



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE LACASAS
Y ALGUNAS HIDROLASAS DE *Hericium erinaceus*
EN CULTIVO SÓLIDO**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN III

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ESTEFANY SÁNCHEZ MALDONADO

CODIRECTORAS

DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

DRA. MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2022

De los miedos nacen los corajes; y de las dudas, las certezas. Los sueños anuncian otra realidad posible y los delirios, otra razón.

Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos.

Eduardo Galeano.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis:

Doctora Maura Téllez Téllez, por todo el apoyo que me dio para poder realizar esta investigación, por compartir su conocimiento conmigo y enseñarme todo cuanto aprendí durante este tiempo, muchas gracias de verdad por todo.

Doctora Ma. de Lourdes Acosta Urdapilleta, por compartirme sus conocimientos, por apoyarme siempre, por la confianza, por todo cuanto ha hecho por mí, no tengo cómo agradecerle tanto.

A los miembros del comité sinodal:

Doctor Edgar Martínez Fernández

Doctor Gerardo Díaz Godínez

Doctora Anabel Ortiz Caltempa

Maestra Alma Delia Sánchez García

Agradezco sus revisiones, sus comentarios y el tiempo dedicado a la evaluación de este proyecto de investigación. Gracias por leer el escrito y estar presentes en los seminarios, gracias por sus preguntas y sus observaciones que me ayudaron a mejorar mi investigación.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, donde me formé como bióloga. Buscaba respuestas y ahora tengo muchas más preguntas.

Al Centro de Investigaciones Biológicas, lugar donde se realizó esta investigación.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por ser mi casa de estudios, mi *alma mater*.

DEDICATORIA

A mi mamá Bertha que siempre me apoyó, que siempre creyó en mí, a quien debo todo lo que soy y por quien he llegado hasta aquí. Gracias por todo el amor y la comprensión, gracias por tanto y por todo.

A mi papá Raúl que me dio el ejemplo de que siempre se puede trabajar por lo que uno quiere, que siempre hay caminos, que no te puedes rendir sin intentarlo de mil formas.

A mis hermanas Ceci y Marichuy que me han dado los ánimos, la motivación y el cariño, que aguardaron con paciencia cada regreso y que han creído siempre en mí, que son uno de los motores de mi vida.

A mi abuelita Zenaida, por cuidarme, por enseñarme tantas cosas, por darme el ejemplo de la fortaleza; a mi abuelito Sabino, por todo su cariño desde que fui pequeña, por ser mi ejemplo de nobleza y de trabajo. También a mis abuelitos Sotero y Pifa, con quien compartí momentos de mi infancia, gracias por sus enseñanzas.

A mi familia, especialmente a mi tía Rosa y a mi prima Lili. Gracias por todo el apoyo que me han brindado, y porque a pesar de la distancia, siguen estando presentes. También a mi primo Hugo, que recuerdo siempre.

A mi mejor amiga Abi, por todo el tiempo compartido durante la carrera, por tantas risas, por todo el apoyo. Porque siempre quise una amiga como tú y encontrarte, me llenó de alegría.

A mi amigo y mi hermano Mike, gracias por todo el tiempo, por tu comprensión, tu cariño, tu paciencia, tu tolerancia, por acompañarme, por estar siempre, por todo, gracias.

A mi amiga Less, gracias por ser como mi hermana, gracias por esas largas conversaciones, por entenderme, por escucharme, por tus palabras que siempre me dan aliento.

A mi nita, gracias por todo lo que compartimos, por ser parte de mi vida y por apoyarme en cumplir uno de mis sueños. Gracias por estar ahí.

A mis amigos Vivi, Rick, Yola, Valentín, gracias por todos los momentos que hemos compartido, por los viajes, las salidas a campo, gracias por regalarme tantos recuerdos divertidos y alegres que nunca olvidaré.

A mis amigas y compañeras Mariel e Isabel, gracias por el apoyo en el laboratorio, por el trabajo juntas, por acompañarme y por tantas risas.

A mi libro abierto, por el abrazo de cada sublime lectura y por cimbrarme con todas esas páginas, momentos y sueños inolvidables.

A mi pueblo, a mi patria, porque vivo creyendo que se puede luchar por un país mejor, porque creo firmemente que estudiar es un acto revolucionario; porque en palabras de Salvador Allende “ser joven y no ser revolucionario, es una contradicción hasta biológica”.

ÍNDICE	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Hongos degradadores de la madera	3
2.1.1. Pudrición blanda.....	3
2.1.2. Pudrición oscura.....	3
2.1.3. Pudrición blanca.....	4
2.2. Características generales de <i>Hericium erinaceus</i>	5
2.3. Sustratos lignocelulósicos.....	7
2.4. Enzimas extracelulares.....	11
2.4.1. Lacasas.....	11
2.4.2. Amilasas.....	12
2.4.3. Celulasas	13
2.4.4. Invertasas.....	13
2.4.5. Pectinasas.....	14
2.4.6. Xilanasas.....	15
3. ANTECEDENTES	16
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
6. OBJETIVOS	21
6.1. Objetivo general.....	21
6.2. Objetivos específicos	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Material biológico.....	23
7.2. Resiembra de la cepa HEMIM-145.....	23
7.3. Preparación y esterilización de sustratos.....	23
7.4. Inoculación de <i>H. erinaceus</i> en diferentes sustratos	24
7.5. Características morfológicas del micelio de <i>H. erinaceus</i>	24
7.6. Velocidad de crecimiento micelial de <i>H. erinaceus</i>	24
7.7. Obtención de los extractos enzimáticos extracelulares de <i>H. erinaceus</i>	25

7.8. Determinación de la actividad enzimática extracelular de <i>H. erinaceus</i>	25
7.8.1. Enzimas extracelulares	25
7.8.1.1. Lacasas	25
7.8.1.2. Amilasas	25
7.8.1.3. Celulasas	26
7.8.1.4. Invertasas	26
7.8.1.5. Pectinasas	26
7.8.1.6. Xilanasas	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
8.1. Características morfológicas del micelio de <i>H. erinaceus</i>	28
8.1. Velocidad de crecimiento micelial de <i>H. erinaceus</i>	34
8.2. Actividad enzimática extracelular de <i>H. erinaceus</i>	36
8.2.1. Lacasas.....	36
8.2.2. Amilasas.....	38
8.2.3. Celulasas	39
8.2.4. Invertasas.....	40
8.2.5. Pectinasas.....	41
8.2.6. Xilanasas.....	41
9. CONCLUSIÓN	43
10. PERSPECTIVAS.....	44
11. LITERATURA CITADA.....	45
12. ANEXOS	51
12.1. Anexo A: Preparación de DNS	51
13. CONGRESO	52

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Cuerpo fructífero de <i>Hericiium erinaceus</i>	6
Figura 2. Diagrama general de la metodología.....	22
Figura 3. Velocidad de crecimiento micelial de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos (a 20°C)	34
Figura 4. Velocidad de crecimiento micelial de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos (a 25°C)	35
Figura 5. Actividad de lacasas de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos.....	37
Figura 6. Actividad de amilasas de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos.....	39
Figura 7. Actividad de celulasas de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos.....	40
Figura 8. Actividad de invertasas de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos	40
Figura 9. Actividad de pectinasas de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos.....	41
Figura 10. Actividad de xilanasas de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Composición química de algunos sustratos lignocelulósicos.....	8
Tabla 2. Características morfológicas del micelio de <i>Hericiium erinaceus</i> sobre diferentes sustratos a 20°C.....	30
Tabla 3. Características morfológicas del micelio de <i>H. erinaceus</i> sobre diferentes sustratos a 25°C	32

ABREVIATURAS

A:	ausente
Ác:	ácido
AH:	agregaciones hifales
C:	carbono
Ca:	calcio
CBH:	exoglucanasa
CIB:	Centro de Investigaciones Biológicas
Cl:	cloro
cm:	centímetros
CMC:	carboximetilcelulosa
CMCasa:	carboximetilcelulasa
DMP:	2,6-dimetoxifenol
DNS:	ácido dinitrosalicílico
EC:	número de la Comisión de Enzimas
ECE:	extracto crudo enzimático
Ed:	editor
Eds:	editores
<i>et al:</i>	<i>et alii</i> , locución latina que significa "y otros"
etc:	etcétera
Fe:	hierro
FP:	papel filtro
g:	gramos
GPDA:	glucosa, peptona y extracto de levadura (medio basal)
H:	hidrógeno
h:	horas
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrógeno
HEMIM:	Herbario Micológico de Morelos
K:	potasio
L:	litro
M:	molar
Mg:	magnesio
mg:	miligramos
min:	minutos
mL:	mililitros
mm:	milímetros
mM:	milimolar
Mn:	manganeso
N:	nitrógeno

Na:	sodio
Na ₂ SO ₃ :	sulfito de sodio
NaOH:	hidróxido de sodio
nm:	nanómetros
O:	oxígeno
P:	fósforo
PDA:	Agar Papa Dextrosa
pH:	potencial de hidrógeno
pp	páginas
SiO ₂ :	silicio
sp:	especie
SSF:	fermentación en estado sólido
U:	unidad de actividad enzimática
UI:	unidades internacionales
U/gXseca:	unidades por gramo de biomasa seca
UAEM:	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
VC:	velocidad de crecimiento
Zn:	zinc
α :	alfa
β :	beta
γ :	gamma
μ L:	microlitros
μ m:	micrómetros
%:	por ciento
\pm :	más menos
°C:	grados Centígrados

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos heterótrofos cuya nutrición se realiza por absorción. Este tipo de nutrición implica la degradación de los sustratos para incorporar los nutrientes al micelio, lo cual es posible mediante la producción de enzimas extracelulares.

La descomposición de los materiales lignocelulósicos producida por los hongos se denomina pudrición o podredumbre. De acuerdo con la manera en que degradan la lignocelulosa, los hongos se han clasificado en distintos tipos de pudrición: pudrición blanda, pudrición oscura y pudrición blanca; la mayoría de los hongos llevan a cabo ésta última, principalmente los basidiomicetos (Mata y Salmones, 2007; Peralta *et al.*, 2017). Cada tipo de pudrición produce diferentes enzimas, lo que permite a los hongos colonizar diferentes nichos ambientales (Mata *et al.*, 2017).

Se han reportado investigaciones donde se cuantifica y evalúa la actividad enzimática extracelular (principalmente las enzimas oxidasas e hidrolasas) de algunos hongos basidiomicetos de podredumbre blanca tales como: *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor-caju* (Reddy *et al.*, 2003; Khalil *et al.*, 2011), *Coprinus comatus*, *Macrolepiota procera*, *Lentinula edodes* (Fen *et al.*, 2014), *Pycnoporus sanguineus* y *Daedalea elegans* (Chan-Cupul *et al.*, 2016), por mencionar sólo algunos, cuando se utilizan como sustrato de crecimiento desechos biodegradables lignocelulósicos en cultivos sólidos.

Otros estudios han sido realizados con *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers., este hongo presenta gran interés de estudio debido a que, además de ser un hongo comestible, las investigaciones demuestran que es un hongo con importantes propiedades medicinales, entre las que resaltan: actividades neuroprotectoras (Kolotushkina *et al.*, 2003), antihiper glucémicas y antihiperlipidémicas (Wang *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2013), anticancerígenas e inmunomoduladoras (Thongbai *et al.*, 2015), etc.

Sin embargo, aún hacen falta más investigaciones que involucren el estudio de la actividad extracelular de las enzimas de este hongo, tales como: lacasas, amilasas, celulasas, invertasas, pectinasas y xilanasas utilizando materiales lignocelulósicos como sustratos de crecimiento, dado que estas enzimas son de gran importancia para

la industria farmacéutica, alimentaria y textil, así como en los procesos de biorremediación de los ambientes que han sido alterados por contaminantes.

Es por esto, que en este trabajo de investigación se evaluó la actividad enzimática extracelular de lacasas y algunas hidrolasas de *Hericium erinaceus* crecido en cultivo sólido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Hongos degradadores de la madera

Los hongos son los principales organismos descomponedores del material orgánico renovable más abundante en la naturaleza: la lignocelulosa (Peralta *et al.*, 2017), que se compone de lignina, hemicelulosa y celulosa. Basado en la habilidad para degradar lignina junto (o no) con celulosa y hemicelulosa, la degradación de la madera ha sido tradicionalmente dividida en: pudrición blanda, provocada principalmente por ascomicetos; pudrición oscura, también llamada pudrición marrón o parda; y pudrición blanca; éstas dos últimas realizadas principalmente por basidiomicetos (Mata y Salmones, 2007; Peralta *et al.*, 2017). En cada tipo específico de pudrición se producen diferentes enzimas, lo que permite a los hongos colonizar diferentes nichos ambientales (Mata *et al.*, 2017).

2.1.1. Pudrición blanda

El nombre podredumbre (o pudrición) blanda se usa debido a la consistencia blanda de la madera que se descompone por los ascomicetos y los deuteromicetos. En la podredumbre blanda la destrucción de las paredes celulares siempre tiene lugar en las inmediaciones de las hifas. Esto conduce a la degradación de la celulosa y la formación de cavidades dentro de la pared celular, que en la sección transversal aparecen como pequeños agujeros circulares u ovals en la pared secundaria (Schwarze *et al.*, 2000; Mata *et al.*, 2017). Deacon (2006) menciona como ejemplos de hongos de pudrición blanda a especies de los géneros *Chaetomium*, *Ceratocystis*, *Lulworthia*, *Halosphaeria* y *Pleospora*.

2.1.2. Pudrición oscura

El término podredumbre oscura (marrón o parda) se refiere al color característico de la madera descompuesta por ciertos hongos, donde la mayoría de la celulosa y la hemicelulosa se degrada (Deacon, 2006); en lo que respecta a la lignina, los hongos pueden únicamente modificarla y ésta permanece como un residuo polimérico en la degradación de la madera (Arantes y Goodell, 2014).

De acuerdo con Deacon (2006) y Peralta *et al.* (2017), la descomposición es típicamente desigual, con algunos grupos de celdas de madera muy degradadas,

mientras que otros sólo lo son ligeramente. Esto hace que la madera se agriete de manera similar a un ladrillo, lo cual es un rasgo característico de los hongos que realizan este tipo de pudrición.

Las hifas de los hongos de podredumbre parda se producen muy escasamente en la madera, a menudo restringidas a la luz de las células leñosas. Los hongos de podredumbre marrón degradan la celulosa mediante un proceso oxidativo, que implica la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante la descomposición de las hemicelulosas. Al ser una molécula pequeña, el H_2O_2 puede difundirse a través de las paredes celulares leñosas para causar una descomposición generalizada. Este modo de ataque es una forma eficiente de utilizar los escasos recursos de nitrógeno en la madera, ya que no requiere la liberación de grandes cantidades de enzimas extracelulares (Deacon, 2006). Algunas especies que realizan este tipo pudrición son: *Gloeophyllum trabeum*, *Fomes fomentarius* y *Serpula lacrymans* (Peralta *et al.*, 2017).

