



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales



**“Evaluación de la actividad enzimática de
Hericum erinaceus en residuos agroforestales”**

TESIS
que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable
presenta:

Gabriela De Vega Luttmann

Director: Dr. Oscar Arce Cervantes
Co-directora: Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

Asesores:
Dra. Josefa Espitia López
Dr. Sergio Hernández León

Tulancingo, Hgo., noviembre de 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Agropecuarias
School of Forestry and Environmental Studies

Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

ICAP-MCTAFS/003/2021

M en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE

Por este conducto se le comunica que el Comité Revisor asignado a la alumna **Gabriela de Vega Luttmann**, de la Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable, con número de cuenta **No. 227163**, que presenta el manuscrito de tesis titulado "**Evaluación de la actividad enzimática de *Hericium erinaceus* en residuos agroforestales**", ha autorizado la impresión del mismo.

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"

Tulancingo de Bravo, Hgo. al 10 de noviembre de 2021.

Dra. Eliazar Aquino Torres
Coordinadora de la Maestría en
Ciencias y Tecnología Agrícola y
Forestal Sustentable

Dr. Armando Peláez Acero
Director del ICAP



Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetz
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
Teléfono: +52 (771) 71 72000 ext 2461
pelaeza@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Evaluación de la actividad enzimática de *Hericium erinaceus* en residuos agroforestales", que desarrolla la estudiante Gabriela de Vega Luttmann

Asistentes:

Dr. Oscar Arce Cervantes

Dra. Jazmin Edith Méndez Hernández

Dra. Josefa Espitia López

Dr. Sergio Hernández León

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por Gabriela de Vega Luttmann, comunicando a la estudiante, realizó oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, 09 de Noviembre de 2021.

Dr. Oscar Arce Cervantes

Dra. Jazmin Edith Méndez Hernández

Dra. Josefa Espitia López

Dr. Sergio Hernández León



Handwritten signatures in blue ink over horizontal lines.



AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Por brindarme la oportunidad de llegar tan lejos, por darme la educación para abrir más puertas, por apoyarme siempre para culminar un objetivo.

A mi tía Vicenta de Vega, sin tu apoyo no habría llegado tan lejos. A mi madre, Christa Luttmann, tú sembraste la semillita de la curiosidad y siempre me has enseñado muchas cosas. A mi padre, Maximo de Vega, de ti aprendí que siempre debo trabajar duro. A mis hermanas, Christa, Lupita y Alicia, las admiro y aprecio infinitamente.

A mi novio, Jaciel, por darme tu amor, por tu paciencia y tus consejos, por estar conmigo aun cuando las cosas se ponen difíciles, por motivarme y darle color a mis días grises.

A mis enanitos, Maika y Sherpa, aunque no puedan leer esto, siempre están a mi lado.

Nunca podré agradecer lo suficiente por todo lo que han hecho por mí.

A mis amigas:

Gracias por su ayuda y su amistad todos estos años.

A Iridiam, tú siempre resuelves mis dudas y me sacas de apuros. Adriana, por tu apoyo en el laboratorio, y por compartirme tu sabiduría. Astrid, por ser mi hermanita de posgrado.

A mis maestros:

Por formar parte de este proceso, quienes me llevaron de la mano, quienes me acompañaron en mi formación y compartieron conmigo sus conocimientos.

Al Dr. Oscar Arce, por guiar mi camino, por dirigir esta tesis y por darme la oportunidad de seguir mis sueños. A la Dra. Josefa Espitia, por compartir conmigo no solo tu intelecto, sino también tu amistad. A la Dra. Jazmín Méndez y el Dr. Sergio Hernández, gracias por su ayuda y compromiso.

Gracias a ustedes he logrado culminar el desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:

Por la beca otorgada para el desarrollo del proyecto “Evaluación de la actividad enzimática de *Hericium erinaceus* en residuos agroforestales” CVU 101322.

ÍNDICE GENERAL

| | | |
|------|--|----|
| I. | Introducción..... | 1 |
| | Hongos basidiomicetos..... | 1 |
| | Enzimas fúngicas lignocelulolíticas..... | 1 |
| | <i>Hericium</i> | 2 |
| | Residuos agroforestales..... | 4 |
| | Aserrín de pino..... | 4 |
| | Cáscara de nuez..... | 6 |
| | Salvado de trigo..... | 7 |
| II. | Antecedentes..... | 8 |
| III. | Justificación..... | 13 |
| IV. | Objetivos..... | 14 |
| | Objetivo general..... | 14 |
| | Objetivos específicos..... | 14 |
| V. | Hipótesis..... | 15 |
| VI. | Material y métodos..... | 15 |
| | 1. Propagación y conservación de microorganismo..... | 15 |
| | 2. Identificación molecular..... | 15 |
| | 2.1 Extracción de DNA..... | 15 |
| | 2.2 Amplificación de las regiones ITS y del gen 5.8S rDNA..... | 16 |
| | 2.3 Secuenciación de DNA y comparación en base de datos..... | 17 |
| | 3. Obtención y conservación de residuos agroforestales..... | 18 |
| | 4. Velocidad de crecimiento..... | 18 |
| | 4.1 En medio de cultivo..... | 18 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2 | En medio combinados con residuos agroforestales | 19 |
| 5. | Producción de enzimas lignocelulolíticas | 19 |
| 5.1 | Cultivo en medio sólido | 19 |
| 5.2 | Obtención del extracto crudo enzimático | 20 |
| 5.3 | Evaluación de celulasas | 20 |
| 5.4 | Evaluación de xilanasas | 21 |
| 5.5 | Evaluación de lacasas | 21 |
| 6. | Análisis estadístico de los resultados | 22 |
| VII. | Resultados y discusión..... | 22 |
| 1. | Identificación molecular | 22 |
| 2. | Velocidad de crecimiento | 23 |
| 2.1 | En medio de cultivo..... | 23 |
| 2.2 | En medio combinado con residuos agroforestales | 23 |
| 3. | Producción de enzimas lignocelulolíticas | 24 |
| 3.1 | Producción de enzimas | 24 |
| 3.2 | Comportamiento enzimático en cada sustrato | 28 |
| VIII. | Conclusiones..... | 33 |
| IX. | Referencias | 35 |

