

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**EFECTO DE LA INDUCCIÓN CON EXTRACTOS ACUOSOS DE PAJA DE TRIGO
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS EN *Pleurotus ostreatus*.**

presentado por

AMAIA REDIN IROZ *(e)k*

aurkeztua

**INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA EN INDUSTRIAS AGRARIAS Y ALIMENTARIAS
NEKAZARITZAKO INGENIARI TEKNIKO *NEKAZARITZA ETA ELIKADURA INDUSTRIAK***

Julio, 2010

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA. ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIEROS AGRÓNOMOS

TRABAJO FIN DE CARRERA DE INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA

Título: Efecto de la inducción con extractos acuosos de paja de trigo sobre la producción de
enzimas lignolíticas en *Pleurotus ostreatus*.

Autora: Amaia Redin Iroz

Directora: Dra. Alejandra Omarini

Tutor: Prof. Dr. Antonio G. Pisabarro de Lucas, Cat. Microbiología

Trabajo fin de carrera presentado por Amaia Redin Iroz para optar al título de Ingeniero Técnico
Agrícola, especialidad en Industrias Agrarias y Alimentarias, siendo su tutor Antonio G. Pisabarro.

Autora: Amaia Redin Iroz

Directora:

Dra. Alejandra Omarini

Tutor:

Prof. Dr. Antonio G. Pisabarro

Cat, Microbiología

RESUMEN DEL TRABAJO:

En la producción de energía a partir de materiales lignocelulósicos, el pretratamiento termoquímico se realiza para desestructurar la lignocelulosa y facilitar la acción posterior de enzimas celulolíticas (endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosilasas) que originarán la glucosa fermentable para la producción de etanol, requiere un alto consumo de energía y de compuestos contaminantes. Para hacer económicamente interesante los compuestos presentes en residuos lignocelulósicos (carbohidratos y unidades de fenilpropano entre otras) el material debe ser degradado. Resulta interesante el empleo de una maquinaria microbiana natural, que posee un evolucionado aprendizaje en el uso de lignocelulosa como fuente de carbono y energía. Los hongos de pudrición blanca, como *Pleurotus ostreatus*, son los degradadores más eficientes ya que atacan preferiblemente la lignina y hemicelulosa (1). Numerosas enzimas están involucradas en este proceso, incluyendo lacasas E.C. 1.10.3.2 (Lac), Manganese peroxidases E.C. 1.11.1.13 (MnP), productoras de peróxido de hidrógeno E.C.1.1.3.7 (AAO) y enzimas hidrolíticas, las cuales han sido identificadas y caracterizadas a nivel molecular.

Ensayos previos en el Grupo de Genética y microbiología (UPNA) han demostrado que la adición de extractos procedentes del lavado de paja de cereales en cultivos líquidos de *P. ostreatus* incrementa la actividad de enzimas degradadora de lignina en más de un orden de magnitud (10 veces). Sin embargo, el mecanismo por el que se produce esta inducción no es conocido, por lo que la posibilidad de utilizarla de forma industrial queda limitada.

En este proyecto se pretende determinar en profundidad el mecanismo por el que se induce la actividad ligninolítica, la ruta de inducción y el compuesto, estudiando *in Vitro* la inducción de la actividad ligninolítica en cultivos sumergidos de *Pleurotus ostratus* acondicionados con extractos acuosos de paja de trigo.

También se determinó la cinética y parámetros de cultivo, determinando la biomasa, consumo de glucosa y pH.

ÍNDICE:

1-INTRODUCCIÓN.....	4
1.1.- Residuos lignolíticos.....	4
1.2.- Generalidades de los Basidiomicetes.....	9
1.2.1.- <i>Pleurotus ostreatus</i> : generalidades y descripción	12
1.2.2. Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	14
1.3- Enzimas fúngicas.....	19
1.3.1.- Enzimas ligninolíticas	20
a) Lacasas: importancia y aplicaciones industriales	21
b) Inducción de la actividad lacasa.	24
c) Utilización de inductores naturales en la producción de lacasa	26
2-ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	27
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
3.1.- Material.....	29
3.1.1.- Material Biológico	29
3.1.2.- Medios de cultivo	29
3.1.3.- Reactivos y soluciones	30
3.1.4.-Equipamientos e instalaciones	33
3.2.- Métodos.....	37
4.- RESULTADOS.....	44
4.1.- Determinación del pH	44
4.2.- Determinación de la biomasa	47
4.3.- Determinación del consumo de glucosa	51
4.4.- Determinación de la actividad de las enzimas ligninolíticas	55
4.5.- Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante	61

5- DISCUSIÓN.....	69
6.- CONCLUSIONES.....	73
7-BIBLIOGRAFÍA.....	74

OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es estudiar la producción de enzimas lignolíticas, principalmente lacasas, y evaluar el efecto extracto acuoso de paja de trigo en la inducción de esta actividad enzimática en cultivos sumergidos de *Pleurotus ostreatus*.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1.- Residuos lignolíticos.

Los residuos agrícolas, forestales e industriales son en su mayoría biomasa lignocelulósica y representan la mayor fuente de carbono renovable en el suelo. Esta materia orgánica ocasiona inconvenientes en el ambiente ya que ocupa mucho espacio y su degradación natural es muy lenta y su almacenamiento casi imposible en los volúmenes en que se genera. En los últimos años se ha intensificado el aprovechamiento de residuos agroindustriales tales como, el serrín, rastrojos de cereales y otros cultivos, la pulpa y hojas de café, residuos de frutas, etc. Para contrarrestar los efectos nocivos que su acumulación produce, se han desarrollado varios procesos biotecnológicos que utilizan los desechos para la producción de alcohol, enzimas, ácidos orgánicos y hongos comestibles, generando productos con valor económico y contribuyendo de esta manera a cuidar al medio ambiente (Baldrian & Valásková, 2008).

Los materiales lignocelulósicos están formados mayoritariamente por polímeros presentes en la pared de las células vegetales: celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas y lignina

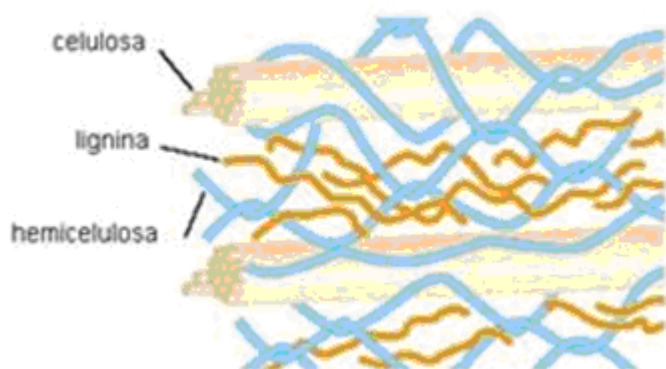


Fig 1. Estructura de las fibras vegetales compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina.

. La mayor parte de los residuos lignocelulósicos lo constituyen la celulosa (38-50%), la hemicelulosa (25-35%), y la lignina (15-25%).

Esta composición varía dependiendo del tipo de residuos:

Composición de diversos residuos lignocelulósicos (% en seco)

Residuo	Hemicelulosas	Celulosa	Lignina	Referencias
Madera dura	24-40	40-55	18-25	McGinnis (1983)
Madera blanda	25-35	45-50	25-35	McGinnis (1983)
Bagazo de caña	24	40	25	Saha (2003)
Mazorca de maíz	35,8	39,4	7,3	Sánchez (1990)
Paja de arroz	25	35	12	Saha (2003)
Paja de trigo	28,8	32,6	14,4	Hoebler et al. (1989)
Pulpa remolacha	24,5	20,7	2	Hoebler et al. (1989)
Sorgo	29,6	33,5	9,1	Sánchez (1990)
Tallo de girasol	17,3	36,8	21,2	Hoebler et al. (1989)

Fuente: Cunningham R. E. López G. D. Etanol de lignocelulósicos. Tecnología y perspectivas 1994.

Celulosa: Es un polímero lineal y altamente ordenado (a veces cristalino), compuesto por subunidades de D-Glucosa unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos, se forman largas cadenas. La unidad básica de la celulosa es la celobiosa (disacárido de glucosa), que es liberada por las celobiohidrolasas. Las largas cadenas de celulosa se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

Hemicelulosa: Es un polímero con un peso molecular menor que el de la celulosa, en el que los azúcares (fundamentalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico) se unen mediante enlaces glucosídicos β -1,4 o β -1,3.

La hemicelulosa tiene ramificaciones, que están formadas por cortas cadenas de azúcares.

Lignina: Es un heteropolímero amorfo, hidrófobo y ópticamente inactivo, de alto peso molecular. Está unida a la hemicelulosa y a la celulosa, formando una barrera infranqueable en la pared de la

celular, esto le da a la pared soporte estructural, impermeabilidad, y resistencia contra los ataques microbianos.

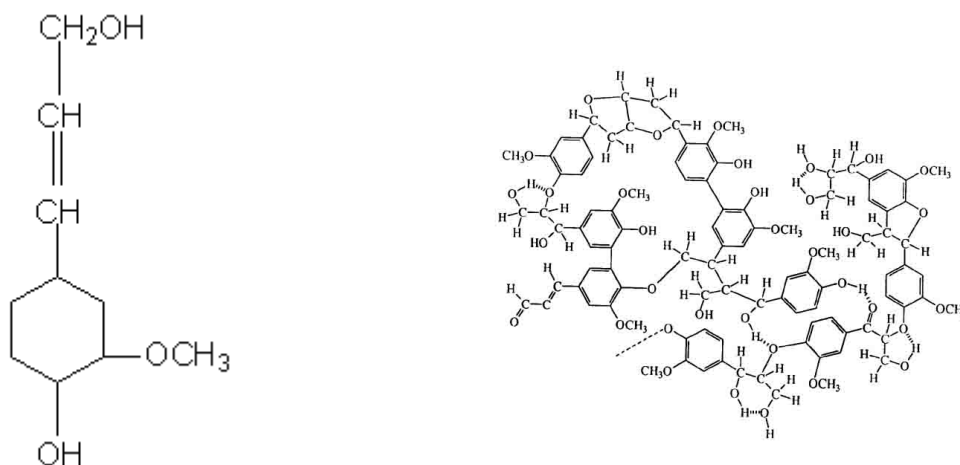


Fig 2. Estructura química de la lignina.

La lignina, forma una red tridimensional constituida por unidades fenilpropanoides que dan lugar a una gran variedad de subunidades interconectadas por diferentes uniones y carbono-carbono y éter.

Los residuos lignocelulósicos se ha utilizado como combustible o materia prima de industrias de construcción, papeleras o textiles. A estas aplicaciones tradicionales, se añade hoy día un gran interés por el estudio de estos materiales como fuente de productos químicos y energía, que podrían sustituir en buena medida a los de origen fósil no renovable (Alíen y Sjöstrém. 1985).

Proceso de producción de bioetanol:

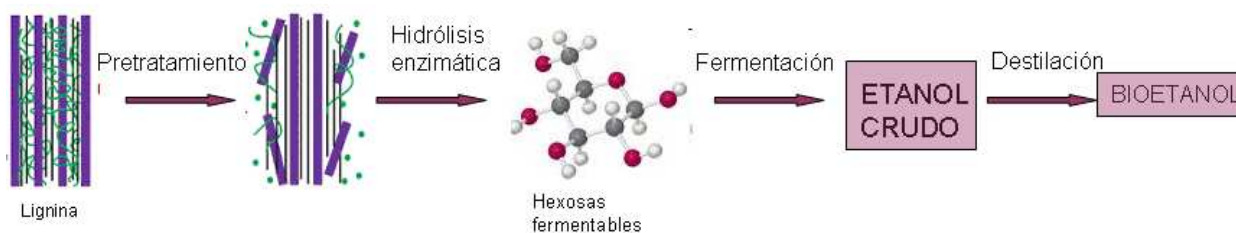


Fig. 3. Esquema sintético de la obtención de bioetanol a partir de residuos vegetales.

El proceso de producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, consta de tres partes principales: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación. De este proceso se obtiene un etanol crudo, que antes de su utilización debe pasar por una destilación.

a) Pretratamiento de los residuos lignocelulósicos:

En los residuos lignocelulósicos es necesario un pretratamiento que facilite el acceso de las enzimas para la hidrólisis de la celulosa.

Se han descrito algunos pretratamientos para producir sustratos fácilmente hidrolizables de varios tipos:

Físicos:

-Pulverizado mecánico: Se reduce el material a astillas, mediante trituración o molienda, mediante molinos de tambor, cuchillas o bolas. Este pretratamiento se puede utilizar con materiales como residuos de maderas forestales o desechos de maíz. (Sung y Cheng, 2002)

-Pirólisis: utilizando temperaturas superiores a 300 °C se obtienen residuos volátiles y cenizas, susceptibles después a una hidrólisis suave. Se utiliza en madera, y residuos de algodón, (Sung y Cheng 2002 y Yu y Zhang, 2003)

Pretratamientos físico-químicos:

-Explosión a Vapor: Se utiliza con productos como maderas blandas o paja, se añade vapor al producto, a unos 160-260°C y alta presión. (De Bari et al 2003)

Agua caliente: Se utiliza agua caliente (170-230°C) presurizada durante 1-46 minutos. (Lynd et al 2003)

Pretratamientos químicos:

-Ozonólisis: Se puede utilizar por ejemplo en serrín de álamo, se trata de una reacción a temperatura y presión ambientales, con la adición de ozono. (Sung y Cheng, 2002)

-Hidrólisis con ácido: se puede utilizar para maderas blandas e incluso duras, dependiendo de la cantidad de ácido que se añada a la reacción. Se realiza a temperaturas elevadas.

Hidrólisis alcalina: Se utiliza NaOH diluido, a 60°C, durante 60 minutos, también puede utilizarse en maderas duras. (Sung y Chang, 2002)

Pretratamiento con Hongos: Se utilizan para esto hongos de podredumbre blanca, degradadores de la lignina, es un proceso mucho más lento que los mencionados anteriormente, pero también más ecológico.

b) Hidrólisis enzimática

El objetivo de este paso es la producción de monosacáridos para su posterior fermentación. Para llevar a cabo este proceso se utiliza una mezcla enzimática compuesta por celobiohidrolasas I y, endoglucanasas, y β -glucosidasas.

Las endoglucanasas atacan al azar en cadenas (1-4)- β -D-glucano, en zonas amorfas de la celulosa o en la superficie de las microfibrillas.

Las celobiohidrolasas liberan celobiosa de los extremos no reductores de las cadenas de β -D-glucano.

La β -glucosidasa hidroliza la celobiosa a glucosa fermentable.

El tiempo máximo que ha de durar esta fase es de 72 horas y ha de realizarse a una temperatura de 50-60°C con agitación.

Libera a partir de la celulosa hexosas fermentables.

c) Fermentación

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura usada con más frecuencia. El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1 g de glucosa. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Boudarel, 1984).

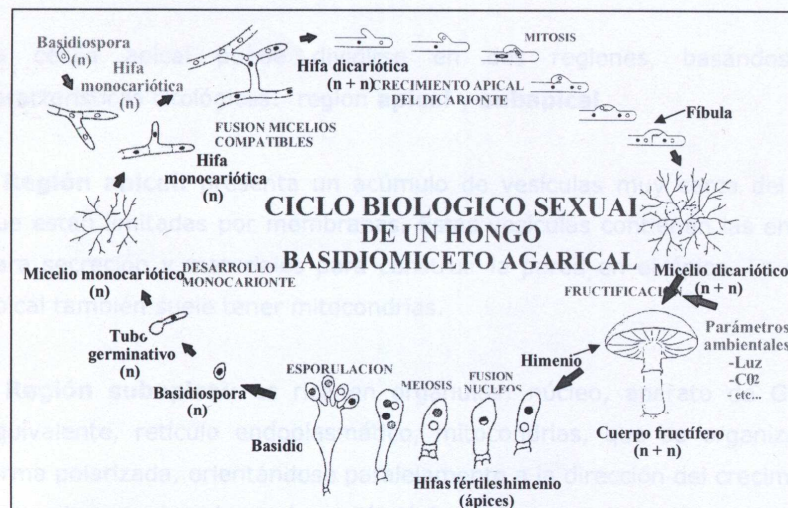
Esta reacción se lleva a cabo en fermentadores que se mantienen a 37°C hasta que se acabe la fuente de carbono, convirtiendo las hexosas derivadas de la celulosa en etanol y CO₂.

Muchos microorganismos son capaces de degradar y utilizar la celulosa y hemicelulosa como fuentes de carbono y energía; sin embargo, sólo un pequeño grupo de hongos filamentosos son capaces de degradar la lignina. Entre ellos los que pertenecen a la clase Basidiomicetes. Estos hongos son conocidos como hongos de podredumbre blanca, son capaces de degradar la lignina a CO₂ y han focalizado el interés de los investigadores debido a la capacidad de algunos de ellos para degradar selectivamente la lignina, dando lugar a un material enriquecido en celulosa (Hattaka A., 1994). Esto permitiría la producción de bioetanol a partir de los desechos lignocelulósicos sin ser necesario un pretratamiento a altas temperaturas y presiones, o con ácidos, que tiene un alto valor económico y resulta contaminante, de esta manera se podría utilizar este material tan abundante en la naturaleza de una manera más ecológica y económica.

1.2.- Generalidades de los Basidiomicetes

Los Basidiomicetes son hongos que generalmente producen cuerpos de fructificación fácilmente visibles al ojo humano (Chang & Miles, 1992). Están constituidos por una masa de filamentos, cada uno denominado hifa y el conjunto de hifas se denomina micelio. La reproducción se realiza por medio de la producción de esporas, aunque cualquier fragmento de hifa tiene la capacidad de propagarse. Las esporas dan origen a hifas tabicadas uninucleadas (micelio primario o monocariote). Este micelio monocariótico crece radialmente, y cuando contacta con otro micelio compatible se produce la fusión de micelios, formando una hifa binucleada, dicariótica (plasmogamia, sin fusión de núcleo). El dicariote así formado, prolifera y cuando las condiciones ambientales son favorables tienen lugar diferenciaciones morfológicas y fisiológicas y dan origen al cuerpo de fructificación, conocido como basidiocarpo o carpóforo (Fig. 4). En algunas células fértiles del himenio, se produce la fusión de los núcleos (cariogamia) e inmediatamente la meiosis, dando origen a cuatro núcleos; cada uno de ellos migra a un filamento que se ha formado en el extremo de la célula o basidio, se rodea de una membrana formando las basidiosporas que repetirán el ciclo nuevamente (Ferri, 1985). En el desarrollo de los hongos, se distinguen dos fases conocidas como estadio vegetativo y estadio reproductivo o de fructificación. El estadio vegetativo se refiere al desarrollo del micelio y el reproductivo a la formación del basidiocarpo. Durante la colonización

del sustrato, se secretan enzimas extracelulares que degradan la materia orgánica transformándola en compuestos orgánicos solubles que son absorbidos por las hifas. El crecimiento del micelio resulta de una fusión de hifas, generando una asociación entre la hifa y el sustrato, que proporciona un fuerte soporte físico necesario para la formación del cuerpo de fructificación (estadio reproductivo). El estadio reproductivo está condicionado a variaciones de factores físicos como el descenso de la temperatura y el aumento de humedad (Chang & Miles, 1989).



(Peñas Parrilla, M. M. ; 1999)

Fig. 4. Ciclo biológico de un Basidiomicete típico.

La mayoría de los basidiomicetes puede utilizar los compuestos de la madera para su crecimiento porque poseen un sistema enzimático que los hace capaces de degradar las fuentes complejas de carbono tales como la celulosa, hemicelulosa y lignina, mostrando un importante papel en el reciclaje de la biomasa forestal y agroindustrial.

El sustrato disponible para el hongo debe ser reducido a sustancias solubles de bajo peso molecular que atraviesen la pared y el plasmalema para ser metabolizados en el interior de la célula. Las hifas secretan enzimas extracelulares (exoenzimas, tales como celulasas, hemicelulasas, lacasas, manganeso y lignina peroxidasas) y ácidos orgánicos que pueden degradar moléculas orgánicas complejas (celulosa, hemicelulosa y lignina), obteniendo moléculas más pequeñas, solubles que son fácilmente absorbidas por las hifas a través de la pared y membrana celular. Estos procesos

requieren la presencia de agua extracelular, la cual es el principal limitante de la actividad fúngica (Ferri, 1985).

Dentro de los Basidiomicetes se agrupan las especies según su capacidad de degradación específica del sustrato (Fig. 5). Es posible considerar a los hongos como: a) de pudrición castaña (“*brown-rot*”), tales como *Piptoporus betulinus* como a aquellos que degradan la celulosa y la hemicelulosa alterando parcialmente la estructura de la lignina sin su degradación definitiva, quedando la madera de color marrón (también conocida como pudrición cúbica), y b) los hongos de pudrición blanca (“*white-rot*”) que degradan la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Estos hongos degradan los tres componentes a la misma velocidad (ataque simultáneo) o hacen una degradación selectiva de la lignina y la hemicelulosa, en este caso la madera adquiere un color blanquecino.

