medio líquido con celulosa microcristalina teñida midiendo la actividad celulolítica en los sobrenadantes (sección 3.3.2). A los 7, 14 y 21 días se tomaron muestras de 1 ml y se incubaron con 3 ml del mismo medio por 30, 60, y 150 min a 37°C. Se midió la absorbancia a 595 nm, corrigiéndose con la producida por tubos preparados bajo las mismas condiciones pero con 0.2

colorante liberado con la **Figura 4.4** y considerando que por cada gramo de celulosa teñida, 79.95 mg de colorante son retenidos (ver sección 3.3.2). Los resultados que se muestran en la **Tabla 4.5** indican una muy limitada degradación de celulosa en todos los casos.

Por otro lado se considero adecuado evaluar el posible efecto acumulado de la acción de las enzimas sobre el sustrato teñido determinando el color liberado directamente en los medios de cultivo líquidos con celulosa teñida. En las muestras tomadas a los 7, 14 y 21 días de los cultivos miceliales a 28°C, se midió la absorbancia del sobrenadante. La degradación de celulosa se calculó de manera similar al experimento anterior utilizando, en este caso, la **Figura 4.5**. Como se observa en las **Tablas 4.6 y 4.7**, las cepas 8x3 y PI8 mostraron un mayor consumo de sustrato que la cepa IAP. El consumo de celulosa se incrementó con el tiempo de incubación, pero sólo fue posible cuantificar una escasa degradación de la celulosa, de 2 a 2.6%, en comparación con el 44% reportado por Ramírez (1989) para cepas silvestres (celulolíticas) en sustratos lignocelulósicos. Una posible explicación del menor consumo de la celulosa en medios líquido es la mayor adaptación de los basidiomicetos para desarrollarse en medios sólidos. En los medio líquidos la baja disponibilidad de oxígeno puede también afectar el consumo de celulosa; en éstos se dificulta también el contacto estrecho entre la fuente de carbono y el micelio, factor que en la literatura se ha reportado como indispensable para que la degradación de la celulosa se lleve a cabo. Finalmente, también es posible que la concentración de celulosa utilizada (1%) produzca un efecto inhibitorio como se observa en la **Figura 4.2**.



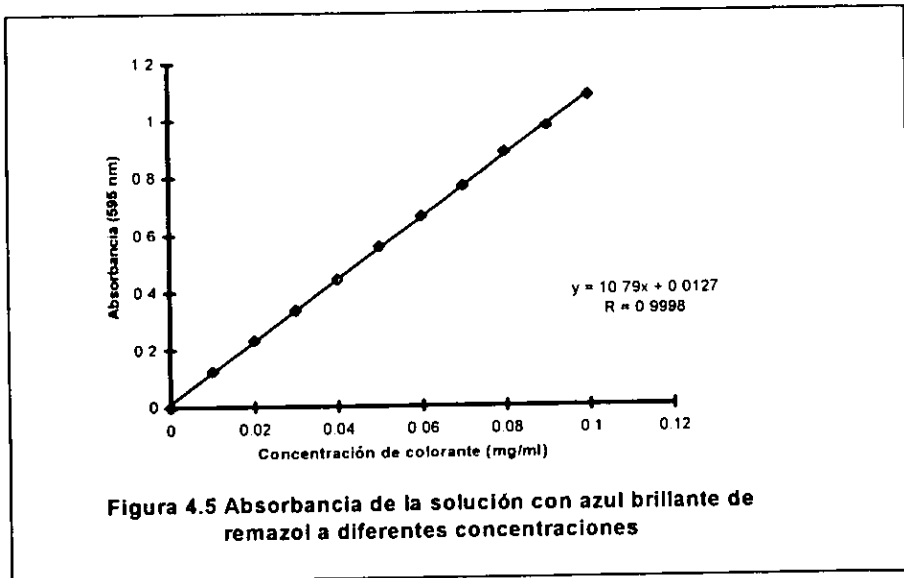
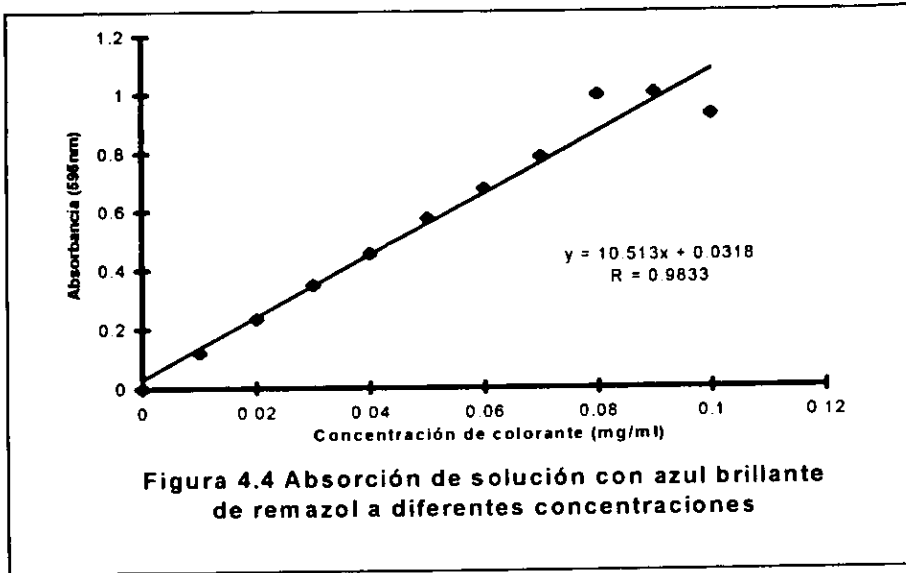


TABLA 4.5. DEGRADACIÓN DE CELULOSA POR SOBRENADANTE DE CULTIVOS LÍQUIDOS DE CEPAS SILVESTRES DE *P.ostreatus*

TIEMPO DE REACCIÓN (min)	DEGRADACIÓN DE CELULOSA ($\mu\text{g/ml}$)		
	TIEMPO DE INCUBACIÓN (días)		
	7	14	21
CEPA P18			
30	1	2	5
60	0	2	4
150	0	0	3
CEPA 8X3			
30	3	3	4
60	1	3	3
150	40	0	7
CEPA IAP			
30	3	5	10
60	0	2	5
150	0	0	2

TABLA 4.6. LIBERACIÓN DE COLOR POR CEPAS DE *P. ostreatus* EN MEDIOS LÍQUIDOS CON 1% DE CELULOSA TEÑIDA CON AZUL BRILLANTE DE REMAZOL

Cepas	ABSORBANCIA		
	$\bar{x} \pm \sigma$		
	Tiempo de incubación (días)		
	7	14	21
8X3	0.1875 ± .0279	0.2241 ± .0215	0.2337 ± .0273
PI8	0.2213 ± .0217	0.2443 ± .0194	0.2384 ± .0129
IAP	0.1544 ± .0254	0.2095 ± .03113	0.1983 ± .0143
Cepas	AZUL BRILLANTE DE REMAZOL EN EL SOBRENADANTE ($\mu\text{g/ml}$)		
	Tiempo de incubación (días)		
	7	14	21
8X3	16.2	19.5	20.4
PI8	19.3	21.4	20.9
IAP	13.1	18.2	17.2

TABLA 4.7. CONSUMO DE CELULOSA POR CEPAS DE *P. ostreatus* CUANTIFICADO POR EL COLOR LIBERADO AL SOBRENADANTE EN MEDIO LIQUIDO CON 1% DE CELULOSA TEÑIDA

CEPAS	CONSUMO DE CELULOSA (g Celulosa consumida) 100 g Celulosa inicial		
	Tiempo de incubación (días)		
	7	14	21
8X3	2.02	2.44	2.56
PI8	2.40	2.68	2.61
IAP	1.64	2.27	2.15

4.3. CUANTIFICACIÓN DEL CONSUMO DE CELULOSA Y DEL CRECIMIENTO MICELIAL EN MEDIO SÓLIDO

Debido a las dificultades encontradas con los métodos anteriores, se decidió intentar cuantificar el consumo de celulosa en un medio sólido con agar al 1 y 1.5 % (sección 3.3.3.). Se prepararon medios con y sin la fuente de carbono, celulosa microcristalina tipo Walseth al 1%. A dichos medios se les determinó el contenido de glucanos empleando el método de Klein-Weissman (1953) (ver sección 3.3.3) utilizando la **Figura 4.6** para convertir los valores de absorbancia a concentración de glucanos y, posteriormente, corregir el efecto del agar como se muestra en la **Tabla 4.8**. Con el objeto de eliminar una posible interferencia de los glucanos provenientes del micelio, así como también de correlacionar el consumo de celulosa con la producción de biomasa y el crecimiento micelial (diámetro de la colonia) se probaron 2 tipos de películas (celofán y polipropileno) que permitieran separar la masa micelial formada. Las películas estériles se colocaron sobre la superficie de los medios depositándose a continuación el inóculo de la cepa P18. Después de 10 días de incubación se determinó en cada caja la cantidad de glucanos atribuibles a celulosa residual. Para ello se restaron los glucanos en los medios sin celulosa de los valores correspondientes en los medios con celulosa (**Tabla 4.9**) eliminando de esta manera el efecto de los glucanos provenientes del agar. Cabe mencionar que el contenido de glucanos en los medios sin celulosa disminuyó de 143 y 176 mg/caja (**Tabla 4.8**) a 65 y 130 mg/caja al usar película de celofán y 71 y 88 mg/caja con películas de polipropileno, lo cual demuestra que una cierta cantidad de glucanos aportados por el agar es consumido por el hongo. De manera similar, el contenido de glucanos en los medios con celulosa disminuye de 308 y 378 mg/caja a 131 y 133 mg/caja al usar celofán y 216 y 211 mg/caja con polipropileno.

El consumo de celulosa se determinó para cada medio restando a las cantidades de celulosa inicial, las residuales, como se muestra en la **Tabla 4.10**. En los medios con película de celofán el consumo de celulosa fue mayor que al usar polipropileno, (60 y 98% comparado con 12 y 39%). Se observó que al aumentar la concentración de agar también aumenta el consumo de celulosa es decir, la degradación de la celulosa por el hongo es favorecida por la presencia del agar que probablemente aporta ciertos azúcares como impurezas, o bien debido a que algunas cadenas laterales del polímero son susceptibles de ser atacadas.