GLOSARIO DE TÉRMINOS

PDA Agar papa dextrosa

SDA Agar dextrosa Sabouraud

EMA Agar extracto de malta

A Agar

AP Aserrín de pino

CN Cáscara de nuez

ST Salvado de trigo

A 100% Aserrín de pino

AC 80% Aserrín de pino y 20% cáscara de nuez

AS 80% Aserrín de pino y 20% salvado de trigo

ACS 80% Aserrín de pino con 10% salvado de trigo y 10% cáscara de nuez

CBHI Celobiohidrolasa I

CBHII Celobiohidrolasa II

EG Exoglucanasa

DNA Ácido desoxirribonucleico

rDNA Ácido desoxirribonucleico ribosomal

dNTP Desoxinucleosido trifosfato

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

NCBI National Center for Biotechnology Information

ECE Extracto crudo enzimático

CMC Carboximetilcelulosa

DNS Ácido 3,5-dinitrosalicílico

ABTS Ácido 2,2-azinobis(3-etilbencenzotiazolinasulfónico)

ANOVA Análisis de varianza

UI Unidades Internacionales de enzima

UI/gSS Unidades Internacionales por gramo de Sustrato Seco

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Hidrólisis enzimática de la celulosa. | 2 |
| Figura 2. <i>Hericiium erinaceus</i> en medio natural. | 3 |
| Figura 3. Desecho de aserrín de pino. | 5 |
| Figura 4. Desecho de la cáscara de nuez en Atotonilco el Grande, Hidalgo. | 6 |
| Figura 5. Tubos de reacción al día 7 después de la siembra..... | 25 |
| Figura 6. Análisis de componentes principales de la producción de enzimas..... | 26 |
| Figura 7. Prueba de Tukey con un α del 5% por tratamientos | 27 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Programa de termociclador para la PCR | 17 |
| Tabla 2. Resultados de la identificación de ambas cepas | 22 |
| Tabla 3. Crecimiento radial del micelio en medio de cultivo | 23 |
| Tabla 4. Crecimiento radial del micelio en medio combinado con sustrato | 24 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Comportamiento enzimático en sustrato de Aserrín..... | 28 |
| Gráfica 2. Comportamiento enzimático en sustrato Aserrín-Cáscara | 29 |
| Gráfica 3. Comportamiento enzimático en sustrato de Aserrín-Salvado..... | 30 |
| Gráfica 4. Comportamiento enzimático en sustrato de Aserrín-Cáscara-Salvado | 31 |

Resumen

La presente investigación muestra la evaluación de la actividad enzimática de *Hericiium erinaceus*, hongo comestible y medicinal, usando residuos de las industrias agrícola y forestal como sustrato para su aprovechamiento.

Los hongos basidiomicetos son degradadores de lignocelulosa, compuesto presente en la composición de los residuos agroforestales. El género *Hericiium* se distingue por su particular forma similar a una anémona, compacto o ramificado recubierto de espinas frágiles que crecen de manera descendente, y por presentar propiedades bioactivas sobre el sistema nervioso.

Cuando a un residuo se le asigna una aplicación alternativa se habla de una materia prima, en este caso un sustrato para fermentación fúngica. En esta investigación se utilizó aserrín de pino como sustrato base para el crecimiento del hongo, suplementado con cáscara de nuez y salvado de trigo.

Se trabajó inicialmente con dos cepas del género *Hericiium*, se identificaron, encontrándose 100% y 95% de identidad con la especie *Hericiium erinaceus*. Posteriormente se trabajó únicamente con la primera cepa.

La velocidad de crecimiento *in vitro* se evaluó usando agar papa dextrosa (PDA), agar dextrosa Sabouraud (SDA) y agar extracto de malta (EMA); el crecimiento en PDA fue más rápido (8.26 mm/día en PDA, 7.56 mm/día en SDA, 5.72 mm/día en EMA, a 25°C); y se utilizó agar combinado con sustratos molidos y tamizados a 0.5 mm por separado para determinar si los residuos eran aptos para la propagación *in vivo*; se encontró que los sustratos no impidieron el crecimiento del micelio, y presentaron una velocidad de crecimiento similar a la obtenida en el medio EMA.

El hongo se cultivó en sustrato sólido para la evaluación de enzimas. Se utilizaron mezclas de 100% aserrín de pino (A), 80% aserrín de pino y 20% salvado de trigo (AS), 80% aserrín de pino y 20% cáscara de nuez (AC), y 80% aserrín de pino con 10% salvado de trigo y 10% cáscara de nuez (ASC); se analizó la producción de enzimas celulasas, xilanasas y lacasas, y se observó una mayor producción de

ellas, de hasta 10 veces más, en los sustratos suplementados con salvado de trigo (AS y ASC).

Hericiium erinaceus puede ser producido en sustratos como el aserrín de pino, al ser suplementado con salvado de trigo.

Abstract

The current research shows the evaluation of the enzymatic activity of *Hericiium erinaceus*, an edible and medicinal fungus, using residues from the agricultural and forestry industries as a substrate for its use.

Basidiomycete fungi are degraders of lignocellulose, a compound present in the composition of agroforestry residues. The genus *Hericiium* is distinguished by its particular anemone-like shape, compact or branched, covered with fragile spines that grow downward, and by presenting bioactive properties on the nervous system.

When an alternative application is assigned to a residue, it is referred to as a raw material, in this case a substrate for fungal fermentation. In this research, pine sawdust was used as a base substrate for the growth of the fungus, supplemented with pecan nutshell and wheat bran.

We worked with two strains of the genus *Hericiium*, they were identified, finding 100% and 95% identity with the species *Hericiium erinaceus*. Later, only the first strain was used.

In vitro growth rate was evaluated using potato dextrose agar (PDA), Sabouraud dextrose agar (SDA) and malt extract agar (EMA); the growth in PDA was faster (8.26 mm/day in PDA, 7.56 mm/day in SDA, 5.72 mm/day in EMA, at 25°C); agar combined with ground substrates and sieved to 0.5 mm separately was used to determine if the residues are suitable for *in vivo* propagation; it was found that the substrates did not inhibit the growth of the mycelium, and presented a growth speed similar to that obtained in the EMA medium.

The fungus was grown on a solid substrate for the evaluation of enzymes. Mixtures of 100% pine sawdust (A), 80% pine sawdust and 20% wheat bran (AS), 80% pine sawdust and 20% walnut shell (AC), and 80% pine sawdust with 10% wheat bran and 10% pecan nutshell (ASC); The production of cellulase, xylanase and laccase enzymes was analyzed, and there is a higher production of them, up to 10 times more, in substrates supplemented with wheat bran (AS and ASC).