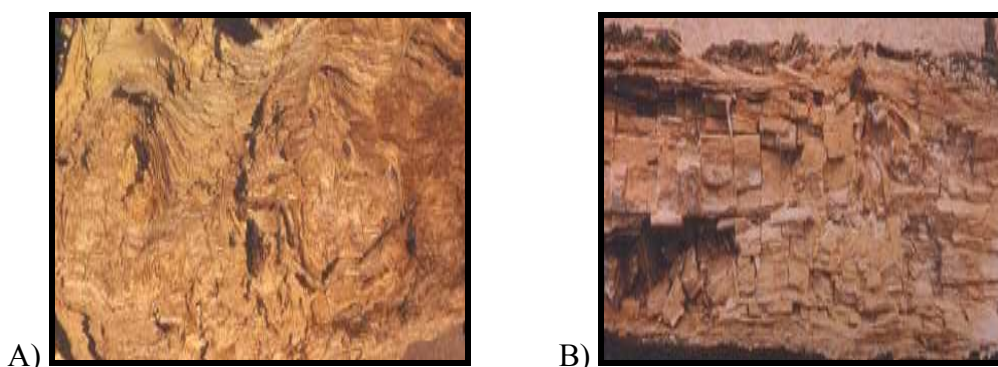


Fig. 5. Madera degradada por la actividad fúngica A) pudrición blanca; B) castaña.

1.2.1.- *Pleurotus ostreatus*: generalidades y descripción

Pleurotus ostreatus es un hongo saprofito o parásito débil, descomponedor de madera, produce la denominada podredumbre blanca. Su hábitat natural son troncos vivos o muertos de planifolios, en especial álamos (*Populus*), hayas (*Fagus silvatica L.*) y sauces (*Salix alba L.*). Raramente se encuentra en coníferas. Crece abundantemente produciendo grandes grupos de fructificación durante los meses de otoño e invierno, tras las primeras heladas nocturnas suaves, en zonas templadas.

La palabra *Pleurotus* viene del griego “pleuro”, que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición de la estirpe respecto al píleo; *ostreatus* en latín quiere decir en forma de ostra, y en este caso se refiere a la apariencia y color del cuerpo fructífero.

Taxonómicamente se lo puede clasificar:

Reino: Fungi

División: Astigomicotes.

Subdivisión: Basidiomicotinas.

Clase: Basidiomicetes.

Subclase: Holobasidiomicetes.

Orden: Agaricales.

Familia: Pleurotaceae

Género: *Pleurotus*.

Los organismos del Reino Fungi, son estrictamente heterotróficos y con excepción de las levaduras, pluricelulares. Casi todos los hongos poseen paredes celulares de quitina, polisacárido que no se encuentra en el reino Plantas. No poseen clorofila ni tejidos conductores, son portadores de esporas, pueden reproducirse generalmente tanto sexual como asexualmente y tienen en su mayoría estructura filamentosa, normalmente ramificada.

Los Amastigomicotes son una división de hongos que se caracteriza por presentar pared celular y por no producir células flageladas en ningún momento de su ciclo vital. Se nutren por absorción, mediante la secreción de enzimas al medio extracelular que descomponen el sustrato en moléculas de fácil asimilación a través de la pared de las hifas

Las Basidiomicotinas son hongos saprofitos, simbióticos o parásitos que producen basidiosporas.

Los Basidiomicetes son una clase de hongos terrestres y acuáticos que presentan hifas septadas. Los septos que separan los cuerpos fructíferos son completos. La reproducción sexual comprende la formación de basidios, donde tiene lugar la meiosis, y nacen las esporas.

Son dicarióticos durante la mayor parte de su ciclo biológico.

El micelio a partir del cual se producen las setas se extiende por debajo de la superficie del suelo y forma un anillo, que va muriendo por el centro y que puede crecer hasta alcanzar un diámetro de 30 m.

En los Holoblastomicetes los basidios no están septados, y se producen en himenios persistentes. Dentro de esta subclase se diferencian dos grupos, Gasteromicetes e Himenomicetes. *Pleurotus* pertenece al segundo grupo, en el que los basidios se producen en un himenio bien desarrollado que queda al descubierto antes de que las basidiosporas maduren.

En el orden Agaricales se encuentran los hongos cuyos cuerpos fructíferos reciben generalmente el nombre de seta, es decir, esporóforos carnosos en forma de paraguas que llevan los basidios sobre la superficie de láminas o poros, (himenio).

La familia pleurotaceae está formada en su mayor parte por hongos lignícolas que se desarrollan generalmente sobre troncos muertos.

El género *pleurotus* agrupa a un total de 39 especies, caracterizada por tener esporas blancas en láminas decurrentes, a menudo con estipe excéntrico.

La morfología de *Pleurotus ostreatus* es la típica de un hongo agarical. Suele encontrarse a menudo recubierto de una capa miceliar en la base, su carne es delgada, blanquecina y elástica, aunque tenaz al envejecer (Fig.6).

Al principio de su desarrollo, el píleo tiene forma de lengua, y cuando madura adquiere forma de concha. Su forma es excéntrica cuando crece en superficies verticales, y central cuando lo hace en camas. La superficie es seca, lisa y brillante, un poco viscosa en tiempo húmedo.

Su coloración varía en función de la luz, generalmente adquiere un gris muy pálido, aunque también puede ser gris acero o gris azul. El tamaño varía de los 5 a 20 cm de diámetro, raras veces puede presentar tamaños mayores en función de las condiciones de fructificación. Su margen es suave, delgado, ondulado y ocasionalmente enrollado.



Fig. 6. Fructificación de *Pleurotus ostreatus*.

Las laminillas son blanquecinas o color crema, decurrentes, anastomosadas (provistas de conexiones o soldaduras transversales) cerca del estirpe y densas. En ellas se disponen los basidios no tabicados, cada uno de ellos con cuatro basidiosporas blanquecinas, lisas y elípticas (8-11x 3-4 μm), las esporas en masa adquieren un color blanquecino o gris blanquecino con reflejos lilas. Presenta un pie o estípote blanquecino, excéntrico, a menudo corto, cilíndrico y macizo.

1.2.2. Cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es un hongo, que en ambiente natural crece sobre árboles, tocones, arbustos y otras plantas leñosas, alimentándose a costa de su madera y destruyéndola.

Su cultivo está en auge en algunos países como España, Italia o Francia, y es de una gran importancia económica.

El cultivo de esta seta es posible realizarlo con diferentes técnicas, pero en todas ellas lo fundamental consiste en sembrar el micelio sobre un sustrato leñoso-celulósico húmedo (casi siempre pasteurizado), incubarlo a 20-25° C, mientras se tiene envuelto el plástico y, por último, mantenerlo descubierto en sitios muy húmedos y frescos, generalmente a, menos de 15° C, hasta que salgan las setas.

Así durante los años se han ido sucediendo distintos tipos de sustratos para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*, entre los que destacan:

1-Cultivo sobre troncos cortados.

Troncos de maderas blandas de menos de 50 cm, en los que se inocula el micelio (colocándolo en orificios o en la superficie del corte); se tienen unos meses en una zanja cubierta y cuando ya ha prendido el hongo, se sacan y se colocan, en otoño, en sitios húmedos, con la base algo enterrada.

Los árboles más adecuados son el chopo o álamo negro (*Populus nigra*) y sus híbridos, así como el chopo temblón (*Populus tremula*). También se pueden emplear el álamo blanco (*Populus alba* L.), los sauces (*Salix alba* L.), moreras (*Morus nigra*), hayas (*Fagus sylvatica*), nogales (*Juglans regia*), cerezos (*Prunus avium*), abedules (*Betula pendula*), castaños de Indias (*Aesculus hippocastanum* L.), robles (*Quercus robur* L) y encinas (*Quercus ilex* L.).

El cultivo sobre este sustrato es bastante fácil y no requiere instalaciones complicadas, pero requiere el corte de árboles y por tanto una reforestación de la masa forestal. La producción de setas dura pocos años y sucede en otoño, obteniéndose unos rendimientos de entre 100 y 150 kg por metro cúbico de madera.

2-Cultivo sobre tocones de madera.

Los tocones de chopos, álamos (*P.nigra*), hayas (*Fangus*), nogales (*Juglans regia*), sauces (*Salix alba* L), moreras (*Morus nigra*), robles (*Quercus robur* L) y encinas (*Quercus ilex* L.), pueden aprovecharse para cultivar *Pleurotus ostreatus*, con la ventaja de que el propio hongo se encargará de atacar a la madera y en pocos años la dejará blanda, lo que facilitará la eliminación del tocón.

La siembra del micelio en el tocón se realiza a los pocos meses de la tala del árbol. Para ello se realizan unos agujeros con una barrena o taladro en diversos puntos del tocón, o algunos surcos con una sierra, con cierta inclinación hacia arriba y adentro, para evitar que se llenen de agua con la lluvia. Después se rellenan de micelio y se cubren con tiras de papel engomado opaco.

Otra forma de siembra consiste en cortar una rodaja del tocón con una motosierra. Se extiende el micelio sobre la superficie nueva y se cubre con la rodaja de madera, sujetándola con unos clavos. El borde se sella con papel engomado.

3-Cultivo sobre paja de cereales.

Es el método que proporciona mayores rendimientos. Consiste en sembrar el micelio sobre un sustrato preparado a base de paja, incubarlo a unos 25° C y luego tenerlo en un sitio fresco, húmedo, ventilado e iluminado. A continuación se detalla esta técnica de cultivo.

INSTALACIONES PARA EL CULTIVO INDUSTRIAL

Si la producción va a ser continua durante todo el año serán precisos dos locales en donde se puedan controlar los parámetros climáticos (temperatura, humedad, luz y ventilación) para la producción de estas setas.

Estos dos locales son:

Un local de incubación, en el que tendrá lugar el crecimiento del micelio sobre el sustrato. La temperatura será de 18 a 22° C y la ventilación de 1 metro cúbico de aire por hora y por kilogramo de sustrato.

Local de cultivo. En él se producirán las setas sobre bloques ya invadidos de micelio. La temperatura será de 12 a 14° C y la HR entre el 85 y 95%. La ventilación ha de ser tal que el contenido en CO₂ sea inferior al 0,06 % (150 m³ de aire por tonelada métrica de sustrato y hora, y una frecuencia de 8 a 10 veces por hora). La iluminación será de 12 horas diarias (200 a 500 lux).

Para obtener estas condiciones climáticas se utilizan pequeños locales que pueden estar dotados de sistemas de calefacción por infrarrojos, humidificación con cortina de agua en los ventiladores, circulación de aire mediante conducciones de plástico perforadas que cuelgan del techo, aislamiento del exterior, sistemas de filtro para evitar la entrada de otros hongos, enfermedades o insectos, etc.



Fig 7. Local de cultivo de *P.ostreatus*

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO.

La preparación de sustratos a base de paja de cereales (centeno (*Secale cereale*), trigo (*Triticum*) o cebada (*Hordeum vulgare*)) requiere los siguientes pasos:

Mojado de los montones de paja en depósitos durante 1 ó 2 días, en mezcladoras o mediante sistemas de riego por aspersión. La temperatura no debe sobrepasar los 60° C para evitar problemas futuros con hongos del género *Trichoderma*. La humedad de la masa de paja deberá ser del 70-80 %. Se añadirá carbonato cálcico para que el pH sea de 6,5.

Enriquecimiento del sustrato. Algunos cultivadores añaden heno picado, harina de maíz, harina de soja, harina de girasol, alfalfa deshidratada, salvado de arroz, etc. Al sustrato se le añaden distintos aditivos para mejorarlo y proporcionar mayor producción: harina de plumas (5%), yeso (10-40%), etc.

Tratamiento térmico. Con ello se consigue destruir semillas, insectos parásitos, hongos, etc, que puedan desarrollarse sobre el sustrato. Para ello se realiza una pasteurización al vapor en cámaras. La temperatura y el tiempo de pasteurización varían según los sitios. En general se emplean temperaturas comprendidas entre los 60 y 80^a C durante unas 5-6 horas, con periodos intermedios de 50° C durante 1-2 días.

Así de una tonelada métrica de paja se obtienen entre 2 y 3 toneladas de sustrato. Cuando el sustrato se enfría hasta 20-25° C y tiene un 70% ya está preparado para la inoculación del micelio.

SIEMBRA E INCUBACIÓN.

La siembra consiste en mezclar el micelio con la paja o sustrato ya preparado, de un modo uniforme. La cantidad de micelio comercial varía entre 1 y 4 % del peso húmedo. A mayor cantidad el desarrollo del hongo será más rápido y abundante pero la temperatura también será mayor, lo que perjudicará al desarrollo del micelio.

El micelio comercial se prepara en laboratorios especializados germinando las esporas en placas con agar-maltosa u otros medios de cultivo. Después se hace crecer sobre granos de cereales esterilizados, y una vez colonizados, se envasan para la venta. Existen varias cepas comerciales de

Pleurotus según el tamaño, color, necesidades de frío, resistencia al calor, etc.

El sustrato sembrado se introduce en sacos de plástico transparente de 15 a 30 Kg. de capacidad. El diámetro de los sacos debe ser inferior a los 40-50 cm. También se pueden emplear jaulas o cajones de tela metálica de malla amplia recubiertos de plástico. Pero las condiciones básicas que han de reunir los envases son:

Su tamaño no puede sobrepasar los 50 cm en ninguna de sus dimensiones, para facilitar el transporte.

La mayor parte de la superficie ha de ser vertical para obtener setas de mayor calidad.

Los bloques de sustrato se colocan en la sala de incubación a 18-22° C. Para que el micelio crezca ha de estar a una temperatura de 25° C, óptima para el cultivo. A los 15-20 días el micelio habrá invadido el sustrato.

RECOLECCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN.

Unas dos o tres semanas después de aparecer el primer botón se recogen las primeras setas. La producción de setas se concentra en periodos de tres a ocho días y luego para de diez a veinte días, después abundan otra semana y así sucesivamente. Para obtener setas con sombreros gruesos, carnosos y de buena calidad es preferible bajar la temperatura 2-3° C. Las setas se cortan con un cuchillo, sin arrancar la base.

En unas siete o nueve semanas se pueden producir entre 100 y 200 kilos de *Pleurotus* por tonelada de sustrato preparado y húmedo. La producción se escalona a lo largo del año, concentrándose entre 2 y 4 meses, distribuidos:

De 15 a 30 días de incubación y crecimiento del micelio.

De 15 a 20 días en la zona de cultivo.

De 45 a 60 días de cosecha.

Los ejemplares para la venta se recogen cuando son jóvenes ya que luego su carne se vuelve correosa. Los sombreros más aceptados por el consumidor son los que pesan menos de 70 g. Los pies y los ejemplares adultos se destinan a la preparación de sopas, salsas o platos preparados con sabor a setas.

En el Grupo de Investigación de Genética y Microbiología (GIGM) de la Universidad Pública de Navarra se ha trabajado y se trabaja actualmente en múltiples facetas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*.

Algunas de las líneas de investigación que se han llevado a cabo son:

- Marcadores moleculares y grupos de incompatibilidad.
- Caracteres de importancia agronómica.
- Genes de hidrofobinas.
- Actividad enzimática.

1.3- Enzimas fúngicas

Los hongos filamentosos se alimentan mediante la absorción de nutrientes. Estos organismos presentan una pared rígida por el exterior de la membrana plasmática, y los nutrientes deben atravesar la pared celular y llegar a la membrana plasmática en forma de compuestos de bajo peso molecular. Los hongos encuentran en la naturaleza complejos macromoleculares insolubles que deben digerir extracelularmente. Para ello, sintetizan y secretan gran variedad de enzimas extracelulares que degradan polímeros para dar lugar a monómeros solubles que puedan absorber.

La mayoría de estas enzimas son hidrolasas que actúan sobre los polisacáridos (carbohidrolasas), proteínas (proteasas), ácidos nucleicos (ADNasas y ARNasas) y lípidos (lipasas).

Gracias a la secreción de enzimas al medio, los hongos son importantes degradadores y se pueden alimentar de sustratos muy diversos.

Además de la importancia de estas enzimas en la nutrición de los hongos, son también muy utilizadas en actividades humanas. Las enzimas fúngicas se emplean en procesos industriales, por ejemplo se emplean proteasas en la industria alimentaria y también en la producción de detergentes.

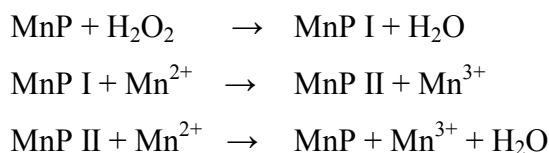
El proceso de síntesis y secreción de enzimas extracelulares por hongos está regulado por una serie de estímulos ambientales y fisiológicos como la temperatura, la edad de los cultivos y la fase de crecimiento en la que se encuentran. Además, la composición del medio de cultivo influye en la producción de ciertas enzimas. De esta forma, muchas hidrolasas de hongos pueden estar sometidas a represión por compuestos presentes en el medio que inhiben su síntesis. Por otra parte las enzimas extracelulares, implicadas en la degradación de diversos compuestos, son inducidas por la presencia del sustrato o por compuestos derivados del mismo (Kubicek, 1987).

1.3.1.- Enzimas ligninolíticas

La degradación o modificación de la lignina es el paso clave en la degradación de la lignocelulosa, y en el intervienen principalmente tres tipos de enzimas: Lacasas (Lac o fenol oxidasas) (EC 1.10.3.2), Manganese peroxidasas (MnP EC 1.11.1.13), Lignina peroxidase (LiP EC 1.11.1.14) y Versátil Peroxidasa (Vp EC 1.11.1.16) (Kirk, 1987).

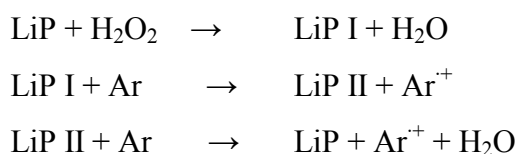
La lacasa es una multicobre oxidasa que reduce el oxígeno formando dos moléculas de agua, y simultáneamente oxida a varios compuestos aromáticos mediante la abstracción de cuatro electrones (Bourbonnais, y col., 1997).

La Manganese peroxidasa (MnP EC 1.11.1.13) es una hemoproteína que cataliza la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} y dependiente de H_2O_2 . La enzima es oxidada por H_2O_2 para generar un intermediario deficiente de un par de electrones, conocido como componente I, que puede ser oxidado por Mn^{+2} o por substratos fenólicos, generando el componente II. El ciclo se completa cuando el componente II gana un electrón, devolviendo así la enzima al estado basal.



Esquema 2. Ciclo catalítico de la enzima MnP

La lignina peroxidasa (LiP EC 1.11.1.14) fue la primera enzima en descubrirse y, al igual que otras peroxidasas, funciona con la vía catalítica en que la Lip es oxidada por H_2O_2 , generando un intermediario deficiente de electrones, que regresa a su estado inicial por medio de dos oxidaciones posteriores.



Esquema 1. Ciclo catalítico de la enzima LiP

(Ar:substrato aromático)

Más recientemente se ha descrito la Versátil Peroxidasa (Vp EC 1.11.1.16) en *Pleurotus* y otros hongos como un tercer tipo de peroxidasas ligninolíticas que combina propiedades catalíticas de LiP, MnP y de peroxidasas de plantas oxidando compuestos fenólicos.

Otras enzimas extracelulares que están implicadas en la degradación de la lignina son oxidasas que generan H₂O₂, y dehidrogenasas asociadas al micelio que reducen los compuestos derivados de la degradación de la lignina. Estas enzimas incluyen las Aril Alcohol Oxidasas (AAO) descritas en *Pleurotus eryngii* y la glioxal oxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*. Las Aril Alcohol Dehidrogenasas (AAD) fúngicas y las Quinona Reductasas (QR) están también involucradas en la degradación de la lignina.

a) Lacasas: importancia y aplicaciones industriales

Las lacasas son proteínas multicobre con actividad fenoloxidasa (EC1.10.3.2, bencenodiol: oxígeno oxidorreductasas) que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, liberando agua al utilizar el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Thurston, 1994).

Es una de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde finales del siglo XIX, cuando se descubrió en el árbol japonés de la laca *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883), del que tomó su nombre. Unos años después se describió en hongos (Yoshida, 1883; Bertrand, 1896), y posteriormente en otras plantas, bacterias e incluso insectos (Gianfreda et al., 1999).

En el caso de los hongos, las lacasas son secretadas al medio extracelular por el micelio de basidiomicetos, deuteromicetos y ascomicetos. Los mayores productores de esta enzima son los basidiomicetos de podredumbre blanca.

a) Propiedades bioquímicas de la lacasa:

En general, las lacasas son proteínas monoméricas con masas moleculares entre 50 y 100 kDa. Son glicoproteínas con un contenido en carbohidratos del 10-45%. Este contenido está implicado con la estabilidad estructural de la proteína y su protección frente a procesos de proteólisis e inactivación

por radicales (Yoshitake et al., 1993; Ko et al., 2001). Su temperatura óptima va desde los 50 a los 70°C (Morozova et al., 2007).

Presentan actividad en un amplio rango de pH, entre 2,0 y 8,5 aunque el óptimo se encuentra entre 3,0 y 5,0 (Thurston, 1994; Leonowicz et al., 2001; Morozova et al., 2007).

Catalizan la reacción de un amplio rango de sustratos, como aminas aromáticas, compuestos fenólicos e incluso iones inorgánicos.

b) Aplicaciones industriales:

Industria papelera

La fabricación industrial de papel requiere la separación y degradación de la lignina, de la celulosa que integra las pastas.

Tradicionalmente, en dicho proceso, la etapa de blanqueo de la pasta de papel es la que genera mayor impacto ambiental, debido al empleo de reactivos químicos clorados que generan organoclorados muy tóxicos. Las mayores restricciones legales han promovido el desarrollo de secuencias de blanqueo libres de cloro basadas en la deslignificación con oxígeno, ozono y peróxido de hidrógeno.