En la **Tabla 4.11** se muestran los valores de crecimiento micelial y producción de biomasa en los diferentes medios. En términos generales, ninguno de estos dos parámetros se vio

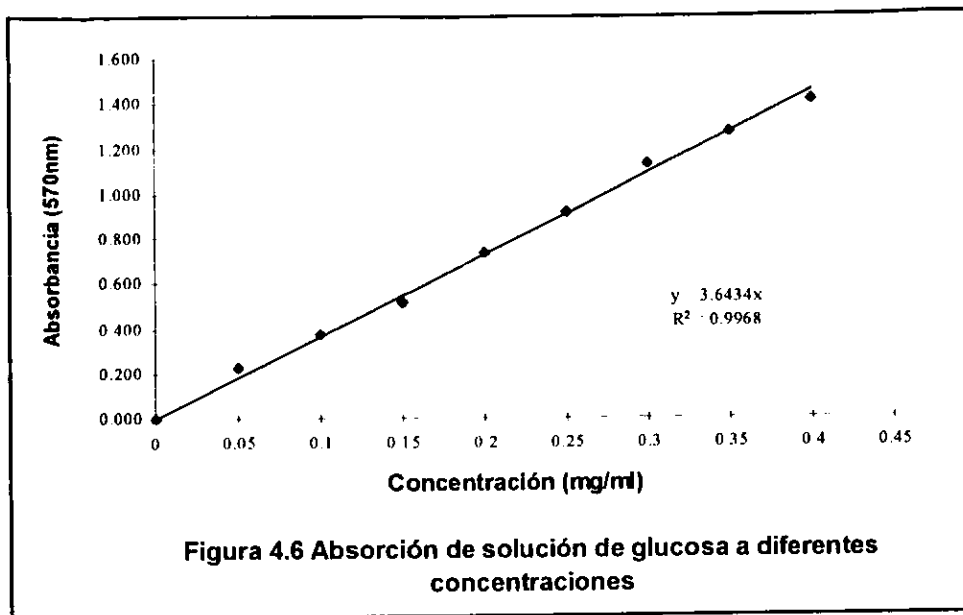


TABLA 4.8. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGAR SOBRE LA DETERMINACIÓN DE GLUCANOS TOTALES EN MEDIOS SIN INOCULAR.

Agar %	CONTENIDO DE GLUCANOS EN SÓLIDOS mg/caja $\bar{x} \pm \sigma$		Glucanos atribuibles a celulosa inicial mg/caja $\bar{x} \pm \sigma$
	Medio completo Celulosa 1%	Medio sin celulosa (Solo Agar)	
1.0	308.6 \pm 14.14	143.1 \pm 17.33	166.0 \pm 22.36
1.5	378.5 \pm 51.85	176.4 \pm 9.86	202.1 \pm 52.77

TABLA 4.9. DETERMINACIÓN DE GLUCANOS TOTALES ATRIBUIBLES A CELULOSA RESIDUAL CON LA CEPA P18*

Agar %	CONTENIDO DE GLUCANOS EN MEDIOS SÓLIDOS mg/caja					
	Medios con película de celofán		Celulosa residual	Medios con película de polipropileno		Celulosa residual
	Celulosa 1%	Sin celulosa		Celulosa 1%	Sin celulosa	
1.0	131.2 \pm 5.02	65.5 \pm 0.85	65.7 \pm 5.09	216.1 \pm 19.6	71.0 \pm 4.44	145.1 \pm 20
1.5	133.1 \pm 28.5	130.5 \pm 46.2	2.6 \pm 54.25	211.3 \pm 16.54	88.2 \pm 7.03	123.1 \pm 19

*A 10 días de incubación.

TABLA 4.10. CONSUMO DE CELULOSA POR LA CEPA P18 A 10 DÍAS DE INCUBACIÓN.

Agar %	Consumo de celulosa							
	Medios con película de celofán				Medios con película de polipropileno			
	Celulosa inicial mg/caja	Celulosa residual mg/caja	(mg)	%	Celulosa inicial mg/caja	Celulosa residual mg/caja	(mg)	%
1.0	166.0 ± 22.36	65.7 ± 5.09	100.3 ± 22.93	60.4	166.0 ± 22.36	145.1 ± 20	20.9 ± 29.9	12.0
1.5	202.1 ± 52.77	2.6 ± 54.25	199.5 ± 75.68	98.7	202.1 ± 52.77	123.1 ± 20	79.7 ± 58.9	39.4

TABLA 4.11. CRECIMIENTO MICELIAL Y BIOMASA DE LA CEPA P18 A 10 DÍAS DE INCUBACIÓN.

Agar %	Medios con película de celofán				Medios con película de polipropileno			
	Celulosa 1%		Sin celulosa		Celulosa 1%		Sin celulosa	
	Diámetro micelial (cm)	Biomasa (mg)	Diámetro micelial (cm)	Biomasa (mg)	Diámetro micelial (cm)	Biomasa (mg)	Diámetro micelial (cm)	Biomasa (mg)
1.0	5.0 ± 0.31	2.36 ± 1.3	5.0 ± 0.8	2.1 ± 1.13	4.65 ± 0.6	3.03 ± 2.2	4.5 ± 0.6	2.0 ± 0.95
1.5	5.16 ± 0.50	2.76 ± 0.58	4.5 ± 0.59	1.56 ± 1.4	No se midió	4.6 ± 1.7	4.2 ± 0.5	2.3 ± 1.8

afectado por la concentración de agar, por la presencia de celulosa o por el tipo de película. Tampoco fue posible establecer una correlación entre ellos, debido en parte a la dispersión de los datos experimentales que se ve reflejada en los grandes coeficientes de variación, de 5 a 13% para el crecimiento miceliar y de 20 al 100% para la producción de biomasa.

Se evaluó la degradación de los dos tipos de película por el hongo. En la **Tabla 4.12** se observa que la película de celofán perdió un 12% de su peso durante la incubación en todos los medios. En el caso de la película de polipropileno la pérdida en peso fue menor. No obstante, la dispersión de los datos no permite establecer diferencias significativas entre los diferentes medios (**Tabla 4.13**). Se presentaron dificultades para recuperar las películas sin residuos de medio lo que posiblemente afectó los resultados. No obstante, con este método fue posible cuantificar el consumo de celulosa por una cepa silvestre de *P. ostreatus* por lo que de esta manera podría cuantificarse la capacidad celulolítica de diferentes cepas. Sin embargo, el método presenta diversas dificultades técnicas que lo hacen muy laborioso y, eventualmente, sujeto a diversas variables que pueden afectar los resultados sin que sea posible tener mucho control sobre ellas. Esto limita su uso como procedimiento de rutina para la clasificación cuantitativa de cepas de basidiomicetos en función de su capacidad celulolítica.

TABLA 4.12. CONSUMO DE LA PELÍCULA DE CELOFAN POR LA CEPA P18 A 10 DÍAS DE INCUBACIÓN.

Agar %	Medios con película de celofán							
	Celulosa 1% peso (mg)		Pérdida de peso		Sin celulosa peso (mg)		Pérdida de peso	
	Inicial	Final	mg	%	Inicial	Final	mg	%
1.0	144.3 ± 16.7	128 ± 15	16.3 ± 22.44	11.2	125 ± 2.16	109 ± 1.3	16.0 ± 2.52	12.8
1.5	147 ± 19	129 ± 19	18.0 ± 26.87	12.2	145 ± 19	128 ± 17	17.0 ± 25.49	11.7

TABLA 4.13. CONSUMO DE LA PELÍCULA DE POLIPROPILENO POR LA CEPA P18 A 10 DÍAS DE INCUBACIÓN.

Agar %	Medios con película de polipropileno							
	Celulosa 1% peso (mg)		Pérdida de peso		Sin celulosa peso (mg)		Pérdida de peso	
	Inicial	Final	mg	%	Inicial	Final	mg	%
1.0	47.6 ± 1.7	51.5 ± 1.5	3.9 ± 2.26	7.5	67.8 ± 20.8	69.0 ± 20	1.2 ± 28.85	1.7
1.5	53.6 ± 3.3	55.5 ± 3.6	1.9 ± 4.88	1.9	51.0 ± 2.8	53.7 ± 5	2.7 ± 5.73	5.0

4.4. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de celulasas por cepas silvestres y mutantes acelulolíticas de *P. ostreatus*

Como una alternativa, para resolver los problemas encontrados en los métodos anteriores se consideró la posibilidad de que la composición del medio influyera en la producción de las celulasas, dado que los resultados obtenidos al incubar las diferentes concentraciones de celulasas de *A. niger* en las placas de agar celulosa teñida mostraron que al 1% de celulosa la tasa de formación de halo disminuye (Sección 4.1). Esto sugirió la posibilidad de que al modificar la composición del medio podrían variar las respuestas de las cepas lo cual explicaría los cambios en el comportamiento de una misma cepa observados por Ramírez (1989) y Camacho (1996), tanto con cepas silvestres como acelulolíticas. Considerando esta posibilidad y los reportes de Coutts (1976), Huitron (1986) y Garzillo (1992), se decidió evaluar el efecto de los componentes del medio en la producción de celulasas por una cepa silvestre celulolítica (Mo. 36) y por una acelulolítica (56 H1N1). Como proponen Mandels (1969) y Huitron (1986) se empleó un medio basal compuesto por celulosa microcristalina tipo Walseth como fuente de carbono, peptona como fuente de nitrógeno y el surfactante Tween 80, el cual provoca cambios en la permeabilidad de la célula que se traducen en incrementos en la producción de celulasas (Reese, 1969; Taniguchi, 1980; Tanaka, 1980). La composición del medio se optimizó de acuerdo al método estadístico de Box Wilson (Cochran, 1997), ampliamente empleado en la optimización de medios de cultivo para la producción de metabolitos. Para ello se fijaron unidades de variación por cada componente para que con los resultados de este primer experimento se identificaran los componentes o condiciones que más afectan y así, proponer una nueva serie de experimentos donde la concentración de algunos componentes se incrementen y otros disminuyan hasta llegar al nivel óptimo para cada uno de ellos (ver **Tabla 4.14**).