Hericium erinaceus can be produced on substrates such as pine sawdust, by being supplemented with wheat bran.

I. Introducción

Hongos basidiomicetos

Los hongos basidiomicetos son un grupo de gran importancia, pues gracias a su versatilidad participan en una gran variedad de procesos en la naturaleza. Existen especies comestibles que aportan nutrientes a la alimentación y especies con relevancia en la medicina por presentar compuestos con actividad contra una amplia gama de patologías clínicas como cáncer de mama, de colon, cervicouterino, de estómago, de próstata, de páncreas; trastornos del sistema inmune, diabetes, trastornos neurológicos, enfermedades cardiovasculares, infecciones virales y microbianas (Roupas *et al.*, 2012). En este grupo se encuentran los hongos de pudrición blanca, microorganismos con potencial para ser aplicaciones como biorremediadores de suelos y aguas contaminadas en las industrias textil y papelera, gracias a que son capaces de producir enzimas con actividad oxidativa contra una amplia variedad de sustancias tóxicas y recalcitrantes que les permiten degradar compuestos aromáticos y heterogéneos (Rojas, 2013).

Enzimas fúngicas lignocelulolíticas

Los principales polisacáridos que comprenden materiales lignocelulósicos incluyen celulosa y hemicelulosa. La hidrólisis enzimática de estos polisacáridos a azúcares solubles (y finalmente a monómeros como glucosa, xilosa y otras hexosas y pentosas) es catalizada por varias enzimas que actúan en conjunto. Por ejemplo, las endo-1,4- β -glucanasas y las exo-celobiohidrolasas catalizan la hidrólisis de la celulosa insoluble a celooligosacáridos (con celobiosa como producto principal), mientras que las β -glucosidasas convierten los oligosacáridos en glucosa (Figura 1, Cerda-Mejía, 2016). De forma similar, las xilanasas, junto con otras enzimas como las α -L-arabinofuranosidasas, las feruloil y acetilxilano esterasas y las β -xilosidasas, catalizan la hidrólisis de las hemicelulosas (Gusakov *et al.*, 2007).

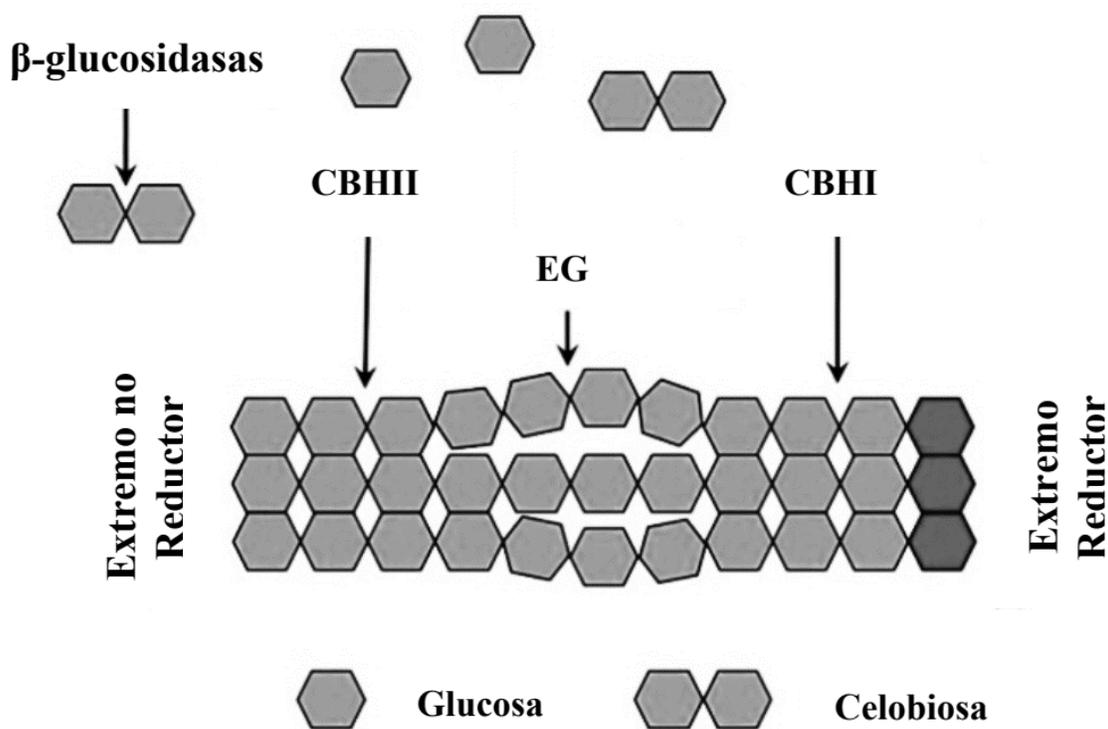


Figura 1. Hidrólisis enzimática de la celulosa (CBHI: celobiohidrolasa I, CBHII: celobiohidrolasa II, EG: exoglucanasa).

Los hongos de pudrición blanca son potentes agentes productores de enzimas lignocelulolíticas, por ejemplo, los géneros *Auricularia*, *Lentinus*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Schizophyllum* y *Trametes*, entre otros (Montoya *et al.*, 2010).

Hericium

El género *Hericium* taxonómicamente pertenece a la división *Basidiomycote*, clase *Hymenomycetes*, subclase *Homobasidiomycetes*, orden *Hericiales* y familia *Hericiaceae*. Todas las especies de *Hericium* producen basidiomata compuesta por espinas frágiles parecidas al hielo que crecen de manera descendente suspendidas de un marco de soporte ramificado o de un cojín de tejido resistente y no ramificado de hasta 40 cm de diámetro, generalmente de color blanco y se torna amarillo o marrón conforme envejece (Figura 2, Naturalista, 2021). Se consideran hongos comestibles y de sabor agradable. Se distribuye en China, Europa, Japón y Norteamérica. Se sabe que las especies de *Hericium* tienen una gran capacidad

saprotrofica y crecen en madera muerta o en proceso de descomposición de árboles de arce, haya, nogal, roble, sicomoro y otras especies de hoja ancha; el micelio y el cuerpo fructífero se desarrollan a temperaturas de entre 20 y 30°C, pero la temperatura óptima de varias especies de este género es de 25°C (Arora, 1986; Imtiaj *et al.*, 2008; Stamets, 2000; Xiao y Chapman, 1997).