2.1.3. Pudrición blanca

De acuerdo con Peralta *et al.* (2017), los hongos de pudrición blanca son llamados así debido a la apariencia blanquecina que se observa con frecuencia en la madera que han atacado. Los hongos de podredumbre blanca se pueden dividir en dos subtipos: 1) los degradadores simultáneos, involucrados en la escisión oxidativa de lignina y polisacáridos estructurales a tasas similares, y 2) los delignificadores selectivos, capaces de eliminar la lignina en avance de celulosa y hemicelulosas; el primer subtipo se considera el proceso más común de degradación de la madera y es utilizado por la mayoría de los hongos de pudrición blanca (Skyba *et al.*, 2013).

Peralta *et al.* (2017) mencionan a *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* como ejemplos de especies que realizan este tipo de podredumbre y son de las especies de hongos más comúnmente estudiadas por sus variables capacidades para degradar la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Otros ejemplos de hongos de pudrición blanca son especies del género *Hericium*, como *Hericium cirrhatum*, *Hericium coralloides* y *Hericium erinaceus* (Boddy *et al.*, 2011).

2.2. Características generales de *Hericiium erinaceus*

Hericiium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers. comúnmente conocido como “melena de león”, “cabeza de mono”, “cabeza de oso”, “seta erizo”, entre otros, es un hongo basidiomiceto que se encuentra clasificado dentro de la clase Agaricomycetes, en el orden Russulales, en la familia Hericiaceae y en el género *Hericiium* (Index Fungorum, 2021).

Boddy *et al.* (2011) mencionan que, aunque se ha visto a *H. erinaceus* fructificando en árboles vivos, una investigación más detallada generalmente indica que son en realidad las partes muertas de tales árboles las que albergan el micelio subyacente del hongo, ya que al igual que *H. cirrhatum* y *H. coralloides*, *H. erinaceus* es saprófito de madera muerta. La melena de león se puede encontrar creciendo en árboles muertos o moribundos de robles (*Quercus* sp.), hayas (*Fagus* sp.), arces (*Acer* sp.), nueces (*Juglans* sp.), olmos (*Ulmus* sp.), abedules (*Betula* sp.), sicomoros (*Ficus* sp.), entre otros. Se encuentra con mayor frecuencia en troncos o tocones (Stamets, 2000; Fora *et al.*, 2009).

El hongo *H. erinaceus* se caracteriza por presentar un cuerpo fructífero en forma de una masa globosa blanca de hasta 40 cm de diámetro en la naturaleza, está compuesto de espinas o agujas simples, blandas y descendentes que miden de 2 a 6 cm de longitud, que se disponen en cascada y sin bifurcación; este hongo carece de estípites pues está adherido a los troncos en los que se encuentra. En un principio, el cuerpo fructífero de *H. erinaceus* es típicamente blanco hasta que comienza a envejecer y se decolora a marrón o amarillo marrón, especialmente desde la parte superior (Figura 1) (Stamets, 2000; De Diego, 2009).

El micelio es blanquecino al principio y a medida que envejece se puede volver amarillo claro o rosado, crece formando zonas triangulares de rizomorfos recogidos (hebras trenzadas y retorcidas, a menudo de diferentes diámetros) que irradian desde la sección central densa; las esporas son elipsoides, lisas o ligeramente rugosas y miden alrededor de 5.5–7 × 4.5–5.5 μm (Stamets, 2000).



Figura 1. Cuerpo fructífero de *Hericium erinaceus*

Fuente:

https://www.reddit.com/r/mycology/comments/e9h9i6/was_told_i_should_put_this_in_here_to_o_lions_mane/

El hongo melena de león, además de ser comestible es un hongo medicinal. Se ha reportado que *H. erinaceus* presenta: actividades neuroprotectoras, los extractos de *H. erinaceus* mostraron capacidades para promover el desarrollo normal de las células cerebelosas cultivadas y demostraron un efecto regulador sobre el proceso de génesis de mielina (Kolotushkina *et al.*, 2003); actividad antienvjecimiento, los β -glucanos de *H. erinaceus* mostraron propiedades significativas contra el envejecimiento de la piel en modelos de ratas envejecidas (Xu *et al.*, 2010); actividad antioxidante, Zhang *et al.* (2012) sugirieron que los extractos de *H. erinaceus* pueden ser una buena fuente para aumentar las actividades de enzimas antioxidantes en humanos; efectos antihiper glucémicos y antihiperlipidémicos, éstos se han demostrado en diversos estudios con ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina utilizando extractos de *H. erinaceus* (Wang *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2013); y actividades anticancerígenas e inmunomoduladoras, varios tipos de cáncer pueden tratarse mediante la administración de preparaciones basadas con este hongo, por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer intestinal, cáncer de páncreas y cáncer de estómago (Thongbai *et al.*, 2015).

Se ha informado sobre los efectos beneficiosos de *H. erinaceus* para la salud a partir de estudios con los extractos químicos de los cuerpos fructíferos y el micelio (Khan *et al.*, 2013) con lo que resalta la importancia del cultivo de este hongo.

El cultivo de *H. erinaceus* y otros hongos de pudrición blanca requiere de sustratos compuestos de materiales que le proporcionen las características físicas y la composición química adecuada para su crecimiento y desarrollo en condiciones controladas. Los sustratos lignocelulósicos cumplen con las condiciones generales requeridas por estos hongos (Montoya-Barreto, 2012).

2.3. Sustratos lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos son los principales constituyentes de los vegetales, representados por lignina, celulosa, hemicelulosa y pectina en sus paredes celulares y el almidón utilizado como reserva energética de la célula. Generalmente las materias primas que componen los sustratos que se utilizan para el desarrollo y crecimiento de hongos de pudrición blanca son materiales heterogéneos que poseen, además de las fuentes de carbono, una cantidad de minerales asociados que pueden servir como inductores dependiendo de las concentraciones en las que se encuentren presentes (Montoya-Barreto, 2012).

Algunos de los sustratos que se han utilizado para el cultivo de estos hongos se encuentran en la tabla 1 donde también se incluyen sus principales componentes.

Tabla 1. Composición química de algunos sustratos lignocelulósicos

SUSTRATO	LIGNINA (%)	CELULOSA (%)	HEMICELULOSA (%)	OTROS COMPONENTES (%)	REFERENCIA
Aserrín de jacaranda (<i>Jacaranda</i> sp.)	35.08	49.51	14.86	Ceniza: 0.4	Urrelo <i>et al.</i> (2016)
Cascarilla de cacahuate (<i>Arachis hypogaea</i>)	27-33	35-45	23-30	Grasa: 1-2 Ceniza: 2-4 Humedad: 8-10	Gatani <i>et al.</i> (2010)
Olote de maíz (<i>Zea mays</i>)	15-15.8	45	33.6-35	Ác. acético: 3.7 Ác. urónicos: 3.45 Arabinano: 3.04 Arabinosa: 4.6 Ceniza: 2 Glucosa: 3.2 Grupos acetilo: 3.07 Proteína: 3.25 Xilosa: 35.3	Cruz <i>et al.</i> (2000) Howard <i>et al.</i> (2003) Garrote <i>et al.</i> (2007) Córdoba <i>et al.</i> (2013)
Rastrojo de maíz (<i>Zea mays</i>)	6.8-15	37.6-45.5	27.6-35	Ác. acético: 2.3 Arabinosa: 3.6 Ca: 0.5 Carbohidratos: 71.4 Ceniza: 6.2 Glucosa: 2.0 Grasa: 1.1 P: 0.08 Proteína: 5.7 Xilosa: 22.5	Cruz <i>et al.</i> (2000) García <i>et al.</i> (2005) Rodríguez (2012) Costa <i>et al.</i> (2015)

Tabla 1. Composición química de algunos sustratos lignocelulósicos (*continuación*)

SUSTRATO	LIGNINA (%)	CELULOSA (%)	HEMICELULOSA (%)	OTROS COMPONENTES (%)	REFERENCIA
Salvado de trigo (<i>Triticum</i> sp.)	12.6	37.6	34.5	Ác. fenólicos: 0.761-1.384 Ác. ferúlico: 0.138-0.631 Ác. fítico: 2.3-6.0 Almidón: 21.1-38.9 Arabinosilanos: 5.0-26.9 Ca: 24-150 Ceniza: 5.7-6.5 Fe: 2.5-19.0 Fibra: 35.7-53.4 Humedad: 11.6-12 K: 1 182-1 900 Lípidos: 5-6.3 Mg: 390-640 Mn: 4-14 Na: 2-41 P: 900-1500 Proteína: 9.9-18.6 Zn: 2.5-14.1 β -glucano: 1.1-2.6	Chaquilla-Quilca <i>et al.</i> (2018)
Bagazo de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	25.15	40.19	26.42	Arabinano: 2.00 C: 48.58 Ceniza: 1.26 Cl: 0.05 Galactano: 1.40 Glucano: 40.19 H: 5.97 Humedad: 4 Manano: 0.48 N: 0.2 O: 38.94 Xilano: 22.54	Neureiter <i>et al.</i> (2002) Asadullah <i>et al.</i> (2007) Manals-Cutiño <i>et al.</i> (2015)

Tabla 1. Composición química de algunos sustratos lignocelulósicos (*continuación*)

SUSTRATO	LIGNINA (%)	CELULOSA (%)	HEMICELULOSA (%)	OTROS COMPONENTES (%)	REFERENCIA
Cascarilla de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	9-20	28-36	24	Ác. urónicos: 1.14 Arabinano: 1.68 Ca: 0.6-1.3 Carbohidratos: 26.5-29.8 Ceniza: 14.3 Fibra: 34.5-45.9 Grasa: 0.3-0.8 Grupos acetilo: 1.62 P: 1.3-0.7 Pentosas: 21-22 Proteína: 2.5 SiO ₂ : 18.8-22.3	Garrote <i>et al.</i> (2007) Vargas <i>et al.</i> (2013)
Paja de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	17.2-18	32.1-43.5	18-24	Ác. acético: 1.05 Arabinosa: 3.4 Glucosa: 3.29 Xilosa: 18.33	Sun y Cheng (2002) Mussatto y Roberto (2002) Howard <i>et al.</i> (2003)

Para poder llevar a cabo la descomposición de los materiales lignocelulósicos, los hongos producen enzimas conforme a la composición de estos sustratos y de esta manera obtienen los nutrientes que necesitan para desarrollo desde el crecimiento del micelio (Montoya-Barreto, 2012).

Sokół *et al.* (2016) mencionan que la tasa de crecimiento del micelio del hongo melena de león en el sustrato está estrechamente relacionada con su actividad enzimática; *H. erinaceus* causa la descomposición de lignina, celulosa, hemicelulosa, almidón y demás componentes en el sustrato en que crece, gracias a su producción de enzimas extracelulares.

2.4. Enzimas extracelulares

Las enzimas extracelulares fúngicas actúan fuera de la célula y su principal función es disminuir el tamaño de las moléculas complejas que se encuentran en el medio sobre el que está creciendo el hongo, las cuales posteriormente son absorbidas como fuente de nutrientes y energía (Bommarius y Riebel, 2004).

Las enzimas lignocelulolíticas actualmente han alcanzado gran relevancia por su capacidad de descomponer una amplia variedad de sustratos de origen vegetal, en conjunto, estas enzimas son capaces de transformar moléculas que tienen un campo de aplicación biotecnológica muy interesante así como de degradar compuestos altamente recalcitrantes (Téllez-Jurado *et al.*, 2016) mediante una serie de mecanismos enzimáticos: oxidorreductasas (como las lacasas) e hidrolasas (como las amilasas, celulasas, invertasas, pectinasas y xilanasas) (Peralta *et al.*, 2017).

2.4.1. Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas que contienen cobre que cataliza la oxidación de varios compuestos aromáticos, específicamente fenoles y anilinas, mientras que reducen concomitantemente el oxígeno molecular al agua. La consiguiente reacción de acoplamiento oxidativo es importante en la síntesis de numerosos complejos naturales como sustancias húmicas, ligninas, taninos, melaninas y alcaloides. Esta misma reacción está involucrada en la transformación de numerosos químicos agrícolas e industriales y puede causar, por ejemplo, su incorporación a la materia orgánica del suelo (Gianfreda *et al.*, 1999).

Estas enzimas forman parte de las enzimas ligninolíticas que presentan los hongos de pudrición blanca para degradar la lignina y son secretadas en múltiples isoformas dependiendo de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo (Giardina *et al.*, 1999).

Las lacasas fúngicas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar y algunas veces mineralizar por completo gran variedad de contaminantes en el medio ambiente (Wilkolazka *et al.*, 2002).

Moreira *et al.* (1999) mencionan que las lacasas tienen muchas aplicaciones, como son: clarificación del vino (remover compuestos fenólicos), análisis de drogas (distinguir morfina de codeína), delignificación y procesos de biorremediación (decoloración de efluentes, blanqueamiento y delignificación de la pulpa de papel, degradación de herbicidas, entre otros).

2.4.2. Amilasas

Las amilasas se clasifican en α -amilasas, β -amilasas y γ -amilasas. Las amilasas son hidrolasas que actúan sobre los enlaces glucosídicos α -1-4. Se distribuyen ampliamente en los sistemas vivos y tienen sustratos específicos (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1995; Gupta *et al.*, 2003). Los sustratos de las amilasas están ampliamente disponibles en fuentes vegetales baratas, lo que hace que las aplicaciones potenciales de la enzima sean más abundantes en términos de costos (Gopinath *et al.*, 2017).

Las amilasas se pueden dividir en endoamilasas y exoamilasas. Las endoamilasas catalizan la hidrólisis de manera aleatoria dentro de la molécula de almidón. Esta acción provoca la formación de oligosacáridos lineales y ramificados de varias longitudes de cadena. Las exoamilasas catalizan la hidrólisis del sustrato desde el extremo no reductor, dando como resultado productos finales sucesivamente más cortos (Gupta *et al.*, 2003). Todas las α -amilasas (EC 3.2.1.1) actúan sobre el almidón (polisacárido) como sustrato principal y producen pequeñas unidades de glucosa (monosacárido) y maltosa (disacárido). El almidón está formado por dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina, que comprenden moléculas de glucosa que están conectadas por enlaces glucosídicos (Gopinath *et al.*, 2017).

Téllez-Téllez *et al.* (2013) y Raveendran *et al.* (2018) mencionan que el principal uso de estas enzimas es la hidrólisis parcial o total del almidón para producir dextrinas y jarabes ricos en glucosa. También mencionan que las amilasas reducen la viscosidad de la solución de almidón utilizada en el recubrimiento del papel, retrasan el estancamiento en la industria de la panificación, se usan como suplemento para mejorar la digestión, producen jarabes ricos en maltosa, soluciones con actividad antiinflamatoria y participan en el proceso de malteado de la cebada antes de la fermentación alcohólica en la producción de cerveza.

2.4.3. Celulasas

Las celulasas son enzimas cuyo sustrato es la celulosa polimérica donde hidrolizan los enlaces β -1,4 para liberar unidades de glucosa. Las tres clases principales de celulasas son endo-(1,4)- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.4), exo-(1,4)- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) (Kuhad *et al.*, 2011).

La exoglucanasa (CBH) actúa en los extremos de la cadena de celulosa y libera β -celobiosa como producto final; la endoglucanasa ataca aleatoriamente los enlaces O-glucosídicos internos, lo que resulta en cadenas de glucano de diferentes longitudes; y las β -glucosidasas actúan específicamente sobre los disacáridos de β -celobiosa produciendo glucosa (Bayer *et al.*, 1994; Singh, 1999).