En este caso, la utilización de enzimas lignolíticas es una buena solución al problema ya que de esta manera no hay contaminación en el blanqueo de la pasta.

Industria alimentaria

Las lacasas participan en la estabilización y en el incremento de la calidad de diferentes bebidas, mediante la eliminación de fenoles indeseables, responsables de la turbidez y oscurecimiento de zumos de frutas, cerveza y vino, y en general aumentando las propiedades organolépticas de estos productos (Felby et al., 1997; Minussi et al., 2002).

Industria cosmética

Los productos utilizados habitualmente para el aclarado o tinte del cabello contienen reactivos químicos fuertes que pueden dañar el pelo. Una alternativa menos dañina podría ser el empleo de lacasas en presencia de estilbenos (Onuki et al., 2000). Por otro lado, pigmentos empleados en esta

industria, como melaninas, se pueden producir a través de reacciones oxidativas catalizadas por lacasa (Nagai et al., 2003; Tetsch et al., 2005).

Industria textil

Una de las aplicaciones de estas enzimas con mayor proyección a escala industrial es su empleo en el blanqueo de fibras de algodón y colorantes textiles, como el índigo en prendas vaqueras (Riva, 2006)

Nanobiotecnología

El fenómeno de la transferencia directa de electrones desde un electrodo a la molécula de lacasa (bioelectrocatalisis) se ha empleado para la creación de cátodos en biopilas de combustible y biosensores. La modificación del cátodo con lacasa incrementa la velocidad de transferencia electrónica y supone una alternativa limpia al uso de platino (metal caro y escaso), generando una energía eléctrica sin combustión (Barton et al., 2001).

Síntesis orgánica

Las lacasas también se emplean en síntesis orgánica. Por ejemplo para la oxidación de grupos hidroxilo de derivados de azúcares, la producción de polímeros complejos (p.ej policatecol para resinas de cromatografía) o la síntesis de agentes farmacológicos (antitumorales, nuevos derivados de antibióticos o antioxidantes) (Abadulla et al., 2000; Mai et al., 2002; Marzorati et al., 2005; Uyama et al., 2006; Baratto et al., 2006; Kunamneni et al., 2008).

Las lacasas se han empleado en la producción de colorantes (Baker et al., 1996). Recientemente se han sintetizado colorantes fenólicos empleando una lacasa industrial (Suberasa® de Novozymes).

b) Inducción de la actividad lacasa.

Las lacasas fúngicas pueden ser constitutivas o inducibles y también, intracelulares o extracelulares (Sariaslani, 1989). Estas enzimas han sido detectadas y purificadas de distintas especies de hongos, y se ha observado que se producen múltiples isoenzimas (Palmieri y col., 2000).

Varias lacasas encontradas son extracelulares y se asocian al crecimiento, y las sustancias que inducen la producción de lacasa son usualmente compuestos que tienen estructuras muy similares o

análogas a los sustratos de la enzima y sirven como una señal a la célula para que produzcan alguna enzima específica (López, 2001).

En la actualidad, se han estudiado compuestos que tienen la capacidad de funcionar como inductores para la síntesis de lacasas en varias especies de hongos.

El hongo *Coriolus hirsutus* ha sido inducido para la síntesis de lacasas extracelulares utilizando como un sustrato la siringaldazina (0.11 μ M), observándose un aumento cercano al 1000%. En 1980, Gigi y colaboradores, obtuvieron resultados de producción y secreción máxima de lacasas en el hongo *Botritis cinerea*, al adicionarle ácido gálico al medio de cultivo líquido. Marbach y colaboradores (1983), encontraron que al adicionarle ácido cumárico al mismo hongo, generó una acción de inducción además del incremento de actividad que habían obtenido adicionando al medio ácido gálico y el jugo de uva, sugiriendo que el hongo se adaptó a diferentes medios excretando así distintas lacasas.

Para el hongo de podredumbre blanca *Pycnoporus cinnabarium*, ocurrió un efecto de inducción de una isoenzima de lacasa, de aproximadamente de 81 kD, al adicionarle 2,5 xilidina (Eggert y col., 1996).

Los compuestos aromáticos utilizados como inductores de la actividad lacasa varían en su estructura principalmente por la disposición de los sustituyentes en el anillo aromático como lo menciona González (2001) en su trabajo, quien observó que al aplicar distintos compuestos aromáticos para inducir la síntesis de lacasas por *Trametes* sp. I-62, encontró que los isómeros del alcohol veratrílico (alcohol 3,4- dimetoxibencílico), el alcohol 2,5-dimetoxibencílico y el alcohol 3,5- dimetoxibencílico (diferentes isómeros de un compuesto) tienen diferentes capacidades de inducción de la actividad de las lacasas. Otros dos compuestos, el ácido p-metoxifenol y el guayacol provocan también un máximo de inducción, pero éste varía con el momento en que ocurre y también con la fase el crecimiento del hongo.

En el hongo *Neurospora crassa* se utilizó como inductor a la D-fenilalanina para producir lacasa, observándose un incremento de la transcripción de lacasas después de 30 horas (Linden y col., 1991).

Sonden y Dobson (2001) utilizaron varios compuestos aromáticos (ácido ferúlico, ácido veratrico, 2,5 xilidina, e hidroxibenzotriazole) como inductores para el hongo *Pleurotus sajor-caju* y observaron un incremento en la expresión de la secuencia de los genes Psc lac 1, 2, 3 y 4.

Recientemente, Elisashvili et al., (2010) han detectado inducción de la actividad lacasa y manganoso peroxidasa utilizando compuestos aromáticos, como el purogallol (o benceno-1, 2, 3,-triol) el cual estimula la síntesis de ambas enzimas en *Cerrena unicolor*.

Por otro lado, se ha observado que al adicionar un exceso de cobre al medio de cultivo se provoca un efecto de inducción para la producción de lacasas (Hubert y Lerch, 1987).

Como ocurrió con el hongo *P. chrysosporium*, al cual se le agregó CuSO₄ (0.4 mM) en el medio, generando así un aumento en su actividad lacasa dentro de los días 2 y 3 (Dittmer y col., 1997). El cobre en *Pleurotus ostreatus* promueve la expresión de las isoenzimas POXA1b regulando así el nivel de la transcripción del gen; siendo el *poxa1b* ARNm el más abundante en la transcripción inducida a todos los tiempos de crecimiento analizados (Palmieri y col., 2000).

c) Utilización de inductores naturales en la producción de lacasa

Por la gran importancia que tiene la aplicación de las lacasas en la industria para la oxidación de los compuestos aromáticos policíclicos encontrados, tanto en los efluentes industriales, como en el suelo contaminado, así como también en el pretratamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol, se ha intensificado la búsqueda de metodologías y especies de hongos que produzcan estas enzimas en mayor cantidad, a un bajo costo y por lo tanto, tengan una mayor aplicabilidad en muchos de los procesos biotecnológicos.

Numerosos estudios se han realizado con el fin de utilizar productos derivados de la agro-industria para la producción de enzimas lignocelulósicas en cultivos sumergidos de varias especies de hongos basidiomicetes. Entre ellos se pueden citar, piel de mandarina, serrín de vid, paja de trigo, hojas de árboles (*Fagus sylvatica*) (Kachlishvili et al., 2005; Mikiashvili et al. 2005).

2-ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Antecedentes:

En el Grupo de Investigación de Genética y Microbiología (GIGM) de la Universidad Pública de Navarra se ha trabajado y se trabaja actualmente en múltiples facetas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*.

Facetas que van desde la anotación del genoma y la mejora de cepas industriales hasta las posibles aplicaciones biotecnológicas de este hongo.

Una de estas aplicaciones podría ser el pretratamiento del material lignocelulósico que se emplea para la producción del bioetanol, en base a la capacidad enzimática del hongo para descomponer esta materia.

Los biocombustibles de segunda generación, que se producen a partir de restos de origen vegetal, necesitan en su proceso un pretratamiento de la materia prima. Actualmente este pretratamiento se realiza con ácidos y a presiones y temperaturas elevadas, lo que da lugar a productos secundarios contaminantes y a un gasto energético muy alto. En caso de que este procedimiento lo pudieran realizar, al menos parcialmente, hongos que produzcan enzimas tales como la manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13), lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), fenol-oxidasa (Pox, lacasa, EC 1.10.3.2) o la peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.13), en nuestro caso el *P. ostreatus*, se reducirían costes y contaminación.

La lacasa o fenol-oxidasa, es una enzima muy importante en la degradación de la lignocelulosa y también en la industria papelera, alimentaria...). Por esto tiene una gran importancia económica, y se están llevando a cabo diversos estudios para conocer su valor de actividad en cultivos de *P. ostreatus*, y posibles métodos de inducción.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material

3.1.1.- Material Biológico

El material biológico utilizado en este trabajo consistió en la cepa dicariótica de *Pleurotus ostreatus* (N001), y en dos cepas monocarióticas del mismo hongo, PC9 y PC15. (Gúmer Pérez, Jasmyn Pangilinan, Antonio G. Pisabarro, and Lucía Ramírez, 2007)

La cepa N001 (Navarra 001, *P. ostreatus* var. *florida*) está caracterizada por tener una elevada producción, presentar setas de gran tamaño y ser tolerantes a altas temperaturas.

PC15 y PC9 provienen de la de-dicariotización a la que se ha sometida la cepa N001, teniendo cada una de ellas solo uno de los dos núcleos del dicarionte.

3.1.2.- Medios de cultivo

3.1.2.1.- Medio sólido Agar-Malta (Eger, 1976)

El cultivo vegetativo de monocariontes y del dicarionte N001 se realizó en medio sólido agar-malta (Tabla1) esterilizado en autoclave (121°C, durante 20 min.) y extendido en placas de Petri de 9 cm de diámetro en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

Tabla1. Composición del medio de cultivo agar-malta.

Extracto de malta.....	20 g
Agar Bacteriológico.....	15 g
Agua destilada.....	1 L

3.1.2.2.- Medio Líquido M7GY

El cultivo líquido M7GY, fue empleado para realizar los inóculos y los cultivos líquidos con los diferentes tratamientos de cada una de las cepas utilizadas en este trabajo (Tabla 2). Este medio

fue colocado en Erlenmeyer con tapón de algodón y esterilizado en autoclave a 121°C, durante 20 min.

Tabla 2. Composición química del medio líquido M7GY.

Glucosa.....	10 g
Tartrato Amónico.....	2 g
MgSO ₄ . /H ₂ O.....	1,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl.....	0,5 g
Extracto de levadura.....	1 g
Solución de elementos traza*	1 mL
Agua destilada.....	1 L

*Solución elementos traza:

Na ₂ B ₄ O ₇ . H ₂ O.....	0,1 g
ZnSO ₄	0,07 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O.....	0,01 g
MnSO ₄ . 4 H ₂ O.....	0,01 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,05 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ . 4H ₂ O.....	0,01 g
Agua destilada.....	1L

3.1.3.- Reactivos y soluciones

- **Buffer Acetato de Sodio 0.1M (pH 5.0)**

Para preparar 1 L de buffer acetato se utiliza:

148 mL **solución A** + 352 mL **solución B** + 500 mL H₂O destilada

Solución A: 11.55 mL ácido acético glacial en 1 L de H₂O destilada (0.2M)

Solución B: 27.2 g acetato de sodio -3- hidrato en 1 L de H₂O destilada (0.2M)

- **2,6 – dimetoxifenol (DMP) 10mM**

Solución stock de 2,6-DMP (20 mM, pH 5.0):

- 26.25 mL de ácido acético (0,2 M)

- 98.75 mL de acetato de sodio (0,2 M)

- 0.3854 g de 2,6- DMP (PM = 154.17)

Luego se añaden 225 mL de H₂O destilada y se ajusta el pH a 5.0.

- ***Sulfato de Manganeso (MnSO₄) 20 mM***

- 3.38 g de MnSO₄ · H₂O en 1 L de H₂O destilada.

- ***Peróxido de Hidrógeno (4 mM)***

- 22.5 µl de H₂O₂ 30% (v/v) en 10mL de H₂O destilada.

- ***1% (w/v) del reactivo DNS:***

-1g de ácido dinitrosalicílico (DNS) (60 mM)

-200 µl fenol-cloroformo isoamil alcohol 25:24:1

-50 mg metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅) (1,7 mM)

-1g de hidróxido de sodio (NaOH) (250 mM)

-H₂O mQ hasta 100 mL

- ***SDS Gel de Poliacrilamida***

- *Gel separador (10 mL, al 10% de acrilamida)*

- H₂O 4 mL

- 30% mezcla de acrilamida* 3,3 mL

- 1,0 M Tris (pH 8,8) 2,5 mL

- 10% SDS 0,1 mL

- 10% Persulfato amónico 0,1mL

- TEMED 0,004 mL

- *Gel concentrador (4mL)*

- H₂O 2,7mL
- 30% mezcla de acrilamida* 0,67mL
- 1,0 M Tris (pH 6,8) 0,5 mL
- 10% SDS 0,04 mL
- 10% Persulfato amónico 0,04mL
- TEMED 0,004mL

El Persulfato amónico 10% se prepara en el momento de preparación del gel, pesando 100 mg de persulfato amónico y añadiéndole 1 mL de H₂O destilada.

*Mezcla de acrilamida: 145g acrilamida y 5g N, N'-metileno bis acrilamida en 500 mL de agua destilada.

- *Tampón de carrera 5x (pH 8,3)*

- Tris base 9 g (15 g/L)
- Glicina 43,2 g (72 g/L)
- SDS 3 g (5 g/L)
- Agua destilada 600mL

Guardar a 4°C, y antes de ser utilizado se lo deja a temperatura ambiente para que no precipite. Luego, se diluye 60 mL de tampón de carrera (5x) en 240 mL de H₂O destilada, para una carrera en la cubeta d electroforesis.

- *Tampón de carga*

- H₂O 3,8 mL
- 0,5 M Tris pH 6,8 1 mL
- Glicerol 0,8 mL
- 10 % SDS 1,6 mL

- 1% azul de bromofenol 0,4 mL

Se utiliza para cargar las muestras en el gel antes de comenzar la electroforesis.

Se usa: 5µL buffer de carga + 15 µL muestra.

- *Marcador de peso molecular: Prestained SDS-PAGE Standarts*

	Proteínas	Calibrated MW (daltons) on Tris-HCl gel
1:	miosina	209,998
2:	β- Galactosidasa	117,068
3:	seroalbúmina bobina	97,834
4:	ovalbumina	55,145
5:	anhidrasa carbónica	37,491

3.1.4.- Equipamientos e instalaciones

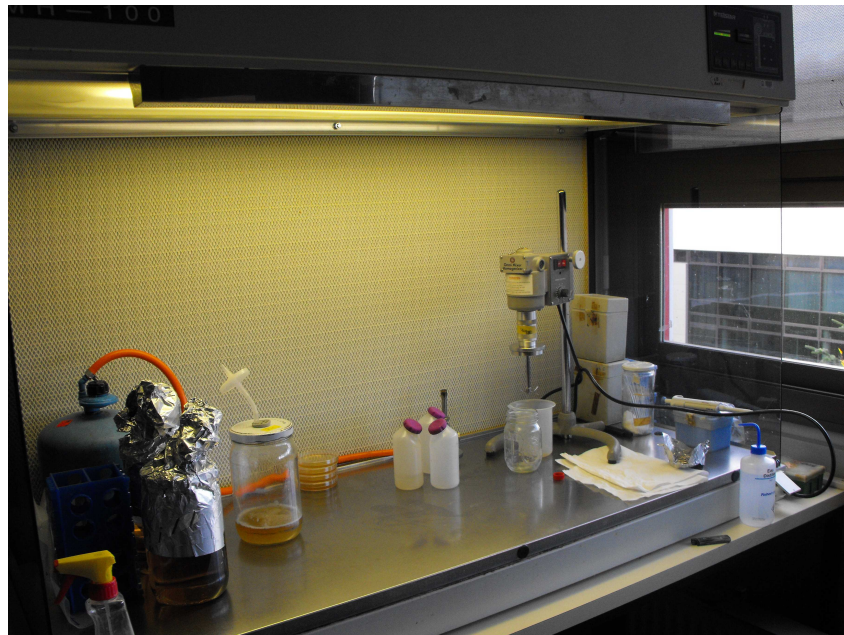
1- Agitador orbital (Stuart SSL1)

El crecimiento de las cepas inoculadas en medio líquido M7GY y los ensayos de cultivo de dichas cepas fueron realizados utilizando un agitador orbital a 25°C y 150 r.p.m., permitiendo la aireación con un filtro unidireccional

2- Campana de flujo laminar (Telstar MH-100)

Los procesos que requieren esterilidad, como pases, pre-inóculos, inóculos y extracciones, etc, se realizan en una campana de flujo laminar Antes de su uso, la campana se esteriliza con luz ultravioleta y etanol.

Fig. 1. Campana de flujo laminar.



3-Cámara de crecimiento

Para el crecimiento de las cepas inoculadas en medio líquido M7GY que fueron incubadas en estático, se utilizó una cámara aislada donde se controlan las condiciones de crecimiento (temperatura, humedad y luz). La temperatura de la cámara se mantuvo constante a 24° C, y la humedad al 30%, siempre en oscuridad.

4-Congelador

Una vez tomadas las muestras de cada experimento, se colocan en un congelador a -20°C, con lo que se asegura la parada total de actividad y la preservación de las muestras para sus posteriores análisis y determinaciones.

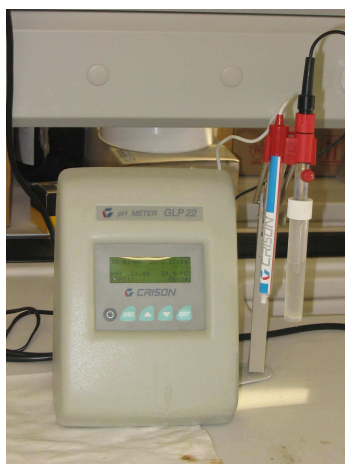
5- Espectrofotómetro

El espectrofotómetro empleado para las mediciones es de la marca Shimadzu, modelo UV-1800. Este espectrofotómetro se utilizó para realizar mediciones fotométricas y de cinética.

6- pH-Metro

El aparato utilizado para la determinación del pH es de la marca Crison, modelo GLP21 (Fig 3).

Fig. 3. Equipo para medir pH.



7- Balanza

Para el ensayo de biomasa se ha utilizado una balanza analítica digital, que puede medir en dos sistemas de unidades, en este caso, se ha medido la masa en gramos. Esta balanza lo muestra con una incertidumbre de 0.0001g. (0,1 mg).

8- Equipo de filtración.

Para determinar la biomasa, se ha utilizado un equipo de filtración, compuesto por una bomba de vacío (Neuberger.N035AN.18), un kitasatos de 500 mL y un olla de filtración (Millipore, XX2702550) donde se pueden hacer 12 filtraciones simultáneamente (Fig. 4).

Fig. 4. Equipo de filtración.



10- Baño termostático

Para el ensayo de la determinación de glucosa se ha utilizado un baño termostático, con controlador de temperatura (fig. 5).

Fig. 5. Baño con termostato.



11- Centrifuga

Cada vez que fue necesario las muestras se centrifugaron a 13000 rpm, durante 4 min, a 4°C, para precipitar los pellet.

3.2.- Métodos

3.2.1.- Crecimiento en placa Petri (agar – malta)

Con el objetivo de tener micelio joven, para su posterior uso como inóculo en medio líquido M7GY, se hacen pases de las tres cepas (N001, PC15 y PC9) a placas de Petri conteniendo medio sólido agar-malta (Eger, 1976). El pase se realiza en esterilidad, a la llama y en campana de flujo laminar, posteriormente las placas se dejan es una estufa en oscuridad a 25°C.

