



UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

“Aprovechamiento de residuos agroforestales en el cultivo de hongos Basidiomicetos”

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

ADRIANA IBARRA ISLAS
ES1511123754

Comité tutorial:

Director: Dr. Oscar Arce Cervantes

Codirectora: Dra. Jazmín Edith Hernández Méndez

Asesor interno:

Dra. Diana Elinos Calderón

ICAp UAEH

UAM Iztapalapa.

UnADM

Los desafíos hacen la vida interesante y superarlos la hace significativa

Joshua J. Marine.

DEDICATORIAS

Principalmente a mis padres...

A ti querida madre Doña Paula con tu ejemplo, fortaleza y tu peculiar forma de ser, te has convertido en el pilar de mi atolondrada vida.

Don Tomé, me enseñaste que trabajando fuerte es la única forma de obtener lo que se desea.

Al ser de luz que me guía en este plano terrenal, Paulina, hija te amo, eres la expresión más pura del amor.

A mi hermana Ime, soy un desastre cuando tu no estas a mi lado.

Mi hermanita Lili, tienes un gran corazón, aunque no lo parezca, gracias por tanto y por todo.

Marco, hermano, gracias.

A las extensiones de hijos que la vida me otorgó Gerardo, Ubaldo, Molly, Toñito, los amo con todo mi ser.

A mi compadre Ubaldo, por todo tu apoyo, nunca podré agradecerte lo suficiente.

Para el Rafiki, gracias por ese cariño que le das a mi hija.

A mis compañeros y amigos de esta travesía, Elizabeth, Beatriz, Cuauhtémoc, Liliana, por la paciencia, el cariño, las desveladas, las pláticas y las tareas compartidas, los quiero y admiro tanto, gracias totales.

Maressa gracias amiga, todo esto es por tu culpa.

AGRADECIMIENTOS

Mi total admiración y agradecimiento al Dr. Oscar Arce Cervantes, por compartir conmigo una pequeña parte de todos sus conocimientos, por su enorme paciencia, confianza y ahora amistad.

A la Ingeniero Agrónoma Gabriela de Vega Luttmann por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y a su director el Dr. Miguel Ángel Míguez Escorcía por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A las próximamente Ingenieras Agrónomas Karina y Claudia, eternamente agradecida por su apoyo durante esta aventura.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
I. RESUMEN.....	viii
II. MARCO TEORICO	1
1.1. GENERALIDADES DE LOS HONGOS.....	1
1.2. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS.....	1
1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS.....	2
1.3.1 BASIDIOMICETOS.....	2
1.3.2 CICLO BIOLÓGICO DE LOS BASIDIOMICETOS	3
1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS EN ESTUDIO	4
1.4.1 <i>Ganoderma lucidum</i>	4
1.4.2 <i>Pleurotus spp</i>	5
1.4.3 <i>Lentinula edodes</i>	7
2. LIGNOCELULOSA Y ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS	8
2.1 Celulasas	9
2.2 Lacasas	10
2.3 Xilanasas	12
3. GENERALIDADES SOBRE LOS RESIDUOS AGROFORESTALES	13
3.1 Acícula De Pino (<i>Pinus pseudostrabus</i>)	14
3.2 Cáscara de nuez pecanera (<i>Carya illinoensis</i>).....	15
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	18
1. OBJETIVO GENERAL	18
2. OBJETIVOS PARTICULARES:	18
VI. METODOLOGÍA	19
1. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS	19
2. OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RESIDUOS AGROFORESTALES.	
20	
3. CRECIMIENTO MICELIAL EN PLACAS.....	23
4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMÁTICO	25
4.1. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	26
4.1.1 DETERMINACIÓN DE CELULASAS	26

4.1.2 DETERMINACION DE LACASAS	27
4.1.3 DETERMINACION DE XILANASAS	28
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
VII. ESQUEMA	29
VIII. RESULTADOS	30
A) VELOCIDAD RADIAL DE CRECIMIENTO	30
B) CINÉTICA ENZIMÁTICA (DETERMINACIÓN DE CELULASAS, XILANASAS Y LACASAS)	32
• CELULASAS	32
• XILANASAS	34
• LACASAS	36
IX. DISCUSIÓN	38
• Velocidad radial de crecimiento	38
• Cinética enzimática	38
X. CONCLUSIONES	39
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	40

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Ciclo de la vida de los hongos basidiomicetos (Gaitán et al., 2006).....	3
Ilustración 2 Ganoderma lucidum (García, 1980).....	4
Ilustración 3 Pleurotus spp. (García, 1980)	6
Ilustración 5. Hidrolisis enzimática de la celulosa (Cerdeja Mejía, 2016).....	10
Ilustración 6 Ciclo catalítico de la oxidación con oxígeno por lacasa (Solomon et al., 2001).	11
Ilustración 7 Estructura del xilano y el sitio de ataque de las enzimas xilanolíticas (Pastor et al., 2007).....	12
Ilustración 8 Acícula de pino (Pinus pseudostrobus) zona residencial en el municipio de Tulancingo de Bravo, Hgo	14
Ilustración 9 Residuo de la cáscara de nuez pecanera (Carya illinoensis) dispuesto a pie de carretera en el municipio de Atotonilco el Grande, Hgo	15
Ilustración 10 Transferencia de micelio	19
Ilustración 11 Crecimiento micelial de hongos en estudio.....	20
Ilustración 12 Residuos agroforestales Acícula de pino (Pinus pseudostrobus) y cáscara de nuez pecanera (Carya illinoensis)	21
Ilustración 13 Licuadora Industrial.....	22
Ilustración 14 Tamices.....	22
Ilustración 15 Sustrato de Acícula de pino tamizado (Pinus pseudostrobus)	23
Ilustración 16 Cáscara de nuez (Carya illinoensis) pulverizada.....	23
Ilustración 17 Sustratos (acícula de pino/cáscara de nuez) y medio de cultivo esterilizados .	24
Ilustración 18 Medición del crecimiento micelial de hongo Lentinula edodes en Cáscara de nuez/Vernier.....	24
Ilustración 19 Matraces EM con los diferentes sustratos	25
Ilustración 20 Inoculación de cepas de hongos a matraces EM con los sustratos	25
Ilustración 21 Incubación de los matraces EM inoculados.....	26
Ilustración 22 Esquema general de la metodología	29

TABLA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Velocidad radial de crecimiento de los hongos en estudio.....	31
Gráfico 2 Medición de Celulasas en cáscara de nuez.....	32
Gráfico 3 Medición de celulasas en acícula de pino.....	33
Gráfico 4 Medición de xilanasas en cáscara de nuez.....	34
Gráfico 5 Medición de xilanasas en acícula de pino.....	35
Gráfico 6 Medición de lacasas en cáscara de nuez.....	36

TABLAS

Tabla 1 Velocidad radial de crecimiento (Muestra/horas)	30
--	----

I. RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la capacidad de crecimiento *in vitro* de los hongos basidiomicetos *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* y *Pleurotus ostreatus* sobre residuos agroforestales, así como la producción de enzimas lignocelulolíticas. Para medir la velocidad de crecimiento radial se estableció un experimento usando PDA como control y 2 tratamientos del medio combinado con 25 g/L de residuo molido de acícula de pino (AP) y cáscara de nuez (CN) con cinco 5 repeticiones. Se estableció un experimento completamente al azar de las unidades experimentales con matraces Erlenmeyer de 250 mL y 6 gramos de los sustratos secos y molidos. Finalmente, para las determinaciones enzimáticas de celulasas y xilanasas se utilizó el método de azúcares reductores con el reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La determinación de lacasas se realizó mediante la oxidación del ácido 2,2-azinobis-3-etilbencentiazolinasulfónico (ABTS). Se realizó prueba de medias de los resultados obtenidos. Se observó crecimiento exponencial en la combinación de PDA/CN de las cepas de los hongos en estudio, destacando la cepa de *Ganoderma lucidum* alcanzando un diámetro radial total de 7.88 cm a las 144 horas.

Posteriormente, se reportaron las unidades Internacionales por gramos de sustrato seco (UI/gss) de los extractos enzimáticos de los hongos en estudio donde se observó la mayor producción enzimática por parte de la cepa de *Ganoderma lucidum* en ambos sustratos.

Para comparar la velocidad radial de crecimiento y actividad enzimática de los hongos en estudio en los diferentes sustratos se realizó un análisis de varianza de una vía.

Finalmente, con este proyecto de investigación mostró que el uso de los sustratos lignocelulósicos son una alternativa ecológica para obtener enzimas lignocelulolíticas para futuras aplicaciones.

II. MARCO TEORICO

1.1. GENERALIDADES DE LOS HONGOS.

Los hongos son organismos eucarióticos carentes de clorofila, cuyo tallo generalmente filamentosos no consta de órganos como raíces, tallos ni hojas, son heterotróficos para sustancias carbonadas, son aerobios o anaerobios facultativos y se alimentan por medio de enzimas y por absorción. Su pared celular está compuesta de quitina y glucanos envueltos en una matriz de polisacáridos y glucoproteínas (Roa, *et. al.*, 2018).

Los hongos se desarrollan mejor en habitats oscuros y húmedos, el pH óptimo para ellos es de 5.6, sin embargo, algunos hongos toleran ambientes con pH de 2 a 9 y pueden desarrollarse en soluciones salinas concentradas o en soluciones azucaradas, que dificultan o impiden la proliferación de bacterias, también prosperan en un amplio intervalo de temperatura (Guzmán *et. al.*, 1993).

Se reproducen mediante la formación de esporas, las cuales pueden ser sexuales (lo que implica un proceso de meiosis) o asexuales (lo que únicamente implica procesos de mitosis). Los hongos pertenecientes a las clases cigomicetos, arquiascomicetos, basidiomicetos, hemiascomicetos y euascomicetos producen tanto esporas sexuales como asexuales (Murray *et.al.* 2009).

1.2. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS

Los hongos están involucrados en numerosos fenómenos biológicos y químicos vinculados a la desintegración de la materia orgánica, procesos industriales de fermentación, producción comercial de medicamentos, alimentación humana y los sistemas de producción agroforestal (Ardón, 2007).

Específicamente, los hongos que crecen en sustratos linocelulósicos tales como la madera o la paja, excretan una mezcla de enzimas hidrolíticas y oxidantes que despolimerizan los componentes del sustrato el cual está compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Algunos hongos comestibles, como los del género *Pleurotus*, tienen la habilidad de colonizar el rastrojo y degradar la lignina, además de la hemicelulosa y la celulosa contenida en

el sustrato. Estos tipos de hongos son considerados como agentes primarios porque son capaces de utilizar los desechos agroforestales en su forma natural sin que hayan sido sujetos a algún proceso de degradación bioquímica o microbiológica. La bioconversión de los residuos agrícolas lignocelulósicos como fuente para la producción de hongos comestibles a través de procesos de fermentación sólida, representa una posibilidad biotecnológica para la obtención de alimento humano rico en proteínas y reducir el impacto ambiental de éstos, partiendo por lo general de materia de bajo costo (Sánchez y Royse, 2002)

1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS.

Los hongos se clasifican en: *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Estos dos últimos son considerados hongos superiores, mientras que el primero agrupa a hongos inferiores, la clasificación se basa en las diferencias en sus estructuras reproductivas. Los *Zygomycota* poseen zygosporas como esporas de reproducción sexual; los *Ascomycota* producen ascosporas, dentro de una cavidad especial llamada ascos, mientras que los *Basidiomycotas* producen basidiosporas en un basidio (Silva *et al.*, 2010).

1.3.1 BASIDIOMICETOS

Los hongos perteneciente a esta grupo, presentan un micelio binucleado, con un crecimiento terminal y membranas celulares muy quitinizadas. Poseen células llamadas basidios, que generalmente son redondos y mazudos donde desarrollan pequeños pedúnculos denominados esterigmas, cuya función es sostener a las esporas y basidiosporas (Navarro, 2013).

Su reproducción es asexual por conidios y sexual por basidio esporas. En general, son hongos saprofitos del suelo y plantas. Pueden tener o no, basidiocarpo para sostener los basidios (Arenas, 2011)

Los hongos basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes microbianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (Brizuela *et al.*, 1998).

1.3.2 CICLO BIOLÓGICO DE LOS BASIDIOMICETOS

La forma de reproducción de los hongos es a través de las esporas, que en el caso de los hongos basidiomicetos estas son llamadas basidios (Suárez, 2010)

Las esporas (Ilustración 1) son lanzadas por el himenio al exterior, si se depositan en lugares húmedos y de condiciones favorables, darán origen al micelio, éste crecerá bajo tierra o leños dando lugar a una seta con basidios en su himenio y se producirán las esporas para que sean nuevamente liberadas al exterior y se completa el ciclo de reproducción (Suárez, 2010).