De acuerdo con Kuhad *et al.* (2011) y Téllez-Téllez *et al.* (2013), dada la función de estas enzimas para hidrolizar la celulosa, se han utilizado con diferentes propósitos tales como: aumentar la digestibilidad de las fibras cuando se usan como alimento en rumiantes, favorecer la formación de azúcares fermentables utilizados para la producción de etanol, butanol y metano, actuar contra enfermedades de las plantas, aumentar los rendimientos de jugo, aclarar y estabilizar los vinos, restaurar la suavidad y el brillo del color del algodón, contribuir a la estabilidad del color de los carotenoides, mejorar la extracción de aceite de oliva, etc.

2.4.4. Invertasas

Las invertasas (β -D-fructofuranósido-fructohidrolasa, EC 3.2.1.26) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los residuos terminales de β -fructofuranósido no reductor en β -fructofuranósidos (Romero-Gómez *et al.*, 2000). Uno de los sustratos sobre los

que actúan las invertasas es la sacarosa donde catalizan su hidrólisis a glucosa y fructosa. Estas enzimas son glicoproteínas, y algunos residuos de manosa son el componente principal del resto de carbohidratos. Las invertasas son unas de las enzimas más utilizadas en la industria alimentaria, especialmente en la preparación de mermeladas y dulces (Klein *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1996).

La producción de jarabe de azúcar no cristizable a partir de sacarosa es una de las principales aplicaciones de la enzima invertasa. El jarabe invertido tiene propiedades higroscópicas lo que lo hace útil en la fabricación de caramelos blandos y fondants como ahumectantes (Kotwal y Shankar, 2009). Además, las bebidas alcohólicas, el ácido láctico, el glicerol, etc., que son producidos por fermentación de sustratos que contienen sacarosa, requieren el uso de invertasa. También se asocia con insulinasas para la hidrólisis de inulina (polifruktosa) a fructosa (Sturm, 1999).

2.4.5. Pectinasas

Las pectinasas se pueden clasificar funcionalmente como exo y endo poligalacturonasas (cortan por hidrólisis los enlaces glucosídicos α -1-4), pectina esterasas (remueven los grupos acetilo y metoxilo de la pectina) (Téllez-Téllez *et al.*, 2013) y pectina liasa y pectato liasa, que realizan una descomposición no hidrolítica de pectatos y pectinatos, caracterizada por una división trans-eliminadora del polímero péptico; rompen el enlace glucosídico en C-4 y simultáneamente eliminan el H de C-5 (Ayers *et al.*, 1966; Téllez-Téllez *et al.*, 2013).

El sustrato sobre el que actúan estas enzimas es la pectina. Las moléculas de pectina están formadas por enlaces α -1,4-glucosídicos entre los anillos de piranosa de las unidades de ácido D-galacturónico (Sakai *et al.*, 1993).

De acuerdo con Téllez-Téllez *et al.* (2013), la principal aplicación de las pectinasas es en la industria alimentaria, donde se utilizan para aumentar los rendimientos en la obtención de jugos así como también en la clarificación de éstos y de los vinos; otros usos que se le dan son la aplicación en el tratamiento de aguas residuales de las industrias de frutas y verduras, también se aplican en el procesamiento de fibras textiles como lino, yute y cáñamo, se usan en la fermentación de café y té, son útiles para favorecer la extracción de aceite vegetal y el tratamiento de la pulpa de papel, etc.

2.4.6. Xilanasas

Las principales xilanasas son: las endoxilanasas (endo- β -1,4-xilanasas; EC 3.2.1.8), son las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos β (1-4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños (Biely, 1985); las exoxilanasas, en estas enzimas, el ataque de la molécula de xilano se produciría a partir de un extremo de la misma (y no en el interior de la molécula como sucede en las endoxilanasas), generándose un único tipo de xilooligosacárido como producto de la hidrólisis del xilano (Reilly, 1981; Kubata *et al.*, 1995), este modo de acción equivaldría a la degradación procesiva de celulosa por parte de las exocelulasas (Sánchez *et al.*, 2003); y, por último, las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), enzimas que actúan sobre xilobiosa y xilooligosacáridos cortos no sustituidos, hidrolizando los enlaces β (1-4) y liberando así residuos de D-xilosa a partir del extremo no reductor de estos sustratos (Reilly, 1981).

Como se ha mencionado anteriormente, el sustrato de las xilanasas es el xilano, que está formado por un esqueleto de moléculas de β -D-Xilosa unidas entre sí por enlaces β (1-4), normalmente la cadena de β -D-xilopiranosas presenta ramificaciones laterales de diferente naturaleza, ya que, aunque en algunas plantas se han encontrado homoxilanos formados exclusivamente por xilosa, lo más frecuente es que el xilano se encuentre en forma de heteropolisacárido (Beg *et al.*, 2001).

Estas enzimas tienen diversas funciones: se consideran aditivos que se utilizan para aumentar el volumen del pan; liberan pentosas en el tratamiento enzimático de la alimentación animal y participan en la degradación de los residuos agrícolas; y se utilizan en el blanqueo biológico de la pulpa y el papel. También son ingredientes en detergentes que ayudan al cuidado de las telas, como espesantes y aditivos anticongelantes y participan en la producción de biocombustibles (Téllez-Téllez *et al.*, 2013).

3. ANTECEDENTES

Se han realizado algunas investigaciones con diferentes hongos, principalmente basidiomicetos, para evaluar su actividad enzimática extracelular cuando son cultivados sobre ciertos sustratos lignocelulósicos seleccionados de acuerdo con su disponibilidad en el área de estudio.

En la investigación de García y Torres (2003), se evaluó la capacidad de *Trametes versicolor*, *Pleurotus floridae* y *Phanerochaete chrysosporium* de crecer sobre ciertos desechos agroindustriales y, a partir del crecimiento del micelio, cuantificaron las enzimas lignolíticas que producen estos hongos en los diferentes sustratos a un tiempo fermentativo de 21 días, utilizando las temperaturas óptimas de crecimiento de cada hongo (*T. versicolor* y *P. floridae* a 28°C y *P. chrysosporium* a 37°C). Ellos reportan, respecto a la actividad de lacasa, que ésta se vio favorecida en los siguientes sustratos: salvado de trigo, donde *T. versicolor* obtuvo actividad de 0.94 U/g, *P. floridae* 0.84 U/g y *P. chrysosporium* 1.43 U/g; olote de maíz, con actividades de 1.58 U/g para *T. versicolor*, 3.20 U/g para *P. floridae* y 0.00567 U/g y para *P. chrysosporium*; paja de arroz, que para *T. versicolor* se encontró una actividad de 3.07 U/g, *P. floridae* 3.21 U/g y *P. chrysosporium* no presentó actividad; y paja de trigo, donde *T. versicolor* mostró 3.07 U/g de actividad, *P. floridae* 3.21 U/g y ninguna actividad para *P. chrysosporium*.

En el 2003, Reddy *et al.* emplearon residuos agrícolas de la platanera (*Musa paradisiaca*), que utilizaron de forma separada en biomasa foliar y pseudotallos para, sobre estos sustratos, realizar el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor-caju* con la finalidad de poder determinar la producción de algunas enzimas, entre las que se encuentran: lacasa, xilanasa, endo-1,4- β -D-glucanasa (CMCasa) y exo-1,4- β -D-glucanasa (actividad de papel filtro), durante la degradación de la biomasa de la platanera por estas dos especies del género *Pleurotus*. Realizaron el cultivo a 25°C y tomaron muestras desde el día 10 y posteriormente a intervalos de 5 días hasta el día 40 del crecimiento del micelio.

Al cultivar a *P. ostreatus* sobre biomasa foliar de la platanera, las actividades específicas máximas de las enzimas lacasa y xilanasa se presentaron en el día 20 (1.7106 U/mg⁻¹ y 0.1435 U/mg⁻¹, respectivamente). Los niveles de CMCasa para

endoglucanasa y actividad FP (papel filtro) para exoglucanasa fueron relativamente bajos durante todo el periodo de cultivo. Sobre biomasa de pseudotallo de la platanera, las actividades específicas máximas de lacasa y xilanasa se observaron el día 10 (0.4722 U/mg⁻¹) y el día 20 (0.0408 U/mg⁻¹), respectivamente. De igual forma, detectaron niveles muy bajos de actividades de actividad de CMCasa y FP.

Por otro lado, al cultivar el hongo *P. sajor-caju* sobre biomasa foliar de la platanera, encontraron la actividad específica más alta de lacasa en el día 10 de cultivo (1.6669 U/mg⁻¹ de proteína) mientras que la actividad específica de la xilanasa fue 0.1411 U/mg⁻¹ el día 10 y 0.1174 U/mg⁻¹ el día 40. En su investigación, sólo pudieron detectar niveles bajos de actividad de CMCasa y FP. Cuando utilizaron biomasa del pseudotallo de la platanera como sustrato, observaron un aumento en la actividad específica de lacasa desde el día 10 (0.1122 U/mg⁻¹) al día 20 (0.7415 U/mg⁻¹). La actividad específica de xilanasa fue de 0.0237 U/mg⁻¹ el día 10 y 0.0862 U/mg⁻¹ el día 40 y, nuevamente, sólo pudieron detectar niveles muy bajos de actividad de CMCasa y FP.

En el trabajo realizado por Khalil *et al.* (2011), se investigó la producción de celulasa por *P. ostreatus* y *P. sajor-caju* en fermentación en estado sólido (SSF) de biomasa lignocelulósica a intervalos de 2 días hasta el día 14 del crecimiento del micelio a temperatura ambiente (25-28 °C). En sus resultados, la actividad de endo- β -1,4-glucanasa alcanzó un pico a los 10 días de fermentación en *P. ostreatus*, después de lo cual los niveles disminuyeron gradualmente. La actividad máxima (7.08 U) se encontró cuando el sustrato era paja de arroz al 1%, mientras que la actividad mínima (1.45 U) fue para paja de arroz al 4%. Por otro lado, encontraron que la actividad endo- β -1,4-glucanasa alcanzó un pico a los 10 días de fermentación en *P. sajor-caju*, después de lo cual los niveles disminuyeron gradualmente. El máximo (1.9 U) se determinó cuando el 1% de paja de arroz fue el sustrato, mientras que el nivel mínimo (0.41 U) fue para el 1% de aserrín.

La actividad exo- β -1,4-glucanasa alcanzó un pico a los 10 días de SSF en *P. ostreatus*, después de lo cual los niveles disminuyeron gradualmente. La actividad más alta (7.36 U) se encontró cuando el 1% de paja de arroz era el sustrato, mientras que el nivel más bajo (1.88 U) fue para el 1% de aserrín. De nuevo, se encontró que la actividad exo- β -1,4-glucanasa alcanzaba un pico a los 10 días de fermentación en *P.*

sajor-caju, después de lo cual los niveles disminuyeron gradualmente. La actividad máxima (2.03 U) se encontró cuando el 4% de bagazo de caña de azúcar fue el sustrato, mientras que el nivel mínimo (0.38 U) fue para el 1% de aserrín.

A su vez, observaron que la actividad de la β -glucosidasa alcanzó un pico a los 10 días de SSF en *P. ostreatus*, después de lo cual los niveles disminuyeron gradualmente. La actividad máxima (3.60 U) se encontró cuando el 1% de paja de arroz era el sustrato, mientras que el nivel mínimo (1.29 U) fue para el 1% de aserrín. Se encontró que la actividad de la β -glucosidasa alcanzaba un pico a los 10 días de fermentación en *P. sajor-caju*, después de lo cual los niveles disminuyeron gradualmente. La actividad máxima (2.63 U) se encontró cuando el 1% de paja de arroz era el sustrato, mientras que el nivel mínimo (0.20 U) fue para el 1% de aserrín.

En el 2014, Krupodorova *et al.* trabajaron con diferentes basidiomicetos, entre los que se encontraba *H. erinaceus*, para determinar la actividad enzimática extracelular de amilasas, lacasas, proteasas y otras enzimas a los 14 días de crecimiento del micelio incubado a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Utilizaron medio basal GPDA, g/L: glucosa – 5, peptona – 2.5, extracto de levadura – 0.5. Dividieron la actividad enzimática extracelular en la siguiente escala: 0 – reacción negativa (color del medio sin cambios); 1 – reacción positiva débil (zona de actividad para amilasa y lipasa ≤ 2 mm; para proteasa zona clara apenas apreciable alrededor de la colonia); 2 – reacción positiva (actividad de zona para amilasa y lipasa 2.1–6.9 mm, para proteasa – 1–2 mm); 3 – reacción positiva fuerte (actividad de la zona para amilasa y lipasa ≥ 7 mm; para proteasa – 4–5 mm). Sus resultados reportan que *H. erinaceus* mostró alta actividad de amilasa al tener un valor de 3 en la escala; baja actividad de lacasas con valor de 1 y nula actividad de proteasas al obtener 0.

En el mismo año, Fen *et al.* investigaron la capacidad de algunos hongos como: *Coprinus comatus*, *Macrolepiota procera*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus nebrodensis*, *H. erinaceus* y otros más, para producir CMCasa y lacasa durante el crecimiento del micelio. Realizaron un primer experimento sobre cajas Petri para observar la capacidad de los hongos para degradar medios de carboximetilcelulosa (CMC), papel filtro y guaiacol a una temperatura de 26°C , a partir de ahí seleccionar los que tuvieron mejores resultados. *H. erinaceus* mostró ser el mejor en la degradación de la CMC (a

una semana de crecimiento) en comparación con los demás hongos y junto a *M. procera*, degradó muy bien el papel filtro (a medio mes de crecimiento). Con respecto al guaiacol, fue también *H. erinaceus* quien obtuvo los mejores resultados (a una semana de crecimiento).

Por ello el hongo melena de león, junto con los que presentaron buenos resultados como *C. comatus* y *M. procera*, continuaron siendo organismos de estudio en el siguiente experimento sobre matraces Erlenmeyer a una temperatura de 26°C, donde se tomaron muestras cada 24 h para la determinación de CMCasa y cada 48 h para la determinación de lacasas. *H. erinaceus* mostró la segunda mejor actividad de CMCasa al alcanzar su pico más alto el día 10 con 22.58 U/L; fue superado por *C. comatus*, cuyo pico de actividad más alto fue el día 9 con 33.92 U/L y que además, presentó valores altos de actividad desde el día 5, mientras que *H. erinaceus* presentó valores más bajos y el día 10 aumentó muy considerablemente su actividad con respecto a los días anteriores. En cuanto a la actividad de lacasa, *C. comatus* y *P. nebrodensis* mostraron actividades mucho más altas (496.67 U/L y 489.17 U/L el día 16 y el día 18, respectivamente) que *H. erinaceus* (48.54 U/L el día 10).