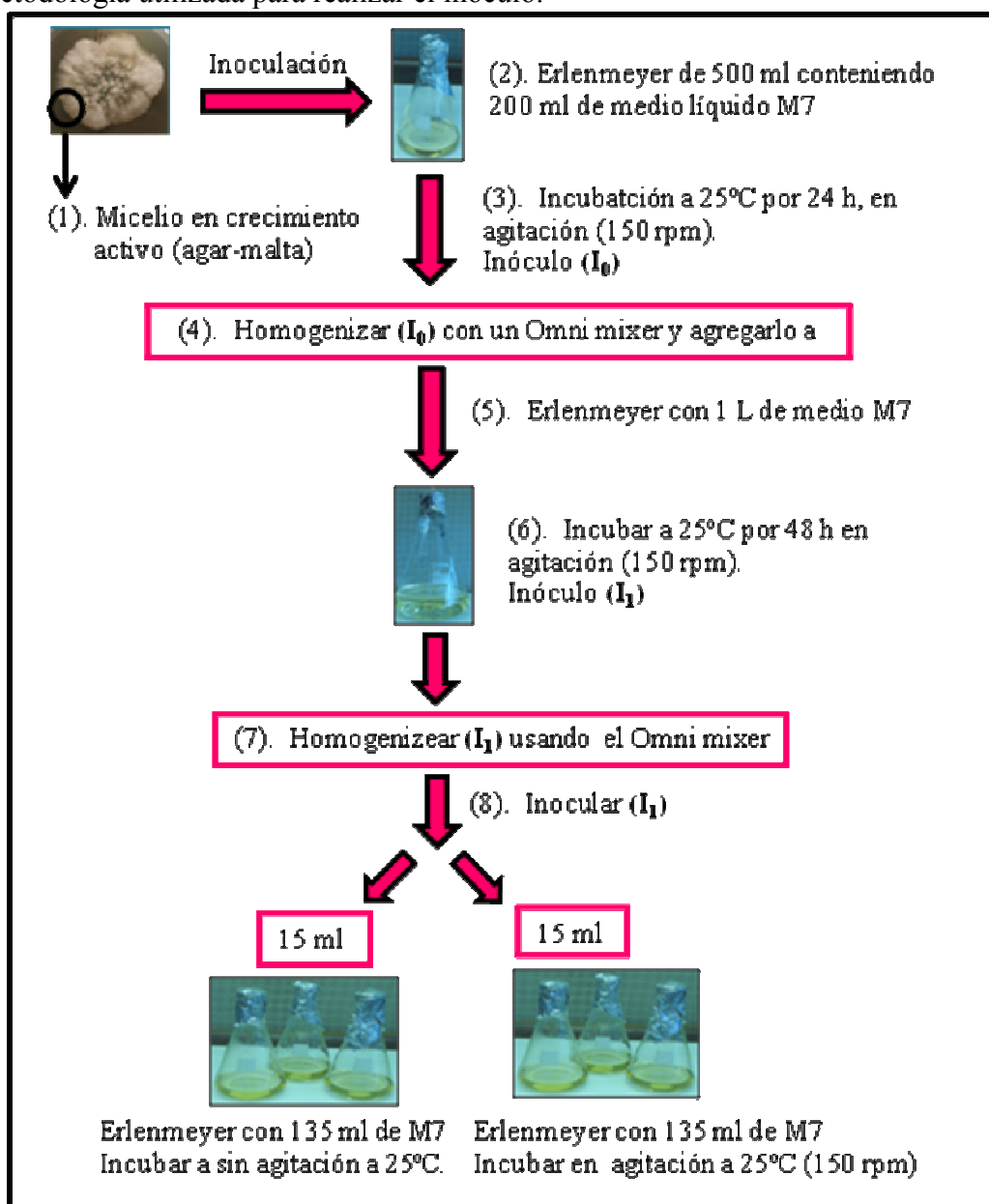
El micelio de las cepas N001 y PC 9 coloniza la placa Petri de 9 cm de diámetro en 7-10 días, en el caso de la cepa de PC 15 el crecimiento es más lento.

Una vez que el micelio ha colonizado la placa de petri, éstas se conservan en una cámara a 4°C donde pueden permanecer durante un par de meses.

3.2.2.- Preparación del inóculo en medio líquido M7GY

En primer lugar se realiza un pre-inóculo. Para ello se inoculan con micelio de cada una de las cepas previamente crecidas en placa de Petri en erlenmeyers que contienen 200 mL de medio líquido M7GY estéril (Fig. 6). Este pre-inóculo (I_0) se mantiene en agitación (150 rpm) durante 24h a 24°C. Inmediatamente después, se homogeniza el pre-inóculo (I_0) de cada una de las cepas empleadas en este trabajo por separado, utilizando un homogenizador (Omni mixer) y se agregaran a sendos erlenmeyer que tienen 1 L de medio líquido M7GY. El inóculo (I_1) de cada una de las cepas se mantiene en agitación (150 rpm) durante 48 h a 24°C. y luego cada uno se homogeneiza por separado y se utilizarán 15 mL de homogeneizado para inocular cada uno de los erlenmeyers conteniendo 135 mL de medio líquido M7GY estéril para iniciar el cultivo experimental.

Fig. 6. Metodología utilizada para realizar el inóculo.



3.2.3.- Preparación del extracto acuoso de paja de trigo (inductor)

Para la preparación del extracto acuoso de paja de trigo se utilizan 150 g de paja de trigo y 1500 mL de agua destilada, incubados en un frasco de vidrio de 2 L, en agitación (150 rpm) durante 5 h, a 25°C. Para obtener el extracto acuoso de paja de trigo, se filtra el contenido del frasco utilizando miracloth. El sobrenadante obtenido es esterilizado a 121°C durante 20 min. Este extracto se utilizará como inductor de la actividad enzimática en medio líquido M7GY inoculado con las cepas de *P. ostreatus*.

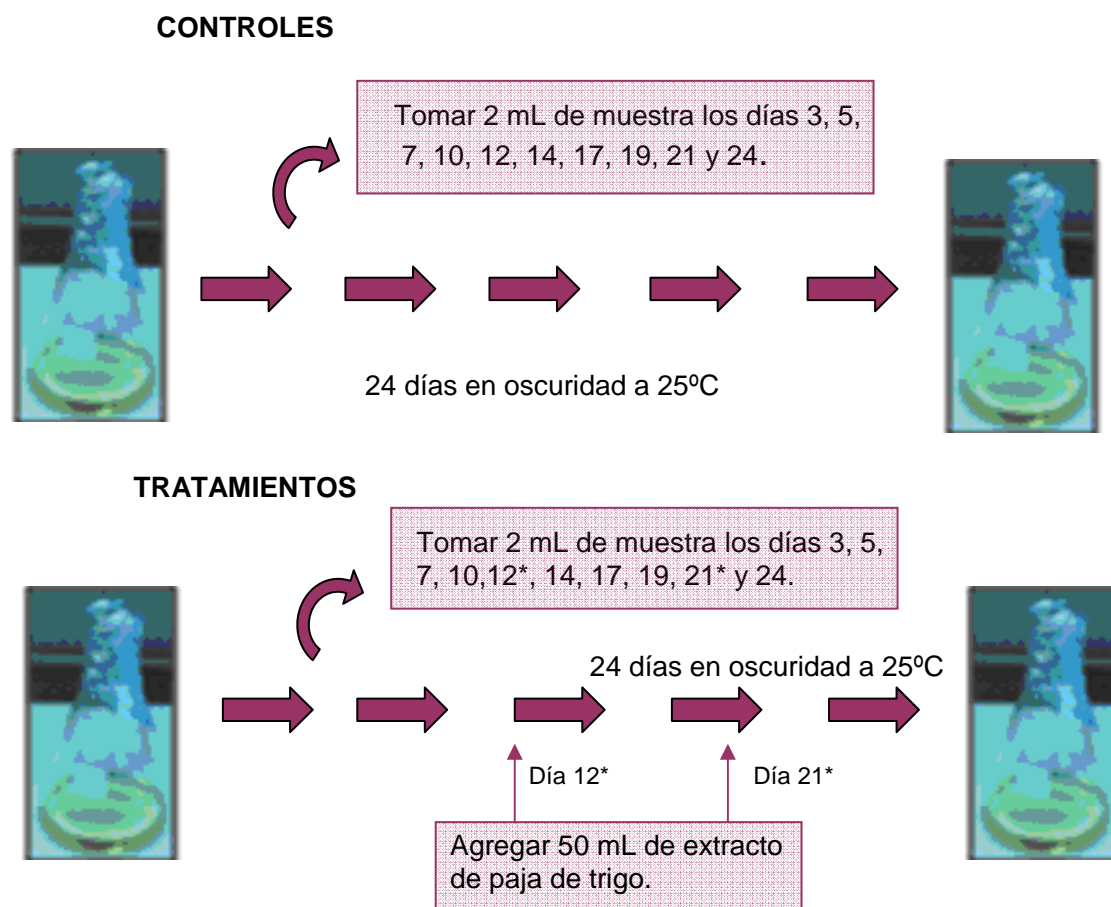
3.2.4.- Metodología de cultivo e inducción de las cepas de *P. ostreatus* en medio líquido M7GY

Los cultivos líquidos de M7GY inoculados con cada una de las cepas de *P. ostraetus* se incubaron en dos condiciones diferentes: a) en un agitador orbital (25°C, en oscuridad a 150 rpm) y b) en estático (25°C, en oscuridad, sin agitación).

Cada uno de los tratamientos (estático (E) y agitación (A) para N001, PC15 y PC 9) se realizó por triplicado. Se utilizaron 3 erlenmeyer conteniendo medio líquido M7GY, inoculados con cada una de las cepas (cultivos controles) y 3 conteniendo medio líquido M7GY inoculados con cada una de las cepas a los que se les añadieron 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo los días 12 y 21 de cultivo en cada una de las condiciones (E y A).

Se tomaron muestras (2 mL) en esterilidad, a distintos tiempos de cultivo (3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24 y 26 días) de cada una de las cepas incubadas en las dos condiciones (E y A).

Estas muestras se utilizaron para hacer las diferentes determinaciones (medición de actividad enzimática (lacasa y manganeso peroxidasa) y concentración de glucosa).



* Los días en los que se hace la inoculación, se toman los 2 mL de muestra antes de añadir el extracto de paja.

3.2.5.- Determinación del pH del medio líquido M7GY y de la biomasa de las tres cepas de *P. ostreatus* cultivadas en estático y agitación.

Para la medición de estos parámetros se usan erlenmeyers de 100 mL conteniendo 20 mL de medio líquido M7GY estéril inoculados con 2,2 mL del inóculo (I_1) homogeneizado de cada una de las cepas utilizadas en este trabajo (fig 6).

Se prepararon 30 erlenmeyers para cada una de las cepas (N001, PC15 y PC9) que se incubaron en las dos condiciones (E y A) descritas en el apartado 3.2.4. Para la determinación de estos parámetros se tomaron muestras por triplicado de cada una de las cepas incubadas en cada una de las condiciones (E y A) a distintos tiempos de cultivo (3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24 y 26 días).

Para la determinación de la biomasa, se filtró el contenido de los erlenmeyers, en una olla de filtración (con filtros millipore de 10 micras, de nylon) y se recogió el filtrado (sobrenadante) en un tubo falcon de 15 mL. Cada uno de los filtros con la biomasa húmeda se deshidrató en estufa a 50°C, durante 24h y luego se pesó en una balanza analítica. En sobrenadante recogido luego de la filtración se usó para medir el pH, utilizando un pHmetro Crison previamente calibrado, con tampones de pH 4 y 7.

3.2.6.- Medición de la actividad enzimática de las tres cepas de *P. ostreatus* cultivadas en medio líquido M7GY en estático y agitación.

La medición de actividad enzimática (Lacasa (Lac) y Manganeso peroxidasa (MnP)) se realiza mediante un método colorimétrico que se ha puesto a punto en el Grupo de Genética y Microbiología de la UPNa (Santoyo et al., 2008). Este método sirve para la valoración simultánea de la producción de enzimas ligninolíticas (Lacasa y MnP).

La medición de la actividad Lacasa se realizó midiendo la oxidación del compuesto 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) el cual produce un dímero llamado cerilignona. Esta oxidación, se permite durante un minuto, en el que origina un aumento en la absorbancia a 468nm.

La actividad MnP se determina a partir de la misma mezcla de reacción, a la que se adicionó Mn^{2+} , para iniciar la reacción se añade H_2O_2 . La actividad enzimática obtenida, se corrige restándole el valor debido a la actividad lacasa.

La mezcla de reacción con 450 μl del sobrenadante del medio de cultivo M7GY y 500 μl 2,6-DMP (10 mM) en buffer acetato (pH 5), la reacción fue monitoreada durante un minuto en el espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1800) para medir la variación de la absorbancia a 468 nm ($= 49600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del producto dimérico de la oxidación). Después de medir la actividad Lac, se añaden 50 μl de MnSO_4 (20 mM) a la misma mezcla de reacción y se midió la variación de absorbancia durante un minuto a 468 nm. Por último se agregaron en la misma mezcla de reacción 30 μl de H_2O_2 (4 mM) y se midió la variación de absorbancia durante un minuto a 468 nm.

Unidad de reacción: Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml).

Cálculos y expresión de resultados:

Durante la medida de la actividad con cada una de las muestras se obtuvieron tres mediciones. La primera medición correspondió a la actividad Lac (mU/mL). La actividad MnP se obtuvo de la diferencia entre la tercera medición (H_2O_2) y la primera (Lac). Si el valor obtenido en esta diferencia es cero o negativo, significa que en la muestra no hay actividad MnP.

Se define como unidad de actividad enzimática (U.A.) como la formación de 1 μmol de producto por minuto. La actividad específica es el número de mili Unidades de enzima por mL de dilución (mU/mL).

3.2.7.- Determinación de la concentración de glucosa.

Para la cuantificar el azúcar residual presente en el medio de cultivo líquido M7GY, se emplea el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller (1959), con algunas modificaciones. Este método se basa en la coloración marrón-rojiza que desarrolla la muestra, producto de la acción reductora de los azúcares, y la absorbancia a 540 nm utilizando el espectrofotómetro.

Para poder realizar la determinación de la concentración de glucosa en cada una de las muestras es necesario realizar una curva patrón de glucosa (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de glucosa de cada uno de las muestras empleadas para realizar la curva patrón de glucosa.

<i>Tubo</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
$\mu\text{l H}_2\text{O dest}$	1000	950	900	800	600	200	0
$\mu\text{l glucosa 10 g/l}$	0	50	100	200	400	800	1000
g glucosa / l	0	0.5	1	2	4	8	10

Metodología utilizada:

1) Añadir a cada tubo de la curva patrón y a cada tubo de reacción:

- 250 μl de agua destilada
- 250 μl de muestra o solución de glucosa
- 1mL de reactivo de DNS

Incubar al baño María a 90° C durante 5 minutos.

2) Enfriar los tubos en baño de agua-hielo.

3) Diluir 1mL de reacción con 8mL de agua destilada. Agitar en vortex.

4) Leer la absorbancia a 540nm contra blanco, utilizando como blanco el tubo con 0 g/l de glucosa

Los resultados se expresan en g/L (gramos equivalentes de glucosa por litro de medio de cultivo).

3.2.8.- Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante de las tres cepas de *P. ostreatus* cultivadas en medio líquido M7GY en estático y agitación.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se hizo bajo condiciones no desnaturalizantes con el fin de detectar las bandas de Lacasas. Los geles separador y concentrador se hicieron al 4 % y 10 % de acrilamida respectivamente (ver materiales, sección 3.1.3.). las soluciones de buffer fueron de 50 mM 1,0 M Tris (pH 8,8) para el gel separador y 1,0 M Tris (pH 6,8) para el gel concentrador; el gel empleado para realizar la corrida electroforética fue 25 mM Tris, 190 mM de glicina y pH 8.3. Una vez cargadas las muestras y el marcador de peso molecular en cada gel, se utilizó un voltaje de 100V durante 2 h hasta que el frente de corrida llega al final del gel. Inmediatamente, se quita el gel de los cristales y se realizan dos lavados en agitación con buffer acetato de sodio (pH 5), con el fin de generar las condiciones óptimas para poder detectar actividad Lac. Luego se quita el buffer y se añade 2,6 DMP hasta cubrir cada gel y se deja reposar durante unos 10 min. Pasado este tiempo, comienzan a aparecer bandas, indicando la presencia de actividad Lacasa.

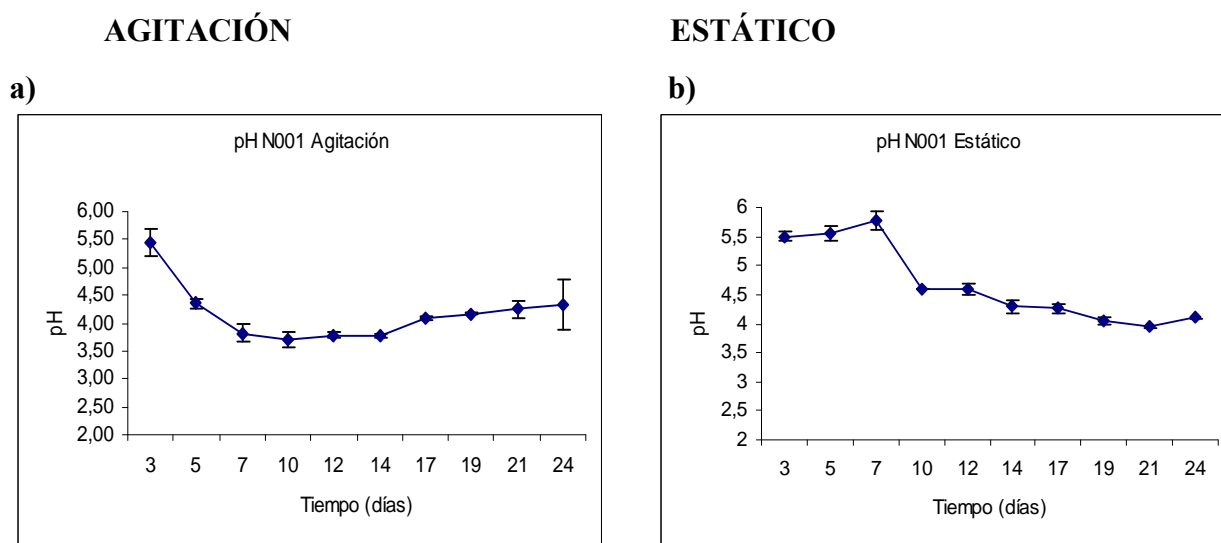
4.- RESULTADOS

4.1. - Determinación del pH del medio de cultivo líquido M7GY a diferentes tiempos durante el cultivo.

En las Fig X1, X2 y X3., se puede observar la variación en la medida del pH de las tres cepas en medio de cultivo líquido M7GY durante el tiempo evaluado (24 días) en las dos condiciones ensayadas: 1) agitación y 2) estático.

El valor del pH de la cepa N001 evaluada en las dos condiciones tiene algunas diferencias en los patrones obtenidos (Fig. X1 a y b). En la condición de agitación, el pH comienza con un valor de 5,45 y este valor disminuye un 30% al día 7 de cultivo (3,71), y luego este valor aumenta a 4,08 el día 17 y se mantiene prácticamente estable hasta el final del cultivo con. Cuando los cultivos de N001 se mantuvieron sin agitación (estático), los valores fueron algo diferentes (Fig X1 b). El valor del pH al día 3 de cultivo comienza en 5,5 y aumenta levemente hasta 5,8 al día 7 de cultivo. Al día 10 se produce un descenso en el valor de pH del 25 % (4,59) y se mantiene prácticamente constante, aunque con una tendencia ligeramente descendente, siendo el valor al final del cultivo de 4,13.

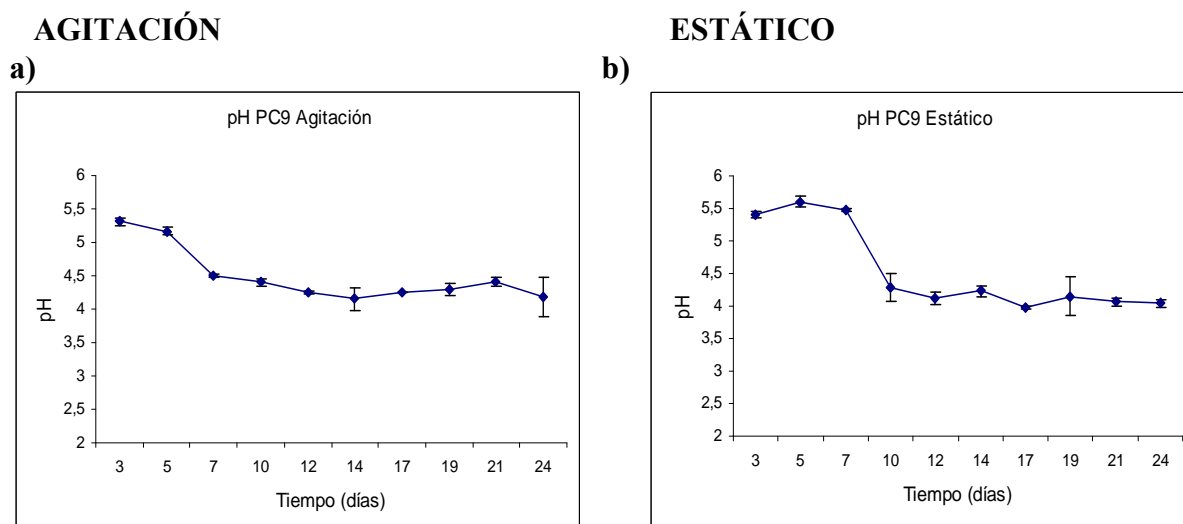
Fig. X1. Evolución de los valores de pH del medio de cultivo líquido M7GY inoculado con la cepa de *P. ostreatus* N001, mantenida en agitación y estático.



El valor del pH de PC9 evaluado en las dos condiciones muestra algunas diferencias en los patrones obtenidos como se puede observar en la Fig. X2 (a y b). En la condición de agitación (Fig X2 a), el pH medido al día 3 de cultivo es de 5,31, observándose una disminución del 15% de su valor al día 7 de cultivo (4,5). Luego, el valor se mantiene prácticamente constante, sin grandes variaciones hasta el final del cultivo.

El patrón de variación de pH obtenido para esta cepa cuando su cultivo fue realizado en estático es muy similar al obtenido para la cepa dicariótica N001 en la misma condición y mostrando diferencias en los valores de los primeros 7 días de cultivo. El valor de pH del día 3 de cultivo comienza en 5,41, éste valore se mantiene casi constante hasta el día 7 (5,47) y el día 10 de cultivo se produce un descenso del valor de pH de un 22%, disminuyendo hasta 4,28 y continúa hasta el final del cultivo (24 días).

Fig. X2. Evolución de los valores de pH del medio de cultivo líquido M7GY inoculado con el monocarionte PC 9, mantenida en agitación y estático.



El valor del pH de PC15 evaluado en las dos condiciones muestra algunas diferencias en los patrones obtenidos como se puede observar en la Fig. X3 (a y b).