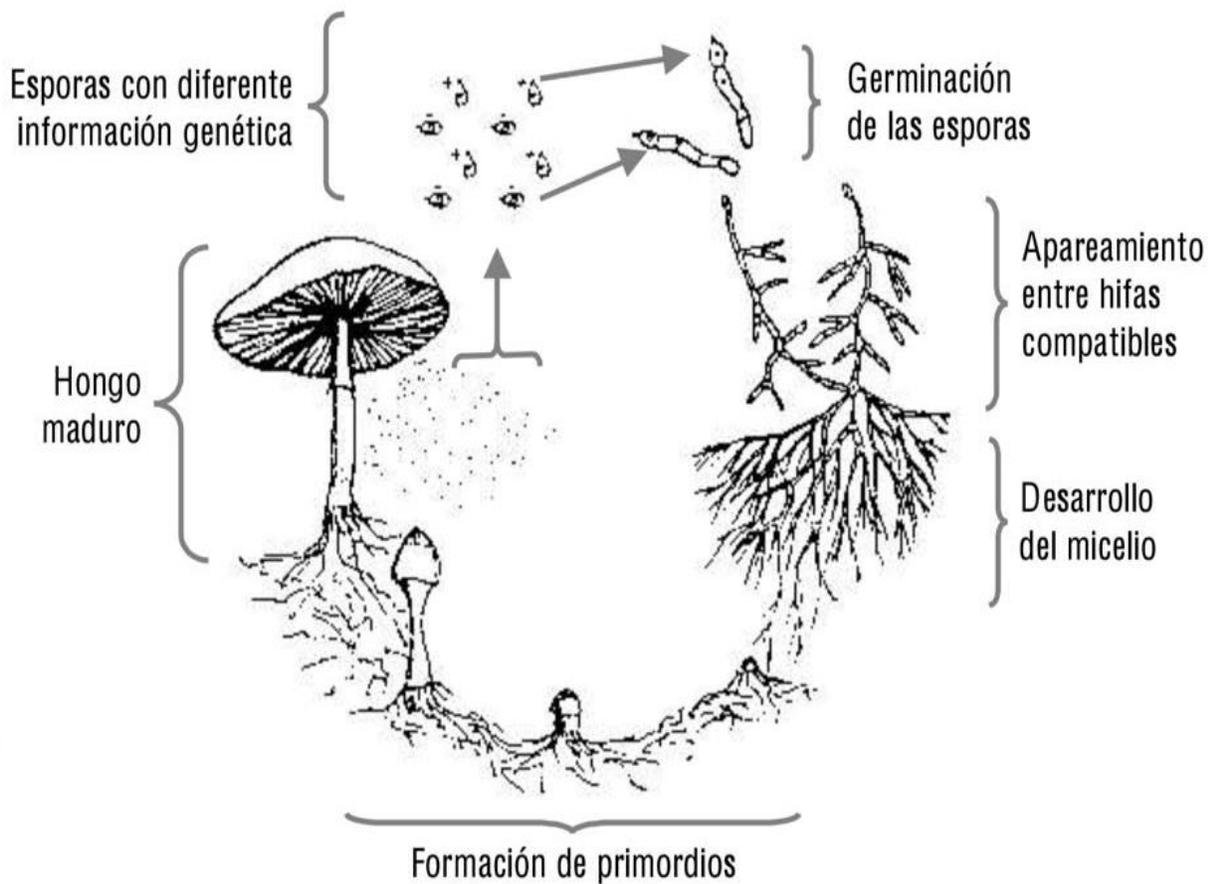


Ilustración 1 Ciclo de la vida de los hongos basidiomicetos (Gaitán et al., 2006)

1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS EN ESTUDIO

1.4.1 *Ganoderma lucidum*

Taxonomía.

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Orden: Polyporales

Familia: Ganodermataceae

Género: Ganoderma

Especie: *Ganoderma lucidum*



Ilustración 2 *Ganoderma lucidum* (García, 1980)

Ganoderma lucidum (Ilustración 2) es un hongo basidiomiceto perteneciente al Orden Poliporales y la familia poliporaceae. En su estado verde el hongo es suave, duro y plano, destacándose por la presencia de un sombrero (píleo), lateralmente estipitado, de hasta 8 cm. en la parte más ancha, rojo barniz brillante, generalmente de tonos más claros hacia el margen, arriñonado en forma de tapa y, dependiendo de la edad presenta colores que van del blanco al negro pasando por tonalidades amarillentas, marrones, azules, rojas, moradas y violáceas en la zona de los poros. El tallo (estipe o estípite) situado lateralmente en el píleo, es pálido,

escabroso hacia el sombrerillo, de 10 cm de alto y 2 cm de ancho. Sus esporas de pared doble, ambas interconectadas por pilares, pared interna castaño-amarillenta, pared externa hialina (Ramírez y Saínz, 2013).

Es reconocido por sus múltiples propiedades beneficiosas para la salud por muchos siglos en China, Japón y Corea (Wasser, 2005) donde se lo conoce como el hongo de la longevidad o inmortalidad. Sus nombres comunes son Reishi y Lingzhi (hierba celestial). Este hongo posee numerosos componentes activos entre los que podemos mencionar: adenosina, proteínas, vitaminas, fenoles, oligoelementos, polisacáridos y triterpenoides. En particular, polisacáridos y triterpenoides, son fracciones intensamente estudiadas por sus propiedades como antioxidante, inmunoestimulante, antitumoral, hepatoprotectora, hipoglucemiante, hipocolesterolemia, entre otras (Bidegain *et al.*, 2015).

1.4.2 *Pleurotus spp*

Taxonomía.

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Basidiomycota

Clase: Homobasidiomycetes

Subclase: Hymenomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: *Pleurotaceae*

Género: *Pleurotus*

Especie: *Pleurotus spp*



Ilustración 3 *Pleurotus* spp. (García, 1980)

Las especies del género *Pleurotus* se caracterizan por presentar basidiomas en forma de abanico (flabeliformes) o de embudo (infundibuliformes). Sus píleos o sombreros pueden tener una gran variedad de colores, desde blanco, blanquecino, crema, amarillento, café pálido a oscuro, café grisáceo, gris azulado, rosa o rosa anaranjado, en algunas ocasiones con la superficie viscosa. Sus láminas están adheridas al pie, son de color blanco, blanquecino, rosadas a rosa anaranjado. El estípite o pie está ausente o puede presentarse lateral, corto o largo. Algunas especies presentan velo, dejan rastros en el borde del píleo y ocasionalmente forman una zona anular en el estípite (Ilustración 3). El contexto (“carne”) es esponjoso, de color blanco a blanquecino, con un olor agradable fúngico o de harina (Sánchez y Royse, 2002).

Tienen propiedades medicinales como: anticancerígenos, antibióticos, reductores del nivel de colesterol, padecimientos cardiovasculares e hipertensión, antitrombóticos, antidiabéticos, suplemento dietético y productos metabólicos con amplio potencial de uso industrial (Martínez, 2014).

Respecto a su aporte nutricional, tiene apreciables valores proteínicos, energéticos, contiene un bajo contenido de grasa, están presentes aminoácidos esenciales, constituyen una fuente rica de vitaminas y minerales como el potasio, fósforo, sodio, magnesio, calcio, zinc y cobre (Romero, 2006).

1.4.3 *Lentinula edodes*

Taxonomía:

- Reino: Fungi
- División: Eumycota
- Subdivisión: Basidiomycota
- Clase: Holobasidiomycetes
- Subclase: Hymenomycetidae
- Orden: Agaricales
- Familia: Tricholomataceae
- Género: *Lentinula*
- Especie: *edodes*
(Solomon, 1996)



Ilustración 4. *Lentinula edodes* <http://www.casaubieta.com/blog/shiitake-lentinus-edodes-hongos-nutri-medicinales/>

Lentinula edodes es un hongo que se caracteriza por tener un sombrero de 5 a 25 cm de diámetro, semiesférico. En su etapa inicial este hongo presenta un color café oscuro casi negro pero con el tiempo su color cambia a café claro. La forma del sombrero, en algunas ocasiones puede ser irregular sin embargo, normalmente el hongo al principio debe estar un

poco enrollado, y a medida que se desarrolla se va encorvando y finalmente cuando alcanza la madurez, su sombrero se vuelve aplanado (Ilustración 4). Otro indicador importante del desarrollo del hongo son las manchas que aparecen de forma irregular en el sombrero, pueden ser puntos de color blanco, pero pueden tornarse de color café oscuro cuando el hongo se está deteriorando (Solomon, 1996).

Lentinula edodes es reconocido por su aporte nutricional, ya que contiene entre 58-60 % de carbohidratos, 3-4% de lípidos y 20-23% de proteínas. Contiene vitaminas B1, B2, B3, B12, ácido fólico, vitamina D y minerales como el Fe, Mn, Ca, Mg, Cd, Na, Cu, P y Zinc (Statens, 2001).

Otras propiedades que se le atribuyen son la actividad anticancerígena, antiviral, antibacteriana y antifúngica (Chang y Miles, 2004).

2. LIGNOCELULOSA Y ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

La lignocelulosa es uno de los componentes principales de las plantas y del material vegetal en descomposición, es la principal biomasa procedente de pastos, árboles y residuos forestales (Gómez, *et al.*, 2008).

La lignina protege a la celulosa y es estructuralmente heterogénea, con un arreglo irregular de polímeros de fenilpropano que se enlazan por polimerización oxidativa. Este polímero es depositado principalmente en la pared celular secundaria y mantiene unidas las fibras celulósicas. Confiere rigidez a la planta e impermeabilidad a los materiales lignificados, es muy resistente a la biodegradación, protegiendo a la pared del ataque microbiano (Cerdeira, 2016).

La lignina no es digerible por los animales pero sí por hongos y bacterias secretoras de enzimas que pueden degradar el polímero (Revollo *et al.*, 2012). Los hongos de la podredumbre blanca constituyen el grupo más importante que biodegradan la lignina, gracias a que producen enzimas lignolíticas (Hammel, 1996).

2.1 Celulasas

Las celulasas son un grupo muy diverso de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -1,4, que mantienen unida la cadena de celulosa. Según su actividad pueden clasificarse en endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas (Cerdeira, 2016).

Las endoglucanasas hidrolizan el enlace glucosídico β -1,4 que existe entre las moléculas de la glucosa en posiciones aleatorias en la zona interior de la estructura de las cadenas y su acción es más común en las zonas de celulosa amorfa que forman microfibrillas. Como resultado de la acción de las endoglucanasas, el polímero es dividido en fragmentos de menor dimensión, con lo que se generan nuevos extremos en la molécula. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas actúan sobre los extremos de la celulosa liberando un dímero denominado celobiosa. Finalmente, las β -glucosidasas catalizan la reacción de hidrólisis del enlace glucosídico presente entre las dos moléculas de glucosa que forman la celobiosa. A través de la acción conjunta de estos tres tipos de enzimas se obtiene la correcta degradación de la celulosa hasta moléculas simples de glucosa (Devía, 2014).

Las endoglucanasas juegan un papel importante al incrementar el rendimiento de jugo de frutas, la filtración de cerveza, mejoran la calidad nutricional de productos de panadería y alimento para ganado (Cullen y Kersten, 1992; Kaur *et al.*, 2007). Las exoglucanasas son importantes en la degradación de la celulosa cristalina, actúan en los extremos de las fibras de la celulosa y en los sitios creados por la acción de las endoglucanasas generando moléculas de celobiosa y pequeñas cantidades de glucosa. Estas enzimas se inactivan en carboximetilcelulosa, pero hidrolizan la celulosa amorfa al atacar los residuos de celobiosa (Kaur *et al.*, 2007).

Por último, las β -glucosidasas, las cuales hidrolizan las moléculas de celobiosa a monómeros de glucosa (Ilustración 5) de esta manera, los microorganismos pueden utilizar los productos generados por la hidrólisis de la celulosa como fuente de carbono para el crecimiento (Rabinovich *et al.*, 2002).

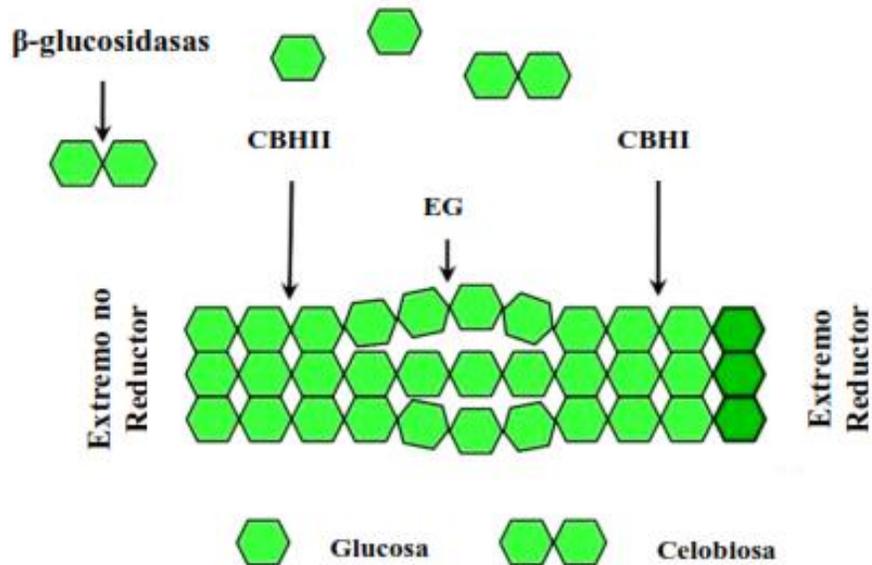


Ilustración 4. Hidrolisis enzimática de la celulosa (Cerde Mejía, 2016).