Una vez establecidos los niveles inferior y superior para cada uno de los componentes, se prepararon 8 medios correspondientes a todas las combinaciones posibles (**Tabla 4.15**). El pH de los medios se ajustó a 4.8 (Garzillo, 1994), se inocularon con 5 ml de homogeneizado de la cepa Mo. 36 y se incubaron a 28°C. A los 8, 16 y 24 días de incubación se determinó la actividad celulolítica conforme al método de Mandels (1976) midiéndose los azúcares reductores por el método de Miller (1959) (ver sección 3.3.4.3). Con base en la **Figura 4.7**, los valores de absorbancia fueron traducidos a las concentraciones de azúcares reductores producidas por la

acción de las celulasas frente al papel filtro. De esta manera, para la cepa Mo. 36 la máxima actividad fue detectada a los 8 días de incubación, observándose una tendencia decreciente pasado este tiempo (a los 16 y 24 días) como se muestra en la **Figura 4.8**. Tal comportamiento es semejante al reportado por Garzillo (1994) quien al crecer *P. ostreatus* (florida) en paja de trigo al 1%, observó que la actividad celulolítica ocurrió entre el tercer y cuarto día de crecimiento y la máxima actividad se registró 2 días después de iniciada ésta. Los niveles se mantuvieron durante los 12 días en que fue crecido el hongo. Estos resultados, al igual que los obtenidos en el presente trabajo, sugieren que la máxima actividad sucede a los 8 días. Por tanto, tales datos (ver **Tabla 4.15**) fueron considerados para el cálculo de los coeficientes de regresión de cada componente del medio a optimizar con el método estadístico (Box Wilson). Para ello los valores de azúcares reductores obtenidos se ordenaron por nivel (inferior y superior). Una vez ordenados por grupo los valores se sumaron entre sí, a los resultados correspondientes al nivel inferior se les asignó el signo negativo y positivo al nivel superior. Ambos valores se restan algebraicamente entre sí y se dividen por el número total de datos, que para este caso fueron de ocho y así se obtuvieron los coeficientes de regresión para cada componente como se muestran en la **Tabla 4.16**. Posteriormente estos resultados se expresaron en gramo por litro (g/l) al multiplicar dichos valores con las unidades de variación del medio basal (**Tabla 4.17**). Por otro lado, para calcular las unidades de variación de cada constituyente del medio para la cepa Mo. 36 se dividió el coeficiente de regresión de cada componente entre aquel coeficiente cuyo valor fuera el mayor, que para este caso, fue de 0.1106.

Una vez que las unidades de variación de cada elemento fueron calculadas, sus valores se sumaron o restaron (según el signo) al medio basal, obteniéndose, la composición del medio optimizado para la producción de celulasas para la cepa Mo. 36 (**Tabla 4.18**). Se observaron incrementos en la concentración de cada uno de los componentes del medio respecto al medio basal; para la celulosa microcristalina, de 4 a 5 g/l; para la peptona, de 0.9 a 1.2 g/l y para el Tween 80 de 1.4 a 1.8 g/l.

Para la cepa 56H1N1 (acelulolítica) se procedió de igual manera que para la cepa Mo. 36, fijando unidades de variación de acuerdo al método estadístico de Box-Wilson como se describió anteriormente (**Tabla 4.14**). Siguiendo el procedimiento antes indicado, se prepararon los 8 medios correspondientes a todas las combinaciones posibles (ver **Tabla 4.19**). Se encontró nuevamente que la máxima producción de azúcares ocurre a los 8 días de incubación, excepto

TABLA 4.14. RANGOS DE VARIACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO BASAL Y CONCENTRACIÓN DE LOS MEDIOS EXPERIMENTALES.

MEDIO BASAL		UNIDADES DE VARIACIÓN		CONCENTRACION EN MEDIOS EXPERIMENTALES (g/l)	
Componentes	Concentración g/l	%	(g/l)	Nivel inferior	Nivel superior
Celulosa microcristalina	4.0	40	1.6	2.40	5.6
Peptona	0.9	30	0.27	0.63	1.17
Tween 80	1.4	30	0.42	0.98	1.82

TABLA 4.15. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO SOBRE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA FRENTE A PAPEL FILTRO DE LA CEPA Mo. 36*.

Medios	COMPOSICIÓN (g/l)			Azucares reductores (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	pH final $\bar{x} \pm \sigma$
	Celulosa microcristalina	Peptona	Tween 80		
1	2.4	0.63	0.98	0.549 ± 0.023	4.80 ± 0.02
2	5.6	0.63	0.98	0.504 ± 0.034	4.36 ± 0.13
3	2.4	1.17	0.98	0.793 ± 0.010	5.86 ± 0.10
4	2.4	0.63	1.82	0.858 ± 0.034	4.60 ± 0.23
5	5.6	1.17	0.98	1.109 ± 0.006	5.53 ± 0.16
6	2.4	1.17	1.82	0.929 ± 0.040	5.61 ± 0.19
7	5.6	0.63	1.82	0.967 ± 0.040	4.39 ± 0.23
8	5.6	1.17	1.82	1.102 ± 0.078	5.27 ± 0.58

*A 8 días de incubación

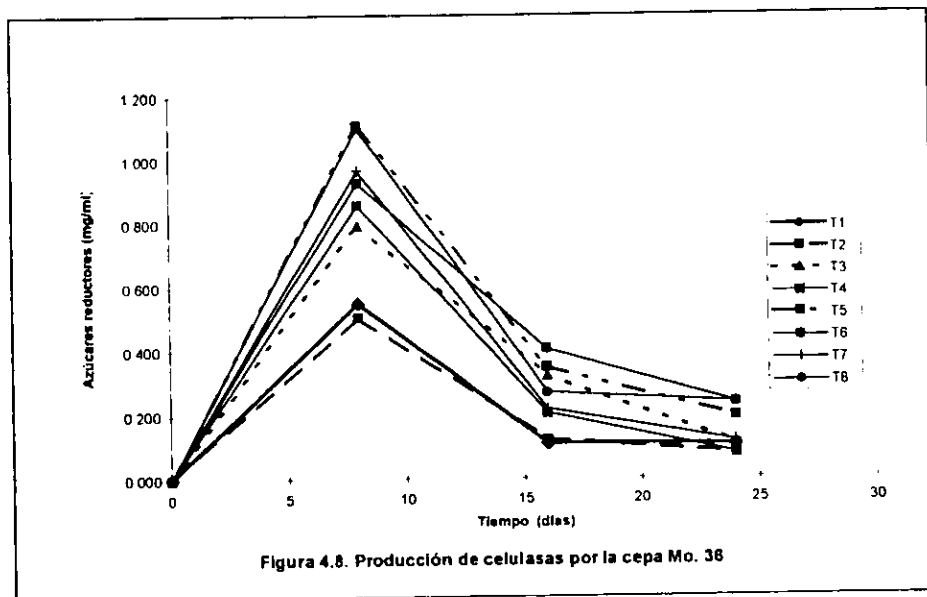
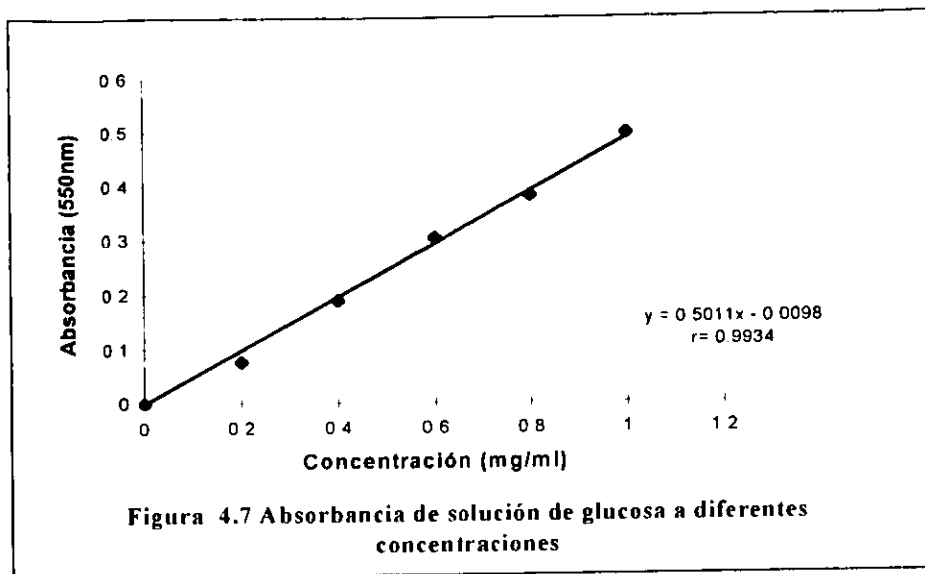


TABLA 4.16. CALCULO DE LOS COEFICIENTES DE REGRESIÓN DE CADA COMPONENTE DEL MEDIO CON LA CEPA Mo.36*.

COMPOSICIÓN (mg/ml)					
Celulosa microcristalina		Peptona		Tween 80	
Actividad celulolítica en los 2 niveles experimentados					
Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
0.549	0.504	0.549	0.793	0.549	0.858
0.793	1.109	0.504	1.109	0.504	0.929
0.858	0.967	0.858	0.929	0.793	0.967
0.929	1.102	0.967	1.102	1.109	1.102
Suma de valores experimentales					
- 3.129	3.682	-2.878	3.933	-2.955	3.856
Coefficientes de regresión para cada componente (suma de valor inferior – suma de valor superior) /8					
0.0691		0.1318		0.1126	

*Según método de Box Wilson

TABLA 4.17. CÁLCULO DE LAS UNIDADES DE VARIACIÓN PARA CADA COMPONENTE DEL MEDIO PARA LA CEPA No. 36*.

Parámetros	COMPONENTES		
	Celulosa microcristalina	Peptona	Tween 80
Coefficiente	0.0691	0.1318	0.1126
Unidad de variación medio basal	1.60	0.27	0.42
Coefficiente de regresión expresado en (g/l)	0.1106	0.0355	0.0473
Unidades de variación (Coeficiente de regresion/ 0.1106)			
Unidades de variación	1.0	0.3205	0.4276

TABLA 4.18. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO PARA LA CEPA Mo.36*.

Parámetros	COMPOSICIÓN DEL MEDIO (g/l)		
	Celulosa microcristalina	Peptona	Tween 80
Medio basal	4.0	0.9	1.4
Unidad de variación	1.0	0.3205	0.4276
Coficiente	5.0	1.2209	1.8276

*Segun método de Box Wilson

TABLA 4.19. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA FRENTE A PAPEL FILTRO DE LA CEPA 56HINI*.

Medios	COMPOSICIÓN (g/l)			Azúcares reductores (mg/ml)	pH final
	Celulosa microcristalina	Peptona	Tween 80	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$
1	2.4	0.63	0.98	0.388 ±0.002	4.53 ±0.03
2	5.6	0.63	0.98	0.292 ±0.015	4.43 ±0.06
3	2.4	1.17	0.98	0.273 ±0.015	4.69 ±0.02
4	2.4	0.63	1.82	0.279 ±0.014	4.46 ±0.04
5	5.6	1.17	0.98	0.298 ±0.0012	4.96 ±0.22
6	2.4	1.17	1.82	0.401 ±0.011	4.78 ±0.20
7	5.6	0.63	1.82	0.292 ±0.012	4.68 ±0.07
8	5.6	1.17	1.82	0.331 ±0.005	4.76 ±0.27

*A 8 días de incubación

para el caso de los medios 5 y 8, donde esto ocurrió a los 16 días de incubación como se muestra en la **Figura 4.9**. Sin embargo, comparando la **Tabla 4.19** y **Tabla 4.20**, la mayoría de los medios incubados a los 8 días muestran una mayor concentración de azúcares reductores, por lo que se decidió considerar los valores obtenidos a los 8 días de incubación para el cálculo de los coeficientes de regresión de cada componente de acuerdo al método de Box Wilson (**Tabla 4.21**).