En otra investigación realizada por Chan-Cupul *et al.* (2016), se evaluó la actividad de enzimas ligninolíticas de *Daedalea elegans*, *Pycnoporus sanguineus*, y *Trametes maxima* sobre paja de trigo, bagazo de caña y aserrín de pino en SSF durante 30 días de crecimiento del micelio a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, tomando muestras de residuo agroindustrial cada 72 h para la cuantificación de la actividad enzimática. En sus resultados, obtuvieron la máxima actividad de lacasa con el hongo *P. sanguineus* cultivado sobre paja de trigo (a los 15 días) y sobre bagazo de caña (a los 6 días) con 1409.0 U/mg de peso seco (118.2 U/L) y 1404.8 U/mg de peso seco (76.7 U/L), respectivamente. Encontraron que ambos valores fueron estadísticamente mayores a la máxima actividad de lacasa de *D. elegans* (a los 21 días) obtenida sobre paja de trigo con 133.9 U/mg de peso seco (27.2 U/L). Sin embargo, reportan que la máxima actividad de lacasa de *T. maxima* obtenida en bagazo de caña (874.4 U/mg de peso seco = 62.1 U/L) a los 3 días de cultivo fue estadísticamente igual a las máximas actividades obtenidas por *P. sanguineus* cultivado sobre paja de trigo (1409.0 U/mg de peso seco = 118.2 U/L) y bagazo de caña (1404.8 U/mg de peso seco = 76.7 U/L).

Respecto al aserrín de pino, en *P. sanguineus* (990.4 U/mg de peso seco = 100.1 U/L, a los 6 días) obtuvieron significativamente una mayor actividad de lacasa en comparación con *T. maxima* (587.9 U/mg de peso seco = 60.2 U/L, a los 6 días) y *D. elegans* (11.8 U/mg de peso seco = 2.1 U/L, a los 9 días) establecidos sobre el mismo sustrato.

4. JUSTIFICACIÓN

Los hongos de podredumbre blanca, como *H. erinaceus*, tienen la capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos gracias a la producción de enzimas. Las enzimas fúngicas, y su actividad, dependen de los sustratos sobre los que se crecen. En función de la composición de los sustratos, los hongos producen enzimas (principalmente oxidasas e hidrolasas) para degradar estos materiales que a su vez les permite obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo. Además, estas enzimas son de gran interés para la biotecnología por lo que han sido utilizadas en la industria farmacéutica, alimentaria y textil, así como en los procesos de biorremediación de los ambientes que han sido alterados por contaminantes.

Por ello, es importante determinar la actividad enzimática extracelular de lacasas (oxidasas) y algunas hidrolasas de *H. erinaceus* crecido sobre distintos sustratos en caja de Petri, que nos permita conocer la capacidad de producción de estas enzimas.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Presentará actividad de lacasas e hidrolasas *H. erinaceus* crecido en cultivo sólido?

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar la actividad enzimática extracelular de lacasas y algunas hidrolasas de *H. erinaceus* crecido en cultivo sólido.

6.2. Objetivos específicos

- Evaluar la velocidad de crecimiento y las características miceliales de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos lignocelulósicos y sobre PDA en caja Petri.
- Cuantificar la actividad extracelular de lacasas y algunas hidrolasas de *H. erinaceus* crecido en cultivo sólido en caja Petri.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 2 se presenta el diagrama general de la metodología.

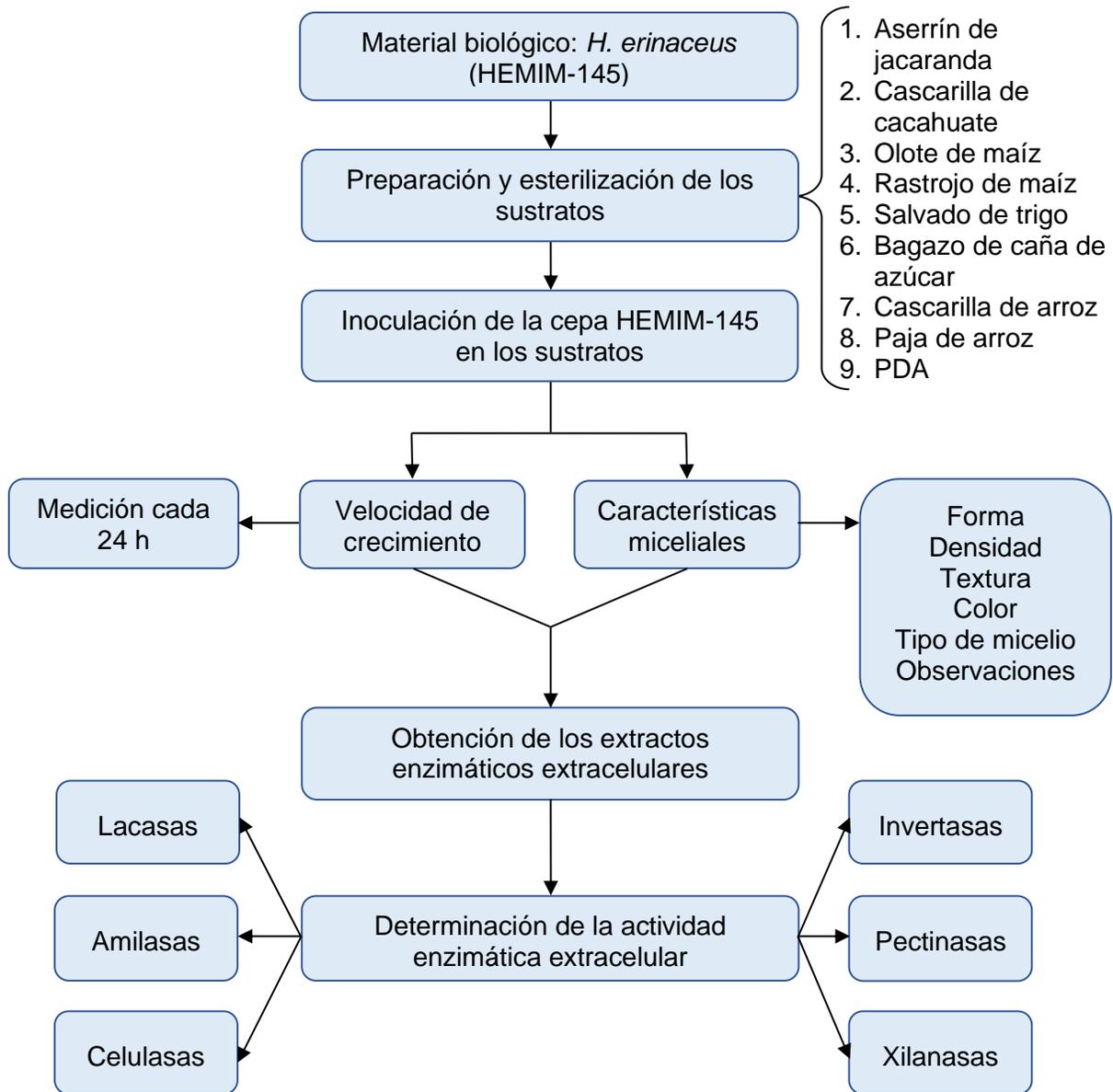


Figura 2. Diagrama general de la metodología

7.1. Material biológico

Para este proyecto de investigación se trabajó con *H. erinaceus*, cepa que se encuentra registrada con la clave HEMIM-145 dentro del cepario HEMIM (Herbario Micológico de Morelos) en el Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIB-UAEM).

Se utilizaron nueve diferentes sustratos para crecer la cepa HEMIM-145: 1) aserrín de jacaranda, 2) cascarilla de cacahuate, 3) olote de maíz, 4) rastrojo de maíz, 5) salvado de trigo, 6) bagazo de caña de azúcar, 7) cascarilla de arroz, 8) paja de arroz y 9) Agar Papa y Dextrosa (PDA), éste último como control para el experimento. Se realizaron cuatro repeticiones para cada sustrato.

7.2. Resiembra de la cepa HEMIM-145

La cepa de *H. erinaceus* (HEMIM-145) se mantuvo mediante subcultivo en cajas Petri (60 mm) con medio PDA y se utilizó como inóculo una vez que el micelio cubrió el 80% de la superficie del medio.

7.3. Preparación y esterilización de sustratos

Se redujo el tamaño (0.5 cm aproximadamente) de cada uno de los diferentes sustratos lignocelulósicos (a excepción del salvado de trigo, el bagazo de caña de azúcar y la cascarilla de arroz) por separado; se trituraron. Se llenó una caja Petri de vidrio de 60 mm de diámetro con el sustrato (la finalidad de ello fue calcular aproximadamente cuánto sustrato era necesario por caja) y se depositó en una bolsa rotulada, esto se repitió cuatro veces; para cada sustrato se realizó lo mismo. Posteriormente se hidrataron los sustratos en cada bolsa colocándoles dentro agua caliente durante 30 min. Trascurrido este tiempo, se drenaron y después se enjuagaron con agua a temperatura ambiente por aproximadamente 10 min y se volvieron a drenar. Una vez drenada el agua, se colocó cada sustrato en una caja Petri hasta aproximadamente la mitad de la caja y se pesó la cantidad de sustrato agregado, esta misma cantidad se colocó en tres cajas más, teniendo un total de cuatro cajas por sustrato (modificado de Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010). Las cajas Petri con los diferentes sustratos se esterilizaron durante 2 h a 121°C.

Se realizó exactamente el mismo procedimiento utilizando cajas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro.

7.4. Inoculación de *H. erinaceus* en diferentes sustratos

A partir de las cajas resembradas de la cepa HEMIM-145 se inocularon las cajas Petri de 60 y 90 mm de diámetro con los sustratos estériles. Para las cajas Petri de 60 mm, se utilizó un horador metálico estéril con el que se cortaron discos de 4 mm de diámetro del borde del crecimiento activo del micelio y cada uno se colocó en el centro de cada caja. Por último, las cajas Petri se sellaron con una película de Parafilm para retener la humedad. Posteriormente, se resguardaron las cajas a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), cubriéndolas de la luz. En el caso de las cajas Petri de 90 mm de diámetro, se utilizaron discos de 5 mm de diámetro y se incubaron a 25°C en ausencia de luz (Sánchez y Royse, 2001).

Para ambos experimentos, se inocularon 8 cajas más (4 en cada uno) con medio de cultivo PDA para utilizarse como control de referencia respecto a las características morfológicas y la velocidad de crecimiento del micelio.

Las inoculaciones se realizaron en condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar.

7.5. Características morfológicas del micelio de *H. erinaceus*

A los 17 días de crecimiento fúngico, se observó y caracterizó el micelio que colonizó los diferentes sustratos en las cajas Petri a temperatura ambiente y las incubadas a 25°C. Se tomaron en cuenta: forma, densidad, textura, color, tipo de micelio y observaciones (modificado de Sobal *et al.*, 2007; Acosta-Urdapilleta, 2020).

7.6. Velocidad de crecimiento micelial de *H. erinaceus*

La velocidad de crecimiento se determinó tomando, con un vernier, las medidas radiales del número de milímetros avanzados cada 24 h por el micelio a partir del inóculo (colocado en la parte central de la caja Petri) (Sánchez y Royse, 2001; Acosta-Urdapilleta, 2020). Durante las mediciones, las cajas Petri se mantuvieron en incubación y a temperatura ambiente como se menciona en el apartado 7.4.

7.7. Obtención de los extractos enzimáticos extracelulares de *H. erinaceus*

Los extractos enzimáticos extracelulares se obtuvieron a los 17 días de crecimiento a partir del sustrato lignocelulósico invadido con micelio de *H. erinaceus* (incubado a 25°C). Se agregaron 25 mL de agua destilada estéril por cada gramo de biomasa seca y se agitaron con movimientos circulares por 2 min aproximadamente. Posteriormente se colocaron en refrigeración (4°C) por 24 h. Una vez pasado el tiempo, se filtraron y se almacenaron a -20°C hasta su uso (Téllez-Téllez *et al.*, 2012).

7.8. Determinación de la actividad enzimática extracelular de *H. erinaceus*

7.8.1. Enzimas extracelulares

7.8.1.1. Lacasas

Se utilizó como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP) a 2 mM. Se realizó a pH de 3.5 a 5.5. En los diferentes pH, cada tubo de ensayo contuvo la mezcla de reacción compuesta por 900 µL de sustrato (DMP en buffer de acetatos 0.1 M a pH de 3.5, 4.5, 5.0 y 5.5) y 100 µL extracto crudo enzimático (ECE) diluido 1:10, excepto a pH 4.0 donde en cada tubo la mezcla de reacción contuvo 980 µL de sustrato (DMP en buffer de acetatos 0.1 M a pH 4.0) y 20 µL ECE sin dilución. Posteriormente la reacción se incubó a 40°C durante 10 min, y se analizó en el espectrofotómetro; la absorbancia se leyó a 468 nm. Se consideró una unidad de actividad enzimática de lacasas como la cantidad de enzima que aumenta una unidad de absorbancia en la mezcla de reacción por minuto y se reportó en unidades (U) por g de biomasa seca (U/gXseca) (Téllez-Téllez *et al.*, 2008).

7.8.1.2. Amilasas

Se utilizó como sustrato almidón al 1%. En cada tubo de ensayo la mezcla de reacción contuvo 900 µL de sustrato (almidón en buffer de acetatos 0.1 M a pH 5.0) con 100 µL de ECE. La reacción se incubó a 35°C por 30 min.

Siguiendo el método de Miller (1959), se utilizó ácido dinitrosalicílico (DNS) (Anexo A); una vez transcurrido el tiempo de incubación, en cada tubo se agregaron 2 mL de DNS para detener la reacción y posteriormente se colocaron los tubos en agua en ebullición por 5 min. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y se analizó en el espectrofotómetro; se leyó la absorbancia a 575 nm (Díaz-Godínez *et al.*, 2016).

7.8.1.3. Celulasas

Se utilizó como sustrato carboximetilcelulosa (CMC) al 1%. En cada tubo de ensayo la mezcla de reacción contuvo 900 µL de sustrato (CMC en buffer de acetatos 0.1 M a pH 4.8) con 100 µL de ECE. La reacción se incubó a 50°C durante 45 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 2 mL de DNS (Miller, 1959) para detener la reacción y posteriormente se colocaron los tubos en agua en ebullición durante 5 min. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y se analizó en el espectrofotómetro; se leyó la absorbancia a 575 nm (Díaz-Godínez *et al.*, 2016).

7.8.1.4. Invertasas

Se utilizó como sustrato sacarosa a 0.1 M. En cada tubo de ensayo la mezcla de reacción contuvo 900 µL de sustrato (sacarosa en buffer de acetatos 0.1 M a pH 5.5) y 100 µL de ECE. La reacción se incubó a 30°C durante 35 min. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 2 mL de DNS (Miller, 1959) para detener la reacción y posteriormente se colocaron los tubos en agua en ebullición durante 5 min. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y se analizó en el espectrofotómetro; se leyó la absorbancia a 575 nm (Díaz-Godínez *et al.*, 2016).

7.8.1.5. Pectinasas

Se utilizó como sustrato ácido poligalacturónico al 0.5%. En cada tubo de ensayo la mezcla de reacción contuvo 900 µL de sustrato (ácido poligalacturónico en agua destilada estéril) con 100 µL de ECE. La reacción se incubó a 45°C durante 45 min. Transcurrido este tiempo, el volumen se ajustó con 2 mL de DNS (Miller, 1959) para detener la reacción y posteriormente se colocaron los tubos en agua en ebullición durante 5 min. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y se analizó en el espectrofotómetro; se leyó la absorbancia a 575 nm (Díaz-Godínez *et al.*, 2001).