2.2 Lacasas

Las lacasas (1,2-benzenediol:oxígeno óxidoreductasa, EC 1.10.3.2) son oxidasas de una variedad de compuestos aromáticos (*p*-difenoles) y se caracterizan por poseer 3 centros catalíticos: Un centro T1, mononuclear, se encarga de la oxidación del sustrato, mientras que dos centros T2 y T3, forman un centro trinuclear, el cual se encarga de reducir el oxígeno molecular a agua (Alcalde y Bulter, 2003; Arias *et al.*, 2003). Entre los sustratos naturales de las lacasas se incluyen fenoles, polifenoles, anilinas, aril-diaminas, fenoles metoxi-sustituidos, hidroxi-indoles, benzenotioles, compuestos metálicos orgánicos e inorgánicos, entre otros (Kunamneni *et al.*, 2008).

En la Ilustración 6 se muestra el ciclo catalítico de oxido reducción llevado a cabo por las lacasas. En estas enzimas, los diferentes centros de cobre actuarían conduciendo electrones desde un sustrato reductor hasta el oxígeno molecular de una manera controlada, sin la formación de intermediarios tóxicos. Esta reacción tiene lugar a través de cuatro oxidaciones monoelectrónicas del sustrato catalizadas en el centro de cobre T1, el cual media la transferencia de electrónica hasta el centro T2/T3, donde tiene un lugar la unión y reducción del oxígeno molecular a agua. Este primer paso de reducción del centro T1 por el sustrato,

constituye el paso limitante en el ciclo global de oxidorreducción de las lacasas (Rodríguez, 2006).

Con respecto a la reducción del O₂, el centro trinuclear T2/T3, reducido completamente, reaccionaría con el oxígeno para dar lugar a un intermediario tipo peróxido, en un paso de reducción con 2 electrones, donde el átomo de cobre de tipo 2 y uno de los átomos de cobre tipo 3 estarían unidos mediante un enlace hidropéroxido este intermediario se activaría para llevar a cabo una reducción adicional, dando lugar a un intermediario tipo nativo donde los dos átomos de cobre anteriores estarían unidos mediante un producto tipo oxo o tipo hidroxilo. La formación del intermediario nativo implicaría la ruptura del enlace O-O de la molécula de oxígeno molecular a través de la transferencia de 2 electrones. Así, la reducción del oxígeno con 4 electrones tendría lugar a través de dos pasos de reducción con 2 electrones cada uno. Por último, el intermediario nativo se relajaría lentamente dando lugar a la enzima en estado de reposo (Rodríguez, 2006).

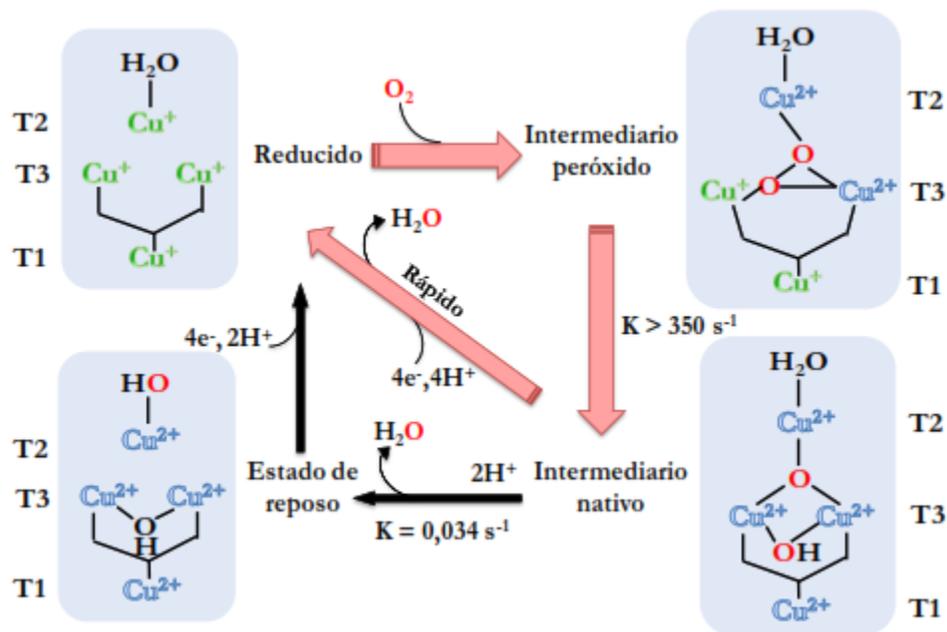


Ilustración 5 Ciclo catalítico de la oxidación con oxígeno por lacasa (Solomon et al., 2001).

Las lacasas de origen fúngico han sido ampliamente estudiadas y en la actualidad tienen usos biotecnológicos (Rodríguez *et al.*, 2003; Kiiskinen *et al.*, 2004).

Entre las aplicaciones biotecnológicas potenciales de las lacasas se encuentran: deslignificación de biomasa lignocelulósica (Rodríguez *et al.*, 2003); bio-blanqueamiento de

pulpa de papel (Bourbonnais *et al.*, 1997; Ibarra *et al.*, 2006); tratamiento de aguas residuales industriales (Bergbauer *et al.*, 1991; Berrio *et al.*, 2007); modificación enzimática de fibras y blanqueamiento de textiles (Abadulla *et al.*, 2000; Kunamneni *et al.*, 2008b); destoxificación de contaminantes y biorremediación (Alcalde *et al.*, 2002).

2.3 Xilanasas

El xilano es el segundo polisacárido más abundante en el planeta y componente principal de las paredes celulares de las plantas junto con la celulosa, hemicelulosa (principalmente xilano) y lignina los cuales se encuentran estrechamente asociados (Subramaniyan y Prema,2002).

La hidrólisis del xilano es efectuada por un complejo de enzimas llamadas de forma genérica xilanasas: endo-1,4- β -xilanasas y las β -xilosidasas (Arce, 2012).

Las endo-1,4- β -xilanasas EC 3.2.1.8. o endoxilanasas son las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos β (1 \rightarrow 4) entre moléculas de xilosa, (Ilustración 7) dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños (Biely, 1995) y las β -xilosidasas liberan residuos de xilosa a partir de xilobiosa y los xilooligómeros generados (Pastor *et al.*, 2007).

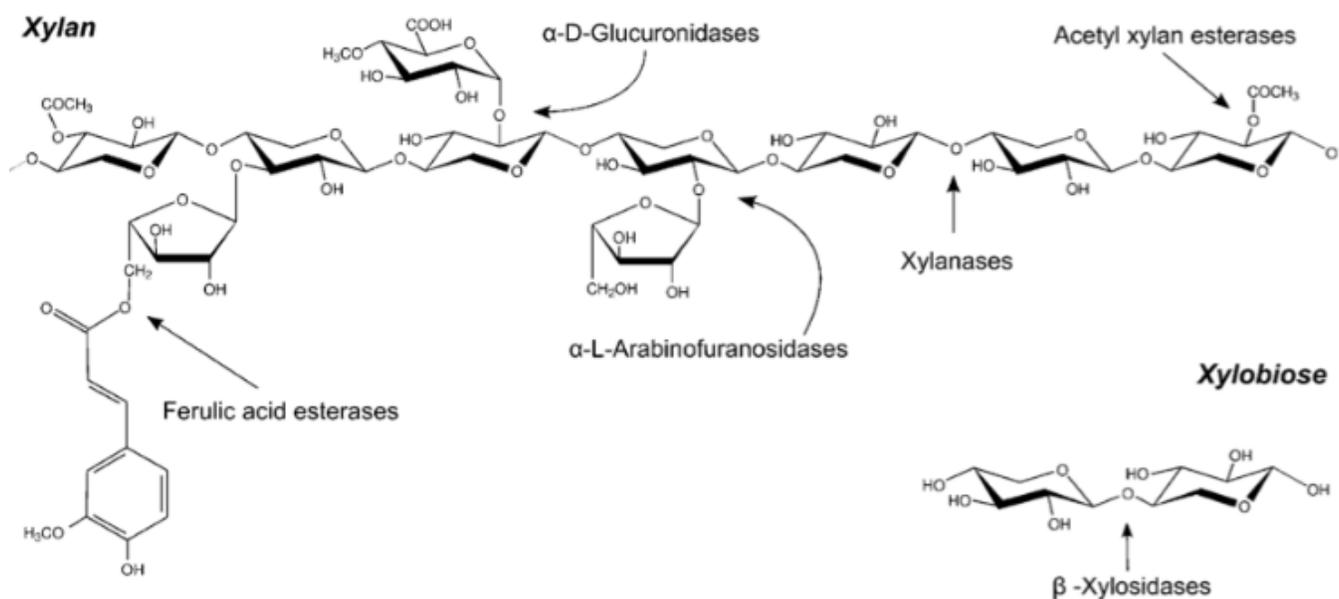


Ilustración 6 Estructura del xilano y el sitio de ataque de las enzimas xilanolíticas (Pastor *et al.*, 2007)

De esta manera, el xilano puede ser degradado a pesar de que el acceso de la xilanasas al polímero de xilano pueda ser obstruido por los sustituyentes en las cadenas laterales y a que

estos constituyentes puedan ser más fácilmente liberados a partir de fragmentos de xilano que del compuesto polimérico como tal (Pastor *et al.*, 2007).

En la actualidad, los usos de las enzimas xilanolíticas está en creciente demanda y son de suma importancia sobre todo en la industria papelera para tratar sus residuos y el pre-blanqueado del papel (Cooper y Bibriesca, 2003) otras aplicaciones incluyen su uso como aditivo en el alimento de las aves para mejorar la ganancia y mejorar la eficiencia de conversión porque se mejora la digestibilidad (Bedford y Classen, 1992), su uso para la extracción de almidón, café y aceites vegetales (Wong y Saddler, 1992) o para el tratamiento de aguas de desecho (Biely, 1995).

3. GENERALIDADES SOBRE LOS RESIDUOS AGROFORESTALES

Los hongos pueden vivir en el suelo, sobre residuos lignocelulósicos, o sobre los troncos de los árboles, para alimentarse secretan enzimas sobre el sustrato donde se encuentran, lo degradan en sustancias simples y absorben los nutrimentos necesarios para su desarrollo (Herrera y Ulloa, 1990).

Mediante el cultivo de hongos se realiza la bioconversión de sustratos agrícolas o agroforestales, en alimentos y medicinas, solucionando de esta manera, al menos parcialmente, tres de los problemas más graves que afronta la población mundial: la escasez de alimentos, las enfermedades y la contaminación ambiental (Rodríguez -Jaramillo, 2005).

Para la elección y preparación del sustrato, se deberán tener en cuenta una serie de factores: la estabilidad de los materiales, la corrección de las propiedades físicas y químicas de estos, la desinfección y la adecuación de las mezclas para que éste sea óptimo (Burés, 2006).

Se pueden usar una gran variedad de sustratos para la preparación del inóculo de los hongos, por ejemplo:

- Materiales lignocelulósico como paja de arroz, trigo, desechos de algodón, pulpa de café, cáscara de nuez, etc (Guzmán *et al.*, 1993).
- Aserrines de la industria maderera, tanto de pino como encino y de las especies tropicales (Romero, 2006).

3.1 Acícula De Pino (*Pinus pseudostrobus*)

El tallo y las ramas se usan como leña combustible o para la fabricación de carbón, la resina se usa para el tratamiento contra torceduras, siendo este su principal producto forestal no maderable para producir brea y trementina (López, 2011).

Las acículas de pino componen un residuo orgánico, químicamente activo y procedente de la superficie de los bosques de pinos de zonas forestales (Karlánian *et al.*,2008) que tarda bastante tiempo en descomponerse, impiden el paso de luz a las plantas inferiores, aumentan la acidez del suelo y son altamente flamables por lo que representan un factor de riesgo para incendios forestales (Córdova, 2009). En varias regiones incluyendo las zonas boscosas del estado de Hidalgo (Ilustración 8) se encuentran grandes volúmenes de este residuo y hasta la fecha no existen normativas que limiten su extracción y utilización (De Vega, 2017).