En la **Tabla 4.22** se muestran los valores de los coeficientes de cada componente del medio para la cepa 56H1N1 en gramos por litro, así como las unidades de variación de cada uno de ellos. Con estos valores se determinó la composición del medio optimizado para la producción de celulasas por la cepa 56H1N1 (**Tabla 4.23**).

En la **Tabla 4.24** se muestra, como resultado del diseño (Box-Wilson), la composición de los medios optimizados denominados medio tipo C(+) para las cepas celulolíticas y medio tipo C(-) para las cepas acelulolíticas. De acuerdo a los resultados anteriormente descritos para la cepa Mo. 36 y 56H1N1, se mostró que la liberación de azúcares reductores se vio efectivamente influida, tanto por las concentraciones probadas, como por los componentes del medio. De ahí la importancia de optimizar la composición del medio antes de establecer criterios cuantitativos de clasificación. Por tal motivo, se consideró conveniente evaluar dichos medios (**Tabla 4.24**) para la producción máxima de celulasas, tanto de las cepas antes empleadas (Mo. 36 y 56H1N1) así de las cepas P403, P404 y P407, clasificadas previamente por métodos cualitativos como celulolíticas C(+), y las cepas PM4, PM204 y PM301 clasificadas previamente como acelulolíticas C(-). Después de 8, 16 y 24 días de incubación se cuantificaron los azúcares reductores. Los resultados obtenidos de este proceso se muestran en las **Tablas 4.25, 4.26 y 4.27** así como en las **Figuras 4.11, 4.12 y 4.13**.

De los resultados en la **Tabla 4.25** se observa que a los 8 días de incubación, las cuatro cepas clasificadas previamente como C(-) presentaron, en el medio tipo C(-), una mayor liberación de azúcares, de 0.532 a 1.440 mg/ml, que en el medio tipo C(+), en donde los valores fueron 0.478 a 1.111 mg/ml para las mismas cepas. Por otro lado, las cuatro cepas clasificadas como C(+) presentaron una mayor liberación de azúcares en el medio tipo C(+), de 0.512 a 1.833 mg/ml, no así en el medio tipo C(-) en donde los niveles fueron 0.518 a 1.615 mg/ml. De lo anterior se observa aparentemente que, a los 8 días de incubación, las cepas clasificadas como acelulolíticas se ven favorecidas en su producción de celulasas por el medio llamado tipo C(-). De igual manera, el medio tipo C(+) favoreció la producción de celulasas de las cepas

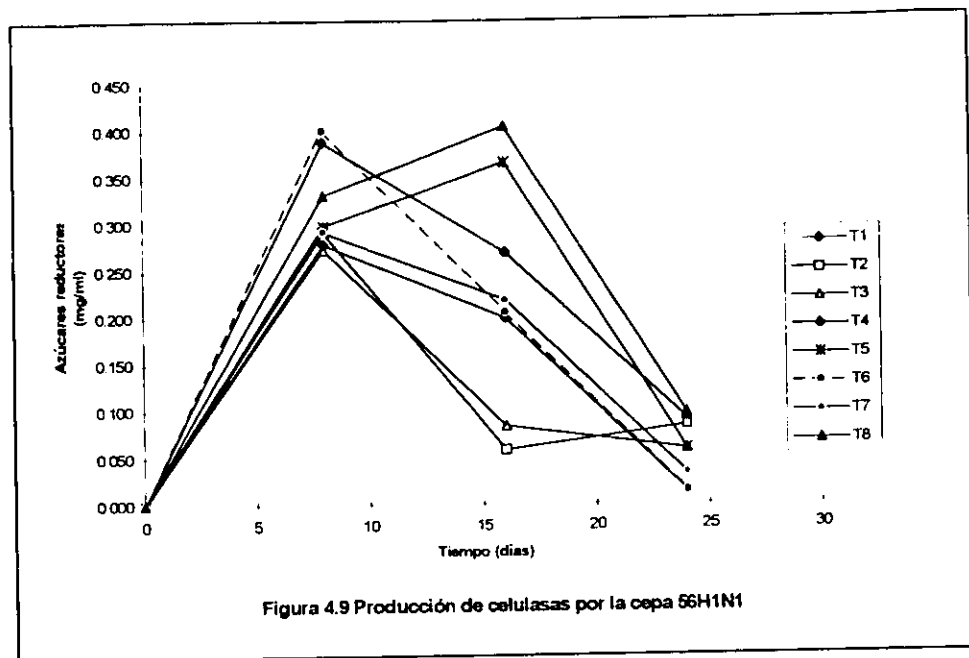


TABLA 4.20. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA FRENTE A PAPEL FILTRO DE LA CEPA 56H1N1*.

Medios	COMPOSICIÓN (g/l)			Azúcares reductores (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	pH final $\bar{x} \pm \sigma$
	Celulosa microcristalina	Peptona	Tween 80		
1	2.4	0.63	0.98	0.270 \pm 0.026	4.62 \pm 0.02
2	5.6	0.63	0.98	0.058 \pm 0.008	4.68 \pm 0.30
3	2.4	1.17	0.98	0.083 \pm 0.011	5.07 \pm 0.41
4	2.4	0.63	1.82	0.199 \pm 0.020	4.73 \pm 0.34
5	5.6	1.17	0.98	0.366 \pm 0.017	5.09 \pm 0.89
6	2.4	1.17	1.82	0.205 \pm 0.006	5.13 \pm 0.72
7	5.6	0.63	1.82	0.218 \pm 0.009	4.88 \pm 0.29
8	5.6	1.17	1.82	0.404 \pm 0.034	5.69 \pm 0.87

*A 16 días de incubación

TABLA 4.21. CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES DE REGRESIÓN DE CADA COMPONENTE DEL MEDIO CON LA CEPA 56H1N1*.

COMPOSICIÓN (mg/ml)					
Celulosa microcristalina		Peptona		Tween 80	
Actividad celulolítica en los 2 niveles experimentados					
Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
0.388	0.292	0.388	0.273	0.388	0.279
0.273	0.298	0.292	0.298	0.292	0.401
0.279	0.292	0.279	0.401	0.273	0.292
0.401	0.331	0.292	0.331	0.298	0.331
Suma de valores experimentales					
- 1.341	1.213	- 1.251	1.303	- 1.251	1.303
Coefficientes de regresión para cada componente (suma de valor inferior – suma de valor superior) /8					
- 0.016		0.0065		0.0065	

*Según método de Box Wilson

TABLA 4.22. CÁLCULO DE UNIDADES DE VARIACIÓN PARA CADA COMPONENTE DEL MEDIO PARA LA CEPA 56HINI*.

Componentes	COMPOSICIÓN		
	Celulosa microcristalina	Peptona	Tween 80
Coefficiente	- 0.0160	0.0065	0.0065
Unidad de variación Medio basal	1.60	0.27	0.42
Coefficiente de regresión (g/l)	- 0.0256	0.0017	0.0027
Unidades de variación (Coeficiente/ 0.0256)			
Unidades de variación	-1.0	0.0685	0.1066

TABLA 4.23. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO PARA LA CEPA 56HINI*.

Parámetros	COMPOSICIÓN DEL MEDIO (g/l)		
	Celulosa microcristalina	Peptona	Tween 80
Medio basal	4.0	0.9	1.4
Unidad de variación	- 1.0	0.0685	0.1066
Coefficiente	3.0	0.9685	1.5066

*Segun método de Box Wilson

TABLA 4.24. COMPOSICIÓN DEL MEDIO OPTIMIZADO PARA UNA MÁXIMA PRODUCCIÓN DE CELULASA.

Medio	COMPOSICIÓN DEL MEDIO OPTIMIZADO (g/l)		
	Celulosa microcristalina	Peptona	Tween 80
Tipo (C +)	5.0	1.22	1.82
Tipo (C -)	3.0	0.96	1.50

TABLA 4.25. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE *P. ostreatus* EN EL MEDIO TIPO (C+) Y TIPO (C-)*.

Cepas	Clasificación cualitativa previa	Azúcares reductores (mg/ml)	
		$\bar{x} \pm \sigma$	
		Medio Tipo (C+)	Medio Tipo (C-)
56H1N1	C-	0.478 ± 0.022	0.532 ± 0.011
PM4	C-	0.491 ± 0.021	0.646 ± 0.023
PM204	C-	1.111 ± 0.290	1.447 ± 0.131
PM301	C-	0.586 ± 0.016	0.626 ± 0.031
Mo36	C+	1.030 ± 0.061	0.835 ± 0.005
P403	C+	1.831 ± 0.033	1.615 ± 0.016
P404	C+	0.512 ± 0.005	0.639 ± 0.044
P407	C+	0.525 ± 0.012	0.518 ± 0.009

*A 8 días de incubación

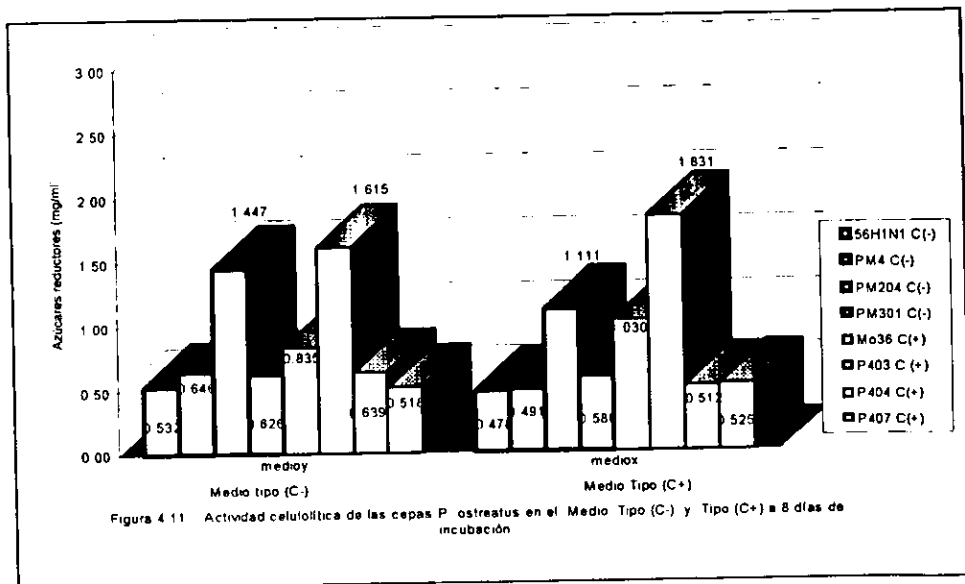


TABLA 4.26. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE *P. ostreatus* EN EL MEDIO TIPO (C+) Y TIPO (C-)*.