En la condición de agitación (Fig X3 a), el pH medido al día 3 de cultivo es de 5,54, observándose una disminución del 25% de su valor al día 7 de cultivo (4,14). Luego, el valor se mantiene prácticamente constante, sin grandes variaciones hasta el día 21 de cultivo y al día 24 de cultivo sufre una subida del 43%, terminando con un valor de 5,46.

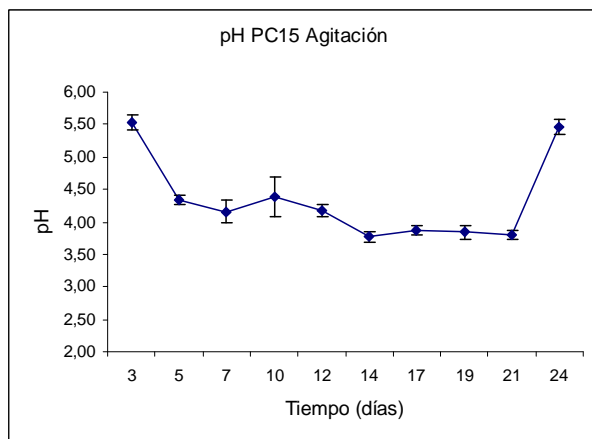
El patrón de variación de pH obtenido para esta cepa analizado en la condición de cultivo estático fue similar al obtenido para la cepa dicariótica N001 y para PC9 en la misma condición, aunque con un patrón diferente al comienzo del cultivo (entre el día 3 y 5).

El valor de pH al día 3 de cultivo comienza con un valor de 4,86, y hay un incremento del 17% al día 5 de cultivo (5,71) manteniéndose hasta el día 7 y luego desciende un 18 al día 10 (pH 4,33), manteniéndose constante hasta el final de cultivo (día 24).

Fig. X3. Evolución de los valores de pH del medio de cultivo líquido M7GY inoculado con el monocariote PC 15, mantenida en agitación y estático.

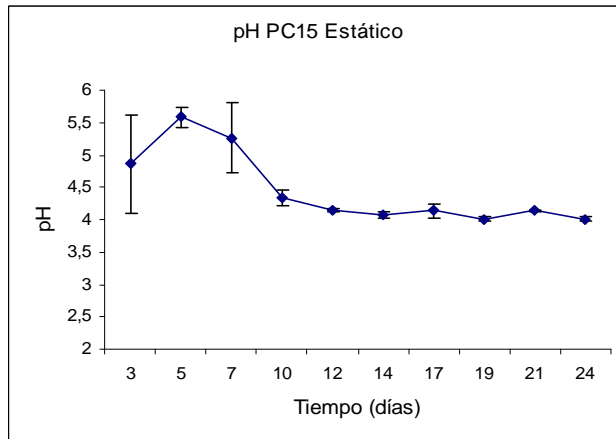
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



En resumen, el comportamiento es diferente en agitación (donde hay una caída inicial del pH desde que empieza el experimento) y en estático (donde el pH inicial se mantiene durante unos 7 días antes de comenzar el descenso).

El nivel final de pH es siempre en torno a 4,0, excepto en PC15, donde el valor el día 24 incrementa un 43% por razones desconocidas.

4.2.- Determinación de la biomasa de las tres cepas de *P. ostraetus* cultivadas en medio líquido M7GY mantenidas con y sin agitación durante 24 días

En las Fig X4, X5 y X6., se observan la variación de la biomasa fúngica de las tres cepas en medio de cultivo líquido M7GY a lo largo de 24 días de cultivo en las dos condiciones ensayadas: 1) agitación y 2) estático.

En la Fig X4 se muestra la cinética del crecimiento del micelio de la cepa N001 en función del tiempo, mostrando algunas diferencias en los patrones de las dos condiciones evaluadas (A y E). Cuando el cultivo se realiza en agitación, en los primeros 7 días de cultivo se produce la fase de crecimiento exponencial de la biomasa fúngica (tasa de crecimiento, $\mu = 0,54 \text{ días}^{-1}$), luego entra en la fase estacionaria, la cual se mantiene casi constante hasta el día 12 de cultivo, e inmediatamente la biomasa comienza a disminuir, indicando que comienza con la fase de muerte celular.

En este caso, la curva de crecimiento coincide con la de pH, entrando en fase estacionaria cuando el pH alcanza el valor mínimo.

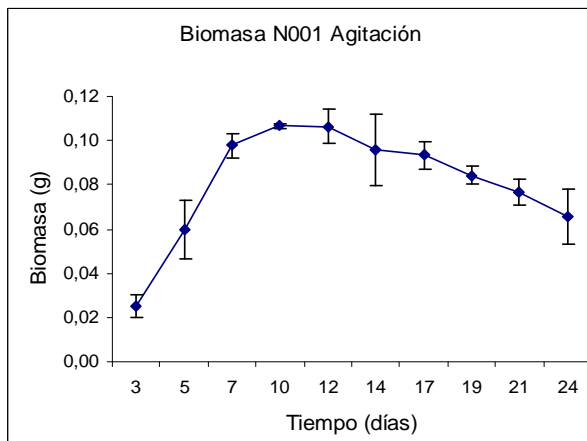
Cuando el cultivo se realiza en estático (Fig X4 b), el crecimiento de la biomasa es un poco más lento que en la condición de agitación, lo que queda demostrado con una fase de latencia más prolongada (los primeros 5 días de cultivo) y una fase de crecimiento exponencial de mayor duración (hasta el día 12 de cultivo) en esta fase, la tasa de crecimiento es de $0,50 \text{ días}^{-1}$. Inmediatamente después entra en una fase de crecimiento estacionario hasta el día 21 de cultivo e momento a partir del cual la biomasa comienza a disminuir, indicando que comienza con la fase de muerte celular.

En este caso, la biomasa alcanzada es de 3,6 g/L, algo menor que la alcanzada en agitación (4,5g/L)

Fig. X4. Determinación del crecimiento de la cepa de *P. ostreatus* N001 cultivada en medios líquido M7GY, mantenida en agitación y estático.

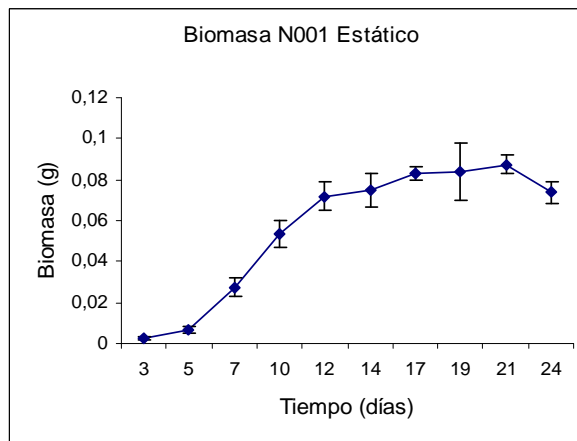
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



La cinética observada por la cepa de PC9 en las dos condiciones evaluadas se observa en la Fig X5 a y b. El patrón de crecimiento de esta cepa en la condición de agitación es similar al obtenido en esta condición en N001. En los primeros 12 días de cultivo, la biomasa fúngica se encuentra en la fase de crecimiento exponencial, con una tasa de crecimiento de $0,11 \text{ días}^{-1}$ (tasa mucho menos que la de N001 en cualquiera de las dos condiciones estudiadas), luego pasa a la fase estacionaria (entre los días 12 y 21 de cultivo) e inmediatamente después la biomasa comienza a experimentar una disminución debida a la muerte celular.

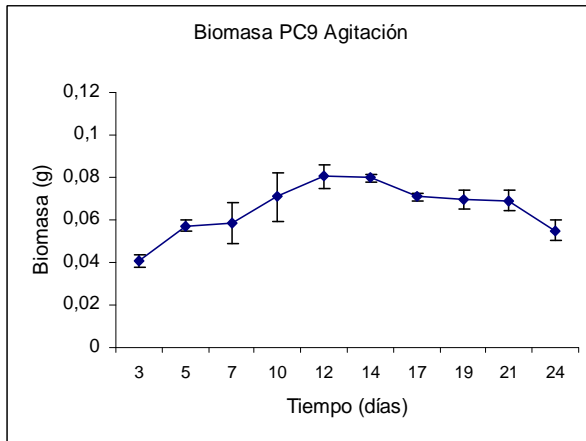
En el caso del ensayo mantenido sin agitación, se produce una fase de latencia hasta el día 5, después el cultivo entra en una fase de crecimiento exponencial, con una mayor tasa de crecimiento ($0,49 \text{ días}^{-1}$) pero de más corta duración (en este caso, la tasa de crecimiento es similar a la obtenida en N001). A partir del día 12, el cultivo permanece con una biomasa estable, sin llegar a producirse la muerte celular en los 24 días que dura el ensayo, los días 17 y 19 se observa un pequeño aumento, pero debido a la dispersión de estos puntos no se puede considerar un incremento de biomasa.

En ambas condiciones se alcanza el mismo máximo de biomasa, $3,6 \text{ g/L}$.

Fig. X5. . Determinación del crecimiento de la cepa de *P. ostreatus* PC9 cultivada en medios líquido M7GY, mantenida en agitación y estático

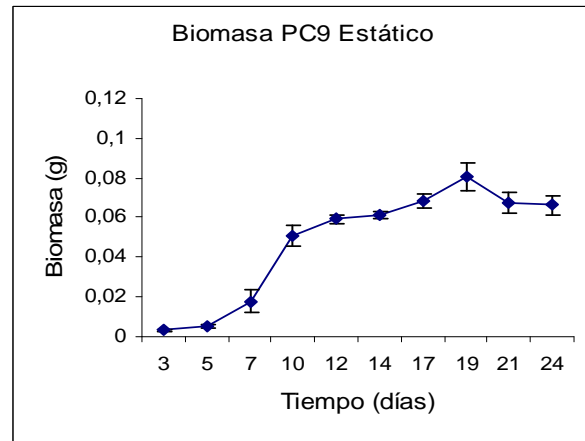
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



Por último, la evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa PC15 muestra un patrón similar al observado en la cepa dicariótica N001. Los valores obtenidos para la biomasa cuando los cultivos son mantenidos en agitación indican que la fase de crecimiento exponencial tiene una duración de 12 días, luego entra en una fase estacionaria donde los valores de biomasa permanecen constantes hasta el día 21 donde comienza a disminuir la cantidad de biomasa, indicando que comienza la fase de muerte celular.

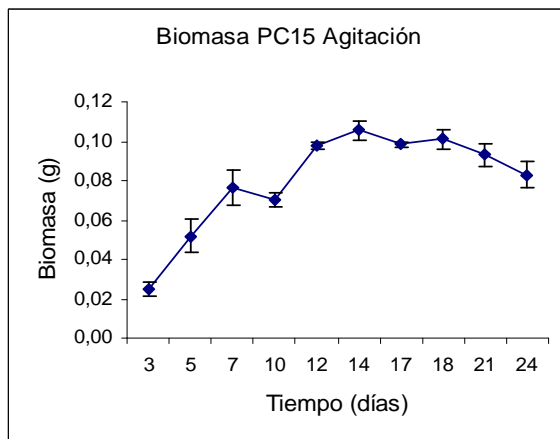
Cuando el cultivo se realizó sin agitación, los valores de biomasa obtenidos muestran un patrón de crecimiento diferente al determinado cuando PC15 está en agitación. Al igual que lo observado para N001, esta cepa comienza con una fase de latencia que dura 5 días y luego entra en fase de crecimiento exponencial hasta el día 12-14 de cultivo, luego los valores se mantienen más o menos constantes hasta el día 19 seguido de una disminución de la cantidad de biomasa. El aumento de biomasa obtenido al día 24 tiene una dispersión muy grande de los valores, por lo que no se puede decir que en este día hay un incremento de la misma.

En el caso de PC15, la tasa de crecimiento es mayor en estático ($0,35 \text{ días}^{-1}$) que en agitación ($0,21 \text{ días}^{-1}$), aunque la biomasa máxima es mayor en agitación ($4,5 \text{ g/L}$, $3,15 \text{ g/L}$ en estático), ya que la fase exponencial es más prolongada.

Fig. X6. . Determinación del crecimiento de la cepa de *P. ostreatus* PC 15 cultivada en medios líquido M7GY, mantenida en agitación y estático

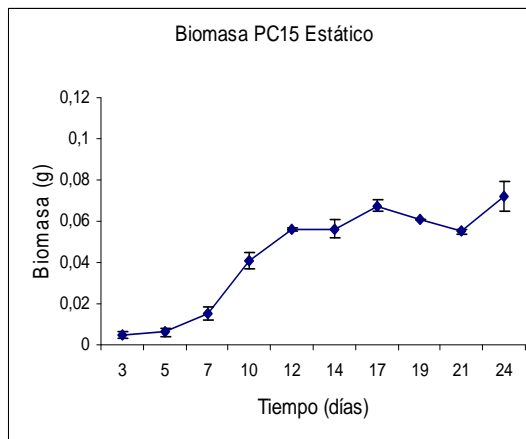
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



Cepas	μ (días ⁻¹)		Biomasa (g/L)	
	Agit.	Est.	Agit.	Est.
N001	0,54	0,5	4,5	3,6
PC9	0,11	0,49	3,6	3,6
PC15	0,21	0,35	4,5	3,15

De las tres cepas, quien mejor crece es N001, que funciona mejor en agitación. PC 15 también funciona mejor en agitación, al contrario que PC9, que crece mejor en estático.

En ambas condiciones la biomasa obtenida es prácticamente igual.

4.3.- Determinación del consumo de glucosa de las cepas de *P. ostreatus* en medio de cultivo líquido M7GY mantenido en estático y agitación

En las figuras X7, X8 y X9 se observan los valores obtenidos para la glucosa consumida a lo largo del ciclo de cultivo (24 días) por cada una de las cepas de *P. ostreatus* (N001, PC9 y PC 15) en medio líquido M7GY con y sin la adición del inductor (extracto acuoso de paja a de trigo) mantenidas en agitación y estático. La concentración inicial del medio de cultivo líquido M7GY es de 8,64 g/L. La Fig. X7 muestra el valor medio del consumo glucosa de la cepa N001 de las

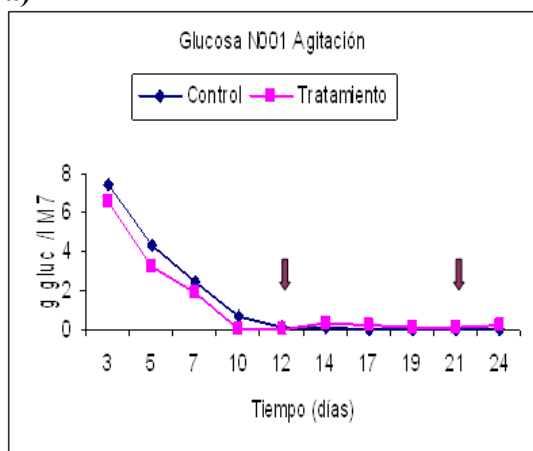
muestras controles (sin inductor) y de las muestras tratadas con el inductor (adición de 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo los días 12 y 21 de cultivo) en las dos condiciones (E y A) a lo largo del ciclo de cultivo (24 días). En las muestras mantenidas en agitación, la concentración de glucosa al día 3 de cultivo en las muestras controles (sin inductor) es de 7,4 g/L, y este valor va disminuyendo regularmente hasta el día 10 de cultivo hasta 0,65g/L. El consumo medio es de 0,80g glucosa por día. Al día 12 de cultivo, la glucosa es de 0,13 g/L y durante el resto de días se mantiene en ese valor hasta el final del cultivo (24 días). En las muestras tratadas (con el inductor), la concentración de glucosa al día 3 de cultivo es de 6,5 g/L, desciende hasta 0,04 g/L al día 10 de cultivo. Se observa un pequeño aumento en la concentración de glucosa al día 14 (0,3g/L) debido fundamentalmente por la adición del inductor, al día 12 de cultivo (3,5 g/L de glucosa en el extracto acuoso de paja de trigo). Este valor desciende el 19 y vuelve a haber un pequeño aumento el día 24 por la adición del inductor el día 21 de cultivo.

La cinética de consumo en estático y agitación es diferente. El aporte de glucosa por parte del inductor en el caso de los tratamientos, no representa una diferencia significativa.

Fig X7. Consumo de glucosa (g/L) por la cepa de *P. ostreatus* N001 en medio de cultivo líquido M7GY mantenido en estático y agitación durante los 24 días de cultivo.

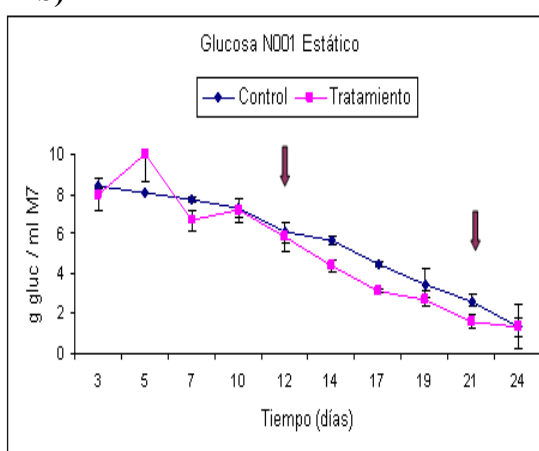
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



*Las flechas indican la adición de 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo como inductor.

La Fig X7 b, muestra el consumo de glucosa para la cepa N001 cultivada en medio M7GY sin agitación. La cantidad de glucosa presente en el medio M7GY, que al comenzar el cultivo era de 8,64 g/L, va descendiendo gradualmente, sin mostrar diferencias en los valores entre las muestras controles y tratadas. La concentración de glucosa va disminuyendo progresivamente hasta el final del cultivo alcanzando valores de 0,025g/L el día 24.

La media de consumo de glucosa sale 0,33/L de glucosa por día de cultivo en el caso del control y 0,32 g/L de glucosa por día en el caso de las muestras tratadas con el extracto de paja de trigo (inductor agregado el día 12 y 21 de cultivo). En el caso de las muestras mantenidas sin agitación, el consumo de glucosa muestra un consumo regular a lo largo del ciclo de cultivo, donde los valores medios obtenidos no descienden tan bruscamente como en el caso de los cultivos de N001 mantenidos en agitación. El consumo medio de glucosa en este caso es menor, 0,33g / día en los controles, y 0, 32 g/ día en los tratados con extracto de paja de trigo.

En la Fig X8 a y b se observa el patrón de consumo de glucosa de la cepa PC9 (controles y tratadas con inductor al día 12 y 21), mantenida en medio de cultivo líquido M7GY en las dos condiciones E y A durante 24 días de cultivo.

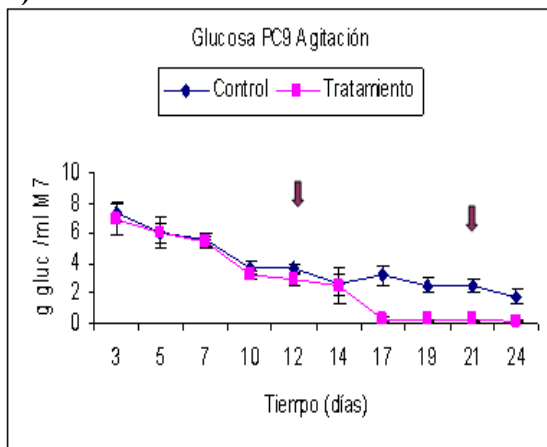
Cuando los cultivos de PC9 fueron mantenidos en agitación (Fig X8a), se puede observar que en las muestras controles la concentración de glucosa decae a 7,4g/L de glucosa a los 3 días de cultivo y este valor sigue disminuyendo hasta el día 10 alcanzando valores de 3,4 g/L, manteniendo los valores con pocas variaciones hasta el día 14 y luego disminuye hasta alcanzar al día 24 un valor de 1,83 g/L, tasa de consumo de 0,26 g/día. En las muestras del tratamiento la cantidad de glucosa al día 3 es de 6,9 g/L, y va descendiendo hasta agotarse el día 17 (consumo medio 0,44 g glucosa por día), después continúa con valores cercanos a 0 hasta el final del cultivo. En las muestras de PC9 mantenidas sin agitación se observa que al día 3 de cultivo la concentración de glucosa es de 8,8 g/L tanto en las muestras controles como las tratadas. La concentración de glucosa disminuye gradualmente hasta el día 12 de cultivo (antes de que se agregue el inductor en las muestras tratadas). A partir del día 14, en las muestras controles la concentración de glucosa continúa disminuyendo hasta alcanzar un valor de 4 g/L al final de cultivo. Mientras que en las muestras que fueron tratadas con el inductor, la concentración de glucosa decae a 3,5 g/L el día 17 de cultivo y luego se mantiene más o menos constante hasta obtener un valor de 1,5 g/L el día 24 de cultivo. La

tasa de consumo en el caso de los controles es de 0,22 g/día, y algo más elevada en los tratamientos, (0,34g /día).

Fig X8. Consumo de glucosa (g/L) por la cepa de *P. ostreatus* PC 9 en medio de cultivo líquido M7GY mantenido en estático y agitación durante los 24 días de cultivo.

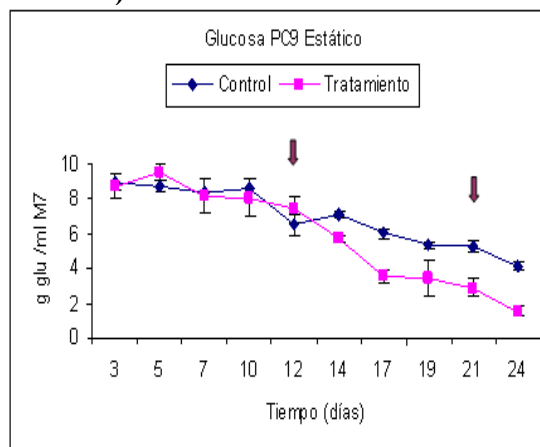
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



Las flechas indican la adición de 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo como inductor.