Se requiere una estandarización correcta para obtener excelentes resultados, ya que es un material naturalmente muy variable. Con la aplicación de técnicas de compostaje se obtienen materiales biológicamente estables, evitando el bloqueo de nutrientes y la eliminación de sustancias fitotóxicas o inhibidoras del crecimiento (Karlánian *et al.*,2008)



Ilustración 7 Acícula de pino (*Pinus pseudostrobus*) zona residencial en el municipio de Tulancingo de Bravo, Hgo

3.2 Cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*)

El nogal pecanero es una planta angiosperma dicotiledónea que, se caracteriza por medir de 15 a 45 m de alto, 12 a 20 m de follaje y con circunferencia de tronco de 2 metros, que produce como fruto una semilla dura y seca dentro de una vaina o ruezno (Figura 8), que es expulsada una vez que ha llegado a su maduración. La semilla tiene una cáscara dura y una semilla o nuez comestible. El fruto seco de *Carya illinoensis* (Wangenh.) K.Koch se conoce comúnmente como nuez pecanera. La nuez pecanera puede distinguirse por su cáscara delgada, denominada también cáscara de papel, misma que facilita el proceso de quebrado (Moncayo y Reyes, 2018). Es uno de los frutos secos más consumidos en la dieta americana, nativo del sur de Estados Unidos (río Mississippi) y norte de México (Vázquez *et al.*, 2016)



Ilustración 8 Residuo de la cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*) dispuesto a pie de carretera en el municipio de Atotonilco el Grande, Hgo

Los meses de mayor producción son de octubre a diciembre, pero es en este último mes del año, cuando se cultiva el 43.3 % de este alimento. En el 2017, la producción de nuez en México registró un aumento de 83 %. Las entidades productoras de nuez en el país fueron Chihuahua, con 45.6 %; Sonora, 25.4 %; Coahuila, 12.5 %; Nuevo León, 7.6 % e Hidalgo, 3.8 %. Estos estados aportaron el 95 % de la producción nacional reportada, lo que representa un volumen de 36 mil 679 toneladas de nuez (Moncayo *et al.* 2018).

En 2015 México se convirtió en el principal exportador de nuez pecanera con 22 mil 738 toneladas, que representa el 56% del volumen comercializado a nivel internacional. Se estima que se producen al año 40 mil 824 toneladas de nuez pecanera, que equivale al 40.1% de lo que se cultiva en el mundo (Moncayo *et al.* 2018).

La disponibilidad de la cáscara, de alguna manera puede ser una problemática (Ilustración 9), si bien es cierto que se usa escasamente como relleno de caminos y abrasivo para metales: Sin embargo, se calcula que del 45–50 % del peso total del fruto es cáscara, la cual queda expuesta a cielo abierto resultando en un contaminante potencial. Este subproducto representa una problemática que hasta el momento no se le ha encontrado una aplicación a pesar de que tiene un alto contenido de compuestos bioactivos con valor en el mercado para fines alimentarios, cosméticos o farmacéuticos (Reyes y Urrea, 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido al desmedido crecimiento de la agroindustria, la cantidad de materiales orgánicos de desecho son una fuente considerable de contaminación ambiental, pues los volúmenes que se generan rebasan la capacidad de biodegradación natural, llegándose a convertir en un riesgo para el equilibrio del ecosistema ya que se acumulan en terrenos o son quemados y de esta manera, se genera también, contaminación ambiental. Por esta razón, existe un interés para la utilización de estos residuos en procesos productivos que permitan emplear estos materiales con sus consecuentes beneficios económicos y ambientales (Piña *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la biodegradación de dichos residuos (lignocelulósicos) por hongos de la pudrición blanca es un proceso que está tomando auge en el sector biotecnológico, ya que se producen hongos comestibles y/o medicinales, a la vez que se reduce el impacto ambiental que genera la eliminación inadecuada de tales residuos (Postemsky *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta que en México se está incrementando el interés por la población de hongos de valor comercial y se busca el abaratamiento de los costos de producción mediante el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos disponibles en la región, es importante la búsqueda de sustratos alternativos de bajo costo y fácil acceso, y que la selección del sustrato sea el adecuado tanto biológica como económicamente (Piña *et al.*, 2005).

IV. HIPÓTESIS

- El crecimiento micelial de las cepas evaluadas y su producción enzimática será favorecido por los sustratos residuales: Acícula de pino (*Pinus pseudostrobus*) y Cáscara de nuez (*Carya illinoensis*)

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar residuos agroforestales en el crecimiento micelial de hongos basidiomicetos

2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el crecimiento micelial de *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus* spp. y *Lentinula edodes* empleando sustratos alternos: Acícula de pino (*Pinus pseudostrobus*) y Cáscara de nuez (*Carya illinoensis*).
- Determinar la actividad enzimática (lacasas, xilanasas y celulasas) en el sustrato residual.

VI. METODOLOGÍA

1. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Para el cultivo del micelio de los hongos se utilizó agar extracto de levadura de malta EMA (33.6 g/L) y agar dextrosa y papa PDA (39 g/L), los cuales se esterilizaron en matraces Erlenmeyer en un autoclave durante un tiempo de 15 minutos a 15 psi y 121°C, posteriormente se distribuyen en cajas Petri, las cuales se dejan solidificar, y se transfieren porciones del micelio del borde de la colonia hacia el medio de cultivo preparado (Ilustración 10) y se mantienen a temperaturas entre 21°C y 25°C, entre 5 a 10 días, para promover el crecimiento del micelio del hongo, posteriormente las cajas Petri inoculadas, se colocan en refrigeración (Ilustración 11).

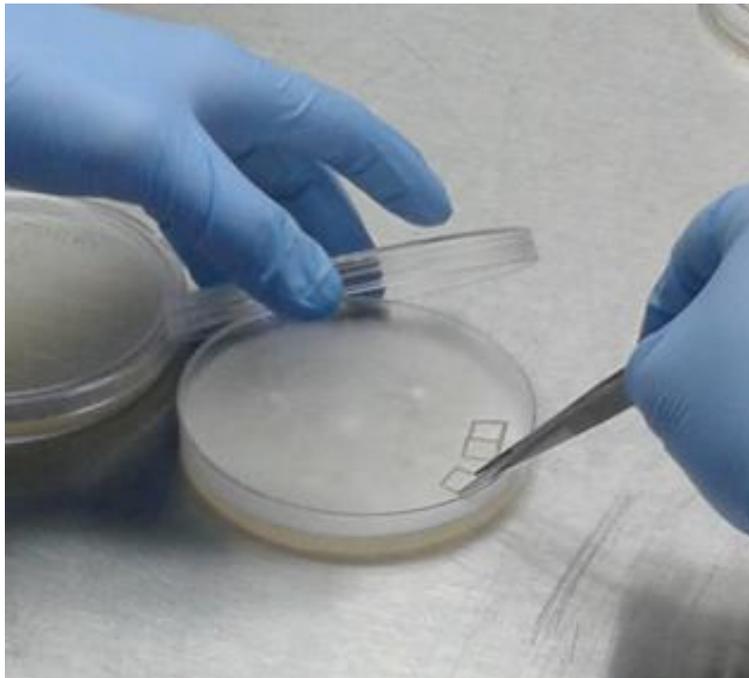


Ilustración 9 Transferencia de micelio

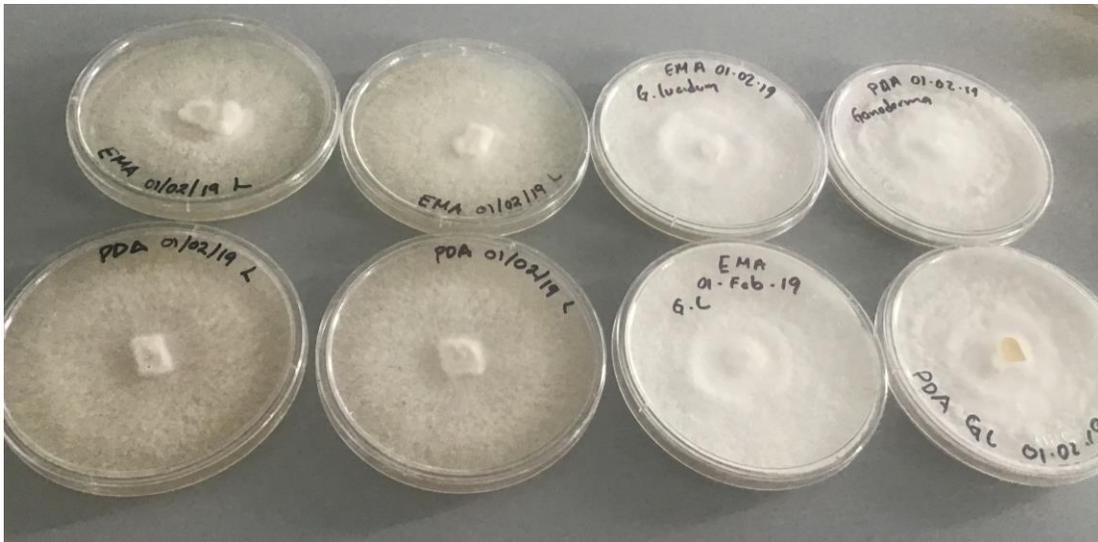


Ilustración 10 Crecimiento micelial de hongos en estudio

2. OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RESIDUOS AGROFORESTALES.

Para esta investigación se seleccionaron y recolectaron dos sustratos, los cuales son abundantes en la región Tulancingo:

- Acícula de pino (*Pinus pseudostrobus*) (Tulancingo de Bravo, Hidalgo)
- Cáscara de nuez (*Carya illinoensis*) (Barranca de Metztitlán, Hidalgo)

Los cuales se secaron para su almacenamiento a temperatura ambiente, sin exposición a la luz del sol directa (Ilustración 12).



Ilustración 11 Residuos agroforestales Acícula de pino (*Pinus pseudostrobus*) y cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*)

Los sustratos se molieron utilizando una licuadora industrial (Ilustración 13), y posteriormente se tamizaron (Ilustración 14) seleccionando el tamaño de partícula de 5 mesh/4000 microons y 10 mesh/2000 microon, para la acícula de pino (*P. pseudostrobus*) se utilizó el sustrato tamizado de 10 mesh (Ilustración 15) y para la cáscara de nuez (*C. illinoensis*) se utilizará la muestra pulverizada (Ilustración 16).



Ilustración 12 Licuadora Industrial



Ilustración 13 Tamices



Ilustración 14 Sustrato de Acícula de pino tamizado (*Pinus pseudostrobus*)



Ilustración 15 Cáscara de nuez (*Carya illinoensis*) pulverizada

3. CRECIMIENTO MICELIAL EN PLACAS.

Se evaluó la velocidad de crecimiento radial en placa (caja Petri) de las cepas de los hongos basidiomicetos. Usando 2 tratamientos: PDA como testigo y la combinación de éste con 2 residuos diferentes Acícula de pino (**AP**) y Cáscara de nuez (**CN**)

Se utilizó el medio PDA (papa dextrosa agar) por ser un medio de cultivo convencional de laboratorio, por su escasa selectividad y por presentar condiciones adecuadas para el crecimiento de cepas de Basidiomicetos en estudio por arriba de otros medios de cultivo (Suárez, 2010) además, tiene un pH de 5.6 a 5.9, y esta ligera acidez inhibe el desarrollo bacteriano (Coello-Lor, *et al.*, 2017).

Adaptando la metodología utilizada por Coello-Lor *et al.*, (2017) se pesaron 60 g de acícula de pino y 20 g de cáscara de nuez, se pusieron a hervir en 500 ml de agua destilada durante 15

minutos, se pesaron 19.5 g de agar PDA se agregó a cada recipiente, se homogeneizaron ambas mezclas y se dejaron hervir por otros 5 minutos, posteriormente se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 15 psi y 121°C (Ilustración 17).



Ilustración 16 Sustratos (acícula de pino/cáscara de nuez) y medio de cultivo esterilizados

Se vertieron los medios en cajas Petri y se dejaron solidificar, posteriormente se sembraron con inóculo de las cepas de los hongos en estudio (*Ganoderma lucidum*, *Pleurotus* spp., y *Lentinula edodes*) para realizar lo anterior se colocaron 5 mm de diámetro en el centro de las cajas Petri, se incubaron a una temperatura de entre 25-28°C y se midió el crecimiento del diámetro micelial en cada caja inoculada cada 24 horas, utilizando un vernier, hasta la invasión total del micelio en la caja de Petri (Ilustración 18).

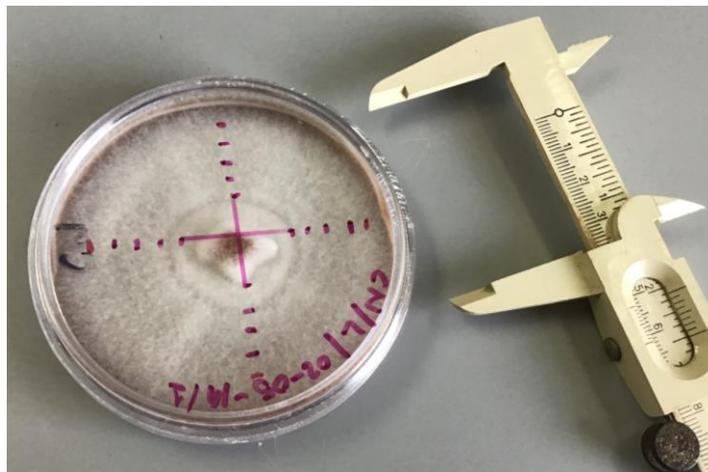


Ilustración 17 Medición del crecimiento micelial de hongo *Lentinula edodes* en Cáscara de nuez/Vernier

4. OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMÁTICO

Para la determinación de cada actividad enzimática se utilizaron 90 matraces. Para cada uno se pesó 4 gramos de paja de cebada y 2 gramos de cada sustrato (acícula de pino y cáscara de nuez) en total 45 matraces con paja de cebada /cáscara de nuez y 45 matraces con paja de cebada/ acícula de pino (Ilustración 19).