Cepas	Clasificación cualitativa previa	Azúcares reductores (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	
		Medio Tipo (C+)	Medio Tipo (C-)
56H1N1	C-	1.801 \pm 0.171	0.719 \pm 0.063
PM4	C-	0.468 \pm 0.036	0.510 \pm 0.021
PM204	C-	1.351 \pm 0.309	1.152 \pm 0.108
PM301	C-	0.726 \pm 0.045	0.803 \pm 0.073
Mo36	C+	1.438 \pm 0.014	0.803 \pm 0.063
P403	C+	1.438 \pm 0.014	1.152 \pm 0.025
P404	C+	3.058 \pm 0.471	0.363 \pm 0.052
P407	C+	0.517 \pm 0.011	0.405 \pm 0.005

*A 16 días de incubación

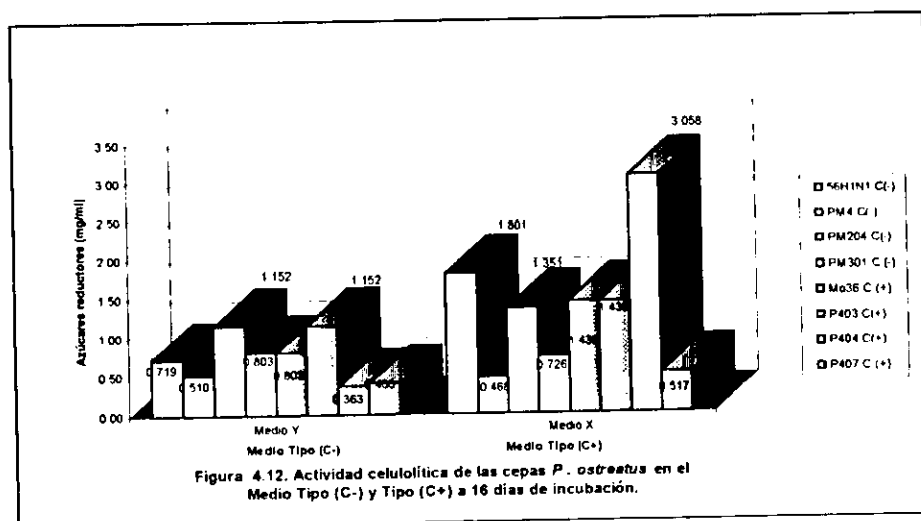
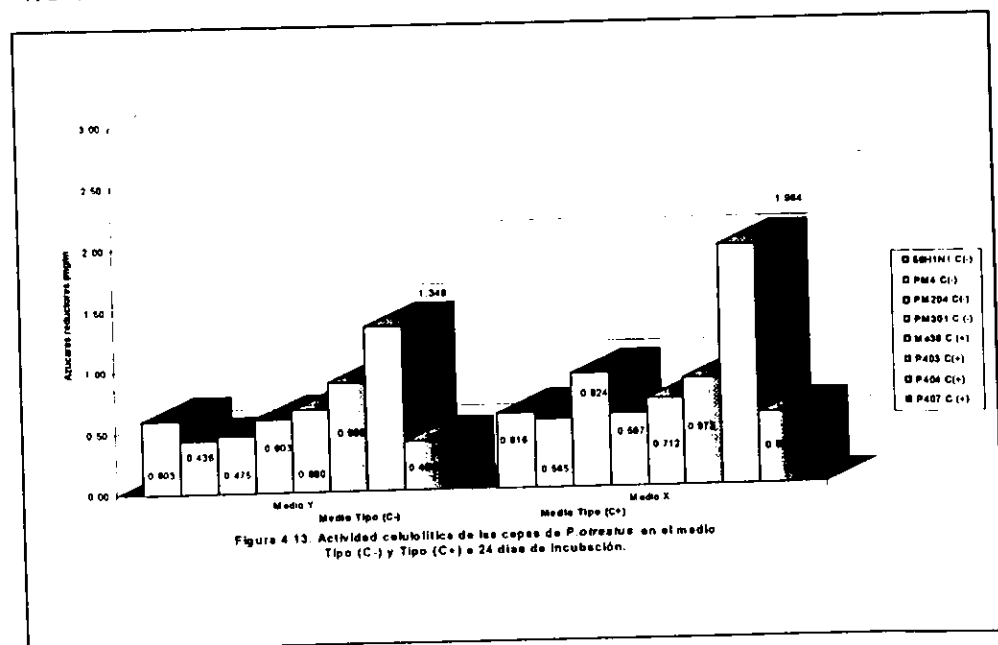


TABLA 4.27. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DE LAS CEPAS DE *P. ostreatus* EN EL MEDIO TIPO (C+) Y TIPO (C-)*.

Cepas	Clasificación cualitativa previa	Azúcares reductores (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	
		Medio Tipo (C+)	Medio Tipo (C-)
56H1N1	C-	0.616 ± 0.014	0.603 ± 0.028
PM4	C-	0.565 ± 0.084	0.436 ± 0.012
PM204	C-	0.924 ± 0.129	0.475 ± 0.032
PM301	C-	0.597 ± 0.025	0.603 ± 0.023
Mo36	C+	0.712 ± 0.048	0.680 ± 0.028
P403	C+	0.873 ± 0.008	0.886 ± 0.007
P404	C+	1.964 ± 0.012	1.348 ± 0.089
P407	C+	0.587 ± 0.008	0.404 ± 0.050

A 24 días de incubación



clasificadas como C(+). Con objeto de corroborar lo anteriormente descrito, se realizó un análisis de varianza, donde se evaluó el efecto de los medios tipo C(+) y tipo C(-), sobre cada una de las cepas encontrándose, diferencias no significativas. Por tanto, se planteó la realización de un análisis de varianza, para valorar el efecto de los medios sobre el grupo de las cepas C(-) y el grupo de las cepas C(+) detectándose nuevamente, diferencias no significativas. No obstante, el análisis de varianza entre las cepas mostró diferencias altamente significativas. Al realizar las pruebas de rango múltiple según Tukey las cepas fueron agrupadas en tres clases a, b y c (ver **Tabla 4.28**). Estos resultados muestran que es posible, proponer criterios más objetivos de clasificación que permitan diferenciar las cepas acelulolítica de las celulolíticas. Las cepas agrupadas en (a) presentan niveles de producción de azúcares reductores bajos (0.4-0.8 mg/ml) se consideran de baja actividad celulolítica. En este grupo se encuentran las cepas 56H1N1, PM4, PM301 P404 y P407. Las cepas agrupadas en (b) presentan niveles de producción de azúcares reductores de 0.8-1.6 mg/ml considerándose de actividad celulolítica intermedia. En este grupo se incluyen las cepas PM204 y Mo. 36. Cabe mencionar que en este grupo se presentan algunas ambigüedades, ya que la cepa PM204 en el medio tipo C(+) se agrupa en a y b, mientras que en el medio tipo C(-) se ubica en los grupos b y c. En cuanto a la cepa Mo. 36 en el medio tipo C(+) y medio tipo C(-) se localizó en los grupos a y b. Finalmente, las cepas agrupadas en (c) presentan niveles de producción de azúcares reductores altos (1.6-3.0 mg/ml) se consideran de alta actividad celulolítica. En este grupo se encuentra la cepa P403 como se aprecia en la **Tabla 4.28**. Pero al realizar la representación gráfica de tales resultados, se observaron claramente tres grupos. Donde las cepas PM204 y Mo. 36 se ubicaron en el grupo b como se muestra en la **Figura 4.14**.

A los 16 días de incubación (**Tabla 4.26**) en la mayoría de las cepas probadas, se observó aparentemente, una mayor liberación de azúcares reductores en el medio tipo C(+), de 0.468 a 3.058 mg/ml, comparada con la obtenida en el medio tipo C(-), la cual fue de 0.363 a 1.152 mg/ml. Es decir, a este tiempo de incubación el medio tipo C(+) aparentemente, favorece de manera indiscriminada la producción de celulasas, tanto para las cepas C(+) como para las cepas C(-). No obstante estos resultados, los criterios de clasificación anteriormente descritos, son aplicables en este tiempo con excepción de las cepas 56H1N1 y P404 que presentaron un comportamiento atípico en el medio Tipo C (+) como se observa en la **Figura 4.15**.

Lo dicho en los párrafos anteriores muestra que los criterios propuestos en este trabajo son aplicables para la clasificación de las cepas incubadas tanto a 8 como a 16 días (Tabla 4.29).

Finalmente, a los 24 días de incubación (Tabla 4.27) no se observaron diferencias importantes en la producción de celulasas entre las cepas, cultivadas en los dos medios.

Con base en los criterios anteriormente descritos, es posible seleccionar aquellas cepas que muestren baja actividad celulolítica como las más adecuadas para una posible aplicación en un proceso de delignificación, ya que probablemente, degradan en una menor proporción la celulosa presente. Adicionalmente, resultaría necesario corroborar su capacidad para degradar la lignina como un segundo criterio de selección. Las cepas que reúnen estas condiciones son la 56H1N1, PM4, PM301 P404 y P407, ya que a los 8 días, presentan niveles de producción de azúcares reductores bajos (0.4-0.8 mg/ml). En el otro extremo se encuentra la cepa P403 que mostró un comportamiento altamente celulolítico. Tal criterio servirá como una herramienta de gran valor para planear la obtención de híbridos mejorados. No obstante, para una selección final, los híbridos deberán ser cultivados en substratos lignocelulósicos para evaluar los cambios en su composición.

Por otro lado, es importante aclarar que de acuerdo con los resultados descritos previamente, las cepas probadas presentaron una misma respuesta con ambos medios optimizados es decir, que cualquiera de los dos medios permitió la clasificación de las cepas. Pero esto no debe descartar la necesidad de optimizar el medio, ya que según la literatura la composición del medio es fundamental para que se exprese o no la actividad celulolítica. Por lo Tanto, los criterios aquí propuestos resultan ser más adecuados que los propuestos por Rautela (1966), quien propuso un método común para determinar si un hongo produce celulasas extracelulares al crecerlo en tubos conteniendo medio de agar con celulosa. Puesto que el medio es opaco, aquellos hongos con celulasas forman zonas claras debajo del micelio mientras que los hongos sin celulasas no presentan cambio alguno en el medio. Sin embargo no advierte que ciertos componentes adicionados al medio permiten la manifestación de celulasas o, inclusive, incrementan su actividad. Por su parte Eriksson (1974) previó este comportamiento modificando dicha técnica al emplear un medio compuesto por 0.1% glucosa y 0.25% de extracto de levadura además de la celulosa. Para medir la capacidad celulolítica de cepas mutantes de *Polyporus adustus*, Eriksson (1974) adicionó el extracto de levadura para asegurarse que las mutantes acelulolíticas de este hongo no fueran del tipo de las mutantes *Collybia velutipes*, que muestran

muy baja actividad de celulasas en ausencia de extracto de levadura en el medio, y actividades normales en presencia de éste (Norkran y Aschan, 1953).