Figura 2. *Hericium erinaceus* en medio natural.

Recibe diversos nombres, los más comunes son “Houtou” (cabeza de mono) en China, “Yamabushitake” (hongo del monje de la montaña) en Japón, “Lion’s mane” (melena de león), “Hedgehog mushroom” (hongo erizo) (Thongbai *et al.*, 2015), y “Pechuga de guajolote” en México (Itahi y Aguilar, 2019).

Se ha utilizado en Oriente como una medicina popular comestible para tratar diversas enfermedades humanas, y por lo tanto ha atraído una atención considerable por sus diversas sustancias bioactivas; se ha demostrado que los compuestos aislados de sus cuerpos fructíferos contienen actividades biológicas interesantes, como efectos citotóxicos en células cancerosas, estimuladores de la síntesis de un factor de crecimiento nervioso y actividades nematocidas y antimicrobianas (Ko *et al.*, 2005). Entre sus propiedades medicinales destaca que promueve la síntesis de factor de crecimiento nervioso, posee efecto regenerativo

en nervios periféricos después de una lesión por aplastamiento, restaura la disfunción sensorial después de una lesión en nervios periféricos, protege a las células nerviosas de la toxicidad por β -amiloide, y mejora el crecimiento de células nerviosas (He *et al.*, 2017).

Residuos agroforestales

Dentro de la cadena de producción se genera residuos o subproductos que no se aprovechan como materia prima posteriormente en el mismo proceso productivo (Rosas-Calleja *et al.*, 2016). El sector agroindustrial genera residuos que pueden ser definidos, según Saval (2012), como materiales obtenidos a partir del consumo directo o industrialización de productos, que se pueden aprovechar para obtener otro producto con valor económico, comercial o social.

La disposición de estos residuos agroindustriales supone un alto costo, lo que extiende el problema desde la parte ambiental hasta la económica (Milena-Yepes *et al.*, 2008). Por eso, la creación de tecnologías que utilicen dichos residuos como materia prima abre las puertas hacia un manejo de subproductos ambiental y económicamente adecuado (González-Álvarez, 2013; Saval, 2012).

Los residuos agroindustriales son materiales lignocelulósicos; es decir, su composición está principalmente constituida de celulosa, hemicelulosa y lignina (Alonso-Gutiérrez *et al.*, 2012; Saval, 2012); gracias a su variada composición química, presentan un alto potencial de aprovechamiento, y es posible obtener de ellos, materia prima óptima para utilizarse en diferentes procesos y diversos productos de interés ambiental, económico o social (Vargas-Corredor y Pérez-Pérez, 2018).

Aserrín de pino

Para el año 2000, se calculó que México procesaba anualmente poco más de 8 millones de metros cúbicos de madera, de la cual el 70% se destina a aserrío. El principal producto de desecho es el aserrín con una producción anual estimada de 2.80 millones de metros cúbicos. El aserrín es un subproducto estable y su acumulación representa un problema de contaminación ambiental, en partículas en

los suelos donde se deposita (Figura 3, Rain, 2016). Se ha encontrado que una capa de aserrín de 5 cm de espesor se descompone en 5 a 8 años. Aunque tiene ciertas aplicaciones en la producción de tabique, combustibles, cama para corrales y producción de papel de baja calidad, actualmente su uso es limitado (Reyes-Reyes *et al.*, 2005).

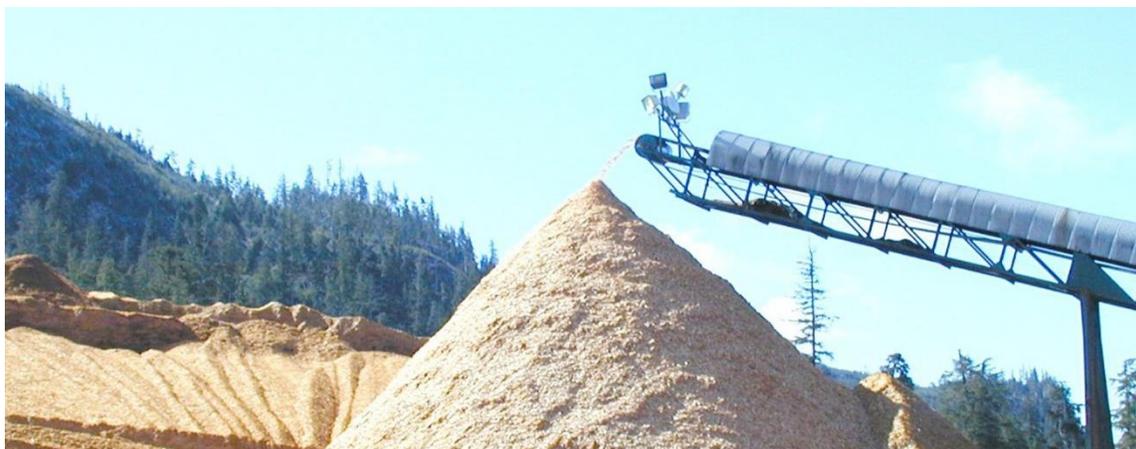


Figura 3. Desecho de aserrín de pino.

Aunque no existen datos concretos sobre la contaminación de los aserraderos, entre los impactos ambientales negativos se encuentra el arrastre a las corrientes de agua de lixiviados tóxicos, como el ácido tánico o taninos y material en partículas finas, además de las emisiones de gases con efecto invernadero por la descomposición anaerobia y la combustión (Balderrama-Castañeda *et al.*, 2011). Los residuos forestales del proceso del aserrío se regalan o se venden a precios mínimos, o se tira de forma clandestina para evitar su acumulación; no se utilizan por desconocimiento de tecnologías y falta de incentivos para su aprovechamiento (Guzmán-Silva *et al.*, 2007), a pesar de tener múltiples aplicaciones como sustrato en la agricultura o en producción forestal, complemento alimenticio para ganado, biocombustible, bioetanol, combustible sólido, pellets, briquetas, usos químicos, extractos fungicidas, antibióticos, insecticidas y antioxidantes, y uso como adhesivo (Fregoso-Madueño *et al.*, 2007). Su composición aproximada es de 15% hemicelulosa, 56% celulosa y 11% lignina (Mishra y Mohanty, 2018). En la combustión del aserrín de pino se ha observado que hasta un 80% de la masa se

pierde durante la pirólisis y la composición de los gases es de 38% CO, 25.4% H₂, 15% CH₄, 17.8% CO₂ y 3.8% de otros compuestos (Chen y Leung, 2003).