Ilustración 18 Matraces EM con los diferentes sustratos

Posteriormente se humedecieron con 15 mililitros de agua destilada, se taparon y se esterilizaron durante 1 hora a 15 Psi y 121°C. Transcurrido el tiempo de esterilización los matraces se sacaron, se enfriaron y se inocularon con las cepas de los hongos en estudio (Ilustración 20).



Ilustración 19 Inoculación de cepas de hongos a matraces EM con los sustratos

Se incubaron por espacio de 20 días en completa oscuridad a temperatura ambiente y humedad mayor al 80% con la finalidad de promover el crecimiento de los hongos en estudio en los sustratos elegidos (Ilustración 21).



Ilustración 20 Incubación de los matraces EM inoculados

Después de 5 días de incubación, se seleccionaron 18 matraces al azar (9 de cada sustrato y 3 repeticiones para cada hongo) para obtener el extracto crudo enzimático. Siguiendo la metodología sugerida por Martínez (2011) a cada matraz se le agregaron 100 mililitros de agua destilada, esta preparación se mantuvo en baño de hielo con agitación magnética durante 30 minutos, posteriormente el contenido de cada matraz se filtró con papel Whatman No. 40 y el extracto se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante recuperado se consideró como ECE (extracto crudo enzimático) y se utilizó para medir las actividades enzimáticas.

4.1. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

4.1.1 DETERMINACIÓN DE CELULASAS

CELULASAS: La actividad celulolítica se midió a los 5 días de cultivo. Se utiliza el método descrito por Miller *et al.*, (1960), el cual se basa en la cuantificación indirecta de azúcares reductores, como la glucosa, que reaccionan con el reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

reduciéndolo al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo oscuro; cuya presencia puede detectarse al medir la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm (Chaplin, 1986). Se utiliza como sustrato una solución de carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich) al 1%, disuelta en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.0). Se realiza una curva estándar con una solución de glucosa 10 mM (0.18 g/100 mL) disuelta en amortiguador de citrato de sodio (50 mM y pH 5.0).

En tubos de ensaye por triplicado se lleva a cabo la reacción para la determinación de celulasas. El volumen de la mezcla de reacción fue de 1 mL (0.9 mL de carboximetilcelulosa y 0.1 mL del ECE). La reacción se realiza a 50 °C durante 20 min, posteriormente se adiciona 1.5 mL del reactivo DNS. Se usan blancos de muestra, los cuales llevan el mismo procedimiento, solo que el ECE se agrega después del reactivo DNS. El volumen total de reacción se agita manualmente, los tubos se colocan en agua en ebullición por 20 minutos. Finalmente, los tubos se colocan en agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las lecturas se realizan en celdas de plástico en un espectrofotómetro (UNICAM HELIOS) a 640 nm. Una unidad internacional (UI) de enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcar reductor (glucosa) por min a 50 °C.

4.1.2 DETERMINACION DE LACASAS

LACASAS: La actividad de esta enzima se evalúa midiendo la oxidación del ácido 2,2-azinobis-3-etilbencenzotiazolinasulfónico (ABTS). El reactivo ABTS ($\epsilon_{420} = 36\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}$), se prepara a una concentración de 0.1 M disuelto en amortiguador de citratos (50 mM, pH 5.0). Esta solución se coloca en un frasco color ámbar y se cubre con papel aluminio, hasta por 10 días. Los tubos de reacción se preparan con 500 μL de ECE y se incuban en baño de agua a 40 °C durante 5 minutos. Al momento de la lectura se adicionan 500 μL del reactivo ABTS en cada muestra para dar un volumen total de 1 mL en una dilución 1:1. Los tubos se agitan con un vórtex y la absorbancia se mide a 420 nm durante 90 segundos, registrando la absorbancia en intervalos de 10 segundos. Una Unidad Internacional (UI) se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de sustrato oxidado por minuto bajo las condiciones de reacción.

4.1.3 DETERMINACION DE XILANASAS

XILANASAS: La actividad de xilanasas se midió por el método del DNS (Miller *et al.*, 1960) con modificaciones de Loera y Córdoba (2003) descritas a continuación: Se utilizó como sustrato una solución de xilano de abedul (Sigma-Aldrich) al 0.5 % el cual fue disuelto en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.3). Se realizó una curva estándar con solución de xilosa a una concentración final de 10 mM (0.15 g/100 mL) disuelta en buffer de citratos (50 mM, pH 5.3).

La reacción se realizó en tubos de ensaye por triplicado. El volumen de la mezcla de reacción fue de 1 mL, que contiene 0.9 mL de sustrato y 0.1 mL del ECE. Se incubó por 5 minutos a 50°C, enseguida se le agregó 1.5 mL del reactivo DNS. Al blanco de muestra se le agregó después del DNS, la muestra del ECE. Las muestras se llevaron a hervir durante 5 minutos para desarrollar color, posteriormente se colocaron en agua fría. Finalmente se mide la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm. Una Unidad Internacional (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de azúcar reductor (D-xilosa) por minuto a 50°C (Qinnghe *et al.*, 2004)

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El experimento se realizó con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x2 (3 cepas, 2 sustratos)

Para la manipulación y análisis de datos se usó el paquete estadístico SAS con prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Para comparar la velocidad radial de crecimiento y actividad enzimática de los hongos en estudio en los diferentes sustratos se realizó un análisis de varianza de una vía.

VII. ESQUEMA

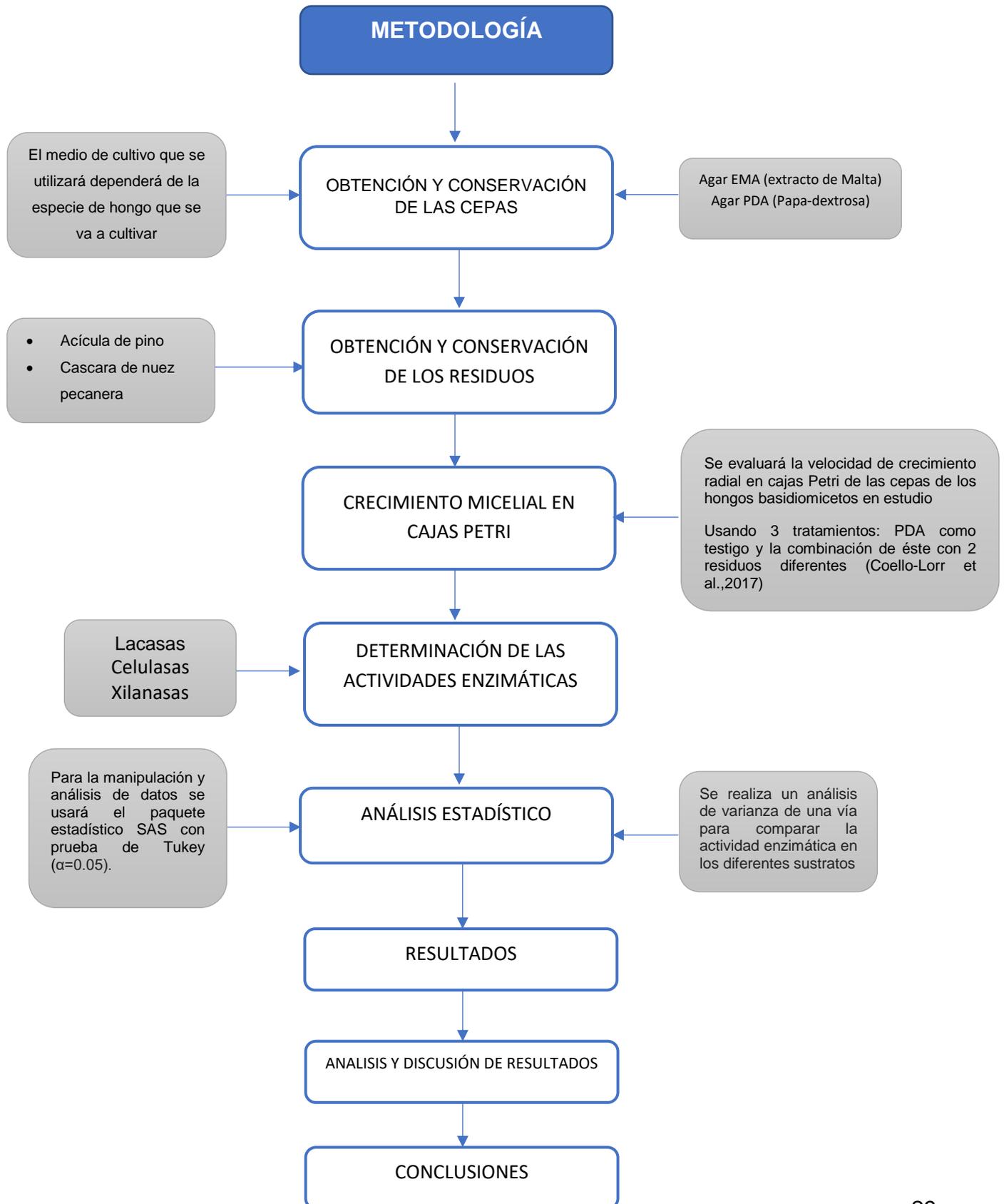


Ilustración 21 Esquema general de la metodología

VIII. RESULTADOS

A) VELOCIDAD RADIAL DE CRECIMIENTO

Se realizaron mediciones del diámetro de crecimiento de cada inóculo cada 24 horas, hasta pasar 216 horas (9 días) obteniendo los siguientes resultados

- Cepa Papa-dextrosa Agar/*Pleurotus ostreatus* (**PDA/Po**) se observa crecimiento significativo a partir de las 48 horas de la inoculación y alcanza después de 216 horas de incubación, un crecimiento radial de **4.98 cm** de diámetro.
- Cepa Papa-dextrosa agar/*Ganoderma lucidum* (**PDA/GI**) se observa crecimiento hasta las 120 horas del inóculo inicial y alcanza un crecimiento radial total de **3.46 cm** a las 216 horas de incubación.
- Cepa Papa-dextrosa agar/*Lentinula* (**PDA/Le**) se observa crecimiento significativo hasta las 96 horas del inóculo inicial alcanzando un crecimiento de **7.45 cm**.
- Cepa Acícula de pino/*Ganoderma lucidum* (**AP/GI**) se observa crecimiento significativo hasta las 96 horas del inóculo inicial, alcanzando un crecimiento de **4.28 cm** de diámetro.
- Cepa Cáscara de nuez/*Pleurotus ostreatus* (**CN/Po**) se observa un crecimiento significativo y medible a partir de las 48 de incubación alcanzando la invasión total de la caja Petri a las 144 horas del inóculo inicial.
- Cepa Cáscara de nuez/*Ganoderma lucidum* (**CN/GI**) presenta crecimiento a partir de las 48 del inóculo inicial y la invasión total del micelio en la caja Petri a las 144 horas
- Cepa Cáscara de nuez/*Lentinula edodes* (**CN/Le**) presenta crecimiento medible a partir de las 96 horas del inóculo inicial y la invasión total del micelio en la caja Petri hasta las 216 horas alcanzando un diámetro total de 7.57 cm

Tabla 1 Velocidad radial de crecimiento (Muestra/horas)

MUESTRA/HORAS	24	48	72	96	120	144	168	192	216
PDA/ <i>Pleurotus</i>	0	0	2.46	2.46	3.35	3.75	3.86	3.98	4.98
PDA/ <i>Ganoderma</i>	0	0	0	0	0	2	2.3	2.6	3.46
PDA/ <i>Lentinula</i>	0	0	0	0	2.81	4.47	5.27	6.08	7.45
AP/ <i>Ganoderma</i>	0	0	0	0	2.2	2.91	3.57	4.23	4.28
CN/ <i>Pleurotus</i>	0	2.26	3.5	4.68	5.88	7.17			
CN/ <i>Ganoderma</i>	0	3.03	4.28	5.83	7.07	7.88			
CN/ <i>Lentinula</i>	0	0	0	2.85	3.83	4.7	5.54	6.83	7.57