A lo largo del presente trabajo, se plantearon varios métodos que permitieron evaluar cuantitativamente la habilidad de distintas cepas de *P. ostreatus* para degradar celulosa. En principio, con cepas celulolíticas se encontró una escasa actividad, debido quizás a la alta concentración de celulosa empleada y la falta de una fuente de nitrógeno orgánica. Por tanto es probable que el sistema enzimático no estuviera presente en el medio. Por consiguiente los métodos inicialmente planteados no detectaron actividad. Cabe mencionar que según la literatura (Gilligan y Reese, 1954) *P. ostreatus* posee un sistema enzimático que actúa de manera sinérgica y requiere ser inducido.

La inducción de dicho sistema enzimático se ve influida de manera diferenciada por la concentración de los componentes, así como el tipo de estos presentes en el medio (Garzillo, 1992, 1994; Kerem, 1992). En el medio pueden encontrarse compuestos de fácil difusión (Celobiosa, celodextrina, etc.), o derivados de celulosa, los que pueden actuar como inductores directos o bien, posteriormente, ser transformados por enzimas intracelulares en inductores más eficientes (Coughlan, 1985; Uzcategui, 1991). Por otro lado, la peptona actúa como fuente de nitrógeno para la síntesis de enzimas y su concentración puede influir aumentando o disminuyendo la producción de celulasas. Huitrón (1986) al trabajar con *Aureobasidium sp.* confirmó lo anterior. Posteriormente, Eriksson y Petterson (1982) encontraron dos tipos de proteasas que incrementan la actividad de las endoglucanasas de *Sporotrichum pulverulentum*. Por su parte, el surfactante Tween 80 actúa incrementando la actividad de las celulasas, posiblemente debido a cambios en la permeabilidad de la célula mas no en la producción de celulasas (Reese, 1969). Con base en lo anterior se decidió modificar la composición del medio apoyándose en un diseño estadístico empleando el método de Box Wilson. Los componentes del medio fueron optimizados para una producción máxima de celulasas para posteriormente, establecer los criterios cuantitativos que permitan seleccionar las cepas por sus habilidades para degradar la celulosa. Tal método posee la ventaja de ser relativamente rápido y sencillo, permite establecer la composición óptima del medio de acuerdo a las cepas, así como establecer criterios cuantitativos de selección. Por otro lado, es importante considerar que para la aplicación de este método en otros organismos es necesario considerar que los sistemas celulolíticos varían de una cepa a otra según los reportes de Garzillo (1992, 1994) y de Kerem (1992), por lo que se

requeriría hacer una evaluación de los posibles componentes del medio necesarios para inducir una producción máxima de celulasas, así como de las condiciones de cultivo.

Los criterios de selección expuestos en el presente trabajo son una herramienta de gran importancia para planear la obtención de híbridos mejorados. Esto se confirma, puesto que la cepa P403, según los criterios antes expuestos, es clasificada como de alta actividad celulolítica. Dicha cepa fue sometida a la acción de un mutágeno por Ramírez (1989) y a partir de esta obtuvo la cepa 56H1N1, a la que consideró como mutante acelulolítica total. Sin embargo, al aplicar los criterios propuestos, esta cepa fue clasificada de baja actividad celulolítica, lo cual comprueba una atenuación de la capacidad celulolítica como consecuencia de la acción del mutágeno. Por otro lado, debido su baja actividad fue seleccionada para obtener el híbrido mejorado 56H1N1 x Mo 36 de cuya progenie Ramírez (1989) obtuvo el monocariote PM4, clasificado por ella como acelulolítico. Según los criterios aquí propuestos este monocariote, fue clasificado como de baja actividad. De igual forma, el monocariote PM301 se obtuvo de la progenie del híbrido mejorado 9H4N2 x Mo. 36 y se clasificó también como de baja actividad. Esto demuestra que los criterios cuantitativos aquí propuestos son de gran importancia para identificar las cepas de baja actividad celulolítica, a lo largo del proceso de mejoramiento genético de cepas (**Figura 4.16**).

TABLA 4.28 RECLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *P. ostreatus* EN LOS MEDIOS TIPO C (+) Y C (-) CON BASE EN SU ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y SEGÚN PRUEBA DE TUKEY*.

Cepas	Clasificación cualitativa previa	Azúcares reductores (mg/ml)	Grupos			Reclasificación
		$\bar{x} \pm \sigma$				
		Medio Tipo (C+)				
56H1N1	C-	0.478 ± 0.022	a			Baja actividad
PM4	C-	0.491 ± 0.021	a			Baja actividad
PM204	C-	1.111 ± 0.290	a	b		Actividad intermedia
PM301	C-	0.586 ± 0.016	a			Baja actividad
Mo36	C+	1.030 ± 0.061	a	b		Actividad intermedia
P403	C+	1.831 ± 0.033		b		Alta actividad
P404	C+	0.512 ± 0.005	a			Baja actividad
P407	C+	0.525 ± 0.012	a			Baja actividad
Cepas	Clasificación cualitativa previa	Medio Tipo (C-)	Grupos			Reclasificación
56H1N1	C-	0.532 ± 0.011	a			Baja actividad
PM4	C-	0.646 ± 0.023	a			Baja actividad
PM204	C-	1.447 ± 0.131		b	c	Actividad intermedia
PM301	C-	0.626 ± 0.031	a			Baja actividad
Mo36	C+	0.835 ± 0.005	a	b		Actividad intermedia
P403	C+	1.615 ± 0.016			c	Alta actividad
P404	C+	0.639 ± 0.044	a			Baja actividad
P407	C+	0.518 ± 0.009	a			Baja actividad

* A 8 días de incubación

TABLA 4.29 CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *P. ostreatus* EN EL MEDIO TIPO (C+) Y TIPO (C-) A 8 Y 16 DÍAS DE INCUBACIÓN.

Cepas	8 Días		16 Días	
	Medio Tipo (C+)	Medio Tipo (C-)	Medio Tipo (C+)	Medio Tipo (C-)
56H1N1	a	a	b	a
PM4	a	a	a	a
PM301	a	a	a	a
P404	a	a	c	a
P407	a	a	a	a
Mo. 36	a b	a b	b	a
PM204	a b	b c	b	b
P403	b	c	b	b

a= baja actividad celulolítica

b= actividad intermedia

c= alta actividad

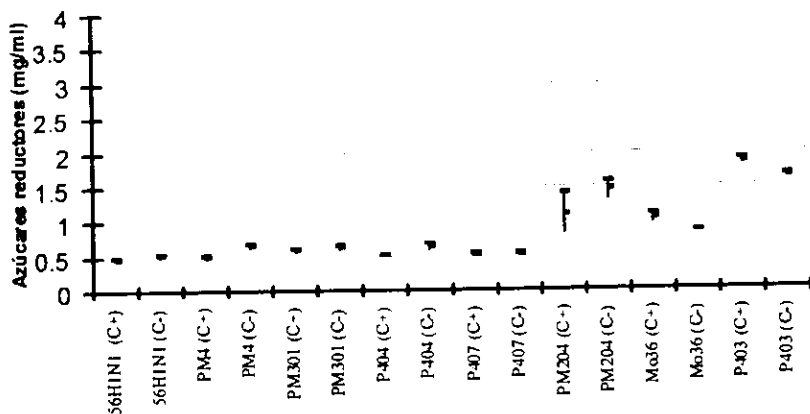


Figura 4.14 Clasificación de las cepas según su capacidad celulolítica a 8 días en los medios Tipo (C+) y Tipo (C-).

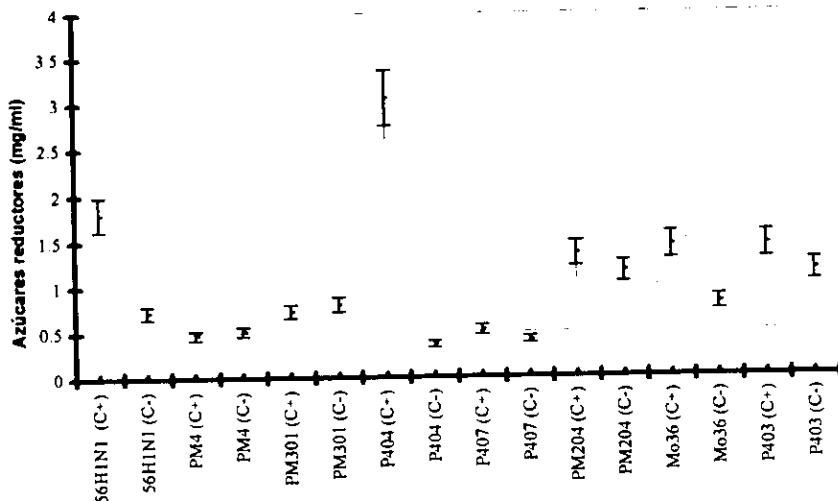
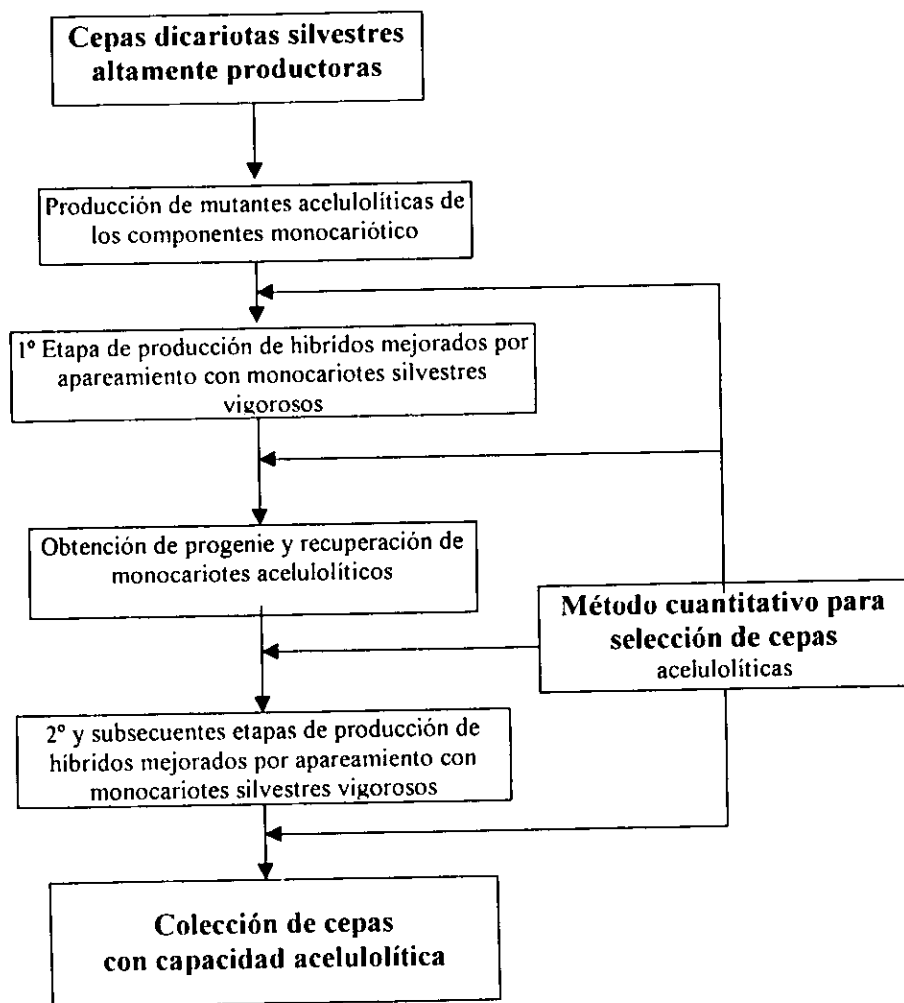