Cáscara de nuez

La cáscara de nuez es el residuo que se genera al pelar el fruto de la nuez pecanera *Carya illinoensis*. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), durante el año 2018 se obtuvo producción de 2,894 toneladas en el estado de Hidalgo (SIAP, 2019). La cáscara de nuez es escasamente usada para relleno de caminos y como abrasivo para metales, generalmente se acumula en terrenos en desuso o a pie de carretera (Figura 4).



Figura 4. Desecho de la cáscara de nuez en Atotonilco el Grande, Hidalgo.

La cáscara constituye del 45% a 50% del peso total del fruto, cuando queda expuesta a cielo abierto es un contaminante potencial. (Suárez-Jacobo *et al.*, 2016) Su composición es aproximadamente de 30% celulosa, 26% hemicelulosa, 41% lignina y 3% de otros compuestos (Hernández-Montoya *et al.*, 2011). Presenta 6.2%

de glucosa, 3.1% de xilosa, 1.2% de galactosa y 5.6% de celulosa, sin presencia de arabinosa y manosa (Antal *et al.*, 2000). Contiene aproximadamente de 4 a 5 veces más compuestos fitoquímicos que el fruto, que junto con su contenido mineral puede ser usada como posible materia prima en diversas aplicaciones agrícolas (Flores-Córdova y Sánchez-Chávez, 2016).

Salvado de trigo

El término salvado se refiere al pericarpio de un grano o cereal (Balandrán-Quintana *et al.*, 2015). El salvado de trigo es una fuente concentrada de fibra insoluble, en la alimentación proporciona beneficios para la salud en términos de prevención de enfermedades como el cáncer de colon y mama, enfermedades cardiovasculares, obesidad y enfermedades gastrointestinales (Stevenson *et al.*, 2012).

El trigo es un cereal originario del oeste de Asia que se cultiva desde hace más de 6,000 años. Actualmente constituye el cultivo más difundido en el mundo abarcando una superficie cosechada de 219 millones de ha/año, seguido por el maíz, el arroz y la soja. Estos cuatro cultivos cubren el 50% de la superficie cosechada mundial. Desde el punto de vista productivo, el trigo ocupa el cuarto lugar a nivel mundial luego de la caña de azúcar, el maíz y el arroz con cáscara. Si se analiza únicamente la producción que podría utilizarse como alimento humano (descontando la fracción no comestible), el trigo ocupa el segundo lugar luego del maíz. Sin embargo, como la mayor parte del maíz se utiliza como alimento forrajero, actualmente el trigo constituye el principal alimento humano (Abbate *et al.*, 2017). Se estimó que en 2018 México tuvo una producción estimada de 2.32 millones de toneladas de trigo cristalino y de 1.60 millones de toneladas de trigo harinero (SAGARPA, 2017).

El grano de trigo se compone de varios tejidos: el germen o embrión, es el órgano reproductivo y de almacenamiento y representa entre 2% y 3% del peso del grano; el endospermo, principal fuente de energía durante la germinación, es la parte anatómica más abundante (81% a 84% del peso del grano); el pericarpio (salvado) está constituido por un conjunto de capas que protegen al grano y comprende entre

14% y 16% del peso de este último (Corke, 2015). Solamente un 10% del salvado producido se destina a la alimentación humana, principalmente como fuente de fibra, y el resto se dirige a la alimentación animal. Entre los usos no convencionales propuestos para el salvado de trigo está su potencial como sustrato para la producción de hongos comestibles y como fuente de azúcares fermentables para procesos biotecnológicos como la producción de bioetanol, su capacidad para la remoción de metales pesados y su factibilidad como componente de empaques biodegradables. Su composición aproximada es de 6.5% a 9.9% de celulosa, 20.8% a 33% de hemicelulosa, 2.2% a 9% de lignina 5% a 26.9% de arabinosilanos (Chaquilla-Quilca *et al.*, 2018).

II. Antecedentes

En 2013, a lo largo del mundo el cultivo artificial de hongos comestibles y medicinales tuvo una producción total de 34.80 millones de toneladas, equivalente a 63 mil millones de dólares, con una producción aproximada de 22% de shiitake *Lentinula edodes*, 19% de setas *Pleurotus spp.*, 18% de *Auricularia spp.*, 15% de champiñón *Agaricus bisporus*, 11% de *Flamulina spp.*, 5 % de *Volvarella spp.*, y 10% de otras especies. Respecto a *Pleurotus spp.*, la producción se concentró principalmente en Asia: China con cerca de 87% del total mundial, Japón, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia, Vietnam e India, con 12%, y sumadas las producciones de Europa y las Américas solo alcanzaron el 1%. El consumo de hongos comestibles alcanzó 4.78 kg por persona al año (13.7 g diarios) en promedio (Royse y Sánchez, 2017).

México posee una larga trayectoria en el cultivo de los hongos comestibles, con datos que se remontan a la década de 1930 con la implementación del cultivo del champiñón *Agaricus bisporus*. En los años 70's se inició el cultivo de las setas *Pleurotus ostreatus*, y hacia el año 1984 se empezó a cultivar el hongo shiitake *Lentinula edodes* (Gaitán-Hernández, 2019).

En el año 2000 se estimó una producción hongos frescos de casi 30,000 toneladas a nivel nacional. La importancia ecológica de dicha producción radica en el aprovechamiento de más de 280,000 toneladas de subproductos agrícolas anuales, tales como pajas de trigo, cebada y sorgo; pulpa de café; bagazo de algodón, de caña de azúcar y agave tequilero; rastros de maíz, haba y frijol; fibra de coco; hojas, hojarasca y cáscaras de diversas plantas. En ese año se obtuvo una producción aproximada de 55 mil toneladas, aproximadamente 85% de champiñón, 10% de setas y menos del 1% de shiitake (Martínez-Carrera *et al.*, 2000).

En los últimos años la producción de hongos comestibles en México ha tenido un crecimiento significativo. De 1991 a 2011 la producción pasó de 9 mil a 62 mil toneladas de hongos frescos por año. México se posicionó como el mayor productor de hongos comestibles de Latinoamérica, al generar el 80% de la producción para la región, seguido por Brasil y Colombia. Entre las principales entidades productoras se encuentran Coahuila, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz. La actividad tiene una importancia ecológica por la utilización y reciclaje de más de 500 mil toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (FORDECYT, 2016).