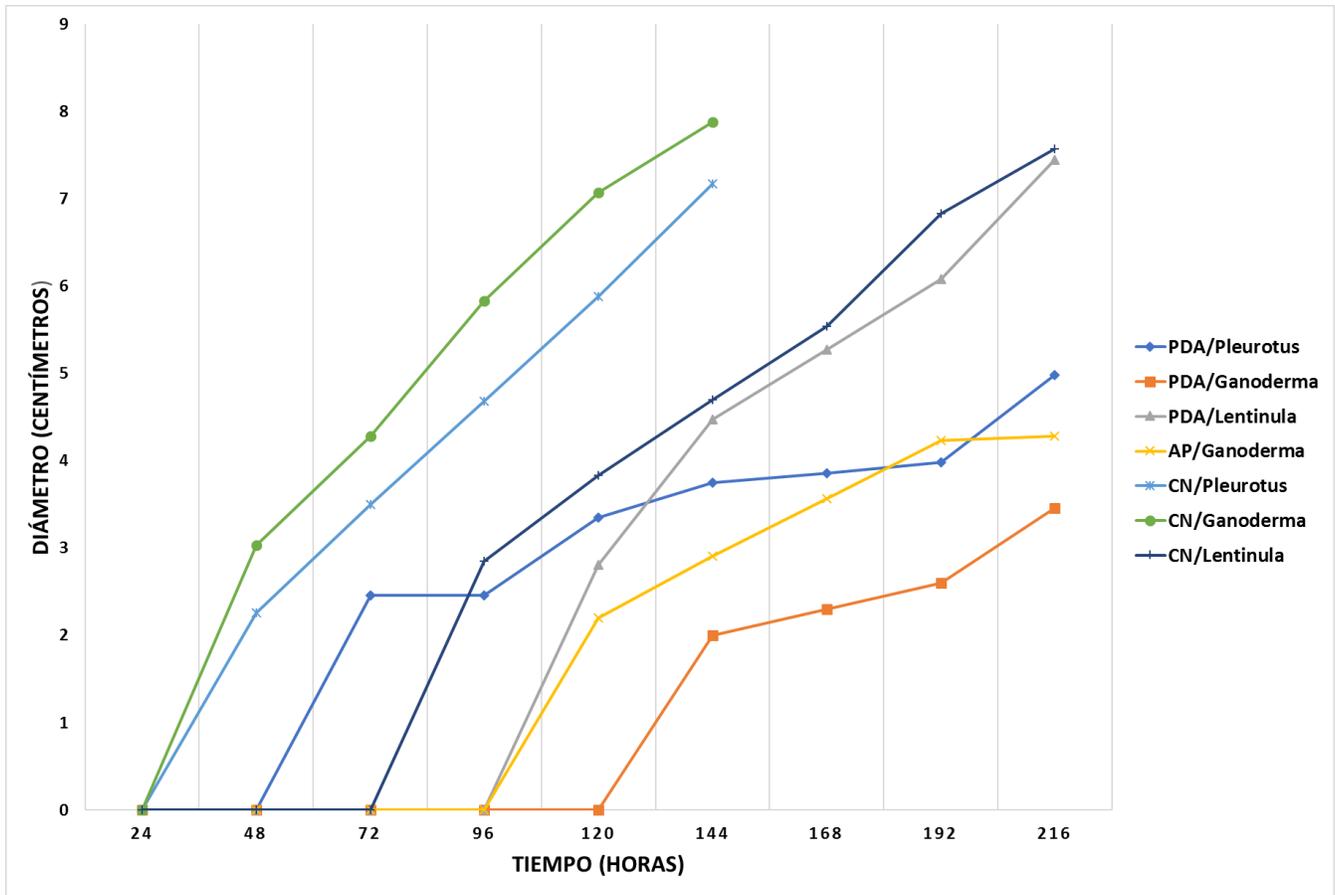


Gráfico 1 Velocidad radial de crecimiento de los hongos en estudio.

Se seleccionó el medio de cultivo Papa dextrosa-agar PDA como medio testigo ya que sus características nutritivas favorecen el crecimiento micelial de los hongos en estudio (Guzmán, G. *et al.*1993) y en los resultados se observa, en el caso de las cepas inoculadas con PDA/testigo tanto en *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus* spp. y *Lentinula edodes*, un periodo de latencia y posterior a este un crecimiento exponencial hasta presentar una invasión total de las cajas Petri generalmente a las 216 horas de iniciada la medición, sin embargo, la cepa PDA/*Lentinula edodes* es la que presenta mayor crecimiento micelial a las 216 horas, cabe resaltar que la cepa con el sustrato Acícula de pino/*Ganoderma lucidum* también presenta un periodo inicial de latencia mayor debido a la adaptación del hongo a las condiciones del sustrato, una vez adaptado, la velocidad radial de crecimiento se incrementa hasta alcanzar su máximo desarrollo a las 216 horas, por último, las cepas con cáscara de nuez son las que presentan fases de latencia corta y crecimiento exponencial hasta alcanzar su mayor crecimiento micelial entre las 144 a 216 horas (Gráfico 1).

B) CINÉTICA ENZIMÁTICA (DETERMINACIÓN DE CELULASAS, XILANASAS Y LACASAS)

- CELULASAS

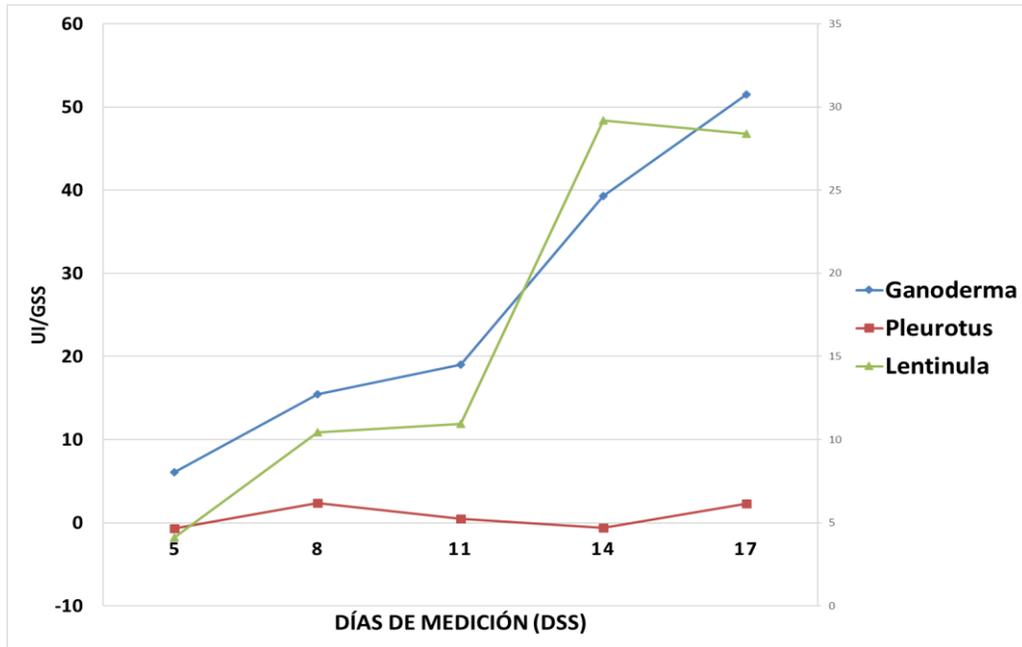


Gráfico 2 Medición de Celulasas en cáscara de nuez

Se evaluó la producción de enzima celulasa en las cepas de los hongos en estudio (*Ganoderma lucidum*, *Pleurotus* spp y *Lentinula edodes*) en el sustrato de cáscara de nuez, en el gráfico 2 se observa un crecimiento exponencial y la mayor producción en la cepa de *Ganoderma lucidum* a los 17 días de incubación con una producción de 51.47 UI/gss, mientras que la cepa de *Lentinula edodes*. se observa su máximo crecimiento a los 14 días con 29.20 UI/gss decreciendo para el día 17, y en la cepa de *Pleurotus* spp. no se observó una producción significativa siendo su mayor producción el día 17 con 4.53 UI/gss.

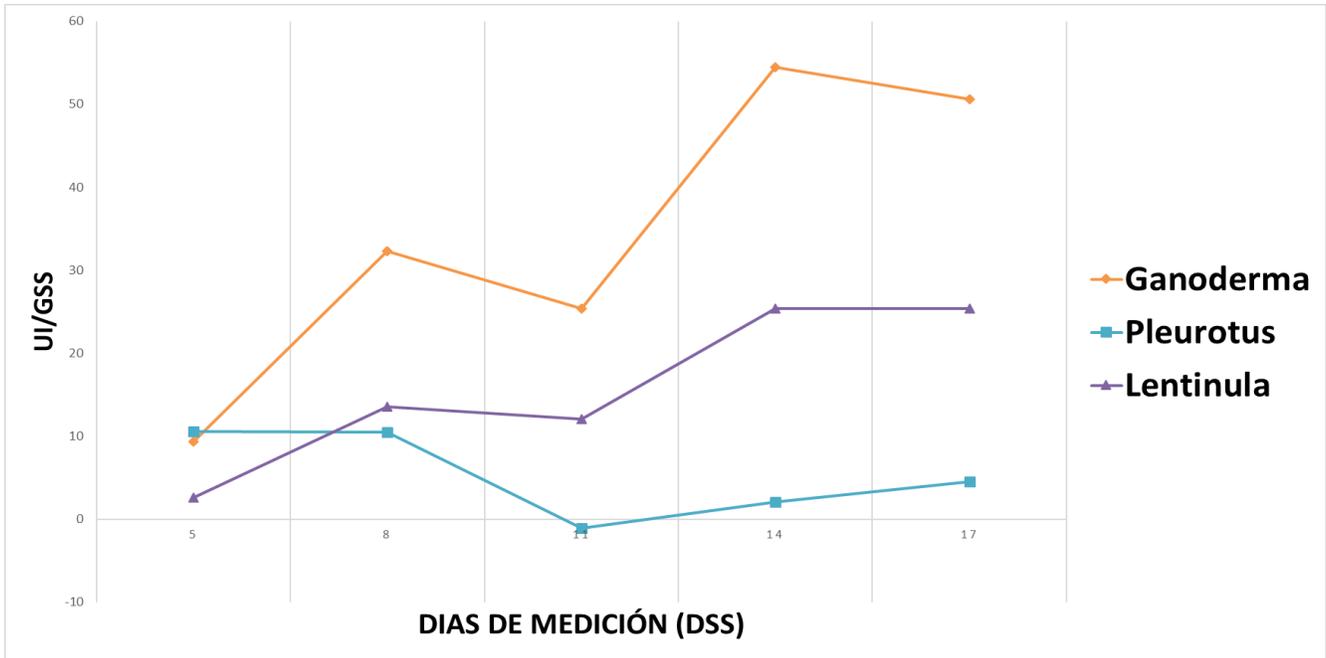


Gráfico 3 Medición de celulasas en acícula de pino

En el gráfico 3 se observa un crecimiento exponencial en la cepa de *Ganoderma lucidum* siendo su mayor producción a los 14 días de incubación con 50.49 UI/gss, en la cepa de *Lentinula edodes* la máxima producción se observa también en el día 14 con 29.20 UI/gss y la cepa de *Pleurotus* spp. presenta un crecimiento lineal hasta el octavo día de medición, posteriormente se observó una disminución de la actividad enzimática en producción para el día 11 e incrementarla ligeramente al día 17 con 2.29 UI/gss.

- XILANASAS.

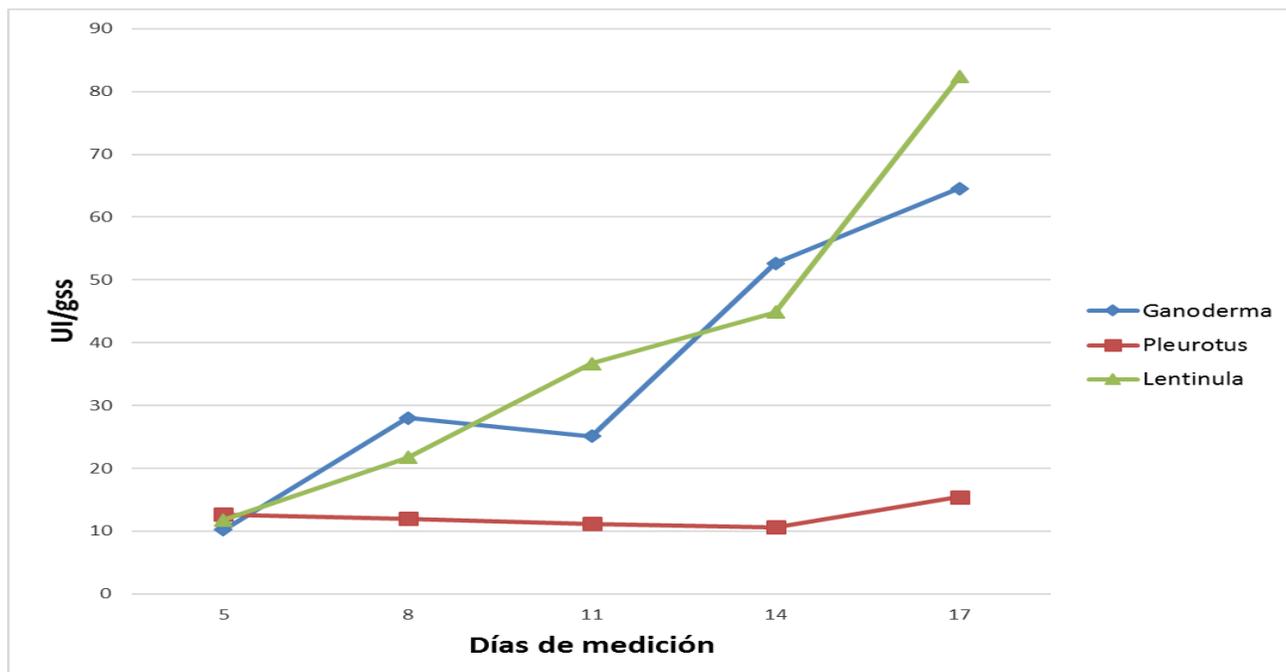


Gráfico 4 Medición de xilanasas en cáscara de nuez

Se observó un crecimiento sigmoideo y exponencial (Gráfico 4) en las cepas de *Ganoderma lucidum* y *Lentínula edodes* alcanzando, ambas cepas, su máxima producción en el día 17 con (64.58 UI/gss y 82.36 UI/gss) respectivamente, en tanto que la cepa *Pleurotus* spp presenta una actividad enzimática inferior, siendo su máxima producción el día 17 con 15.43UI/gss