Figura 4.15 Clasificación de cepas según su capacidad celulolítica a 16 días en los medios Tipo (C+) y Tipo (C-)

Por último, como ya se ha discutido en el presente trabajo el método de selección aquí propuesto posee varias ventajas sobre los empleados anteriormente; por lo que no está por demás puntualizarlas:

Método convencional (Rautela).	Método modificado (Eriksson).	Método cualitativo por formación de halos de claridad (Ramírez).	Método cuantitativo propuesto (Pérez).
Tubos conteniendo medio de agar con celulosa. (Medio no optimizado)	Tubos conteniendo medio de agar con celulosa (Medio no optimizado)	La formación de halos de clarificación en medios de peptona-papel filtro y celulosa doble capa modificado (Medio no optimizado).	Optimización del medio de acuerdo al método estadístico de Box Wilson y determinación de la actividad celulolítica conforme al método de Mandels (1976) midiéndose los azúcares reductores por el método de Miller (1959)
No advierte que ciertos componentes adicionados al medio permiten la manifestación de celulasas o inclusive, incrementan su actividad.	Modifica técnica de Rautela previó que ciertos componentes adicionados al medio permiten la manifestación de celulasas o, inclusive, incrementan su actividad por lo que emplea un medio compuesto por 0.1% glucosa y 0.25% de extracto de levadura además de la celulosa.	No advierte que ciertos componentes adicionados al medio permiten la manifestación de celulasas o, inclusive, incrementan su actividad.	Se advierte que ciertos componentes adicionados al medio permiten la manifestación de celulasas o inclusive, incrementan su actividad.
Criterios cualitativos de clasificación: los hongos con celulasas formaran zonas claras debajo del micelio mientras que los hongos sin celulasas no presentaran cambio alguno en el medio.	Criterios cualitativos de clasificación: los hongos con celulasas formaran zonas claras debajo del micelio mientras que los hongos sin celulasas no presentaran cambio alguno en el medio.	Criterio cualitativo de selección: presencia de zonas claras (halo de claridad) debajo del micelio indica capacidad celulolítica y la ausencia de celulasas no presenta halo. Su evaluación del carácter celulolítico requiere de dos métodos complementarios: 1) Peptona-papel filtro. 2) Medio modificado de doble capa.	Se identifica tres grupos de cepas: a) De baja actividad celulolítica con una producción (0.4-0.8 mg/ml) de azúcares reductores. b) De actividad celulolítica intermedia con una producción (0.8-1.6 mg/ml) de azúcares reductores. c) De actividad celulolítica alta con una producción (1.6-3.0 mg/ml) de azúcares reductores.
Susceptible de evaluaciones erróneas.	Susceptible de evaluaciones erróneas.	Susceptible de evaluaciones erróneas.	Evaluaciones de mayor confiabilidad
		En varios casos no se aprecia la formación del halo debido al rápido crecimiento micelial.	El micelio no interfiere en la evaluación
Eficacia del método			
Deficiente.	Deficiente	Debido a que una cepa presenta un comportamiento celulolítico diferente en ambos métodos de evaluación.	Ya que prevé un comportamiento celulolítico más definido y claro.
No recomendable como herramienta para planear la obtención de híbridos mejorados debido a sus limitaciones	No recomendable como herramienta para planear la obtención de híbridos mejorados debido a sus limitaciones	No recomendable como herramienta para planear la obtención de híbridos mejorados debido a sus limitaciones	Recomendado como herramienta para planear la obtención de híbridos mejorados
	Métodos sencillos y rápidos		Método relativamente sencillo y rápido

FIGURA 4.16. PROCESO GENERAL PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LAS CEPAS DE *P. ostreatus*.



5. CONCLUSIONES

A lo largo del presente trabajo se plantearon varias metodologías encaminadas a evaluar cuantitativamente la habilidad de las cepas para degradar celulosa. Con bases en los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1) En la detección de halos celulolíticos en placas de agar con celulosa teñida las cepas silvestres (8x3, IAP y PI8) no presentaron halos, mientras que solo se observaron halos claros al emplear enzima celulolíticas de *A. niger*, cuya dimensión dependía de la concentración de enzima, del tiempo de incubación y de la concentración de celulosa. Se observó que a concentraciones de 1% de celulosa ó superiores se inhibe marcadamente la degradación de la misma.
- 2) Al evaluar la actividad celulolítica mediante la liberación de color en un medio líquido con celulosa teñida, las cepas silvestres (8x3, IAP y PI8) presentaron muy bajos consumos (2 a 2.6%)
- 3) Al determinar el consumo de celulosa empleando medios sólidos, la cepa PI8 consumió 60.4 y 90.6% de la celulosa inicial al emplear estos medios con películas de celofán, mientras que con películas de polipropileno se registró 12 y 37% respectivamente. La producción de biomasa y el crecimiento micelial fueron mayores con películas de polipropileno. No obstante que esta técnica permite cuantificar la capacidad celulolítica, se presentan ciertas dificultades técnicas que limitan seriamente su uso como método estándar.
- 4) De acuerdo con los reportes en la literatura que indican que la composición del medio influye sobre la producción de celulasas, se propuso la optimización del medio para las diferentes cepas probadas. Se encontró así un medio tipo C (-) y un medio tipo C (+) que al evaluar su efecto sobre las cepas por medio de un análisis de varianza este indicó que no había diferencia significativa en la producción de celulosa entre los medios empleados y las diferentes cepas.

- 5) Por otro lado en la producción de azúcares por las cepas, el análisis de varianza indicó, entre éstas diferentes altamente significativa. Al realizar las pruebas de rango múltiple según Tukey las cepas fueron agrupadas en tres categorías (a, b y c). Proponiéndose los siguientes criterios de clasificación:
- Las cepas agrupadas en (a) presentan niveles de producción de azúcares reductores bajos (0.4-0.8 mg/ml) se consideran de baja actividad celulolítica. En este grupo se encuentran las cepas 56111N1, PM4, PM301 P404 y P407.
 - Las cepas agrupadas en (b) presentan niveles de producción de azúcares reductores de 0.8-1.6 mg/ml se consideran de actividad celulolítica intermedia. Se incluyen las cepas PM204 y Mo. 36
 - Las cepas agrupadas en (c) presentan niveles de producción de azúcares reductores altos (1.6-3.0 mg/ml) se consideran de alta actividad celulolítica. En este grupo se encuentra la cepa P403
- 6) Los criterios anteriores pueden servir como herramienta para planear la obtención de híbridos mejorados. Estos deberán ser, no obstante, cultivados en substratos lignocelulósicos para evaluar los cambios en su composición.

RECOMENDACIONES

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Debido a que la degradación de la celulosa y de la lignina son procesos simultáneos en los hongos de pudrición blanca, se recomienda determinar la capacidad de los mutantes para degradar lignina empleando un medio con agar y lignina kraft. Esto permitirá evaluar la capacidad real de estas cepas.

Se recomienda evaluar la capacidad de las cepas con capacidad reducida, en substratos lignocelulósicos para cuantificar cambios en la composición

Para evaluar la capacidad celulolítica de otros organismos, es importante considerar que los sistemas celulolíticos varían de una especie a otra según reportes de Garzillo, (1992, 1994) y Kerem (1992) por lo que es recomendable evaluar diferentes fuentes de carbono, de nitrógeno (tanto orgánico como inorgánico) y otros surfactantes.

BIBLIOGRAFIA

- Adamovi'c M, Grubi'c G, and Milenkovi'c I (1998) "The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding" *Animal Feed Science and Technology*. **71**: 359-364.
- Agosin EB, Monties, and Odier E. (1985) "Structural changes in wheat straw components during decay by lignin-degrading white rot fungi in relation to improvement of digestibility for ruminants". *J. Sci. Food Agric*. **36**: 925-935.
- Aguilera A, Hernández M, and Ramírez, B. (1982) "Delignificación de rastrojo de maíz por *Pleurotus ostreatus*". Tesis de licenciatura, Facultad de Química. México UNAM.
- Ahmedova ZR. (1991) *Cellulases and ligninases of basidiomycetes. Cellulosic. Pulp, fibre and enviromental aspects*. Ed Ellis Horwood England. 371-376.
- Ander P, and Eriksson KE. (1977) "Selective degradation of wood components" *Physiol. Plant*. **41**: 239.
- Avilés EM E. (1988) "Mutantes acelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*. Desarrollo de la metodología para su producción y caracterización". Tesis de Maestría. Departamento de Bioquímica, DEPG. Facultad de Química, UNAM.
- Ayers AR, Ayers SB, and Eriksson KE. (1978) "Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*". *Eur. J. Biochem*. **90**: 171-181.
- Boel E, Hansen MT, and Hoegh I (1984b) "Two different types of intervening sequences in the glucoamylase *Aspergillus niger*" *EMBO J*. **3**: 1581-1585.
- Blazej A. and Kosik M. (1993) *Environmentally acceptable conversion technology for the biochemical utilization of lignocellulosics En: Cellulosics, pulp, fibre and enviromental aspects* Ed Ellis Horwood. England. 355-364
- Dare PH, Clark TA, and Chu-Cho M (1988) "Consumption of substrate components by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during growth and fruiting on softwood and hard-wood-base media" *Process Biochem* **23**: 156-160
- Call HP, and Emeis CC (1983). "Blue pectin: A new sustrate for determining pectinolytic activity" *Journal of Food Biochemistry*. **7**:43-52
- Camacho MG. (1996) "Desarrollo de un método para cuantificar el consumo de celulosa por cepas (C-) de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr. Kummer)" Tesis de licenciatura, UNAM Campus Iztacala.