El cultivo y producción de hongos destaca la relevancia de los residuos generados de los sectores agrícola, agroindustrial y forestal como parte de un proceso biotecnológico. Estos compuestos son empleados como materia prima para procesos de fermentación sólida utilizando organismos basidiomicetos superiores. Varios hongos de esta división son aprovechables para la producción de alimento, piensos, enzimas, compuestos medicinales, y se usan en procesos de biorremediación (Philippoussis, 2009).

En muchos países, diversos subproductos agroindustriales generalmente se eliminan como desechos, los cuales pueden generar problemas ambientales, económicos y sanitarios. La bioconversión de estos residuos con hongos colabora

en la disminución del impacto ambiental, representa una fuente económica y da lugar a nuevos empleos (Israilide y Philippoussis, 2003).

La biomasa vegetal presenta grandes cantidades de carbohidratos que proporcionan una fuente abundante de energía en forma de azúcares que pueden ser utilizados para numerosos procesos industriales y agrícolas. Sin embargo, el enorme potencial energético de estos carbohidratos está desaprovechado actualmente porque los azúcares están encerrados en polímeros complejos y, por lo tanto, no son fácilmente accesibles para la fermentación. Estos polímeros complejos a menudo se denominan colectivamente lignocelulosa. Los azúcares generados por la degradación de la biomasa vegetal representan potencialmente materias primas abundantes y económicamente competitivas para la fermentación en productos químicos, plásticos y combustibles, incluido el etanol como sustituto del petróleo. Los hongos filamentosos son una fuente de celulasas y hemicelulasas, así como de otras enzimas útiles en la hidrólisis enzimática de los principales polisacáridos (Gusakov *et al.*, 2007).

El principal componente de los residuos agroindustriales es la lignocelulosa, la cual está constituida por tres fracciones principales: celulosa (40-60%) que está protegida por hemicelulosa (20-40%) y por lignina (10-25%). La celulosa es un polímero lineal del dímero glucosa-glucosa con enlaces β -1,4 (celobiosa), su hidrólisis genera unidades de D-glucosa. La celulosa tiene una estructura muy cristalina, rígida y difícil de romper. La hemicelulosa es un heteropolisacárido que contiene 15% de hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y 85% de pentosas (D-xilosa 75% y L-arabinosa 10%). La lignina es un heteropolímero amorfo ramificado de naturaleza fenólica con grupos metoxi y fenilpropánicos formado por alcoholes aromáticos como cumarílico, coniferílico y sinapílico (BNDES y CGEE, 2008; Cuervo *et al.*, 2009; Saval, 2012).

Especies de este grupo como los géneros como *Auricularia delicata*, *Coriolus versicolor*, *Fomes*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum*

commune, y *Trametes trogii* en la actualidad son reconocidas por su gran capacidad de degradación de celulosa y lignina. Asimismo, estos hongos han sido utilizados en procesos con fines de biodescomposición de diferentes polímeros: aromáticos, carbohidratos, colorantes sintéticos, hidrocarburos (Arora *et al.*, 2002; Litthauer *et al.*, 2007; Elisashvili *et al.*, 2010; Méndez-Hernández *et al.*, 2019).

La cáscara de nuez ha sido utilizada como sustrato para la fructificación de *Ganoderma lucidum*, en combinación con otros residuos de la industria de la nuez pecanera, como el pericarpio de la nuez y astillas de ramas de poda (Ozcariz-Fermoselle *et al.* 2018).

Recientemente, en el Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp) se ha mostrado la posibilidad de utilizar residuos agroindustriales locales para la producción de micelio en placa. En dicho proyecto se utilizaron 10 cepas del género *Pleurotus*, de manera *in vitro* en medio de cultivo combinado con residuos de acícula de pino, bagazo de agave, cáscara de nuez, hoja de tamal y pulpa de café, obteniendo un aumento en la velocidad de crecimiento de tres y hasta 10 veces en los tratamientos combinados comparados con el testigo (Ozcariz-Fermoselle *et al.*, 2019).

Existen reportes de la presencia de *Hericiium* de manera silvestre en diferentes partes de la República Mexicana, principalmente en zonas montañosas correspondientes a la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, con más avistamientos entre los meses de julio a enero (NaturaLista, 2019).

La producción de hongos del género *Hericiium* en subproductos agrícolas se ha evaluado anteriormente midiendo el crecimiento del micelio y la producción de basidiomasa.

Chang y Roh (1999) informaron el uso de diferentes especies de madera para probar su potencial para la producción de *H. erinaceus*. Concluyen que el encino y el pino son adecuados para el crecimiento micelial y la densidad de *H. erinaceus*.

Las especies analizadas por Ko *et al.*, (2005) mostraron una temperatura óptima para el crecimiento micelial de 25–30°C. Las pruebas de crecimiento micelial en

medios de aserrín de encino sugieren que subproductos agrícolas probados como salvado de arroz, salvado de cebada, polvo de soja, cáscara de huevo, col china y salvado de trigo son suplementos adecuados para el cultivo de *Hericium*.

Hassan (2007) reporta que obtuvo hasta 50% de eficiencia biológica en aserrín de madera dura con 65% de humedad en un periodo de incubación de 37 a 46 días, por encima de tratamientos de aserrín suplementados con paja de arroz y trigo.

Imtiaj *et al.* (2008) estudiaron el crecimiento micelial de cepas de *Hericium* colectadas de diferentes hábitat. Concluyeron que la temperatura más adecuada es de 25°C, el requerimiento de pH fue de 6, y presentó buen desarrollo en el medio de aserrín de encino suplementado con 10 a 20% de paja de arroz.

Hu *et al.*, (2008) cultivaron *H. erinaceus* y *H. laciniatum*; utilizaron desechos de cáscara de arroz, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar y sedimentos de soja para reemplazar parcialmente el aserrín. Concluyeron que ambas especies presentaron eficiencia biológica superior, de 80.4% y 77.5%, usando una relación 1:1 de caña de azúcar y aserrín en peso seco, a 23°C, con 30 mg de micelio seco, aireación no forzada y 90% de humedad relativa. Ambas especies de *Hericium* mostraron mayor capacidad lignocelulolítica en los sustratos con bagazo de caña de azúcar (1:3 y 1:1).