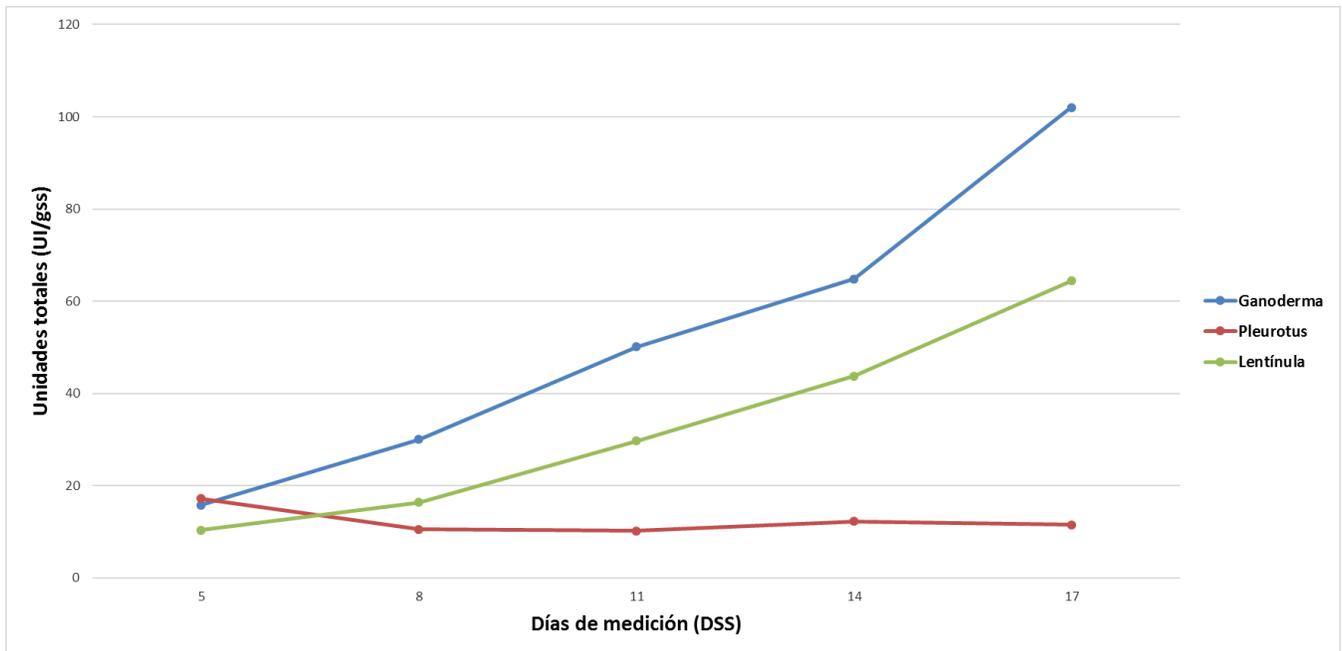


Gráfico 5 Medición de xilanasas en acícula de pino

En el gráfico 5 se observa la mayor producción enzimática de la cepa de *Ganoderma lucidum* con 102.03 UI/gss a los 17 días de incubación, por otra parte, la cepa de *Lentinula edodes* produce, al mismo día, 64.44 UI/gss; por último, la cepa de *Pleurotus* spp inicia con la mayor producción enzimática al día 5 de la medición (17.17 UI/gss); posteriormente la producción decrece al día 8 y se mantiene relativamente igual al día 17 con 11.48 UI/gss.

- LACASAS

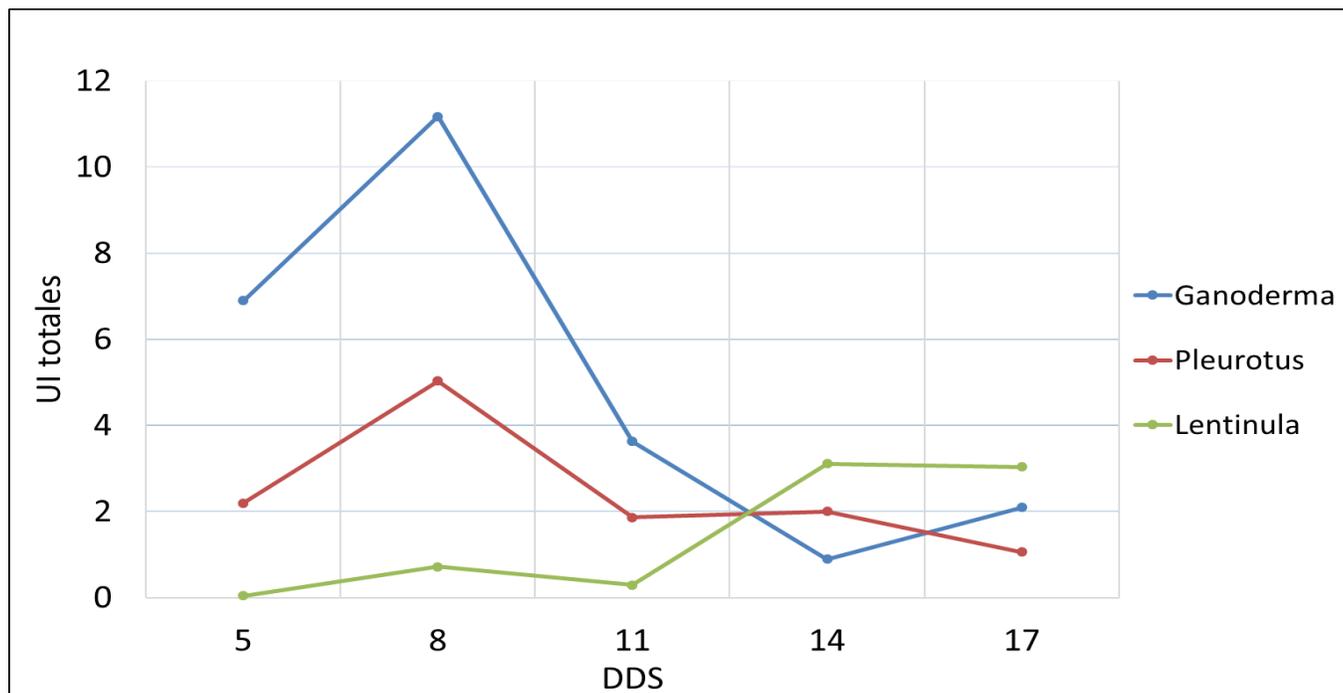


Gráfico 6 Medición de lacasas en cáscara de nuez

En la gráfico 6 se observa la mayor producción enzimática por parte de la cepa de *Ganoderma lucidum* en el día 8 de medición con 11.17 UI/gss para posteriormente caer drásticamente en el día 14 y aumentar ligeramente en el día 17 de la medición enzimática, por otro lado, la cepa de *Pleurotus* spp. muestra similar comportamiento que la cepa anterior siendo su mayor producción al día 8 con 5.08 UI/gss para decaer la producción en el día 11 manteniéndose estable y decaer nuevamente en el día 17 del experimento, finalmente la cepa de *Lentinula edodes* muestra un comportamiento sigmoideo pero con poca producción enzimática, siendo el día 14 de mayor producción con 3.11 UI/gss y después su producción decrece al día 17 terminando con 3.03 UI/gss.

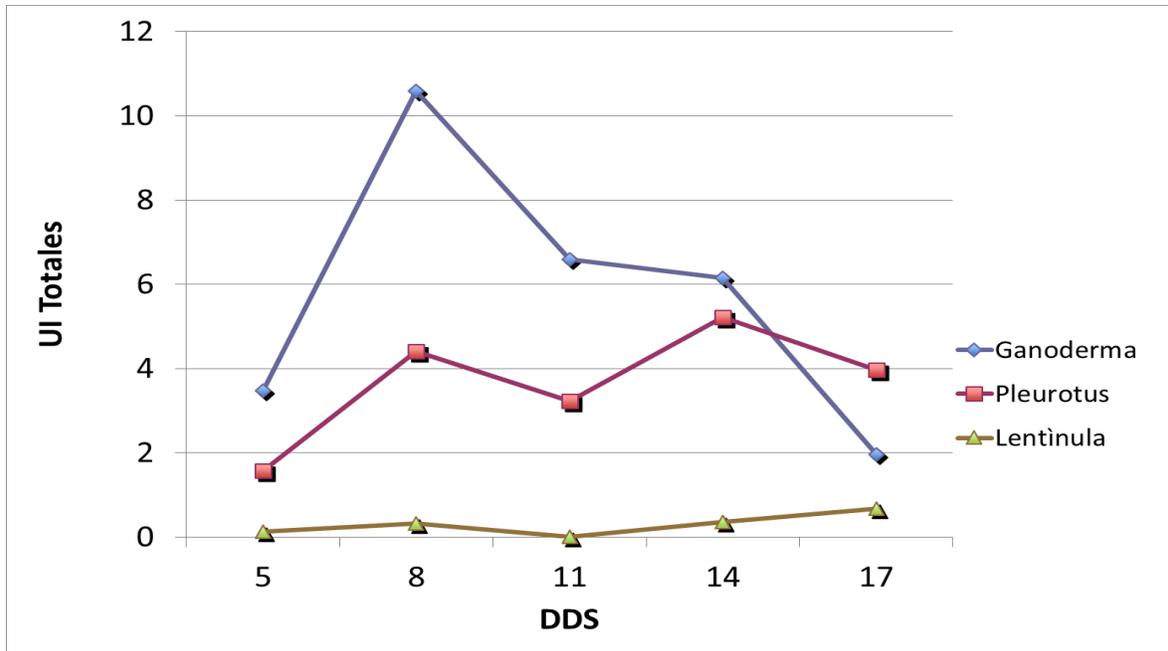


Gráfico 7 Medición de lacasas en acícula de pino

Se observa, en el gráfico 7, la máxima producción enzimática en el día 8 del experimento por parte de la cepa de *Ganoderma lucidum* con 10.59 UI/gss para posteriormente disminuir a partir del día 11 y seguir haciéndolo hasta el final de la medición. En el caso de la cepa de *Pleurotus* spp. la medición enzimática presenta altibajos en la producción, mostrando su máxima producción el día 8, decayendo para el día 11, nuevamente vuelve a incrementarse al día 14 para que, finalmente decaiga para el día 17, por otra parte, la cepa del *Lentinula edodes*, muestra una escasa producción de enzimas en comparación con las otras dos cepas.

IX. DISCUSIÓN

- Velocidad radial de crecimiento

Gaitán-Hernández, 2005 en su estudio sobre el crecimiento del diámetro micelial promedio en *Pleurotus eryngii* sobre agar extracto de malta y medios suplementados con paja de trigo y aserrín de encino (*Quercus* sp.) y de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) obteniendo un crecimiento lineal en función del tiempo, similar a los resultados obtenidos de la cepa *Pleurotus* spp. en agar PDA con sustrato cáscara de nuez, la cual presenta el mismo comportamiento lineal en función del tiempo.

Por otra parte, Martínez *et al.*, 2015, en la evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre extracto de malta- agar/orujos de pera, manifiestan un desarrollo micelial inferior de las cepas de *Agrocybe aegerita* sobre las de *Pleurotus ostreatus* bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura de incubación utilizadas para esta investigación, mostrando similitud con las cepas de *Pleurotus* spp sobre el sustrato de cáscara de nuez.

De Vega, 2017, evaluó la la velocidad de crecimiento de diferentes cepas del género *Pleurotus* en medio PDA combinado con cáscara de nuez y acícula de pino, obteniendo resultados similares en ambos tratamientos de igual modo a los presentados en esta investigación.

- Cinética enzimática.