La Fig. X9 muestra el valor medio del consumo glucosa de la cepa PC15 de las muestras controles (sin inductor) y de las muestras tratadas con el inductor (extracto acuoso de paja de trigo agregado al día 12 y 21 de cultivo) en las dos condiciones (E y A) durante el cultivo (24 días). En las muestras mantenidas en agitación la concentración de glucosa en las muestras controles y tratadas, muestras un gran consumo de glucosa por esta cepa en los primeros 3 días de cultivo, alcanzando valores de 4,9 y 5,2 g/L, respectivamente. En cada una de las muestras se observa un descenso en la concentración de glucosa, llegando a valores muy bajos (0,06g/L en los controles y 0,026 g/L en las tratadas) al día 12 de cultivo. El consumo medio de glucosa por la cepa PC15 en esta condición fue de 0,55 g/L de glucosa por día. A partir del día 12 los valores son cercanos a cero, aunque las muestras tratadas muestran un leve incremento debido a que los días 12 y 21 se agrega el inductor.

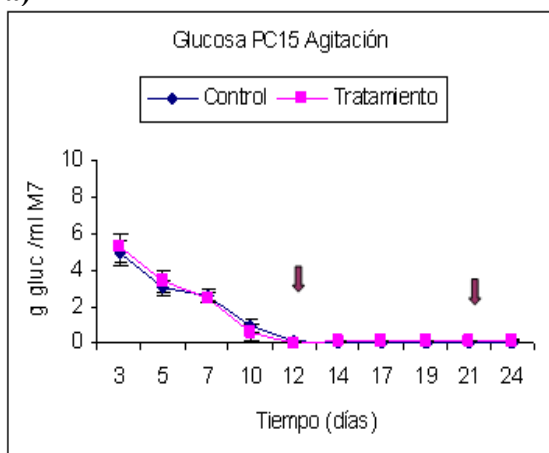
En las muestras de PC15 que fueron mantenidas sin agitación, se observa que al día 3 de cultivo las muestras de los dos tratamientos (control y tratamiento) alcanzan valores de 8 g/L de glucosa, indicando que en esta condición el consumo de glucosa en los primeros 3 días de cultivo es

algo menor que cuando las muestras son mantenidas en agitación. La glucosa se va consumiendo muy lentamente en ambas muestras hasta el día 19 de cultivo (6,5g/l), a partir de este día el consumo aumenta ligeramente, llegando alcanzando una concentración el día 24 de 4,5g/l glucosa. La tasa de consumo de glucosa de PC15 en estas condiciones es de 0,17 g/ día.

Fig X9. Consumo de glucosa (g/L) por la cepa de *P. ostreatus* PC15 en medio de cultivo líquido M7GY mantenido en estático y agitación durante los 24 días de cultivo.

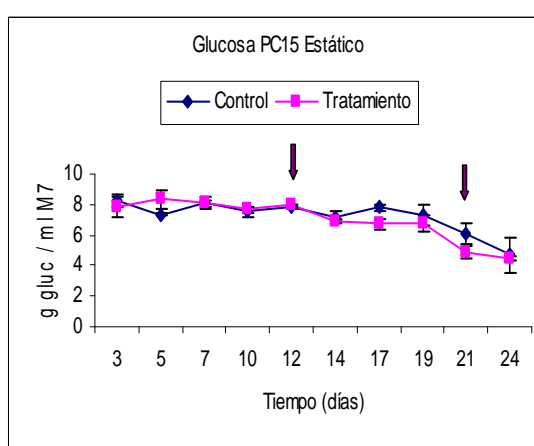
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



Las flechas indican la adición de 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo como inductor.

La cinética de en PC15 en agitación, se asemeja más a la de N001 agitación que a la de PC9 en las mismas condiciones, en cambio en el caso del ensayo sin agitación es completamente diferente.

4.4.- Determinación de la actividad de las enzimas ligninolíticas (Lac y MnP) de las cepas de *P. ostreatus* (N001, PC9 y PC15) en medio de cultivo líquido M7GY mantenidas en estático y agitación

Se determinó la actividad de las enzimas ligninolíticas (Lac y MnP) de los sobrenadantes de medio de cultivo líquido M7GY de las muestras controles y tratadas con el inductor de las tres cepas de *P. ostreatus* (N001, PC9 y PC15) durante 24 días de cultivo y en las dos condiciones ensayadas: estático y agitación.

4.4.1.- Determinación de la actividad lacasa de las cepas de *P. ostreatus* (N001, PC9 y PC15) en medio de cultivo líquido M7GY mantenidos en estático y agitación

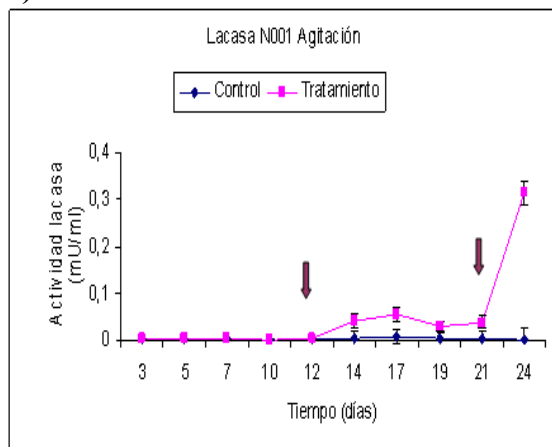
En las Fig X10, X11 y X12., se observa la cinética de la actividad lacasa obtenida para las tres cepas en medio de cultivo líquido M7GY durante 24 días, en las dos condiciones ensayadas: 1) agitación y 2) estático.

En la Fig X10 se observa la cinética de la actividad lacasa de las muestras controles y tratadas con inductor de la cepa N001 (en agitación y estático). Los primeros 12 días de cultivo no se observan diferencias significativas de la actividad lacasa entre las muestras controles y tratadas, obteniéndose valores de actividad muy bajos (Fig X10 a). A partir del día 12 de cultivo, se observan diferencias significativas en los valores de actividad entre las muestras (controles y tratadas) debido a la adición del inductor. Los valores de actividad lacasa en las muestras tratadas antes de agregar el inductor fue de 0,002 mU/mL y luego de 48 hs este valor experimenta un incremento (de 15 veces) en la actividad obteniendo un valor de 0,041 mU/mL. Los valores de actividad en las muestras tratadas siguen en aumento hasta el día 17 de cultivo, luego se mantienen más o menos constantes hasta el día 21 de cultivo (antes de la segunda inducción). A las 72 hs de la segunda inducción con el extracto acuoso de paja de trigo se observa un incremento mayor al experimentado en la primer inducción obteniendo un valor medio de actividad lacasa de 0,300 mU/mL. Los valores de actividad de las muestras controles se mantienen muy bajos con respecto a los obtenidos para el tratamiento con el inductor y sin grandes cambios hasta el final del cultivo.

Fig. X10. Cinética de la actividad lacasa de la cepa N001 en medio de cultivo líquido M7GY mantenidas en estático y agitación.

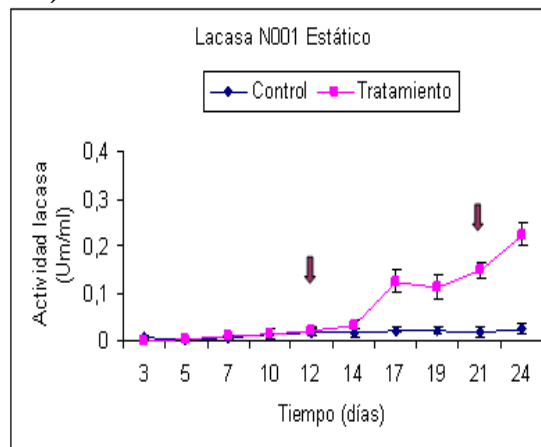
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



Las flechas indican la adición de 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo como inductor.

En la Fig X10 b, se observan los valores obtenidos de actividad lacasa para las muestras que fueron mantenidas sin agitación. Las muestras controles (sin tratar con el inductor) no experimentan incrementos importantes en los valores de actividad lacasa durante los 24 días de cultivo, manteniendo valores muy bajos de actividad (entre 0,001-0,010 mU/mL).

En el caso de las muestras tratadas, la actividad lacasa es muy baja al comienzo del cultivo, hasta el día de 12, antes de que se le adicione el inductor. A las 48 hs de haber añadido el inductor, se produce un incremento de la actividad lacasa llegando a valores de 0,125 mU/mL el día 17. Este valor se mantiene hasta el día 21 (antes de la segunda inducción), y luego de las 72 hs de haber sido inducido con el extracto, las muestras experimentan un gran aumento en la actividad lacasa llegando a valores de 0,223 mU/mL.

La cinética de actividad lacasa cuando se añade el inductor es algo diferente en las dos condiciones, mientras que en los cultivos en agitación, después de la primera inducción, los valores de actividad vuelven a descender hasta que se produce la segunda inducción, en los cultivos que se mantienen sin agitación, la actividad continúa subiendo, aumentando esta subida con la segunda inducción.

En la Fig X11 se observa la cinética de la actividad lacasa de las muestras controles y tratadas con inductor de la cepa PC9, obtenidas en agitación y estático. Los primeros 12 días de

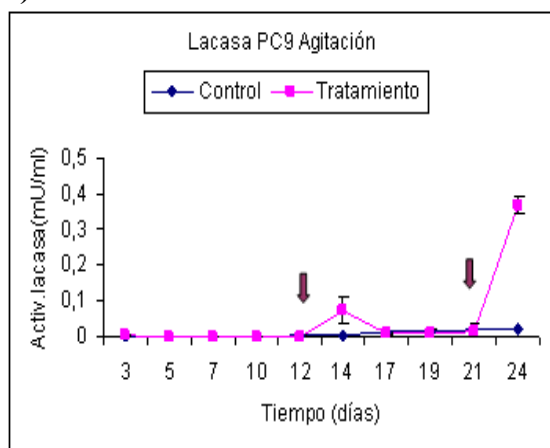
cultivo en el experimento que fue mantenido en agitación no se observan diferencias significativas de la actividad lacasa entre las muestras controles y tratadas, obteniéndose valores de actividad muy bajos (Fig X11a). A partir del día 12 de cultivo, las muestras tratadas con el inductor muestran un incremento de la actividad lacasa con respecto a las no tratadas. Este incremento se observa a las 48 hs de ser añadido el inductor, y la actividad enzimática alcanza un valor de 0,074 mU/mL y luego desciende al día 17 hasta obtener un valor de 0,010. El día 21 se realiza la segunda inducción y 72 hs después, las muestras tratadas experimentan un aumento en la actividad, esta vez mucho mayor (0,370 mU/mL al día 24 de cultivo) que el obtenido en la primera inducción de la actividad lacasa (al día 14), alcanzo un valor de 0,320 mU/mL.

Los valores de actividad lacasa obtenida en las muestras controles (sin tratar con el inductor), es muy baja durante los 24 días, con valores que van de 0,0014 a 0,014 mU/mL.

Fig. X11. Cinética de la actividad lacasa de la cepa PC9 en medio de cultivo líquido M7GY mantenidas en estático y agitación.

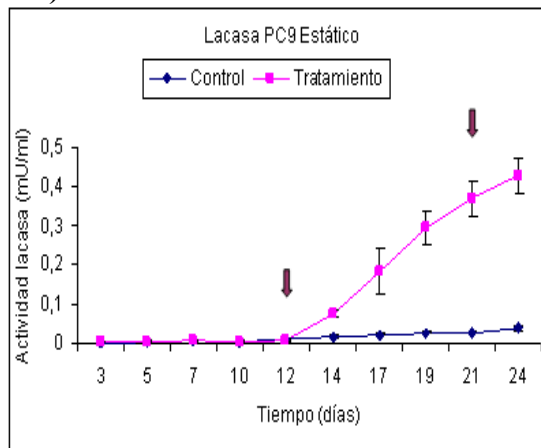
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



Las flechas indican la adición de 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo como inductor.

Cuando el experimento con PC9 se mantuvo en la condición estática, la cinética de la actividad de las muestras tratadas con el inductor muestra diferencias con respecto a las obtenidas cuando éstas se mantuvieron en agitación (Fig X11 b). En las muestras controles (sin inductor), la actividad lacasa obtenida es muy baja durante todo el cultivo (0,0001-0,003 mU/mL).

Mientras que en las muestras a las que se le añadió el extracto de paja de trigo (inductor) experimentaron un fuerte incremento en los valores de actividad enzimática. A las 48 horas de haber sido inducidas, las muestras tratadas tienen un valor promedio de actividad de 0,084 mU/mL. Este valor sigue en aumento hasta el día 19, alcanza un valor de 0,295 mU/mL, manteniéndose sin modificaciones hasta el día 21 de cultivo, en el que se vuelve a añadir inductor. A las 72 hs de haber añadido inductor por segunda vez, las muestras tratadas incrementan su actividad hasta alcanzar valores de 0,37 mU/mL.

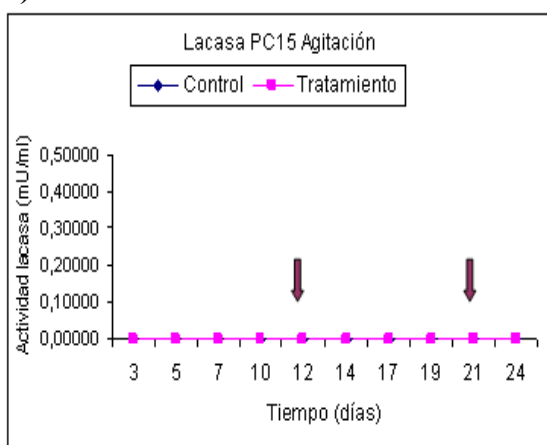
En la Fig X12 a y b, se observan los valores de actividad lacasa obtenidos para la cepa PC15 en las dos condiciones (E y A).

En la Fig X12 a, se muestra la cinética de la actividad lacasa obtenida en la condición de agitación. Los valores de actividad en los cultivos de PC15 control y tratados (adición del inductor al día 12 y 21 de cultivo), son muy bajos con respecto a los resultados obtenidos para las cepas N001 y PC9, y no se observa en ellos ningún patrón de inducción de la actividad al añadir el extracto. El mismo patrón se obtiene cuando los cultivos se realizaron en la condición estática. Las muestras inducidas con el extracto de paja de trigo a los 12 y 21 días de cultivo no experimentan una clara inducción de la actividad enzimática tal como fue observado para las cepas N001 y PC9.

Fig. X12. Cinética de la actividad lacasa de la cepa PC15 en medio de cultivo líquido M7GY mantenidas en estático y agitación.

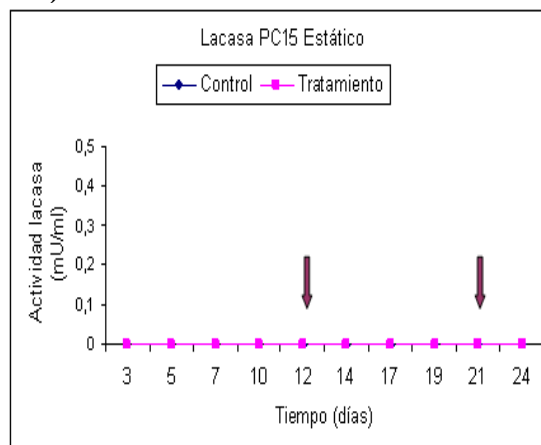
AGITACIÓN

a)



ESTÁTICO

b)



Las flechas indican la adición de 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo como inductor.

En resumen, se ve una clara inducción en N001 y PC9, con patrones distintos en las condiciones estático y agitación, sin embargo, no hay una inducción apreciable en PC15.

4.4.2.- Determinación de la actividad manganeso peroxidasa de las cepas de *P. ostreatus* (N001, PC9 y PC15) en medio de cultivo líquido M7GY mantenidos en estático y agitación

Se han medido los valores de la actividad manganeso peroxidasa medida en los sobrenadantes de cultivos de las tres cepas cultivadas en medio de cultivo líquido M7GY durante 24 días, y que fueron mantendias con y sin agitación.

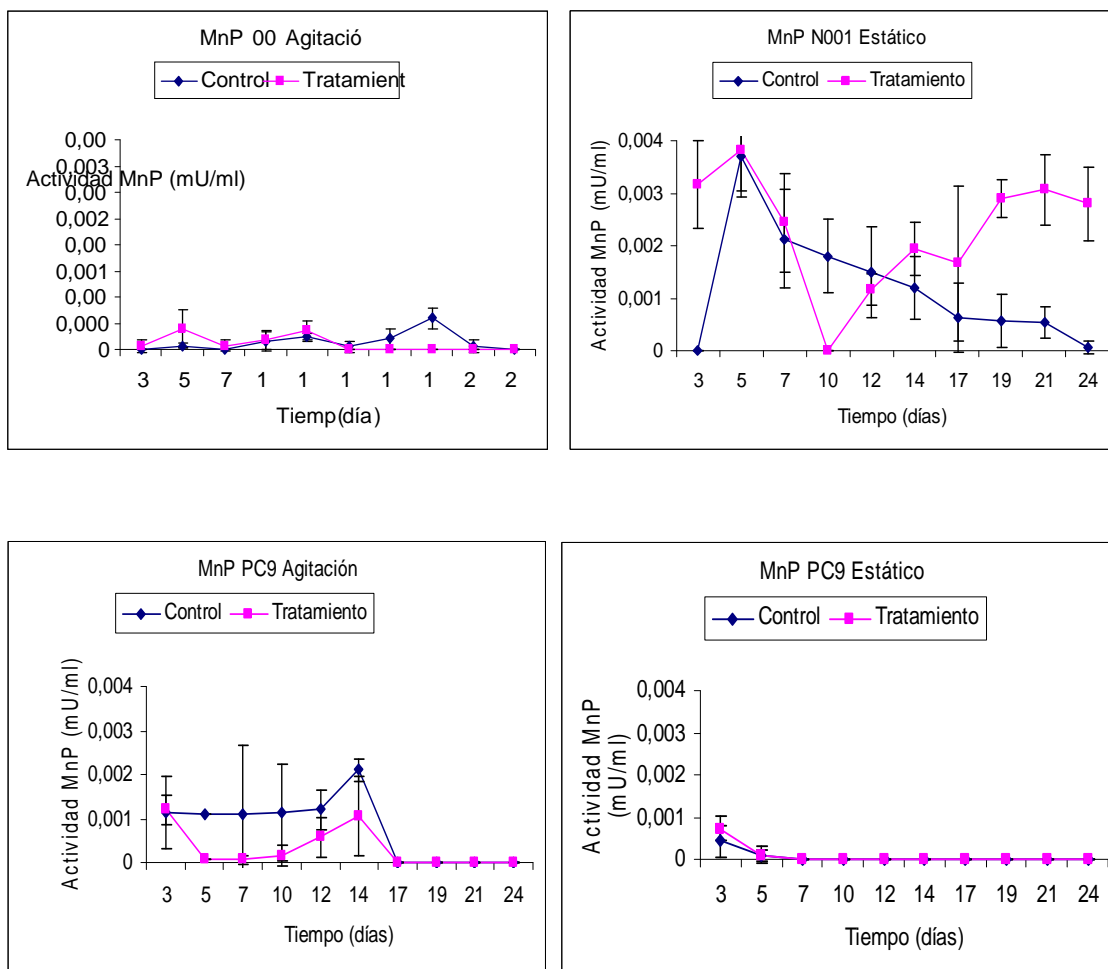
Los resultados obtenidos de la actividad de esta enzima en las tres cepas de *P. ostreatus* evaluadas en las dos condiciones, revelan valores de actividad muy bajos comparados con los obtenidos para la actividad lacasa medida en las mismas condiciones.

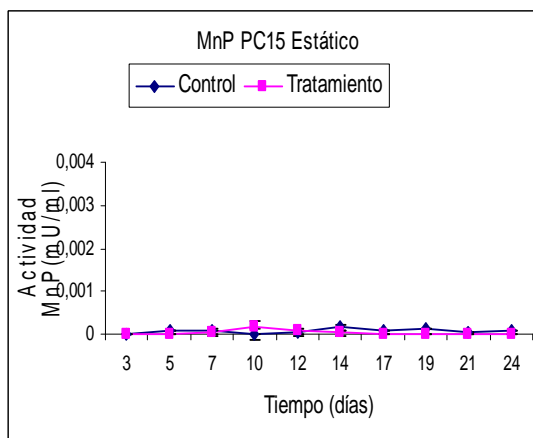
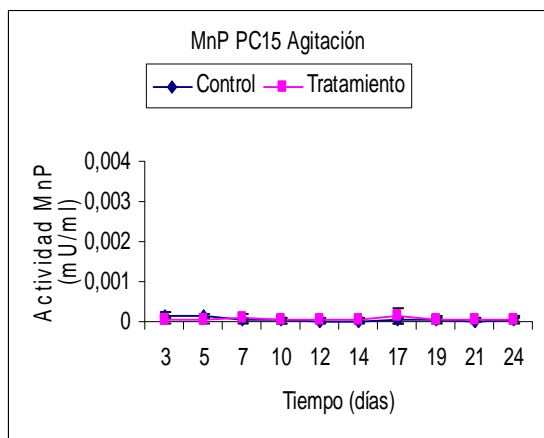
El la Tabla X1, se muestran los valores de actividad para la manganeso peroxidasa (mU/mL) medida en las cepas N001, PC9 y PC15, mantenidas en agitación. Los valores de actividad MnP en las muestras controles y tratadas con el inductor (al día 12 y 21 de cultivo) de la cepa N001 obtenidos fueron de un orden de magnitud menor que los obtenidas cuando el cultivo se realizó sin agitación. Las muestras que fueron inducidas (día 14 de cultivo), experimentan una inhibición de la actividad MnP (0 mU/mL), mientras que en las muestras controles (sin inductor), la actividad se mantiene, alcanzando el máximo el día 19 y luego decae a cero al día 24. Por otra parte, en las muestras tratadas con inductor, la segunda induccion que se realiza el día 21 no tiene ningún efecto sobre la actividad de la manganse peroxidasa. Sin embargo, cuando el cultivo se realizó sin agitación, los valores de actividad MnP en las muestras controles tienden a disminuir en el tiempo. Mientras que en las muestras tratadas con el inductor, mantienen los valores de acticidad observándose un leve incremento luego del día 19 y se mantiene hasta el dia 24 de cultivo.