La actividad enzimática de los hongos depende en gran medida de la composición del sustrato. *Hericium erinaceus* tiene una producción de celulasas, β -glucosidasas y lacasas superior a *Flammulina velutipes*, pero inferior a *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes*; xilanasas similar a los otros hongos (dependiendo de las condiciones de cultivo); y α -amilasa, inferior a las otras tres especies (Ko *et al.*, 2005); asimismo, la actividad enzimática es mayor en medios con pH ligeramente ácido (Schimpf y Schulz, 2016). Estas características hacen de este género una herramienta para la degradación de la lignocelulosa con diversas aplicaciones, como mejorar la digestibilidad de la paja; Jalc *et al.* (1997) usaron paja de trigo incubada durante 30 días a 28°C y observaron que *H. clathroides* mejoró la digestibilidad de materia seca *in vitro* de 41.4% a 56.3%, resultados comparables

con los obtenidos con *Daedalea quercina* (59.2%), *Phelinus laevigatus* (50.2%), *Inonotus andersonii* (51.4%), *Inonotus obliquus* (52%) e *Inonotus dryophilus* (55.9%).

III. Justificación

Debido al crecimiento de la agroindustria, los materiales orgánicos de desecho son una fuente considerable de contaminación ambiental, pues la cantidad que se generan excede la capacidad de degradación natural, convirtiéndose en una amenaza para el equilibrio del ecosistema ya que se acumulan en terrenos o son quemados y de esta manera, se genera también, contaminación ambiental. Los materiales lignocelulósicos juegan un papel muy importante debido a la enorme disponibilidad y a las diferentes fuentes agroindustriales que lo generan. Debido a ello es necesario encontrar tecnologías novedosas utilizando recursos renovables (Alvarez–Castillo *et al.*, 2012). Bajo el enfoque de economía circular un residuo pierde su condición y se convierte en materia prima en la transformación para formar parte de nuevos productos (Lett, 2014). La existencia y disponibilidad de materiales lignocelulósicos que no tienen una siguiente aplicación, ofrece la oportunidad de su aprovechamiento con fines productivos, al mismo tiempo que se colabora con disminuir el impacto que se genera al medio ambiente.

Las posibles aplicaciones de los materiales lignocelulósicos a través de microorganismos que producen complejos enzimáticos aún continúa en desarrollo, con la finalidad de satisfacer las necesidades humanas usando los recursos de forma sustentable. El costo de las enzimas que degradan la lignocelulosa es uno de los factores rotundos en la viabilidad de un proceso biocatalítico. Sin embargo, la producción de enzimas en condiciones óptimas para su producción puede significar una mejora en el proceso. Debido a esto, es importante describir las capacidades hidrolíticas de los organismos que degradan estos materiales, para así, lograr avances en los procesos industriales (Tovar-Herrera, 2013).

México es actualmente el décimo tercer productor de hongos comestibles a nivel mundial, lo que genera una entrada de 200 millones de dólares anuales y 25 mil empleos. El incremento de la producción que ha tenido el país ha sido gracias a una mayor aceptación y valoración de los hongos comestibles que son una fuente de proteínas, vitaminas, minerales fibra dietética y que se ha demostrado que estimulan y refuerzan el sistema inmunológico (FORDECYT, 2016).

Por otra parte, la mayoría de las investigaciones en torno al género *Hericiium* se enfocan en sus propiedades medicinales y diversos compuestos con potencial terapéutico. Su comercialización como suplemento (deshidratado, en cápsulas y en extracto) ha tomado más fuerza en la última década, por lo que es necesario desarrollar más investigación respecto a su cultivo haciendo uso de los materiales disponibles.

IV. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad enzimática del hongo *Hericiium sp.* cultivado en residuos agroforestales.

Objetivos específicos

- Identificar molecularmente las especies de *Hericiium spp.* obtenidas del cepario de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) y de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).
- Determinar la velocidad de crecimiento de *Hericiium in vitro* en medios de cultivo de laboratorio y agar combinado con residuos agroforestales.
- Evaluar la producción de enzimas lignocelulolíticas (celulasas, xilanasas y lacasas) en cultivo en medio sólido usando diferentes combinaciones de residuos agroforestales como sustrato.

V. Hipótesis

El uso de aserrín de pino y cáscara de nuez pecanera como sustrato complementado con salvado de trigo permitirá al hongo *Hericiium erinaceus* la producción de enzimas degradadoras de la lignocelulosa para aprovechar estos residuos agroforestales.

VI. Material y métodos

1. Propagación y conservación de microorganismo

Se obtuvieron dos cepas de *Hericiium*, una de fuente comercial perteneciente al cepario del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y la segunda proveniente de la colección de la Universidad Autónoma Chapingo. Ambas cepas identificadas a nivel de género.

Las cepas del hongo *Hericiium* se mantuvieron en PDA a 4°C (Ko *et al.*, 2005). Se preparó inóculo fúngico a partir de micelio cultivado en PDA en placas de Petri de 90 mm durante 14 días a 24°C en la oscuridad. Se tomaron discos de agar de 4 mm de diámetro de la periferia de la colonia en crecimiento de *Hericiium* y se usaron para inocular medios en placa.

2. Identificación molecular

2.1 Extracción de DNA

La identificación de las dos cepas de *Hericiium* se realizó mediante el “Método de extracción de DNA a partir de tejido vegetal” usando el kit de purificación de DNA Wizard® de Promega, con algunas modificaciones.

Se preparó gel de agarosa al 1%. Se obtuvo el micelio de la placa Petri y se colocó en un mortero. Se colocaron 600 µL de *Nuclei Lysis Solution* en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se agregó nitrógeno líquido en el mortero esperando que se disipara. Se repitió este paso tres veces, y en la siguiente ocasión se molió el material usando el pistilo, evitando que el mortero se quedara sin nitrógeno. El micelio molido se agregó al tubo Eppendorf después de que se disipara el nitrógeno. Se incubaron durante

15 min a 65°C. Se adicionaron 200 µL de *Protein Precipitation Solution*, se agitaron durante 20 s y se colocaron en un vaso de precipitado con hielo durante 2 min. Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 min.

Se colocaron 600 µL de isopropanol en tubos Eppendorf nuevos. Se recuperó el sobrenadante de los tubos originales y se colocaron los tubos en hielo durante 2 min. Se centrifugaron a 13 000 rpm durante 1 min. Se desechó el sobrenadante. Se agregaron 600 µL de etanol al 70% preparado con agua inyectable por el borde del tubo, no directamente hacia el fondo. Se invirtió suavemente numerosas veces hasta que se observaron fragmentos en suspensión. Se colocaron los tubos en hielo durante 2 min. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 min y se desechó el sobrenadante y se esperó a que el residuo de etanol se evaporara. Se añadieron 70 µL de agua a los tubos y se agitó hasta disolver. Se pasó el líquido de las muestras a un solo tubo y se colocó en refrigeración.