7.8.1.6. Xilanasas

Se utilizó como sustrato xilano al 0.5%. En cada tubo de ensayo la mezcla de reacción contuvo 900 µL de sustrato (xilano en buffer de acetatos 0.1 M a pH 5.3) con 100 µL de ECE. La reacción se incubó a 50°C durante 45 min. Transcurrido este tiempo, se agregaron 2 mL de DNS (Miller, 1959) para detener la reacción y posteriormente se

colocaron los tubos en agua en ebullición durante 5 min. Se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y se analizó en el espectrofotómetro; se leyó la absorbancia a 575 nm (Díaz-Godínez *et al.*, 2016).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se incluyó un blanco por ensayo de enzima, cuyo tubo contuvo la misma cantidad de sustrato para cada enzima reemplazándose únicamente la cantidad de ECE por agua destilada estéril.

Las actividades de las hidrolasas fueron reportadas en unidades internacionales (UI) y una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 mM de producto por minuto; se reportó como unidades internacionales por g de biomasa seca (UI/gXseca) (Téllez-Téllez *et al.*, 2008). Todos los valores de actividad se informaron como la media \pm desviación estándar.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Características morfológicas del micelio de *H. erinaceus*

Las características morfológicas de la cepa *H. erinaceus* sobre cajas Petri a temperatura ambiente (20°C aproximadamente) (Tabla 2) fueron muy similares a las que presentó la misma cepa sobre cajas Petri cuando se incubaron a 25°C a los 17 días de crecimiento (Tabla 3).

No hubo diferencia de características en algunos de los sustratos para ambas temperaturas, por ejemplo: el micelio fue de tipo ligeramente aéreo, hialino y con densidad escasa cuando se utilizó aserrín de jacaranda como sustrato; micelio aéreo, ligeramente blanco y ligeramente algodonoso cuando se creció sobre cascarilla de cacahuate y olote de maíz; y micelio aéreo, blanco, con densidad abundante y de textura algodonosa cuando se utilizó rastrojo de maíz. Al crecer a *H. erinaceus* sobre salvado de trigo, tanto a 20°C como a 25°C se observó un micelio de color blanco, con densidad muy abundante y de textura algodonosa. En cuanto a la paja de arroz, el micelio fue ligeramente aéreo, blanco, con densidad regular y de textura algodonosa; lo cual pudo observarse en ambas temperaturas de crecimiento. En bagazo de caña de azúcar, el micelio fue de tipo rastrero, ligeramente blanco y ligeramente algodonoso en los dos experimentos. Sobre cascarilla de arroz, el micelio fue ligeramente blanco y ligeramente algodonoso tanto a 20°C como a 25°C. La densidad del micelio en bagazo de caña fue escasa y en cascarilla de arroz fue regular a los 17 días de crecimiento a 20°C y 25°C sobre cajas Petri, esto resulta opuesto a lo encontrado por Ko *et al.* (2004), quienes cultivaron a *H. erinaceus* en tubos de ensayo durante 20 días a 28°C en diferentes sustratos y encontraron un micelio con densidad regular y escasa cuando se creció sobre bagazo de caña de azúcar y cascarilla de arroz, respectivamente.

Algunas diferencias se pudieron apreciar en sustratos como: aserrín de jacaranda, que a temperatura ambiente dio crecimiento a un micelio escasamente algodonoso pero a incubación de 25°C el micelio fue ligeramente algodonoso; olote de maíz, donde la densidad del micelio cambió de escasa a regular para 20°C y 25°C, respectivamente; salvado de trigo, que a 20°C presentó micelio de tipo ligeramente aéreo mientras que a 25°C el micelio fue aéreo; y cascarilla de arroz, que a temperatura ambiente

desarrolló micelio rastrero mientras que a temperatura constante de incubación el micelio fue ligeramente aéreo.

También se observaron diferencias y similitudes con respecto al PDA como control. La densidad, generalmente fue de regular a abundante en los sustratos y en el control sólo regular. Por otro lado, en el control como en los sustratos utilizados, la textura varió entre ligeramente algodonosa y algodonosa dependiendo de la temperatura. A 20°C y a 25°C los sustratos presentaron micelio de tipo rastrero, aéreo o ligeramente aéreo, mientras que en el control sólo fue rastrero. El tipo de micelio rastrero fue observado por Park *et al.* (2018) al evaluar 18 cepas silvestres de la melena de león recolectadas en Corea y 2 cultivares de *H. erinaceus* a los 14 días de crecimiento sobre PDA a 25°C, también reportan en su investigación que la mitad de las cepas presentaron un color marrón y la otra mitad un color blanquecino, éste último color coincide con el observado en esta investigación, sin embargo, el color marrón no se observó en la cepa HEMIM-145 a los 17 días de crecimiento sobre PDA ni tampoco se apreció sobre los sustratos lignocelulósicos. En estos sustratos, el color del micelio se percibió de ligeramente blanco a blanco mientras que en el PDA fue claramente blanco. Tanto en PDA como en la mayoría de los sustratos lignocelulósicos, se observó un cambio de color en el micelio de blanco o ligeramente blanco a amarillo claro a los 30 días de crecimiento, lo cual coincide con lo reportado por Stamets (2000) quien menciona que el hongo *H. erinaceus* presenta un micelio blanquecino que con el tiempo se torna amarillo claro o rosado.

En general, *H. erinaceus* presentó mejores características miceliales cuando se utilizaron sustratos lignocelulósicos que cuando se utilizó el medio de cultivo PDA. Los sustratos sobre los que se presentaron mejores características miceliales fue cuando se creció sobre salvado de trigo, rastrojo de maíz y cascarilla de cacahuate. Además, se demostró que la temperatura constante de 25°C favoreció las características miceliales sobre la temperatura ambiente de aproximadamente 20°C.

Tabla 2. Características morfológicas del micelio de *Hericium erinaceus* sobre diferentes sustratos a 20°C

Sustrato	Tipo de micelio	Color	Densidad	Textura	AH	Observaciones	Imagen
Aserrín de jacaranda	Ligeramente aéreo	Hialino	Escasa	Escasamente algodonosa	A	Micelio aéreo poco visible	
Cascarilla de cacahuete	Aéreo	Ligeramente blanco	Regular	Ligeramente algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
Olote de maíz	Aéreo	Ligeramente blanco	Escasa	Ligeramente algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
Rastrojo de maíz	Aéreo	Blanco	Abundante	Algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
Salvado de trigo	Ligeramente aéreo	Blanco	Muy abundante	Algodonosa	A	Micelio aéreo poco visible Color amarillo claro a los 30 días	

Tabla 2. Características morfológicas del micelio de *Hericiium erinaceus* sobre diferentes sustratos a 20°C (continuación)

Sustrato	Tipo de micelio	Color	Densidad	Textura	AH	Observaciones	Imagen
Bagazo de caña de azúcar	Rastrero	Ligeramente blanco	Escasa	Ligeramente algodonosa	A	-	
Cascarilla de arroz	Rastrero	Ligeramente blanco	Regular	Ligeramente algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
Paja de arroz	Ligeramente aéreo	Blanco	Regular	Algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
PDA	Rastrero	Blanco	Regular	Ligeramente algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	

AH: Agregaciones hifales

A: Ausente

Tabla 3. Características morfológicas del micelio de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos a 25°C

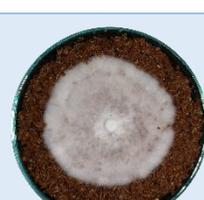
Sustrato	Tipo de micelio	Color	Densidad	Textura	AH	Observaciones	Imagen
Aserrín de jacaranda	Ligeramente aéreo	Hialino	Escasa	Ligeramente algodonosa	A	Micelio aéreo poco visible	
Cascarilla de cacahuete	Aéreo	Ligeramente blanco	Regular	Ligeramente algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
Olote de maíz	Aéreo	Ligeramente blanco	Regular	Ligeramente algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
Rastrojo de maíz	Aéreo	Blanco	Abundante	Algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
Salvado de trigo	Aéreo	Blanco	Muy abundante	Algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	

Tabla 3. Características morfológicas del micelio de *Hericium erinaceus* sobre diferentes sustratos a 25°C (continuación)

Sustrato	Tipo de micelio	Color	Densidad	Textura	AH	Observaciones	Imagen
Bagazo de caña de azúcar	Rastrero	Ligeramente blanco	Escasa	Ligeramente algodonosa	A	-	
Cascarilla de arroz	Ligeramente aéreo	Ligeramente blanco	Regular	Ligeramente algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
Paja de arroz	Ligeramente aéreo	Blanco	Regular	Algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	
PDA	Rastrero	Blanco	Regular	Algodonosa	A	Color amarillo claro a los 30 días	

AH: Agregaciones hifales

A: Ausente

8.1. Velocidad de crecimiento micelial de *H. erinaceus*

En las figuras 3 y 4 se muestra la velocidad de crecimiento micelial de *H. erinaceus* a 20°C y 25°C, respectivamente.

Al mantenerse a 20°C, el micelio creció más rápido sobre cascarilla de arroz (0.01207 mm/h), seguido de paja de arroz (0.01025 mm/h) y bagazo de caña (0.01017 mm/h); el crecimiento resultó lento sobre aserrín de jacaranda (0.00858 mm/h) (Figura 3).

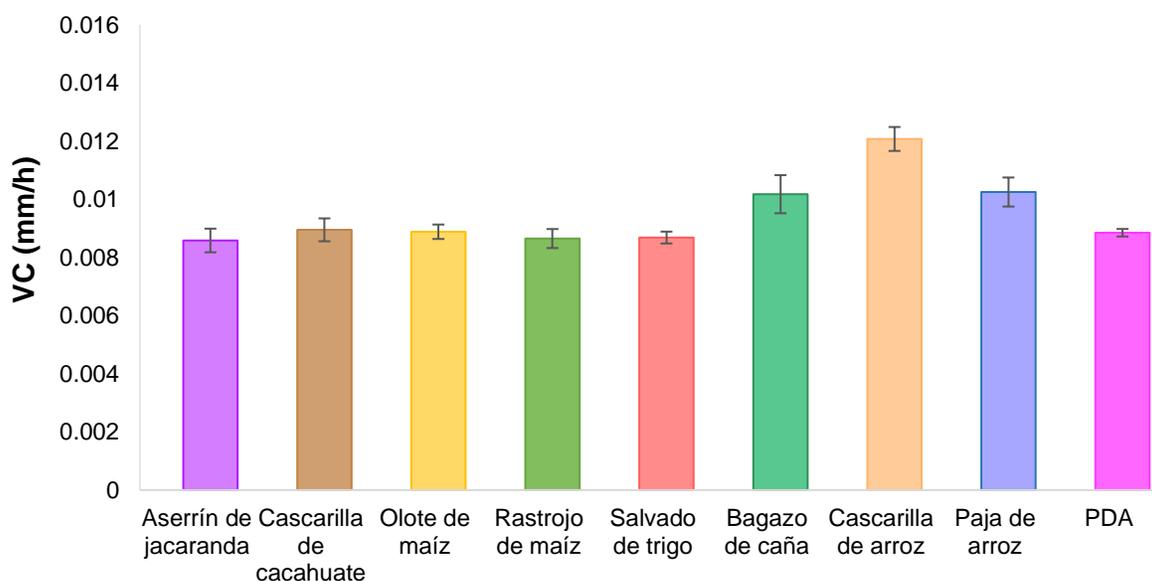


Figura 3. Velocidad de crecimiento micelial de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos (a 20°C)

Por otra parte, cuando las cajas Petri se incubaron a 25°C, el crecimiento fue más rápido comparado con las cajas Petri incubadas a 20°C, siendo nuevamente cascarilla de arroz (0.01442 mm/h) donde se presentó mayor velocidad de crecimiento, seguido de bagazo de caña (0.01382 mm/h) y paja de arroz (0.01282 mm/h) (Figura 4). A diferencia de Ko *et al.* (2004) que reportan que *H. erinaceus* crece más rápido sobre bagazo de caña de azúcar (124 mm/20 días) que sobre cascarilla de arroz (103 mm/20 días) a 28°C. Cabe mencionar que se ha observado que el crecimiento difiere entre cepas de *H. erinaceus* de acuerdo con lo reportado por Siwulski *et al.* (2009) al evaluar la tasa de crecimiento de tres cepas del hongo melena de león (D5, D9, H1) utilizando como sustrato una mezcla de aserrín de haya y pino que se complementó con salvado

de trigo y con glucosa en tubos de ensayo incubados a 25°C por 21 días. En sus resultados, la cepa D9 presentó el crecimiento más rápido (94 mm/21 días), el micelio de la cepa H1 creció más lento (86 mm/21 días) que el de D9, mientras que la cepa D5 se caracterizó por el crecimiento micelial más lento (80 mm/21 días) de las 3 cepas.

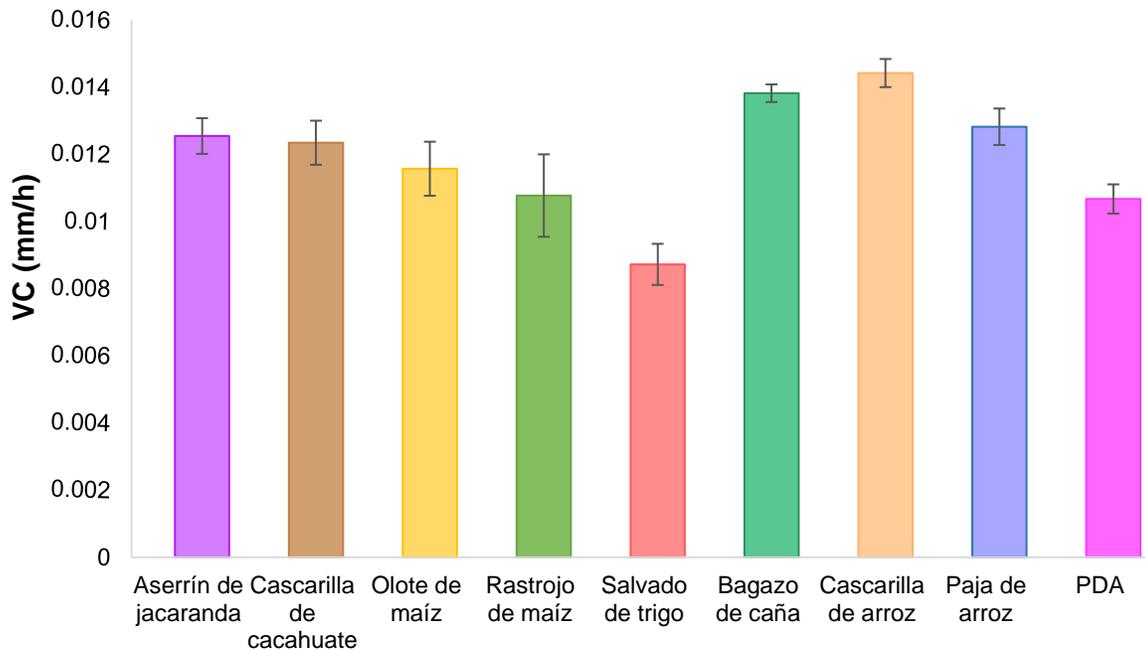


Figura 4. Velocidad de crecimiento micelial de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos (a 25°C)

Se obtuvo generalmente un mayor crecimiento en los sustratos utilizados que en control, además de que *H. erinaceus* creció mejor a temperatura constante que a temperatura ambiente. El crecimiento de los hongos es un fenómeno complejo que no tiene una definición sencilla, es un incremento ordenado de los componentes celulares que involucran un aumento de biomasa (Prosser, 1995; Sánchez y Royse, 2001). La velocidad de crecimiento celular pueden variar por diferentes factores, tales como las características genéticas y el número de generaciones (multiplicaciones) de la cepa. Intervienen factores externos como las condiciones ambientales, las condiciones de asepsia de las plantas de producción donde se desarrollan los cultivos, el estado

(sólido o líquido) y las características fisicoquímicas de los sustratos en los que crecen, entre otros (Chang y Miles, 2004).