Los valores de actividad manganeso peroxidasa detectados para la cepa PC9 en agitación, son muy bajos en las muestras controles y tratadas y luego del día 14 de cultivo ya no se detecta actividad. Las muestras tratadas con el inductor al día 12 y 21 no muestran un incremento de la actividad. Cuando esta cepa se cultivó sin agitación, sólo se detectaron valores de actividad MnP muy bajos, en los primeros 5 días de cultivo y luego desaparece.

Por último, los valores de actividad manganeso peroxidasa obtenidos en los cultivos de la cepa PC15 son bajos en las dos condiciones ensayadas. Cuando el cultivo se realizó en agitación, las muestras tratadas mantuvieron valores bajos durante todo el experimento, mientras que en las controles sólo se detectó actividad al comienzo del cultivo. Los valores detectados en las muestras que se mantuvieron sin agitación fueron más bajos y por lo general no se detectó actividad MnP.

Fig X13. Cinética de la actividad Manganeso peroxidasa de las cepas N001, PC9 y PC15 en medio de cultivo líquido M7GY mantenidas en estático y agitación.





Se añadió a los cultivos 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo, sin observarse ningún tipo de inducción.

4.1.5.- Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante de las tres cepas de *P. ostreatus* cultivadas en medio líquido M7GY en estático y agitación.

Con el fin de identificar la o las enzimas lacasas responsables de la actividad enzimática obtenida en los extractos de las tres cepas de *P. ostreatus* utilizadas en este trabajo, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE (no desnaturizante) y comparadas con un marcador estándar de peso molecular (PM). En la Fig. X13 se observan los patrones de bandas obtenidos luego que los geles se hicieron reaccionar durante 10 min con 25 mL de DMP (10 mM) para detectar actividad lacasa en cada una de las cepas, en las dos condiciones (A y E) y tiempos (12, 14, 21 y 24 días) de cultivo evaluados. Como se puede observar en cada figura, se obtuvieron una o dos bandas de proteína (lacasa), que se corresponden con valores de PM 55,145 y 37,491 kD, aproximadamente.

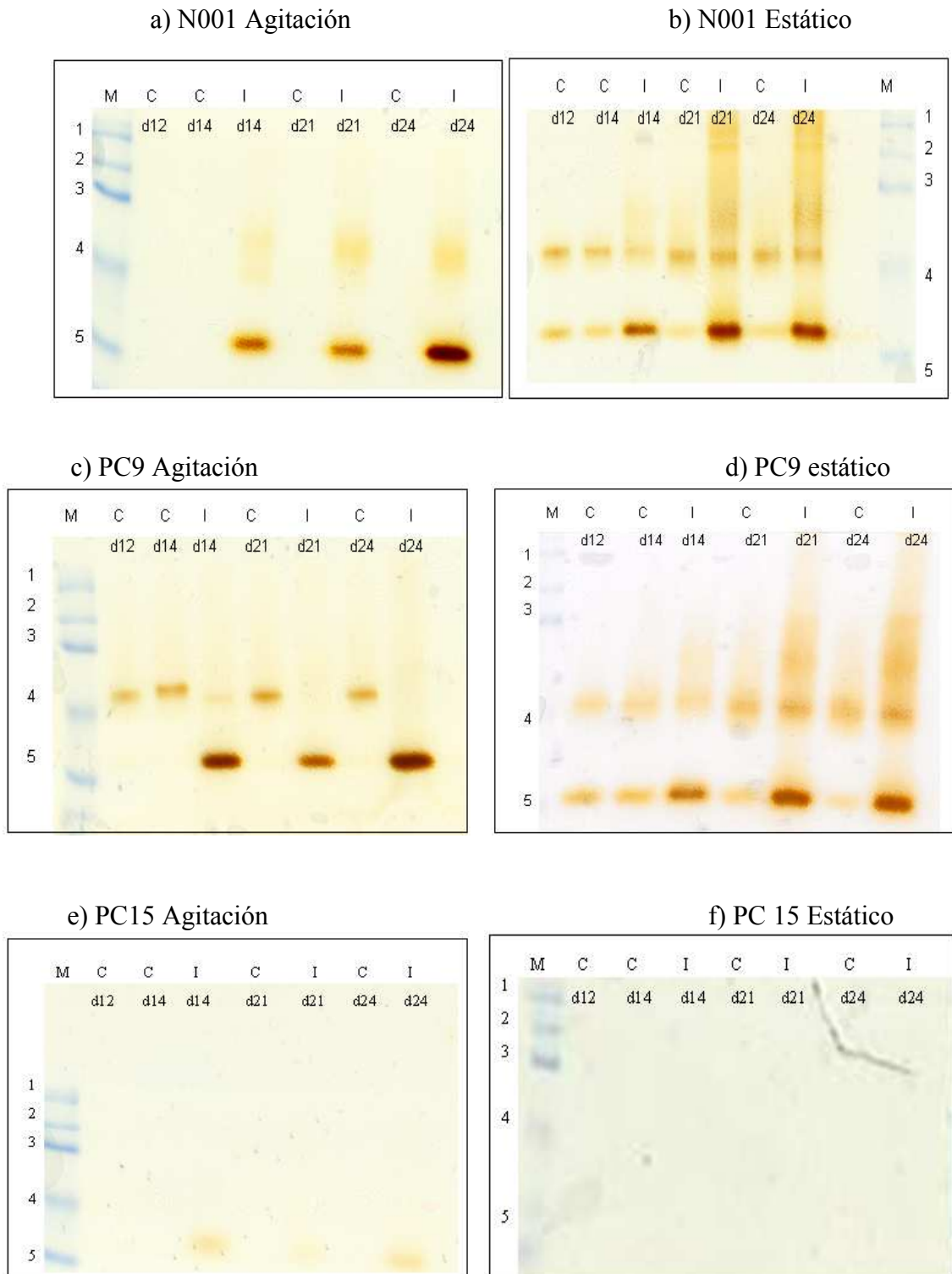
En la Fig X13 a y b, se muestra el efecto del inductor en las muestras de N001, como se puede observar se encontraron diferencias en el patrón de bandas de esta cepa en cada una de las condiciones (controles y tratadas con inductor) y tiempos evaluados. Cuando las muestras fueron cultivadas en agitación, sólo se observan bandas de actividad en las muestras tratadas, las cuales corresponden a lacasas que tienen un PM cercano a 55,145 y 37,491 kD. Es interesante mencionar que las lacasas presentes en las cepas de N001 tienen valores de PM entre 53-63 kD, y al realizar la inducción con el extracto acuoso de paja de trigo ha aparecido una nueva banda que se corresponde con una enzima que tendría con un peso aproximado de 37 kD. Cuando las muestras de N001 fueron cultivadas sin agitación, se encontraron bandas de actividad lacasa en las posiciones

correspondientes a valores de PM 55,145 y 37,491 kD, tanto en las muestras controles como las tratadas con el inductor. La diferencia radica en que al añadir el inductor las muestras poseen mayor intensidad de banda, la cual se corresponde con el incremento de actividad observado en cada una de ellas en los tiempos 14, 21 y 24 días.

En la Fig X13 c y d, se muestra el efecto del inductor en las muestras de PC9, observándose diferencias en el patrón de bandas de actividad en cada una de las condiciones (E y A). Cuando las muestras fueron cultivadas en agitación, a diferencia de lo que se observó para la cepa N001, hemos detectado bandas de actividad en las muestras controles y tratadas para las enzimas que con PM cercano a 55,145 y 37,491 kD. Es interesante mencionar que en las muestras controles se observa una banda de actividad correspondiente a un PM entre 55,145 kD, y al realizar la inducción con el extracto acuoso de paja de trigo aparece la banda que corresponde a una lacasa con un peso aproximado de 37,491 kD y sólo en las muestras de 14 días (48 hs luego de la inducción) aparece la banda correspondiente a 55,145 kD. Cuando las muestras de PC9 fueron cultivadas sin agitación, se encontraron bandas de actividad lacasa en las posiciones correspondientes a valores de PM de 55,145 y 37,491 kD, tanto en las muestras controles como las tratadas con el inductor, obteniéndose el mismo patrón de bandas que para la cepa N001. La diferencia radica en que al añadir el inductor las muestras poseen mayor intensidad de banda, la cual se corresponde al incremento de actividad observado en cada una de ellas a los tiempos 14, 21 y 24 días.

En la Fig X13 e y f, se muestra el efecto del inductor en las muestras de PC15, observándose diferencias en el patrón de bandas de actividad en cada una de las condiciones (E y A) y con los patrones obtenidos para N001 y PC9. Sólo fue posible encontrar bandas de actividad lacasa que se corresponde con un peso aproximado de 37,491 kD en las muestras inducidas correspondientes a los días 14, 21 y 24 de cultivo. Al realizar la inducción con el extracto acuoso de paja de trigo aparece la banda que corresponde a una lacasa con un peso aproximado de 37 kD con una muy baja intensidad lo que se corresponde con la baja actividad detectada para esta cepa. Cuando las muestras de PC15 fueron cultivadas sin agitación, no fue posible detectar bandas de actividad de las muestras controles y tratadas con el inductor.

Fig X13. Zimograma de las isoenzimas de lacasa derivadas de las muestras de las tres cepas en ausencia (día 12 y 21) y presencia del inductor (día 14 y 24) y en las dos condiciones (E y A).

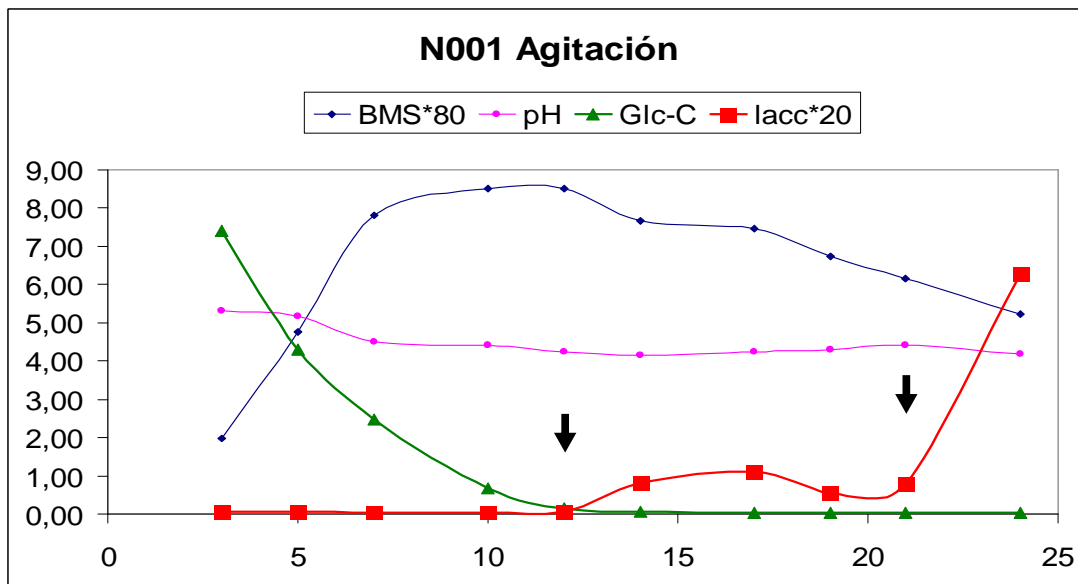


C: muestra control; I: muestra inducida; M: macador de peso molecular: Peso molecular: 1) 209,998; 2) 117,068; 3) 97,834; 4) 55,145; 5) 37,491

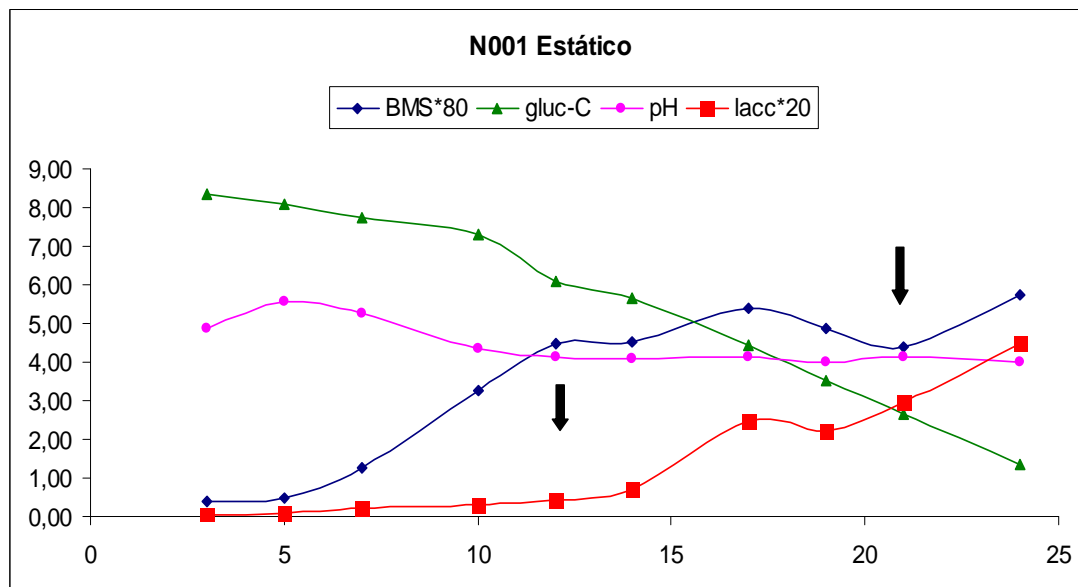
*Comparativa de los parámetros de cultivo (pH, biomasa y consumo de glucosa), así como de la actividad lacasa de los cultivos inducidos con extracto acuoso de paja de trigo de las cepas N001, PC9 y PC15 en medio M7GY. Todo ello en condiciones con y sin agitación.

Fig. C1

A)



B)

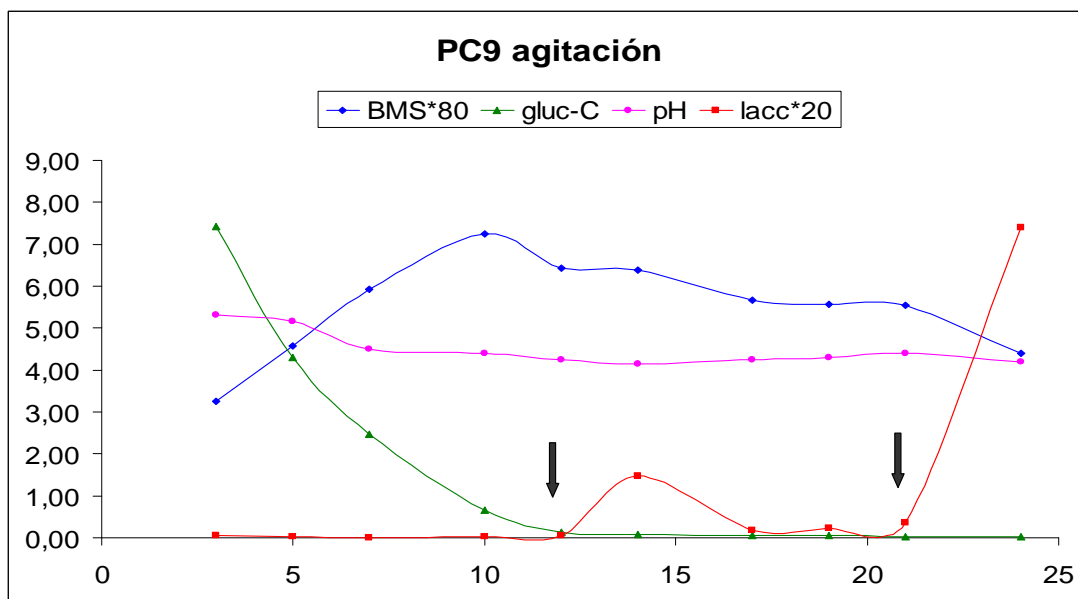


En las figuras C1, se comparan los parámetros de cultivo de N001, en las condiciones agitación y estático.

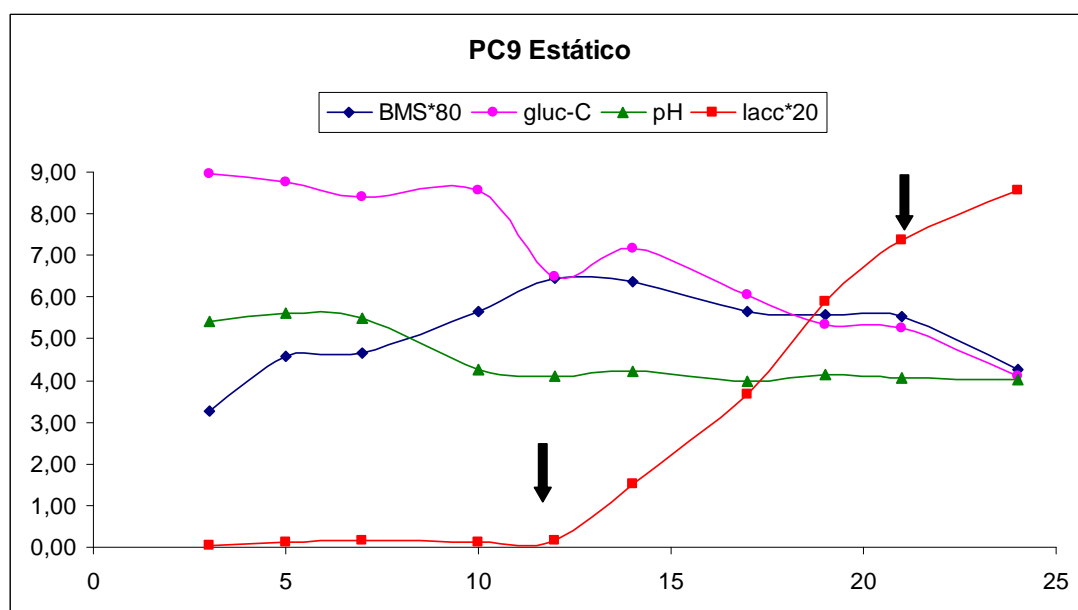
En los ensayos realizados en agitación, destaca que cuando se produce el agotamiento de la glucosa en el medio, comienza la muerte celular en el cultivo. Esto no se produce en agitación, ya que no se llega a agotar la glucosa.

Según el comportamiento que has seguido estos cultivos, hacia el día 7 se produce una parada en el descenso del pH, y a partir de ese momento se mantiene con pocas variaciones. Este momento coincide con un cambio en la fase de crecimiento en las dos condiciones, comenzando la fase estacionaria en el caso del cultivo en agitación, y el crecimiento exponencial en estático.

Fig. C2 A)



B)



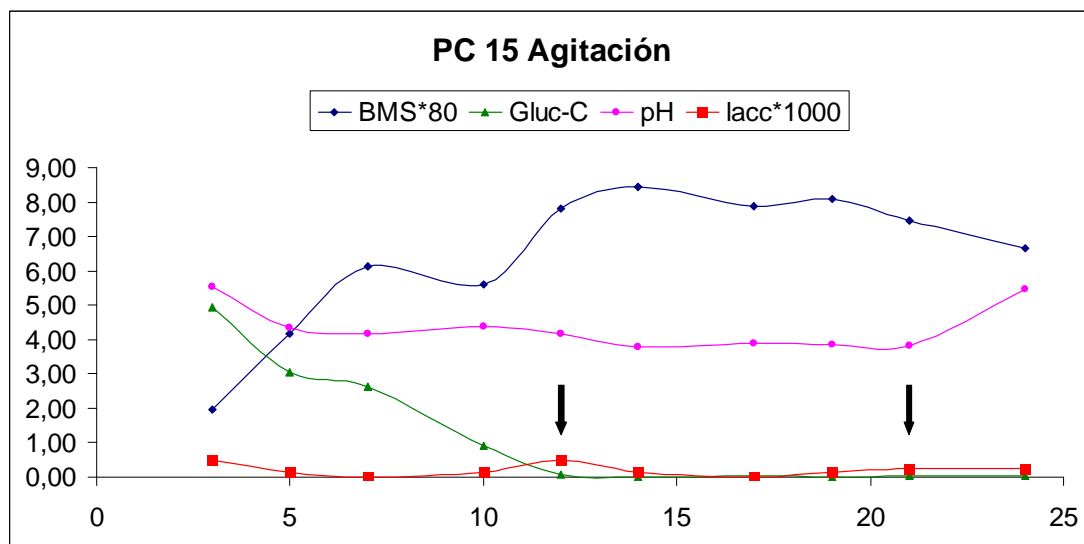
La figura C2 representa las condiciones de cultivo y la actividad lacasa de la cepa PC9 en condiciones de agitación (A), y no agitación (B).