Quintero, 2006 demuestra la capacidad de los hongos *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium* sobre materiales lignocelulósicos (viruta de madera, carozo de maíz y compost de jardinería) para producir enzimas ligninolíticas, obteniendo en *Bjerkandera adusta* mayor actividad enzimática en los dos primeros sustratos, presentando similitud en los resultados de las cepas de los hongos en estudio destacándose la de *Ganoderma lucidum* en los sustratos acícula de pino y cáscara de nuez

Pelaez-Acero, et al., 2009 utiliza al bagazo de caña con tres diferentes tratamientos de humedad midiendo la actividad enzimática de dos cepas de *Pleurotus* (*P. ostreatus* y *P. sapidus*) a los 5 y 7 días de incubación obteniendo como resultado mayor producción de enzimas lacasas y

celulasas en *P. sapidus* y *P. ostreaus* mayor cantidad de xilanasas, contrariamente a la cepa de *Pleurotus ostreaus*, donde su mayor producción es de lacasas en los sustratos empleados en este proyecto (acícula de pino y cáscara de nuez)

X. CONCLUSIONES

La velocidad radial de crecimiento establece el grado de adaptación y desarrollo de los hongos, en el caso de los hongos basidiomicetos cultivados *in vitro* en los sustratos agroforestales, el micelio de la cepa de *Ganoderma lucidum* crece con mayor rapidez en ambos sustratos (acícula de pino y cáscara de nuez) con respecto a las cepas de *Pleurotus* spp y *Lentinula edodes*, mostrando así que la utilización de los sustratos agroforestales son una buena alternativa de uso para la propagación y crecimiento de los hongos basidiomicetos.

En cuanto a la producción de enzimas lignocelulolíticas de los hongos, se observa que la cepa con mayor producción de enzimas celulasas y xilanasas, en ambos sustratos, fue la de *Ganoderma lucidum* no obstante para la producción de lacasas, se reporta la cepa de *Ganoderma lucidum* con la mayor producción solamente en el día 8 de la medición, también en ambos sustratos.

Finalmente, con este proyecto de investigación se muestra que el uso de los sustratos agroforestales son una alternativa ecológica para obtener enzimas lignocelulolíticas para futuras aplicaciones.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra K. H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G. M. (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, Pp.3357-3362.
- Alcalde, M., Bulter, T. (2003) Colorimetric assays for screening laccases. En : Methods in Molecular Biology, vol. 230. Directed Enzyme Evolution : Screening and Selection Methods. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Pp 193-201.
- Arce Cervantes, O. (2012) Producción de extractos enzimáticos a partir de *Fomes* spp. EUM1 y su evaluación en condiciones rumiales. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Pp. 18-25.
- Bergbauer, M., Eggert, C., Kraepelin, G. (1991) Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Pp.105-109.
- Ardón López, C. (2007) La producción de hongos comestibles. Tesis para obtener el grado de Maestría en docencia Universitaria. Universidad De San Carlos. Guatemala. 2
- Arenas Guzmán R. (2011) Micología Médica Ilustrada. Cuarta Edición. McGrawHill. 70.
- Bedford, MR., Classen, HL. (1992) The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. In: Visser, J., Beldman, G., vanSomeren, MAK., Voragen, AGJ., Xylans and xylanases Amsterdam Pp 361-370.
- Bidegain, M., Postemsky, P., González Matute, R., Figlas, D., Devalis, R., Delmastro, S., Pereyra Huertas, C., Curvetto, N., Cubitto, MA. (2015) Optimización de la producción del hongo medicinal Reishi (*Ganoderma lucidum*) para el desarrollo de nutracéuticos y fitoterápicos. Laboratorio de Biotecnología de Hongos comestibles y medicinales. Centro de recursos naturales renovables de la zona semiárida. P 3.
- Biely, P (1985) Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology Chapter 3. Pp.286-290.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S. (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environment Microbiology*, Pp.4627-4632.

- Brizuela, M.A., García, L., Pérez, L., Mansur, M. (1998) Basidiomicetos: una nueva fuente de metabolitos secundarios. Instituto Cubano de Investigaciones de los derivados de la caña de azúcar. P 2.
- Burés, S. (2006) Manejo de sustratos. Curso de gestión de viveros forestales. Red de viveros. P 48.
- Cerda Mejía, L. (2016) Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelerero. Tesis para obtener el grado de doctorado. Programa De Doctorado Microbiología Ambiental y Biotecnológica. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. P 13.
- Chang, S., Miles, P (2004) Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect an environmental impact. CRC press, Florida. Pp. 50-389.
- Chaplin, M.F (1986) Monosaccharidos. Carbohydrate Analysis. A practical approach. Press, England. Pp 1-36.
- Coello-Loor, C., Avellaneda-Cevallos, J., Barrera-Ávarez, A., Peña-Galeas, M., Yépez-Macías, P., Racines-Macías, E. (2017) Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas de *Pleurotus* spp., cultivadas en un medio agar con diferentes sustratos. Ciencia y Tecnología UTEQ. Pp 33-39.
- Cooper Bibriesca, BL.(2013) Enzimas xilanólíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. Vertientes revista especializada en Ciencias de la Salud 16(1): 19-22
- Córdova Ordóñez, M. M. (2009). Estudio comparativo del crecimiento micelial del hongo (*Pleurotus ostreatus*) en acícula de pino, bagazo de caña y bagazo de maíz (Bachelor's thesis, Universidad del Azuay).
- Cullen, D., Kersten, P. (1992) Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In Applied Molecular Genetics of filamentous fungi. Edited by Kinghorn, J. R., Turner, G. New York, Chapman and Hall Chapter 4. Pp. 100-131.
- De la Vega Luttmann, G. (2017) Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el crecimiento in vitro de *Pleurotus* spp. Tesis Licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo p 7.
- Devía Ulloa, J. (2014) Estudio del efecto de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Universidad de Chile. P 8

- Gaitán Hernández, R., Salomones, D., Pérez Merlo, R., Mata, G. (2006) Manual práctico del cultivo de setas. Aislamiento, siembra y producción. Instituto de Ecología A.C. p 4.
- García Bona, LM. (1980) Navarra: Hongos y setas. Caja de ahorros de Navarra. P 82.
- Gaitán-Hernández, R. (2005) Evaluación *in vitro* del hongo comestible *Pleurotus eryngii*: Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos. Revista Mexicana de Micología, num.21 Pp 77-84.
- Gómez, J., Samaniego, J., Antonissen, M. (2008) Consideraciones ambientales en torno a los biocombustibles líquidos. Serie medio ambiente y desarrollo N° 137. CEPAL. Santiago de Chile.
- González García, Y., González Reynoso, O., Nungaray Arellano, J.(2005) Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. Revista Digital Científica y Tecnológica e-Gnosis No. 3. Universidad de Guadalajara.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto Velazco, C., Guzmán Dávalos, L.,(1993). El cultivo de hongos comestibles. Instituto Politécnico Nacional. 56
- Karlanian, MA.,Barbao. LA., Morisigue, DE. (2008) Evaluación de las acículas de pino utilizadas en mezclas de crecimiento para el cultivo de plantas ornamentales en maceta. Instituto de Floricultura. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Los Reseros y las Cabañas. p 2.
- Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B,A., Saini, A H. S. (2007) Purification of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. Bioresource Technology. Chapter 98: 74-81
- Kiiskinen, L. L., Rättö, M., Kruus, K. (2004) Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3):640-646.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., Alcalde, M. (2008^a). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7(1):32.
- Hammel, K,E (1996) Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. New J Chem. P 195-198

- Herrera, T., Ulloa, M., (1990) El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. Editorial Fondo de cultura económica. México. p 552.
- Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M. J., Martínez, A. T. (2006) Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine free bleaching eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(7):1159-1165.
- Loera, O., Córdova, J. (2003) Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (2)_ 177-181.
- Lomelí Ramírez, M., Arias, A. (2006) Tratamiento Fermentativo - Químico - Mecánico Del Bagazo De Maguey (*Agave Tequilana* Weber) Para Su Aplicación En Papel Hecho A Mano. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 5, núm. Su1, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México pp. 23-27.
- López Zepeda, G.A., Mateo Sánchez, J.J. (2011) Catalogo de árboles y arbustos. Primera parte. Coniferales. Centro de investigaciones forestales. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. P 102.
- Martínez, D., Buglione, M., Filippi, M., Reynoso, L., Rodríguez, G., Agüero, M.(2015) Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera. Artículo. *Anales de Biología* 37: 1-10.
- Martínez Miranda, D. (2014) Producción de tres especies de *Pleurotus spp.* Utilizando diferentes sustratos. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas. México. P 6.
- Martínez, V. F. J (2011) Efecto de estrés térmico en la producción de lacasas en *Fomes* sp EUM1. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México.
- Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E., Burton, A.L (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* 2. Pp 127-132.
- Moncayo, M., Reyes, A., Carrillo, M.(2018) Aprovechamiento de subproductos agronómicos. *Revista Académica de Investigación, TLATEMOANI*. p 2.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M., (2009). *Microbiología Médica*, sexta edición. Elsevier. Entro. p 60.

- Navarro, R., (2013) Micología Veterinaria. Tesis y disertaciones académicas. Educación superior. Facultad de Ciencias Animal. Departamento de medicina veterinaria. Universidad Nacional Agraria. p 11.
- Pastor, Fl., Gallardo, O., Sanz, AJ.,Pilar,D. (2007) Xylanases: molecular properties and applications. Industrial Enzymes. Pp 65-82.
- Peláez- Acero,A., Meneses, M., Miranda, L., Loera, O. (2009) Producción de enzimas fibrolíticas por cultivo sólido en bagazo de caña de azúcar con dos especies de *Pleurotus*. Artículo extraído desde: <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/handle/123456789/7488>
- Piña, G., Nieto, M., Robles, M.(2015) Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible (*Pleurotus* spp.). Revista Internacional de Contaminación ambiental. p142.
- Quintero, D., Feijoo, C., Lema, R.(2006) Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Vol. 13 Numero 2. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia pp 61-67.
- Ramírez Villapudua, J.,Saínz Rodríguez,R. (2013) Cultivo del hongo Reishi (*Ganoderma lucidum*) en sustratos artificiales. Universidad Autónoma de Sinaloa. Agrobiológica, S.A de C.V. p 1.
- Rabinovich, M., Melnick, M.S., and Bolobova, A.V. (2002) The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. Biochemistry. Moscow. Chapter 8: 850-871.
- Revollo Escudero, E., Serna Daza, O., Hernández Torres, J. (2012) Caracterización De Actinobacterias Raras, Degradadoras De Lignocelulosa: Demostración De Actividad Lacasa En Dos Aislados De *Tsukamurella* sp. y *Cellulosimicrobium* sp. Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN), Universidad Industrial de Santander, Colombia.
- Reyes Vázquez, N., Urrea López, R. (2016). Capítulo 4. Aprovechamiento integral de la nuez pecanera como fuente de fitocompuestos. En Retos y oportunidades para el aprovechamiento de la nuez pecanera en México. CIATEJ. Unidad Noreste. CONACYT. México. P 97.
- Roa, G., Camacho, C.,Ardila, R.,Nieves, A., (2018). Viabilidad para la creación de una empresa que fabrique y comercialice el extracto de *Ganoderma lucidum*. Facultad de

Ciencias Economicas y Administrativas. Especialización En Formulación Y Evaluación Social Y Económica De Proyectos. Universidad Católica de Colombia. Pp. 16-17.

- Rodríguez Sánchez, E. (2006) Caracterización Molecular De Lacasas De *Pleurotus eryngii*: Expresión Heteróloga De Estas Enzimas Y Aplicaciones En La Degradación De Contaminantes Aromáticos. Tesis para obtener el grado de Doctor. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R., Morris, H. (2003) Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20(4):164-168.
- Rodríguez, V., Jaramillo, L. (2005). Cultivo de hongos medicinales en residuos agrícolas de la zona cafetera. Federación Nacional de cafeteros de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café "Pedro Uribe Mejía" CENICAFE. P 5.
- Romero-Arenas, O., López Escobedo, R., Damián, M. A., Hernández Treviño, I., Parraguirre Lezama, J. F., Huerta Lara, M. (2012). Evaluación del residuo de cáscara de nuez (*Juglans regia* L.) en la producción de plántulas de *Pinus patula*, en vivero. *Agronomía Costarricense* 36(2): 103-110.
- Romero Cumplido, A. (2006). Cultivo de *Pleurotus* spp. Sobre sustratos no convencionales. Tesis para obtener el grado de licenciatura. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional. 11-20.
- Rojas Verde, M. (2010). Producción De Enzimas Lignolíticas Por Hongos De Pudrición Blanca Aislados En Nuevo León. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sánchez Vázquez, J., Royse, D. (2002) La Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Editorial Limusa, S.A. p 20.
- Silva, S., Fritz, F., Cubillos, A., Díaz, C. (2010) Utilización de podas del arbolado urbano como sustrato para la propagación de hongos comestibles (Shiitake) en la comuna de La Pintana. Pp 5-6.
- Solomon, E., Martin, D., Ville, W. (1996) Biología de Vilee. 3era. Edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México P 123

- Stamets, P (2001). Crecimiento y preparación de hongos medicinales. Mycomedia productions and funfi perfecti. Australia
- Suárez Arango, C. (2010) Obtención *in vitro* de micelio de hongos comestibles, Shiitake (*Lentinula edodes*) y Orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos para la producción de la semilla. Tesis para obtener la Especialización En Ciencia Y Tecnología De Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. P 22.
- Subramaniyan, S., Prema, P.(2002) Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. Critical Reviews in Biotechnology 1 Pp 33-46.
- Wong, KKy., Saddler, JN. (1992) Trichoderma xylanases, their properties and purification. Crit Rev Biotechnol 12: 413-435.