Dado que a temperatura de 25°C se obtuvieron mejores resultados para la velocidad de crecimiento y las características morfológicas, se obtuvieron los ECE del micelio crecido sobre los sustratos en las cajas Petri incubadas a 25°C para la determinación de su actividad enzimática extracelular.

8.2. Actividad enzimática extracelular de *H. erinaceus*

8.2.1. Lacasas

Al comparar la actividad de lacasas de *H. erinaceus* a diferentes pH de los ECE (obtenidos de las cajas Petri incubadas a 25°C), los valores más altos se obtuvieron en cascarilla de cacahuete (Figura 5), que de acuerdo con Gatani *et al.* (2010), contiene un 27-33% de lignina, componente de la lignocelulosa que degradan las lacasas. En este sustrato, el pH con mayor actividad fue 5.0 (788.66 U/gXseca), seguido de 4.5 (636.41 U/gXseca).

En cuanto al resto de los sustratos utilizados, la mayoría presentó mayor actividad de lacasas a pH 4.0, seguido del pH 4.5. En el olote de maíz y la paja de arroz se obtuvo la mayor actividad a pH 4.0, con 360.02 U/gXseca y 329.43 U/gXseca, respectivamente. Estas actividades son más altas que las encontradas por García y Torres (2003), quienes reportan que a los 21 días y a temperatura óptimas de crecimiento de cada hongo (*T. versicolor* y *P. floridae* a 28°C y *P. chrysosporium* a 37°C), *P. floridae* y *T. versicolor* tuvieron actividades de 3.20 U/g y 1.58 U/g, respectivamente, cuando se utilizó olote de maíz como sustrato de crecimiento, mientras que, en paja de arroz *P. floridae* presentó una actividad de 3.21 U/g, *T. versicolor* 3.07 U/g y *P. chrysosporium* no presentó actividad.

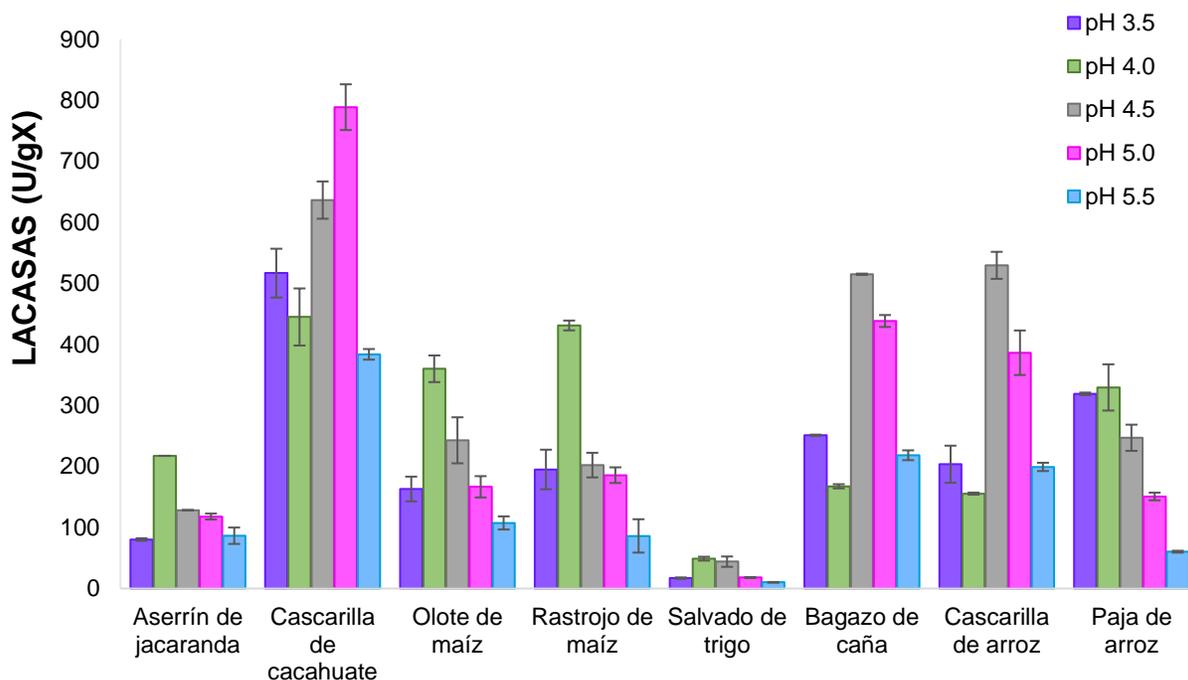


Figura 5. Actividad de lacasas de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos

Las actividades de lacasas más bajas encontradas en este trabajo se presentaron en el salvado de trigo: 48.87 U/gXseca a pH 4.0, 43.99 U/gXseca a pH 4.5, 17.91 U/gXseca a pH 5.0, 16.99 U/gXseca a pH 3.5 y 10.08 U/gXseca a pH 5.5 (Figura 5). García y Torres (2003) reportan, para salvado de trigo, una actividad de 1.43 U/g, 0.94 U/g y 0.84 U/g para *P. chrysosporium*, *T. versicolor* y *P. floridae*, respectivamente. En comparación con los resultados de los autores antes mencionados, las actividades de *H. erinaceus* sobre salvado de trigo fueron más altas.

Algunos de los sustratos utilizados en la presente investigación provinieron de la misma planta: rastrojo y olote son ambos de maíz, y cascarilla y paja de arroz. A pesar de que cada par de residuos pertenece a la misma poácea, tienen diferente composición química, por lo que la actividad de enzimas detectada sobre estos sustratos es diferente. Estas diferencias entre residuos de la misma procedencia también fueron observadas en la investigación de Reddy *et al.* (2003), quienes usaron platanera (*Musa paradisiaca*) de forma separada en biomasa foliar y pseudotallos para evaluar la producción de algunas enzimas (entre las que se encuentran las lacasas) de *P. ostreatus* y *P. sajor-caju*; ambas especies presentaron mejor actividad cuando

se utilizó la biomasa foliar de la platanera, que cuando se utilizó el pseudotallo de la misma. Encontraron las más alta actividad para ambas especies de *Pleurotus* cultivadas en biomasa de platanera; 1.7106 U/mg⁻¹ el día 20 y 1.6669 y U/mg⁻¹ el día 10 para *P. ostreatus* y *P. sajor-caju*, respectivamente. Estas actividades son mayores a la máxima actividad de lacasa encontrada en este trabajo para *H. erinaceus* (788.66 U/gXseca a pH 5.0 el día 17). Cabe mencionar que estos autores utilizaron también una temperatura de 25°C.

De acuerdo con el trabajo de Fen *et al.* (2014), *H. erinaceus* mostró una actividad de lacasas de 48.54 U/L el día 10 a una temperatura de 26°C en un medio de guaiacol; los valores obtenidos en esta investigación son más altos que los que ellos reportan. En este trabajo en todos los sustratos lignocelulósicos utilizados (excepto salvado de trigo) se favoreció la producción de lacasas.

Las variaciones de actividades de lacasas encontradas en los diferentes sustratos a diferentes pH podrían indicar que es posible que se trate de diferentes isoenzimas que excreta *H. erinaceus* en cada uno de los sustratos probados. Esto puede ser explicado dado que los sustratos tienen diferente composición lignocelulósica y de acuerdo con Carlile *et al.* (2001), cuando se cultivan hongos de pudrición blanca en medios de composición ligeramente diferente, se sintetizan diversas formas de una misma enzima (isoenzimas) que a pesar de poseer propiedades catalíticas similares, difieren notablemente en sus características físico-químicas, por lo que se deduce que hay formas múltiples que coexisten en determinado momento; así como que también puede variar la proporción de estas isoenzimas a lo largo del desarrollo del hongo.

8.2.2. Amilasas

Los valores más altos de actividad de amilasas se obtuvieron cuando se creció a *H. erinaceus* sobre salvado de trigo (9.62 U/gXseca), éste puede contener de 21.1% hasta 38.9% de almidón (Chaquilla-Quilca *et al.*, 2018); componente que es sustrato de las amilasas y que, al estar presente estimula al hongo para la producción de estas enzimas que realizan la degradación del almidón.

El segundo valor más alto se encontró en el rastrojo de maíz con poco más de la mitad del valor del sustrato anterior (5.31 U/gXseca) y la menor actividad se presentó en bagazo de caña (1.57 U/gXseca) (Figura 6).

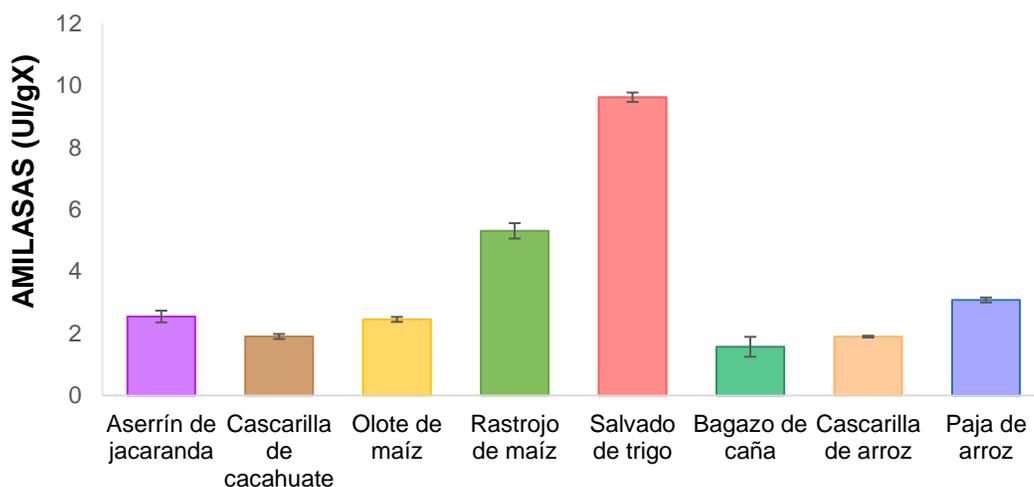


Figura 6. Actividad de amilasas de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos

8.2.3. Celulasas

La actividad más alta para las celulasas se encontró cuando se creció a la cepa HEMIM-145 sobre cascarilla de cacahuete (6.46 U/gXseca), cuyo contenido de celulosa está reportado por Gatani *et al.* (2010) de 35 a 45% mientras que el porcentaje de lignina en este sustrato es menor (27-33%). Chan-Cupul *et al.* (2016) mencionan que puede ser que, al haber un menor contenido de lignina, esto le facilite al hongo la accesibilidad a la celulosa, fuente de carbono para el crecimiento fúngico y síntesis enzimática de celulasas que lleven a cabo la degradación de la celulosa. Fen *et al.* (2014) demostraron que *H. erinaceus* produce CMCase en medios de cultivo que contienen CMC, donde la temperatura de incubación fue de 26°C. En sus experimentos obtuvieron una actividad de CMCase de 22.58 U/L el día 10 que fue menor a la mayor actividad encontrada en esta investigación.

El salvado de trigo mostró la segunda mejor actividad de celulasas (5.49 U/gXseca), mientras que los sustratos sobre los que se encontraron los valores más bajos fueron cascarilla de arroz y bagazo de caña (0.027 U/gXseca y 0.029 U/gXseca) respectivamente (Figura 7).

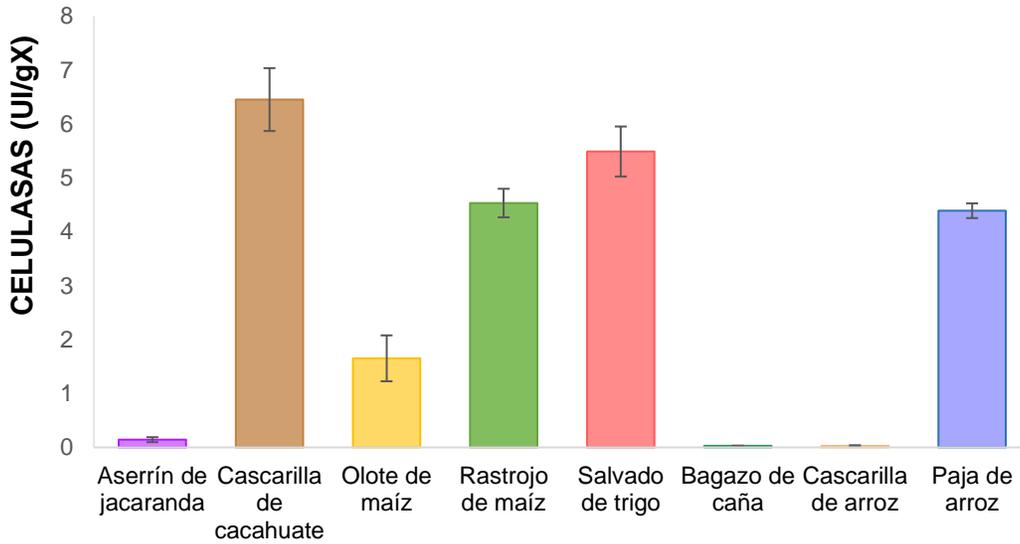


Figura 7. Actividad de celulasas de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos

8.2.4. Invertasas

En la figura 8 se puede apreciar la actividad enzimática extracelular de las invertasas, al crecer a *H. erinaceus* sobre salvado de trigo se obtuvo la mayor actividad de estas enzimas (6.25 U/gXseca), seguido de rastrojo de maíz (3.04 U/gXseca) con aproximadamente la mitad del valor sobre el sustrato anterior y al final de todos se encuentra cascarilla de arroz (0.087 U/gXseca) con el valor más bajo.