- Cochran G, William Cox and Gertrude M. (1997) *Diseño Experimental* Ed. Trillas Edición tercera 396-409.
- Coughlan MP. (1985) *In biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Ed. G. E. Russell, Interscience Newcastel-upon-Tyne, UK 3: 37.
- Coughlan MP. (1990) "Cellulose degradation by fungi Fogarty W.M and Kelly C. T. In *Microbial enzymes and biotechnology*" 2 Ed. *Elsevier Applied Science*. 1-28.
- Coutts AD and Smith RE. (1976) "Factors Influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*". *Applied and Enviromental Microbiology* 31: 819-825.
- Deshpande V, Eriksson KE. and Petterson B. (1978) *Eur. J. Biochem.* 90,191
- Enari T.M. and Markkanen P. (1977) *Advances in Biochemical Engineering*. Springer Verlag New York 5:1-21
- Eriksson KE. and Petterson B. (1975 a) "Extracellular enzyme sistem utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* for the breakdown of cellulose". *Eur. J. Biochem.* 51. 193-206.
- Eriksson K. E., and Petterson, B. (1975 b) "Extracellular enzyme sistem utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* for the breakdown of cellulose". *Eur. J. Biochem.* 51: 213-218.
- Eriksson K. E., and Petterson, B. (1982) "Properties of pulps from thermomechanical pulping of chip pretreated with fungi". *Svensk papperstidning* 25: 33-34.
- Eriksson KE. (1981a) "Fungal degradation of wood components". *Pure Appl Chem.* 53: 33-43.
- Eriksson KE. and Goodell EW. (1974) "Pleiotropic mutants of the wood-rotting fungus *Polyporus adustus* lacking cellulase, mannanase, and xylanase". *Can. J. Microbiol* 20: 371-378.
- Eriksson, KE. (1993) "Concluding remarks: Where do we stand and where are we going?". *J. of Biotechnology* 30: 149-158.
- Eriksson KL. Blanchette RA. and Ander P. (1990) *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag, New York.
- Fan LT, Lee YH and Gharpuray MM. (1977) "The nature of lignocellulosic and their pretreatment for enzymatic hydrolysis". *Adv. Biochem.* 23: 155-189.
- Garzillo AM. Di. Paolo SV, and Burla G (1992) "Differenty-induced Extarcellular Phenol Oxidases from *Pleurotus ostreatus*". *Phytochemistry.* 31: 3685-3690.

- Garzillo AM, Ruzzi M. and Buonocore V. (1994) "Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*". *Appl. Microbiol Biotechnol* **42**: 476-481.
- Gerhartz, W. (1990) *Enzymes in Industry. Production and Applications* VCH Publishers Federal Republic of Germany. 33-90.
- Gilligan, W., and Reese, E. T. (1954) *Canadian Journal of Microbiology* **1**: 90
- Gold MH, Wariisshi H. and Valli K (1989) "Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". *ACS Symp Ser* **389**: 127-140.
- Gujral GS, Bisaria R, Madan M, and Vasudevan P. (1987) "Solid state fermentation of *Saccharum munja* residues into food through *Pleurotus* cultivation". *J. Ferment Technol* **65**: 101-105.
- Houtman C and Atalla HR. (1995) "Cellulose-Lignin Interaction" *Plant. Physiol* **107**: 977-984.
- Huitron C, Gilbón A and Lario G. (1986) "Producción de celulasas por un hongo levadeiforme que degrada celulosa cristalina" *Biotecnología de enzimas* 39-52.
- Hüttermann, A., and Noelle, A. (1982) *Holzforschung* **36**, 283.
- Kelleher Jr. TJ. (1981) *The ligninolytic activity of Phanerochaete chrysosporium Burds: Regulation and application*. Dissertation. Rutgers University, New Brunswick, New Jersey.
- Kerem Z, Friesem D. and Hader Y. (1992) "Lignocelulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanaerochaete chrysosporium*". *Appl. and Environmental Microbiology*. **4758(4)**: 1121-1127.
- Keyser P, Kirk TK. and Zeikus JG (1978) "Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation". *J Bacteriol*. **135**: 790-797.
- King NJ. (1966) "The extracellular enzymes of *Coniophora cerebella*". *Biochem. J.* **100**: 784-792.
- Kirk TK. and Moore WE. (1972) "Removing lignin from wood with white-rot fungi and digestibility of resulting wood". *Wood Fiber* **514**: 172-179.
- Kirkpatrick N, Reid ID, Ziomek E, Ho C. and Paice MG. (1989) "Relationship between fungal biomass production and the brightening of hardwood kraft pulp by *Coriolus versicolor*" *Appl. Environ Microbiol* **55**: 1147-1152.
- Kirk TK, Schultz E, Connors WJ, Lorenz LF. and Zeikus JG. (1978) "Influence of culture parameter on lignin metabolism by *Phanerochaete Chrysosporium*". *Arch.*

Microbiol. 117: 277-285.

Klein B. and Weissman M. (1953) "New color Reagent for determination of Hexoses: Determination of Glucose in Blood Serum". *Anal. Chem.* 25 (5): 771-774.

Leal-Lara H. y Ramírez-Carrillo R (1992) Potencialidades del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* para el aprovechamiento de residuos agroindustriales. Cuadernos de Posgrado No. 32, Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, México.

Mandels M, Andreotti RY. and Rocho Ch. (1976) "Measurement of saccharifying cellulase". *Biotechnol y Bioeng. Symp.* 621-623.

Mandels M. and Weber, J. (1969) "In cellulases and their applications". *Adv. Chem. Series.* 95: 391-414

Miller GL. (1959) "Use of dinitrosalicylic as reagent for the determination of reducing sugars". *Anal. Chem* 31. 426-428.

Moyson E, De Smet K and Verachttert H (1991) "Biodegradation of wheat straw by higher fungi." In: Verachttert H, Verstraete W (eds) International Symposium on Enviromental Biotechnology, Ostend, Belgium, Royal Flemish Society of Engineers, Antwerp 22-25: 539.

Norkrans B. and Aschan K. (1953) "A study in the cellulolytic variation for wild types and mutans of *Collybia velutipes*. II. Relation to different nutrient media". *Physiol. Plant* 6: 829-836.

Palmieri G, Giardina P. and Marzullo L (1993) "Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 632-636.

Penttila ME and Nevalaine KM (1984) "Cloning of *Aspergillus niger* genes in yeast. Expression of the gene coding *Aspergillus* β -glucosidasa". *Mol Gen. Genet.* 194: 494-499.

Poincelot PR. and Day PR. (1972) "Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi". *Appl. Microbiol* 25 (5) 875-879.

Ramírez CR. (1989) "Producción y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la ligninocelulosa". Tesis de maestría en biotecnología. Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM.

Ramírez-Carrillo R, Leal-Lara H. and Eger-Hummel G. (1991) *Genetic control of cellulose Degradation by Pleurotus ostreatus En: Science and Cultivation of Edible Fungi.* Ed: Maher J. 1: 11-15.

- Ramírez-Carrillo R, Leal-Lara H, Eger-Hummel G., F. Padilla and Alcántara M. (1993) "Biological degradation of lignocellulose using *Pleurotus ostreatus* strains obtained by genetic manipulation". En: Cellulosics: Pulp, Fiber and Environmental Aspects Ed: Kennedy J. F., G. O. Phillips and P.A. Williams, Ellis Horwood Ltd. New York. 1: 1415-420.
- Rautel GS. and Cowling EB. (1966) "Simple cultural Test for relative cellulotic activity of fungi". *Appl. Microbiol.* 14: 892-898.
- Raymond A. and Mandels M. (1976) "Measurement of Saccharifying Cellulase". *Biotechnol. & Bioeng. Symp.* 6: 21-33.
- Reese, E. T. and Shibata. Y. (1965) " β -mannanases of fungi". *Can. J Microbiol.* 11: 167-183.
- Reese ET. and Mandels (1963) *Enzymatic hidrolisis of β -glucans. In Advances in enzymic hidrolisis of cellulose and related materials.* Edited by E. T. Reese. Pergamon Press, Oxford. 197-234.
- Reese ET, Lola JL and Parrish FW. (1969) "Estimation of exo- β -1-4-glucanase in crude cellulase solutions". *Adv. Chem. Ser.* 95: 26-33.
- Saddler JN. and Khan AW. (1980) "Cellulose production by *Acetivibrio cellulolyticus*". *Can J. Microbiol.* 26: 760-765.
- Sarkanen KV. and Ludwig CH. (1971) *Lignins: Ocurrence formation. Structure and Reactions.* Wiley-Interscience, New York.
- Sorensen H. (1952) "On the specificity and products of action of xylanase from *Chaetomium globosum*". *Kunze. Physiol. Plant.* 5: 183-198.
- Schemaker HE and Leisola MSA (1990) "Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*". *J. Biotechnol* 13: 101-109.
- Streamer, M. Eriksson K. E., and Petterson, B. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 607. 197
- Tah-Mun Su. (1976) "Comments on the papers presented at the cellulase production". *Biotechnol. y Bioeng. Symp.* 683-89.
- Tanaka, M., Taniguchi, M., and Moringoa, T (1980). *J. Ferment. Technol.* 58 (2): 149-154.
- Taniguchi, M., Tanaka, M. Matsuno, R. And Kamikubo, T., (1980) *J. Ferment. Technol.* 58 (2): 143-148.

- Uzcategui E, Raices M. and Eriksson KE. (1991) "Pilot production and purification of cellulolytic enzyme system from the white-rot fungus *Phanerochaete Chrysosporum*". *Biotechnol. Appl. Biochem* **13**: 323-334.
- Vaheri, MP. (1982 a) "Acidic Degradation Production of Cellulose during Enzymatic Hydrolysis by *Trichoderma reesei*". *J. Appl. Biochem* **4**: 153
- Varadi J. (1972) "The effect of aromatic compounds on cellulase and xylanase production of fungi *Schizophyllum commune* and *Chaetomium globosum*. In Biodeterioration of materials". Edited by A. H Walters and E. H. Hueck-van der Plas. *Appl. Sci. Publ. London*. **2**: 129-135.
- Walseth CS. (1952) "Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms". *Tappi. J. Tech. Assoc Pulp. Pap. Ind.* **35**: 228-233.
- Westermarck, U., and Eriksson, K. E., (1974 a) "Carbohydrate-dependent enzyme quinone reduction during lignin degradation". *Acta Chem. Scand. Ser. B* **28**: 204-208.
- Westermarck, U., and Eriksson, K. E., (1974 b). "Cellobiose:quinone oxidoreductase a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi". *Acta Chem. Scand. Ser. B* **28**: 209-214.
- Youn H-D, Chil Hah Y. and Kang S-O (1995) "Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi" *FEM Microbiology Letters* **132**:183-188.