En la condición de agitación al acabarse la glucosa el día 12 de cultivo, este comienza su fase de muerte celular, sin agitación sin embargo, la glucosa no llega a agotarse, y comienza la muerte celular más tarde.

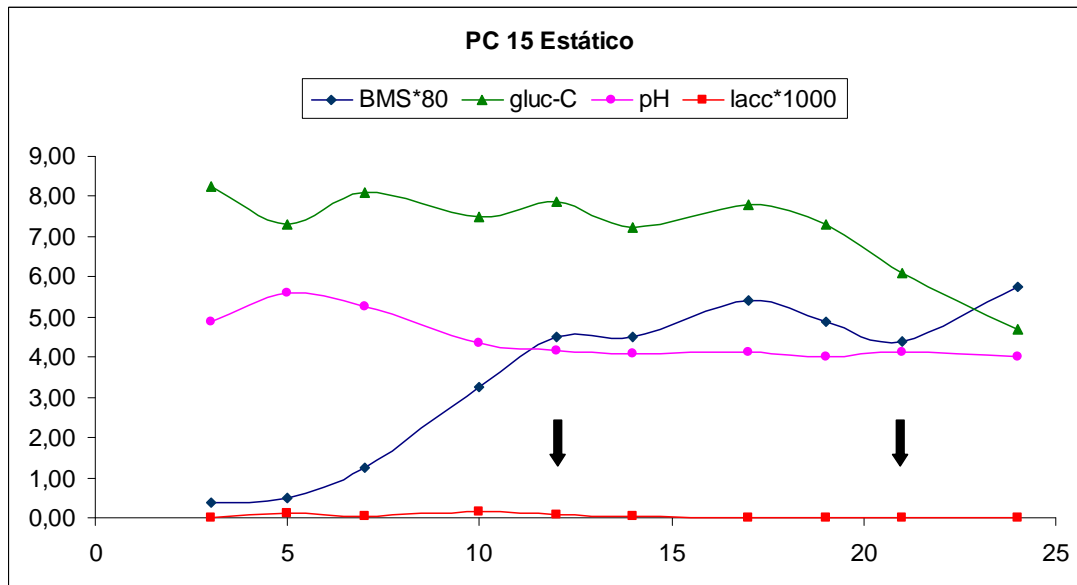
El pH en las dos condiciones se estabiliza en la última etapa del crecimiento exponencial.

Se produce un aumento de la actividad enzimática con la adición del inductor, en la condición de agitación esto coincide con el agotamiento de glucosa. El patrón de aumento de la actividad enzimática es diferente en las dos condiciones, en estático es gradual, mientras que en agitación baja, para volver a aumentar con la segunda inducción. Esto podría deberse a la diferencia de nutrientes, ya que en agitación se ha agotado la glucosa, mientras que en estático el medio sigue conteniendo glucosa.

Fig. C3 A)



B)



En los dos casos el pH se estabiliza en la misma fase de crecimiento, en la fase exponencial, al igual que lo hace PC9.

En agitación, al agotarse la glucosa el día 12 de cultivo, entra en fase estacionaria, en cambio en estático, al igual que las otras cepas, no llega a agotarse.

En la actividad lacasa, no se observa una gran inducción con la adición del extracto de paja, aunque en el caso de agitación si que se produce un leve incremento de la actividad.

5.-DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo han permitido avanzar en el conocimiento sobre el crecimiento y la producción de enzimas de la cepa dicariótica de *P. ostraetus* N001 y de los dos monocariontes PC9 y PC15 obtenidos de su de-dicariotización. Para ello se han evaluado la variación del pH de medio de cultivo líquido M7GY, la producción de biomasa y el consumo de glucosa del medio durante el ciclo de cultivo de 24 días en dos condiciones diferentes, con y sin agitación.

Los resultados obtenidos de la determinación del pH en las tres cepas indican que el pH del medio de cultivo tiene una disminución de su valor inicial de aproximadamente un punto, pasando de un valor inicial de 5,5 a 4,5. Este patrón de disminución se observó cuando las cepas fueron cultivadas con y sin agitación, con diferencias temporales en la caída del valor. Cuando los cultivos se mantuvieron en agitación, el descenso del valor del pH del medio se produce entre el día 5 y 7 de cultivo, mientras que en la condición sin agitación esta caída se produce principalmente entre el día 7 y 10 de cultivo. Moreira et al. (2009) y Matheus et al. (2003) han reportado reducciones en los valores del pH de medios de cultivos inoculados con *Lentinus crinitus* y *Psilocybe castanella*. Además han observado que si el pH inicial es ácido (2.5), durante el crecimiento de estos hongos, el valor del pH tiende a incrementarse hasta alcanzar el valor óptimo para su crecimiento y la reacción opuesta se ha descrito cuando el valor de pH inicial es básico. En general los hongos pueden crecer en un rango amplio de pH, con un valor óptimo generalmente situado entre 4 y 5 de la escala de pH, en la mayoría de las especies evaluadas, tal como se observó en nuestros resultados.

El patrón de crecimiento de la biomasa obtenido para cada una de las cepas de *P. ostraetus* en las condiciones evaluadas demostró que se pueden distinguir las tres fases principales del crecimiento microbiano: fase exponencial donde se produce un crecimiento activo debido a que el medio de cultivo le proporciona los nutrientes necesarios para su desarrollo; fase de latencia, ante el agotamiento de nutrientes en el medio o la acumulación de metabolitos tóxicos el crecimiento cesa por completo después de un periodo de decrecimiento en la tasa de crecimiento, y la fase de muerte celular, donde se produce un aumento progresivo de la tasa de mortalidad, número pequeño de sobrevivientes pueden persistir en cultivo debido a que las células consiguen crecer gracias a los nutrientes liberados por las células que mueren y se lisan.

Los patrones de crecimiento de la biomasa obtenidos para las tres cepas fue muy similar en cada condición evaluada, observándose una pequeña diferencia en la duración de la fase de crecimiento exponencial, la cual tuvo una duración un poco más prolongada cuando las cepas crecieron sin

agitación. Este hecho podría estar asociado a que el consumo de glucosa fue mucho mayor cuando las cepas crecieron en agitación, y que el agotamiento de nutrientes en el medio induce un cambio de metabolismo y un cese del crecimiento. Además, cuando los cultivos se realizaron sin agitación, el crecimiento del micelio es diferente al obtenido cuando los cultivos son agitados en un shaker orbital. En los cultivos sin agitación, el micelio se desarrolla sobre la superficie del medio de cultivo formando una capa densa de micelio, mientras que el micelio cultivado en agitación, lo hace formando *pellets* o acumulos de micelio (formando pequeñas bolitas de micelio) que se distribuyen en todo el medio homogéneamente y crecen de manera sumergida teniendo un mayor contacto con los componentes del medio. Teniendo en cuenta las diferencias observadas en el crecimiento de la biomasa y el contacto que tiene el micelio en cada una de las condiciones (estático y agitación) podríamos inferir que cuando los cultivos se realizan en agitación, el micelio tiene una fase de crecimiento exponencial más corta debido a que los *pellets* generados están homogéneamente distribuidos por el medio y esto le permite un mayor contacto y mejor aprovechamiento de los nutrientes.

Los resultados obtenidos del consumo de glucosa de estas cepas fue muy similar en cada condición evaluada (estático y agitación), observándose diferencias en el patrón de consumo, principalmente entre los cultivos realizados con o sin agitación. Los patrones obtenidos del consumo de glucosa por las tres cepas cuando se cultivaron en agitación, fueron muy similares. En todas se observó que la curva de decrecimiento de la glucosa coincide con el fin de la fase de crecimiento exponencial (entre los días 10 y 12 de cultivo). Mientras que cuando los cultivos de cada una de las cepas fueron realizados sin agitación, el consumo de glucosa fue mucho menor, mostrando un decrecimiento gradual durante el tiempo, sin llegar a agotarse totalmente la cantidad de glucosa en los medios de cultivo. La cepa PC15 cultivada sin agitación fue la que tuvo el menor consumo de glucosa durante los 24 días de cultivo, lo cual coincide con su tasa de crecimiento mucho más lenta y menor producción de biomasa con respecto a N001 y PC9. Con respecto al efecto producido por el inductor (extracto acuoso de paja de trigo añadido a los cultivos de las muestras del tratamiento al día 12 y 21 en cada una de las cepas, no se observaron diferencias en el consumo de glucosa de las muestras controles (sin inductor). Al realizar el experimento con el inductor (extracto de paja de trigo) no se ha evaluado el efecto que tiene agregar el inductor sobre el crecimiento del micelio en cada una de las cepas, por lo que es uno de los futuros ensayos a realizar en el grupo.

Se evaluó el efecto del inductor en la producción de lacasas de las tres cepas cultivadas en medio líquido M7GY con y sin agitación en la fase de crecimiento estacionaria. Los resultados

indicaron que la adición del inductor al medio de cultivo tuvo un efecto positivo principalmente en N001 y PC9 en las dos condiciones (E y A). Los valores de actividad lacasa obtenidos para la cepa de PC15 fueron muy bajos (0-0,0002 mU/mL) durante todo el ciclo de cultivo, no observándose ninguna inducción al añadirle al cultivo el extracto de paja de trigo. Sin embargo la actividad lacasa medida en los cultivos con PC9 y N001 mostró un patrón de inducción luego de 48 hs de haber añadido el inductor (día 14 de cultivo) el cual se mantuvo y incrementó los valores de actividad al realizar una segunda inducción (al día 21 de cultivo) con el mismo extracto, luego de 72 hs. Cuando los cultivos de la cepa N001 fueron mantenidos en agitación, luego de 48 hs de haber añadido el inductor (día 14) observamos un aumento de unas 15 veces de la actividad lacasa (hasta 0,07 mU/mL). Esta inducción se mantiene y luego de añadir por segunda vez el inductor, se produce un incremento superior en la actividad enzimática alcanzando un valor promedio de 0,3 mU/mL. En los cultivos de esta cepa mantenidos sin agitación, la primera inducción tuvo valores similares a los obtenidos cuando los cultivos se agitaron, con la diferencia que después de la primera inducción los valores de actividad lacasa no descienden, sino que continúan aumentando gradualmente hasta que se añade por segunda vez el inductor, alcanzando un valor de 0,22 mU/mL (al día 24). La cinética de la actividad lacasa determinada para la cepa de PC9 mostró diferencias en las dos condiciones (E y A). Cuando fue cultivada en agitación, se observó un incremento de actividad lacasa 48 hs después de haber añadido el inductor, luego ésta disminuye y 72 hs después de la segunda inducción vuelve a aumentar hasta alcanzar valores de 0,39 mU/mL. Mientras que sin agitación, la cinética obtenida es similar a la observada para N001. 48 hs luego de añadir el inductor se produce un incremento de la actividad, y ésta va aumentando gradualmente con el tiempo y luego de las 72 hs de la segunda inducción la actividad lacasa fue de 0,42 mU/mL.

Numerosas investigaciones se han realizado con el fin de incrementar la producción de lacasas en medio de cultivo líquido utilizando diferentes inductores, la mayoría de ellos compuestos aromáticos tales como el ácido gálico, 2,5 xilidina, ácido ferúlico, ácido cumárico (González, 2001) ácido p-metoxifenol, el guayacol (Márquez Ortega, 2004) entre los más utilizados. Nuestros resultados indicaron que el uso de extractos acuosos de paja de trigo tienen un efecto positivo en el incremento de la actividad lacasa. Este efecto podría estar vinculado a la composición química de estos extractos. Sun and Sun (2010) identifican los principales compuestos extraídos de paja de trigo utilizando varios métodos de extracción y reportaron que los principales compuestos identificados corresponden compuestos lipofílicos, entre ellos, ácidos grasos libres, esteroides, ceras, ésteres, triglicéridos, y compuestos no lipofílicos, entre ellos identifican compuestos fenólicos tales como ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vainíllinico, ácido benzoico, ácido cumárico, entre los más

importantes. Estos compuestos fenólicos se han utilizado en muchos trabajos (Sonden y Dobson, 2001; Eggert y col., 1996; Marbach et al., 1983) con el fin de obtener una inducción de actividad lacasa. Dado que aún no se han realizado las determinaciones de la composición de los extractos de la paja de trigo que hemos utilizado como inductor de la actividad sólo podemos inferir que el incremento que hemos obtenido podría estar asociado al efecto de uno o varios de los compuestos reportados anteriormente como componentes de la paja de trigo.

Los valores obtenidos para la manganeso peroxidasa, han dado resultados muy bajos de actividad, en muchas ocasiones ausencia total de actividad, tanto en los controles como en las muestras tratadas con el inductor. Catal et al. (2008) y Brown (1993) observaron la actividad MnP que cepas de *Bjerkandera adusta* (Willdenow) P. Karsten y *Phanerochaete chrysosporium* podría ser incrementada utilizando adicionando selenio al medio de cultivo o bien manteniendo el cultivo a una temperatura de 45°C durante un cierto tiempo.

Al comprobar la actividad lacasa por medio de geles de SDS-PAGE no desnaturizante hemos podido comprobar el patrón de izoenzimas de cada una de las cepas en las dos condiciones ensayadas. Los resultados obtenidos en las tres cepas indican la presencia de una banda de actividad enzimática que corresponde con enzimas que tienen un peso molecular cercano a 55 Kd, la cual se corresponde con los pesos moleculares de las lacasa identificadas para *P. ostreatus*. La banda de enzima correspondiente a un peso molecular de 55 Kd se visualiza principalmente en las muestras controles y tratadas con el inductor de N001 y PC9 que se mantuvieron sin agitación y en las muestras controles de estas dos cepas que se cultivaron en agitación. Mientras que la banda correspondiente a una lacasa 37 Kd se visualiza en las muestras controles y tratadas de la cepa N001 y PC9 cultivadas sin agitación, presentando mayor intensidad de banda en las muestras tratadas con el inductor, mientras que en las muestras que aparece en las muestras tratadas con inductor de las tres cepas evaluadas. Es interesante destacar que hasta el momento no ha sido reportado para *P. ostreatus* la presencia de una lacasa con peso molecular cercano a 37 Kd. De las 12 lacasas identificadas en esta especie, todas tienen PM entre 53 y 63 Kd, siendo este trabajo el inicio de futuras investigaciones para intentar identificar esta nueva enzima y poder conocer su función.

6.- CONCLUSIONES

- El pH óptimo del medio de cultivo de las tres cepas evaluadas es de 4.5
- El crecimiento de la biomasa de cada una de las cepas es influenciado por la agitación de los cultivos, disminuyendo el tiempo de crecimiento exponencial.
- El consumo de glucosa está asociado al desarrollo de la biomasa y es influenciado por la condición de cultivo. Cuando los medios se mantienen sin agitación el consumo de glucosa es menor.
- El extracto acuoso de paja de trigo tuvo un efecto positivo en la inducción de la actividad lacasa solamente en las cepas de N001 y PC9, aumentando la actividad después de ser añadido.
- Identificación de una nueva isoenzima con un peso molecular de 37 Kd, la cual es inducida por el extracto acuoso en las muestras en agitación y está presente en las muestras no tratadas y en con mayor intensidad en las tratadas con el inductor, cuando los cultivos se realizan sin agitación.

7-BIBLIOGRAFÍA.

- ALFARO SÁNCHEZ, M.. (2008) Tesis de master de biotecnología. “Puesta a punto de un método de medida de la actividad Lacasa segregada por monocariontes de *Pleurotus ostreatus* durante el proceso de pretratamiento biológico de lignocelulosa para la producción de bioetanol”
- BALAN, V. , DA COSTA SOUSA, L. SHISHIR P.S.CHUNDAWAT, RAMIN VISMEH, A.DANIEL JONES, BRUCE E. DALE (2007) Mushroom spent straw: a potencial substrate for an etanol-based biorefinery.
- BALDRIAN P & VALÁSKOVÁ V.(2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 501-521.
- BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PENTACLOROFENOL (PCF) POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA. OLGA RUBILAR ARANEDA. TEMUCO – CHILE 2007
- BOLLAG , J. AND LEONOWICZ, A. Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases
- BROWN, J, DAN LI, ALIC, M. ANDGOLD, M.H.(1993) Heat Shock Induction of Manganese Peroxidase Gene Transcription in *Phanerochaete chrysosporium*
- CAÑAS PORTILLA, A.I. (2009) Diseño de nuevos sistemas lacasa mediador : Empleo de mediaores de origen natural y mejora de lacasas por evolución dirigida.
- CATAL T., LIU H, BERMEK H. (2009) Selenium induces manganese-dependent peroxidase production by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* (Willdenow) P. Karsten.
- CHANG S T & PG MILES (1992) Mushroom biology: a new discipline. *The Mycologist* 6: 64-65.
- CHANG S T & PG (1989) Edible Mushrooms and Their Cultivation. Florida: CRS Press.
- COLL, P. M. ,FERNANDEZ-ABALOS, J.M. , VILLANUEVA, J.R. SANTAMARIA, R. AND PEREZ, P(1993) Purification and Characterization of a Phenoloxidase(Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete
- CULLEN, D. AND KERSTEN P. Fungal enzymes for lignocellulose degradation.

- CULLEN, D. AND KERSTEN P. (2004) Enzymology and mollecular biology of lignin degradation.
- ELISASHVILI, V , KACHLISHVILI E., KHardZIANI, T., AGATHOS, S.N. (2020) Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes
- ELISASHVILI, V. , KACHLISHVILI, E , TSIKLAURI, N. METREVELI, E. KHardZIANI, T. AGATHOS. S. N. (2008) Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia.
- FARAACO, V. GIARDINA, P. AND SANNIA, G (2003) Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters
- FERRI F. (1985) . I Funghi: Micologia, Isolamento, Coltivazione. Edagricole, Bologna, Italy, pp. 398.
- FONSECA, M. I. SHIMIZU, E. ZAPATA, P. D. VILLALBA, L. L. (2009) Laccase-producing ability and the inducing effect of copper on laccase production of White rot fungi native from Misiones (Argentina)
- MILLER , L. (1976) *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*
- SOLÍS –OBA, M. E. ABÁRZANA, M. GARCÍA-GARIBAY Y G. VINIEGRA-GONZÁLEZ. El ABTS+ agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato.
- GIARDINA, P. FARACO, V. PEZZELA, C. PISCITELLI, A. VANHULLE, S. SANNIA, G. (2009) Laccases: never-ending story.
- GONZALES RÍOS, L Papel de la lacasa, agentes reductores y sustancias quelantes de Fe⁺⁺ en la degradación de lignina por *Petriellidium fusoideum*.
- HAMMEL, K. E. AND CULLEN, D. (2008) Role of fugal peroxidases in biological lygninolysis.
- Identification and quantification of lipophilic extractives from wheat straw. 2010. Sun RC and Sun XF. *Industrial Crops and Products*, 14: 51-64.
- KACHLISHVILI, E. PENNINGX, M.J. TSIKLAURI, N. AND ELISASHVILI, V. (2005) Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*
- KERSTEN, P. CULLEN, D. (2006) Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*.

- MATHEUS RR, BONONI VLR, MACHADO KM, SILVA, RR AND RODRIGUEZ(2003). Growing Basidiomycetes in bioreactors to be applied to bioremediation of HCB in soil. Proceeding of Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium in Magar, VS and Kelley ME (Eds). In Situ and On Site Bioremediation, Battelle Press, Columbus, p. G-05.
- MANCILLA, R.. CANESSA, P. MANUBENS, A. AND VICUÑA R. (2010) Effect of manganese on the secretion of manganese-peroxidase by the basidiomycete eriporiopsis sub.
- MÁRQUEZ ORTEGA, A.E. (2004) “Determinación de patrones de inducción de lacasas en el hongo Trametes sp. EUM1”
- MIKIASHVILI, N. ELISASHVILI S., V. WASSER& E. NEVO (2005) Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of Trametes versicolor. Biotechnology Letters
- MOREIRA NETO SL.2009. Influence of pH on the growth , laccase activity and RBBR decolorization by tropical Basidiomycetes. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52: 1075-1082
- PÉREZ, G. ,PANGILINAN, J. , PISABARRO, A.G. AND RAMÍREZ, L. (2008), Telomere Organization in the Ligninolytic Basidiomycete Pleurotus ostreatus
- PALMIERI, G, GIARDINA,P BIANCO, C FONTANELLA,C AND SANNIA,G(1999) Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus Pleurotus ostreatus.
- RAMÍREZ, N. VARGAS, M. ARIZA, J.C., MARTÍNEZ,C (2003) Caracterización de lacasa por dos métodos de producción con Pleurotus ostreatus.
- RUBILAR ARANEDA, O (2007) Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca.
- SÁNCHEZ, O.J. Y CARDONA, C.A. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas.
- SÁNCHEZ,C. (2008) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi.
- SAPARRAT, M. ,GUILLÉN,F, ARAMBARRI, A.M. MARTÍNEZ, A.T. AND MARTÍNEZ, M.J. (2002)Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete Coriolopsis rigida
- SANTOYO, F. GONZÁLEZ, A.E. TERRÓN, M.C. RAMÍREZ, L. AND PISABARRO, A.G. Quantitative linkage zapping of lignin-degrading enzymatic activities in Pleurotus ostreatus.

- TANAKA, H. KOIKE, K. ITAKURA, S. ENOKI, A (2009) Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*.