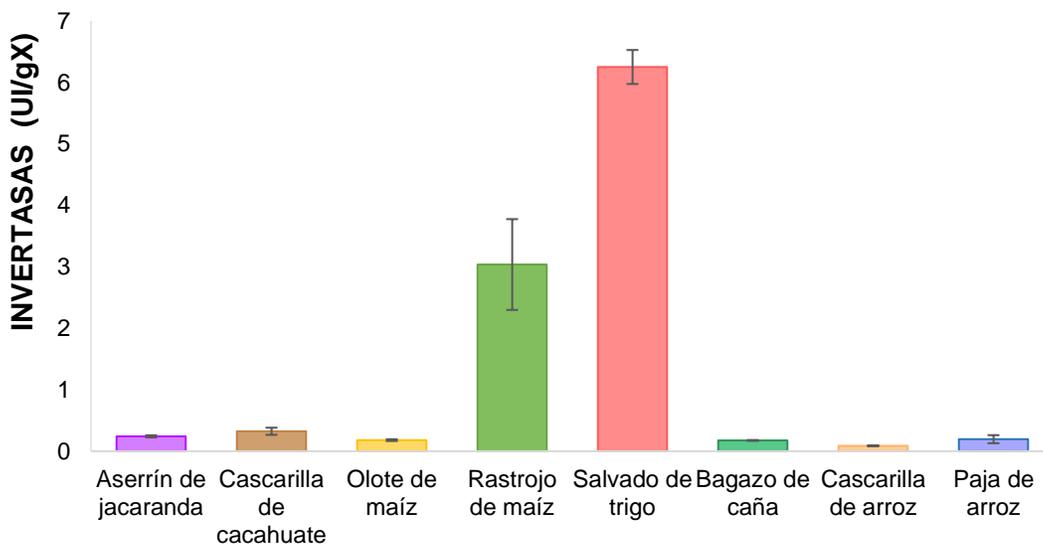


Figura 8. Actividad de invertasas de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos

8.2.5. Pectinasas

Al evaluar la actividad de pectinasas sobre los diferentes sustratos evaluados, se encontró que el hongo melena de león presentó el valor más alto de actividad de estas enzimas al utilizarse salvado de trigo como sustrato de crecimiento (5.34 U/gXseca) (Figura 9). Esta actividad es menor a lo reportado por De Souza *et al.* (2006) para el hongo *Pleurotus pulmonarius* que presentó actividades de pectinasas de 63 U/g el día 5, 91 U/g el día 10 y 83 U/g el día 20 de cultivo sobre salvado de trigo, donde la temperatura de incubación fue de 28°C.

En esta investigación, *H. erinaceus* mostró la menor actividad de pectinasas sobre bagazo de caña de azúcar (0.64 U/gXseca)

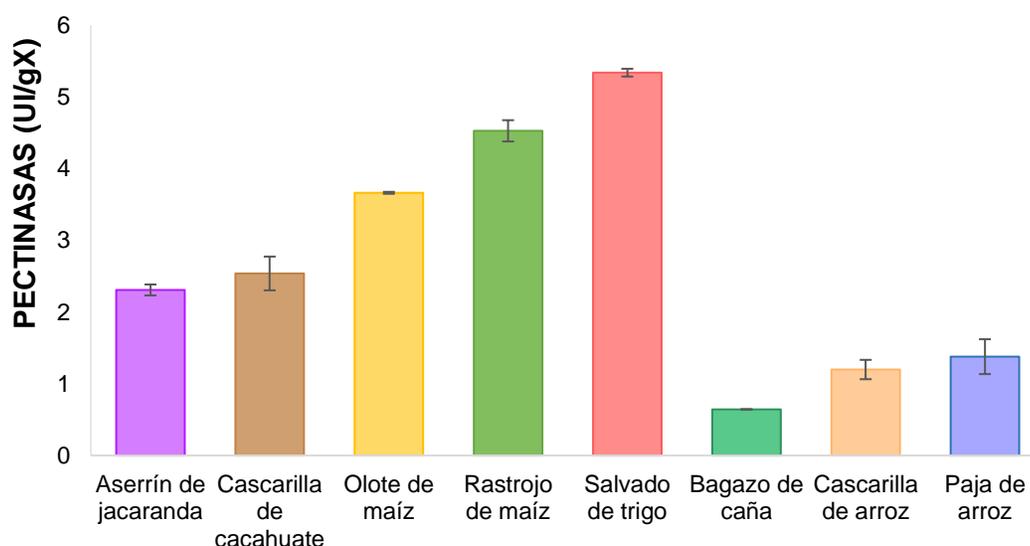


Figura 9. Actividad de pectinasas de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos

8.2.6. Xilanasas

Por último, en la cuantificación de la actividad de las xilanasas, el valor más alto para esta enzima fue de 12.74 U/gXseca y se obtuvo al crecer a *H. erinaceus* sobre salvado de trigo, que contiene un porcentaje de 34.5% de hemicelulosa (cuyo componente principal es el xilano) y de 5.0% a 26.9% de arabinoxilanos (Chaquilla-Quilca *et al.*, 2018). Reddy *et al.* (2003) encontraron la mayor actividad de xilanasas fue de 0.1435 U/mg⁻¹ el día 10, al crecer *P. ostreatus* sobre la biomasa foliar de la platanera y de 0.1411 U/mg⁻¹ para *P. sajor-caju* el día 20. Estas actividades son

mayores a la máxima actividad de xilanasa encontrada para *H. erinaceus* cuando el hongo fue crecido en salvado de trigo.

Sobre cascarilla de cacahuate se obtuvo la segunda mejor actividad (9.93 U/gXseca) mientras que la actividad más baja se presentó sobre bagazo de caña (0.35 U/gXseca) y aserrín de jacaranda (0.49 U/gXseca) (Figura 10).

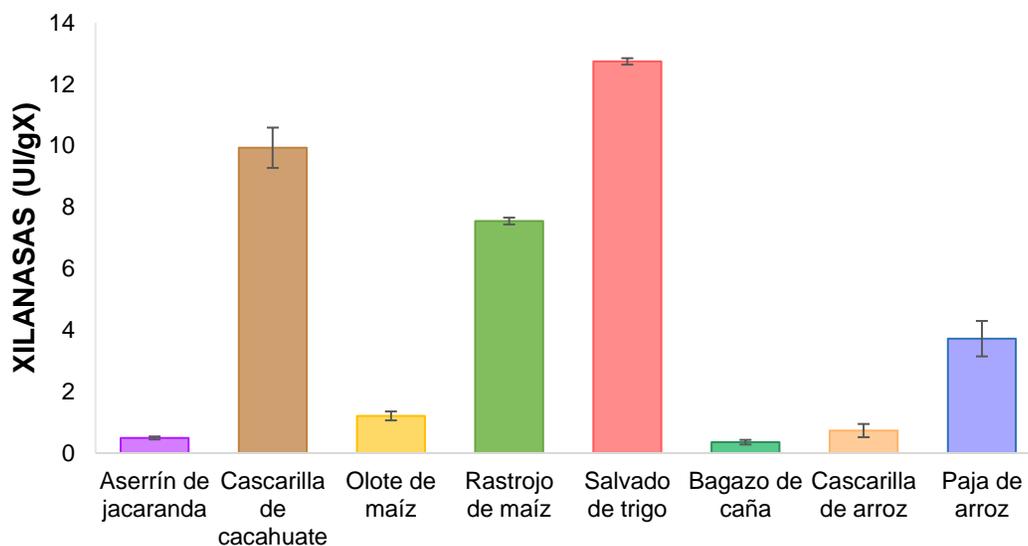


Figura 10. Actividad de xilanasas de *H. erinaceus* sobre diferentes sustratos

9. CONCLUSIÓN

Las condiciones de crecimiento y fuente de nutrientes son factores muy importantes en el cultivo de hongos. La cepa *H. erinaceus* creció mejor a 25°C, desarrolló mejores características miceliales sobre: salvado de trigo, rastrojo de maíz y cascarilla de cacahuate, mientras que en sustratos como: cascarilla de arroz y bagazo de caña de azúcar se favoreció su velocidad de crecimiento.

Los sustratos utilizados para el cultivo de los hongos de pudrición blanca proporcionan nutrientes, energía, e incrementan o disminuyen producción de enzimas extracelulares. Los valores de actividades enzimáticas extracelulares encontrados en esta investigación fueron altos para lacasas y relativamente bajos para las enzimas hidrolasas analizadas. A excepción del salvado de trigo, todos los sustratos lignocelulósicos utilizados en esta investigación favorecieron la producción de lacasas. Para amilasas, invertasas y pectinasas presentaron mejor actividad cuando se utilizó salvado de trigo y rastrojo de maíz. La actividad de celulasas y xilanasas se vio favorecida cuando los sustratos de crecimiento fueron cascarilla de cacahuate y salvado de trigo. En general *H. erinaceus* presentó baja actividad de hidrolasas, se podría optimizar la condición de cultivo para mejorar la actividad de estas enzimas y, dadas las variaciones en la actividad de lacasas, se podría determinar si existen diferentes isoenzimas de estas enzimas oxidasas en cada cultivo.

Con base en los resultados, puede afirmarse que los sustratos lignocelulósicos utilizados dieron a *H. erinaceus* las características fisicoquímicas necesarias para la producción de lacasas, mientras que no favorecieron la actividad de hidrolasas.

10. PERSPECTIVAS

A partir de este proyecto de investigación se proponen las siguientes perspectivas:

- Realizar mezclas de cascarilla de cacahuate, rastrojo de maíz y salvado de trigo para el cultivo de *H. erinaceus*.
- Cuantificar la actividad enzimática extracelular de *H. erinaceus* en cultivo sólido de una mezcla de cascarilla de cacahuate, rastrojo de maíz y salvado de trigo, obteniendo muestras en diferentes días.
- Realizar zimogramas para detectar la presencia de isoformas de lacasas.
- Cuantificar la actividad enzimática intracelular de *H. erinaceus* durante diferentes etapas celulares.

11. LITERATURA CITADA

- Acosta-Urdapilleta ML (2020). *Determinación de la actividad antioxidante y contenido de proteína de cuerpos fructíferos de cinco especies de Pleurotus cultivadas sobre paja de trigo*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.
- Acosta-Urdapilleta ML, Alonso GA, Rodríguez A, Adame M, Salgado D, Salgado J, Montiel-Peña M, Medrano-Vega F y Villegas EC (2010). *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. En D Martínez-Carrera, N Curvetto, M Sobal y VM Mora (Eds.), *Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: avances y perspectivas en el siglo XXI* (pp. 189–220). Puebla, Puebla, México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo.
- Arantes V y Goodell B (2014). Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. En TP Schultz, B Goodell y DD Nicholas (Eds.), *Deterioration and protection of sustainable biomaterials* (pp. 3–21). Washington D. C., Estados Unidos de América: American Chemical Society.
- Asadullah M, Rahman MA, Ali MM, Rahman MS, Motin MA, Sultan MB y Alam MR (2007). Production of bio-oil from fixed bed pyrolysis of bagasse. *Fuel* 86 (16): 2514–2520.
- Ayers WA, Papavizas GC y Diem AF (1966). Polygalacturonate transeliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 56: 1006–1011.
- Bayer EA, Morag F y Lamed R (1994). The cellulosome—a treasure-trove for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 12 (9): 379–386.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L y Hoondal GS (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 326–338.
- Biely P (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* 3 (11): 286–290.
- Boddy L, Crockatt ME y Ainsworth AM (2011). Ecology of *Hericium cirrhatum*, *H. coralloides* and *H. erinaceus* in the UK. *Fungal Ecology* 4 (2): 163–173.
- Bommarius AS y Riebel BR (2004). *Biocatalysis: fundamentals and applications*. Atlanta, Georgia: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Carlile MJ, Watkinson SC y Gooday GW (2001). *The fungi*. Nueva York, Estados Unidos de América: Academic Press.
- Chan-Cupul W, Heredia-Abarca GP y Rodríguez-Vázquez R (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 32 (3): 339–351.
- Chang ST y Miles PG (2004). *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. Nueva York, Estados Unidos de América: CRC Press.
- Chaquilla-Quilca G, Balandrán-Quintana RR, Mendoza-Wilson AM y Mercado-Ruiz JN (2018). Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo. *CienciaUAT* 12 (2): 137–147.
- Chen JS, Saxton J, Hemming FW y Peberdy JF (1996). Purification and partial characterization of the high and low molecular weight form (S-and F-form) of

- invertase secreted by *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology* 1296 (2): 207–218.
- Córdoba JA, Salcedo E, Rodríguez R, Zamora JF, Manríquez R, Contreras H, Robledo J y Delgado E (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Revista Latinoamericana de Química* 41 (3): 171–184.
- Costa LA, Fonseca AF, Pereira FV y Druzian JI (2015). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corn stover. *Cellulose Chemistry and Technology* 49 (2): 127–133.
- Cruz JM, Domínguez JM, Domínguez H y Parajó JC (2000). Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. *Food Biotechnology* 14 (1–2): 79–97.
- De Diego F (2009). *Hericium erinaceus*. En F De Diego (Ed.), *Guía de bolsillo para el buscador de setas* (pp. 71–72). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- De Souza DF, Tychanowicz GK, Marques CG y Peralta RM (2006). Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *Journal of Basic Microbiology* 46 (2): 126–134.
- Deacon JW (2006). Fungal ecology: saprotrophs. En JW Deacon (Ed.), *Fungal biology* (pp. 213–216). Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd.
- Díaz-Godínez G, Cervantes-Muñoz P, Acosta-Urdapilleta ML, Villegas E, Gupta VK y Téllez-Téllez M (2016). Enzymatic activity of three wild mushrooms. *Mycosphere* 7 (10): 1568–1575.
- Díaz-Godínez G, Soriano J, Augur C y Viniegra-González G (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 271–275.
- Fen L, Xuwei Z, Nanyi L, Puyu Z, Shuang Z, Xue Z, Pengju L, Qichao Z y Haiping L (2014). Screening of lignocellulose-degrading superior mushroom strains and determination of their CMCase and laccase activity. *The Scientific World Journal* 2014: 1-6.
- Fora CG, Lauer KF, Stefan C y Banu C (2009). *Hericium erinaceus* and *Sacroscypha coccinea* in deciduous forest ecosystem. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 13: 67–68.
- García AM y Torres RG (2003). Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5 (1): 56–64.
- García W, Pezo D, San Martín F, Olazábal JP y Febres FF (2005). Composición de los alimentos. En W García, D Pezo, F San Martín, JP Olazábal y FF Febres (Eds.), *Manual del técnico alpaquero* (pp. 57–58). Cusco, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Garrote G, Falqué E, Domínguez H y Parajó JC (2007). Autohydrolysis of agricultural residues: study of reaction byproducts. *Bioresource Technology* 98 (10): 1951–1957.
- Gatani M, Argüello R y Sesín S (2010). Materiales compuestos de cáscaras de maní y cemento. Influencia de diferentes tratamientos químicos sobre las propiedades mecánicas. *Materiales de Construcción* 60 (298): 137–147.

- Gianfreda L, Xu F y Bollag JM (1999). *Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal* 3 (1): 1–26.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G y Sannia G (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341: 655–663.
- Gopinath SCB, Anbu P, Arshad MKM, Lakshmipriya T, Voon CH, Hashim U y Chinni SV (2017). Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed Research International* 2017: 1–9.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK y Chauhan B (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38 (11): 1599–1616.
- Guzmán-Maldonado H y Paredes-López O (1995). Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35 (5): 373–403.
- Howard RL, Abotsi ELJR, Jansen Van Rensburg EL y Howard S (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2 (12): 602–619.
- Index Fungorum (2021). Recuperado el 1 de enero de 2021, de <http://www.IndexFungorum.org>
- Khalil MI, Hoque MM, Basunia MA, Alam N y Khan MA (2011). Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35 (4): 333–341.
- Khan MA, Tania M, Liu R y Rahman MM (2013). *Hericium erinaceus*: an edible mushroom with medicinal values. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 10 (1): 253–258.
- Klein RD, Deibel Jr MR, Sarcich JL, Zurcher-Neely HA, Reardon IM y Henrikson RL (1989). Purification and characterization of invertase from a novel industrial yeast, *Schwanniomyces occidentalis*. *Preparative Biochemistry* 19 (4): 293–319.
- Ko HG, Park HG, Kim SH y Park WM (2004). Mycelial growth and fruiting body formation of *Hericium erinaceum* in sawdust and agricultural by-product substrates. *The Korean Journal of Mycology* 32 (2): 89–94.
- Kolotushkina EV, Moldavan MG, Voronin KY y Skibo GG (2003). The influence of *Hericium erinaceus* extract on myelination process *in vitro*. *Fiziologichnyi Zhurnal* 49 (1): 38–45.
- Kotwal SM y Shankar V (2009). Immobilized invertase. *Biotechnology Advances* 27: 311-322.
- Krupodorova T, Ivanova T y Barshteyn V (2014). Screening of extracellular enzymatic activity of macrofungi. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 3 (4): 315–318.
- Kubata BK, Takamizawa K, Kawai K, Suzuki T y Horitsu H (1995). Xylanase IV, an exoxylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 which produces xylotetraose as the only low-molecular-weight. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (4): 1666–1668.
- Kuhad RC, Gupta R y Singh A (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research* 2011: 1–10.

- Liang B, Guo Z, Xie F y Zhao A (2013). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of aqueous extract of *Hericium erinaceus* in experimental diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13 (253): 1–7.
- Manals-Cutiño EM, Penedo-Medina M y Salas-Tort D (2015). Caracterización del bagazo de caña como biomasa vegetal. *Tecnología Química* 35 (2): 244–255.
- Mata G y Salmones D (2007). Los hongos, silenciosos y pacientes degradadores de la materia orgánica. En R Zuleta-Rodríguez, D Trejo-Aguilar y AF Trigos-Landa (Eds.), *El maravilloso mundo de los hongos* (pp. 109–116). Xalapa, Veracruz, México: Universidad Veracruzana.
- Mata G, Salmones D y Savoie JM (2017). Las enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus* spp. En JE Sánchez y DJ Royse (Eds.), *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus* spp. (pp. 63–82). Tapachula, Chiapas, México: Ecosur.
- Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426–429.
- Montoya-Barreto S (2012). *Obtención de enzimas lignocelulolíticas y polisacáridos a partir de residuos lignocelulósicos del departamento de caldas empleando macromicetos de pudrición blanca por fermentación sumergida y fermentación en estado sólido*. Tesis doctoral. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Moreira MT, Feijoo G, Sierra-Alvarez R y Field JA (1999). Reevaluation of the manganese requirement for the biobleaching of kraft pulp by white rot fungi. *Bioresource Technology* 70: 255–260.
- Mussatto SI y Roberto IC (2002). Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 28: 34–39.
- Neureiter M, Danner H, Thomasser C, Saidi B y Braun R (2002). Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100 (1–9): 49–58.
- Park SA, Kim SJ, Kim HL y Kang HW (2018). Cultural characteristics and antioxidant activity of wild-type collections of *Hericium erinaceus*. *Journal of Mushroom* 16 (1): 9–15.
- Peralta RM, da Silva BP, Gomes-Côrrea RC, Kato CG, Vicente-Seixas FA y Bracht A (2017). Enzymes from basidiomycetes - peculiar and efficient tools for biotechnology. En G Brahmachari, AL Demain y JL Adrio (Eds.), *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 119–149). Chennai, India: Academic Press Elsevier.
- Prosser JI (1995). Kinetics of filamentous growth and branching. En NAR Gow y GM Gadd (Eds.), *The growing fungus* (pp. 301–318). Londres, Inglaterra: Chapman and Hall.
- Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyma SB, Abraham A, Mathew AK, Madhavan A, Rebello S y Pandey A (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology* 56 (1): 16–30.
- Reddy GV, Babu PR, Komaraiah P, Roy KRRM y Kothari IL (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry* 38 (10): 1457-1462.
- Reilly PJ (1981). Xylanases structure and function. En A Hollander, R Rabson, P Rogers, A San Pietro, R Valentine y R Wolfe (Eds.), *Trends in the biology of*

- fermentation for fuels and chemicals* (pp. 111–126). Nueva York, Estados Unidos de América: Plenum Press.
- Rodríguez CE (2012). *Efecto del uso de mezclas de lignocelulosas sobre la producción de etanol de segunda generación*. Tesis de ingeniería. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Romero-Gómez S, Augur C y Viniegra-González G (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters* 22: 1255–1258.
- Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J y Vandamme EJ (1993). Pectine, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology* 39: 213–294.
- Sánchez JE y Royse DJ (2001). Crecimiento y fructificación. En JE Sánchez y DJ Royse (Eds.), *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* (pp. 49–66). San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México: Ecosur.
- Sánchez MM, Pastor FIJ y Diaz P (2003). Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp. BP-23. A unique type of cellulase among Bacillales. *European Journal of Biochemistry* 270 (13): 2913–2919.
- Schwarze FW, Engels J y Mattheck C (2000). Fundamental aspects. En FW Schwarze, J Engels y C Mattheck (Eds.), *Fungal strategies of wood decay in trees* (pp. 26–32). Berlín, Alemania: Springer.
- Singh A (1999). Engineering enzyme properties. *Indian Journal of Microbiology* 39 (2): 65–77.
- Siwulski M, Sobieralski K y Wojniłowicz M (2009). Comparison of mycelium growth and yielding of selected strains of *Hericium erinaceus* (Bull. Fr.) Pers. on sawdust substrates with the glucose addition. *Herba Polonica* 55 (3): 266–272.
- Skyba O, Douglas CJ, Mansfield SD (2013). Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (8): 2560–2571.
- Sobal M, Martínez-Carrera D, Morales P y Roussos S (2007). Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 19 (1): 15–23.
- Sokół S, Góla-Siwulska I, Sobieralski K, Siwulski M y Górka K (2016). Biology, cultivation, and medicinal functions of the mushroom *Hericium erinaceum*. *Acta Mycologica* 50 (2): 1–18.
- Stamets P (2000). Growth Parameters for gourmet and medicinal mushroom species. En P Stamets (Ed.), *Growing gourmet and medicinal mushrooms* (pp. 387–394). Berkeley, California, Estados Unidos de América: Ten Speed Press.
- Sturm A (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121 (1): 1–8.
- Sun Y y Cheng J (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83 (1): 1–11.
- Téllez-Jurado A, Arana A, Anducho MA y Mercado Y (2016). Enzimas lignocelulolíticas: producción, usos y perspectivas. En MC Area y SW Park (Eds.), *Panorama de la industria de celulosa y papel y materiales lignocelulósicos 2016* (pp. 64–83). Posadas, Argentina: Universidad Nacional de Misiones.

- Téllez-Téllez M, Díaz R, Sánchez C y Díaz-Godínez G (2013). Hydrolytic enzymes produced by *Pleurotus* species. *African Journal of Microbiology Research* 7 (4): 276–281.
- Téllez-Téllez M, Diaz-Godínez G, Aguilar MB, Sánchez C y Fernández FJ (2012). Description of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* expressed under submerged fermentation conditions. *Bioresources* 7 (2): 2038-2050.
- Téllez-Téllez M, Fernández JF, Montiel-González AM, Sánchez C y Díaz-Godínez G (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 675–679.
- Thongbai B, Rapior S, Hyde KD, Wittstein K y Stadler M (2015). *Hericium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom. *Mycological Progress* 14 (91): 1–23.
- Urrelo DF, Leal L y Bozo C (2016). Composición química de la madera de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC) Standley proveniente de la comunidad rural Ocho Hermanos, Municipalidad El Carmen Rivero Torrez, Departamento de Santa Cruz. *Revista Boliviana de Química* 33 (3): 104–115.
- Vargas L, Alvarado P, Vega-Baudrit J y Porras M (2013). Caracterización del subproducto cascarilla de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia* 23 (1): 86–101.
- Wang JC, Hu SH, Wang JT, Chen KS y Chia YC (2005). Hypoglycemic effect of extract of *Hericium erinaceus*. *Journal of de Science of Food and Agriculture* 85: 641–646.
- Wilkolazka AJ, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W y Leonowicz A (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 566–572.
- Xu H, Wu PR, Shen ZY y Chen XD (2010). Chemical analysis of *Hericium erinaceum* polysaccharides and effect of the polysaccharides on derma antioxidant enzymes, MMP-1 and TIMP-1 activities. *International Journal of Biological Macromolecules* 47: 33–36.
- Zhang AQ, Fu L, Xu M, Sun PL y Zhang JS (2012). Structure of a water-soluble heteropolysaccharide from fruiting bodies of *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Polymers* 88: 558–561.

12. ANEXOS

12.1. Anexo A: Preparación de DNS

Se utilizó:

- NaOH al 1%
- Na₂SO₃ al 0.05%
- Fenol al 0.02%
- DNS al 1%

Se colocó el NaOH en un vaso de precipitado, se agregó agua destilada estéril (menor a la cantidad del volumen final deseado) y se mezcló con ayuda de un agitador magnético. Una vez disuelto el NaOH, se agregó el Na₂SO₃, a continuación el fenol y por último el DNS hasta su completa disolución. Posteriormente se aforó al volumen final, después se colocó en un frasco de vidrio ámbar y finalmente se refrigeró a 4°C hasta su posterior uso.

13. CONGRESO



**Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería**



**XIX CONGRESO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

MODALIDAD
VIRTUAL

27 SEPTIEMBRE - 1º OCTUBRE, 2021

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA A:

Estefany Sánchez-Maldonado, Mariel Fabián-Jurado, Maura Téllez-Téllez, Ma. de Lourdes Acosta-Urdapilleta, Gerardo Díaz-Godínez, Edgar Martínez-Fernandez, Alma D. Sánchez García, Anabel Ortiz Caltempa, Reyna Isabel Cueva-Clavijo

Por la presentación del e-póster:

ACTIVIDAD EXTRACELULAR DE HIDROLASAS DE *Hericium erinaceus* EN CULTIVO SÓLIDO

en el XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
27 de septiembre - 1º de octubre, 2021

Dr. Jaime Ortega López
PRESIDENTE SMBB

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
PRESIDENTA COMITÉ ORGANIZADOR

Dr. Alvaro R. Lara
PRESIDENTE COMITÉ CIENTÍFICO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 1 de febrero de 2022

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **ESTEFANY SÁNCHEZ MALDONADO**, con el título del trabajo: **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EXTRACELULAR DE LACASAS Y ALGUNAS HIDROLASAS DE *Hericium erinaceus* EN CULTIVO SÓLIDO.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el **voto de calidad** y pueda optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

SECRETARIO: DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA

VOCAL: DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

SUPLENTE: DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

SUPLENTE: M. EN C. ALMA DELIA SÁNCHEZ GARCÍA





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2022-02-01 17:22:59 | Firmante

SJS9/7IDjylwGC3H53If0CLg5a4/TP12IDvSSuYwkNOtAqaU/lmKQM+PVouTWnWkHV5ZWIGVQFYkpNhiWSUcs4UsRPR2y3bdBYDX+ufCrqVHDxPvt7xkeTZQZehLuXsAQsME31UBiUfaVx2Bih519gNknshIP/3VHZmKkngaX/6tiefUikd9TYKqxX0AaQF4vavYCeYQDr4RQpuXkWAaBeQ83t3MYyeWKDE0S4OouudvDLSGLWJ2cuFXFWHz+/IMmO3jsHnMrCP lZsnCmXc+KvClS6P7WrU4O5f34B/jn42NrVJgbdyfalMw72OjFfsVZNxU6tAPQj8phRKbbn/olA==

EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ | Fecha:2022-02-01 17:55:22 | Firmante

mLKAac+TFO2c6J2zxsFysVEgQDwjDnwVYC4znOqn8uNUI9GD7+dFulpXTcSpWNHglKcaANYotltQz/wJMUxY12695n0Rj15nqwdQhfhEaJ4Wfnwi93TyhWkbcu0DSW8GxbOg6UzKGFHywHJLnP8p0BkXfsXptL3Go5lTin9EJ6z/a8Wbw/xlN+zzntCjtcAUbrKr71pAU5ZNf9/HbpjoaRerUHLwlg1jGr/0zxoVLGdVb0wUTwS6zd8Z84ew4Uyx2i08HwXk3I2M6Su7i mte4fEam0ekTzRh38rolXBvl6O8ISCKzo1tWsltz7+iYOG+3bQ8F3utaSXTDh2QYw==

MAURA TELLEZ TELLEZ | Fecha:2022-02-01 19:20:15 | Firmante

w3LPI4iRZevLqesHteEtMihxqKEy5vvV8oD3EA0w+x3meuu3z3TrAamv0bQH6lZg0HWCCU0XchYVWYXkWuq1c4Vsmko9Wp1ETGHAS+Tjlvea/+3CktG1BN18BttcOxuWaEx1/w a0LqKIZ8iQYi5xsmuC837p8AaTm4O0z5o3h0k3oxrq2W0YO5ClaEWg8kNN/YWJhi/c3h8/RBPWwbwOwop3UKvBLGDO7mrGu6jxdD2RrUNKNYoJ7JewWB8bMhuBnBO4m8cKs 1JZYzn4C2Uah7kD8i+LsnOtljoTPZ8/JDbagVSejSG7XEXJUMprgYngHMMWUGtr90z1gVM/y04qQ==

GERARDO DÍAZ GODÍNEZ | Fecha:2022-02-01 20:35:48 | Firmante

GFPNN46dzZUeQ/tq5k9dX997BSd2U443OganmV++zGSWePMGaTawkwPudqjSeX1OwSgSIam3J/ZhtVDefZA7MltPNzYS77nOu1s/v86r7UhbRNpE8/5XNM8s9V9t9Ggt4DAM co4QrlvK0kfe6RY43PqrROTup1HBQPa3AQQLZ0i0UX90GhYOGWFB7ChG3jPsz9lxd4H/chyVaa7aZHMWdJpwhBgbCwJ/CkF8+WAReWQdkis+all+NtuMweXr42I01oHyVV6Nucl 30Jd06d5nLH3kPdDwckjNV560tRtEIG1k0DJcST7/TiYyh8wcO1crzGWoA24EePpoJOKEbzOuQ==

ALMA DELIA SÁNCHEZ GARCÍA | Fecha:2022-02-02 13:12:38 | Firmante

YuuXZPbWxNOFz+djGWEz7ChmQl25dHMWDWS6eX7S3e90zU325D3nrU71dIT415Jm3IGTTdPLbgiE2urSBP5mra8B1IdSoe4gS9wrrutxPRNQmWWO5I2sFiDgf2Ahdhig6EA4 hANwib4RICQ2w6lVJ6HASj12ZA1wtRjiEFvd7zwi9nqlhbp4mn2F9y/IYfnpMC0s/zBJFbWFZtBU2fQO2qm3aJmSQX8ZP8sOtBcOjHADXx9xuo3RedUHIMTHIQ70nusyVCbKAM/V Z7mj3LgV6J8hZ5jmMPP8G20gKwlvOrZAWwV6DsBomwTXjO1OqQbcZDz8uWaefVRj/HO4VQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



NjiaSw103

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/yBcV3lUuar1p1QCDC6AGhnKjtADTDd>