Se colocó el gel de agarosa en la cámara de electroforesis, y se llenó de Buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) 1.02x hasta cubrir por completo el gel. Se colocaron 1 µL de Buffer de carga naranja y 5 µL de muestra de DNA a 80 V durante 3 min, y a 100 V durante 30 min.

Transcurrido este tiempo se extrajo el gel de la cámara y se colocó en la bandeja del fotodocumentador (ENDURO GDS Labnet®). Se ajustó la exposición de luz UV para apreciar los carriles formados de las muestras de DNA. Las muestras se almacenaron de 2 a 8°C.

2.2 Amplificación de las regiones ITS y del gen 5.8S rDNA

La amplificación de las regiones ITS-1, ITS-2 y del gen 5.8S rADN se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990).

En un tubo Eppendorf de 200 µL se colocaron 155 µL de H₂O, 8 µL de cebador ITS4, 8 µL de cebador ITS5, 4 µL dNTP, 20 µL PCR buffer, 4 µL de la muestra de ADN y 1 µL de la Taq DNA polimerasa. Se agitó suavemente y se separó en 4 tubos

con un volumen de 50 μ L cada uno. Se programó el termociclador como se observa en la Tabla 1, los pasos 1 y 2 a 95°C consisten en la desnaturalización de las cadenas de DNA, el paso 3 a 55°C se reduce la temperatura, en el paso 4 a 47°C ocurre la hibridación, el paso 5 a 72°C se lleva a cabo la elongación de las cadenas nuevas. Este proceso se repite 34 veces a partir del paso 2; posteriormente continúa durante 5 minutos a 72°C para terminar la reacción, y disminuye la temperatura a 12 °C para su posterior refrigeración hasta el momento de realizar la identificación de la secuencia (Hernández-León *et al.*, 2018).

Tabla 1. Programa de termociclador para la PCR

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|-------|------|------|------|------|-----------------------------------|----------|--------------------------|
| T | 95°C | 95°C | 55°C | 57°C | 72°C | Inicia el ciclo | 72°C | 12°C |
| t | 7 min | 30 s | 30 s | 30 s | 45 s | nuevamente en el paso 2 x34 | 5 min | Por tiempo indefinido |

Los productos de la amplificación se revelaron en un gel de agarosa al 1.5% y una mezcla de buffer de carga compuesta de 6 μ L de buffer naranja y 3 μ L de buffer azul. Los marcadores (1 kb DNA Ladder, LR 100 bp) se prepararon con 2.5 μ L del marcador, 2 μ L buffer TAE 1.12x, 1.5 μ L buffer de carga. Para las muestras se usaron 8 μ L de DNA y 2 μ L buffer de carga.

Se colocó en la cámara de electroforesis a 70 V durante 50 min. Transcurrido ese tiempo se observó en el fotodocumentador. Las muestras se almacenaron de 2 a 8°C.

2.3 Secuenciación de DNA y comparación en base de datos

El amplicón obtenido se envió al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para ser secuenciado. La secuencia consenso fue comparada con las almacenadas en el algoritmo Nucleotide BLAST (NCBI, 2020). Se consideró elegir la secuencia que tuviera el 100% de similitud y un valor de E igual a 0.

3. Obtención y conservación de residuos agroforestales

Para determinar los residuos agroforestales con fines de aprovechamiento que serían utilizados para el cultivo de *Hericium* se consideraron los siguientes criterios de selección de residuos (Saval, 2012):

- Que el principal componente del residuo pudiera ser utilizado como sustrato para la producción fermentativa de insumos de procesos industriales.
- Que el residuo estuviera disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés.
- Que no tuviera otras aplicaciones o usos que compitan con el proceso que se pretende promover.
- Que no requiriera pretratamiento, y en caso de requerirlo, que éste sea sencillo y económico.
- Que la disponibilidad del residuo permitiera planificar el proceso para el cual se va a utilizar.
- Que fuera estable, es decir, que no se descomponga fácilmente bajo las condiciones ambientales del sitio donde se genera.

Las alternativas disponibles fueron aserrín de diversos tipos de maderas, predominantemente de pino, que se manejan en la región; y la cáscara de nuez, proveniente de la industria de la nuez pecanera, ampliamente cultivada en el estado de Hidalgo; y salvado de trigo de amplia disponibilidad.

Debido a que los residuos mencionados son materiales secos y estables, se conservaron a temperatura ambiente, sin exposición a luz solar y alejados de fuentes de humedad.

4. Velocidad de crecimiento

4.1 En medio de cultivo

El hongo fue inoculado en placas Petri con diferentes medios de cultivo. Se usó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3x2, se establecieron como factores tres medios de cultivo (PDA, SDA y EMA, preparados siguiendo las instrucciones del producto) y dos temperaturas de incubación (25 y

28°C). Se emplearon cinco repeticiones por tratamiento con un total de 30 observaciones. Para la medición se trazaron tres rectas (A, B, C) tomando como intersección el centro del inóculo a 60° y se marcó sobre cada recta el crecimiento por día. La velocidad de crecimiento se calculó mediante el diámetro recorrido por el micelio sobre la media de días de invasión (Imtiaj *et al.*, 2009). Se consideraron los datos de crecimiento hasta el día 14, y se llevó a cabo el análisis de la tendencia del crecimiento con base en la pendiente.

4.2 En medio combinados con residuos agroforestales

Para determinar la velocidad de crecimiento en medio combinado con los residuos agroforestales se molieron los residuos de aserrín de pino, cáscara de nuez y salvado de trigo, y se tamizaron por separado a 0.5 mm (35 mesh). Se usaron 15 g de agar con 25 g de residuo molido (Ozcariz-Fermoselle *et al.*, 2019); se prepararon 3 tratamientos combinados: agar con aserrín de pino (AP), agar con cáscara de nuez (CN) y agar con salvado de trigo (ST). Se seleccionó como testigo el medio de cultivo y la temperatura en donde se obtuvo la velocidad de crecimiento mayor en la prueba anterior, que fue el PDA a 25°C, y un tratamiento únicamente con agar como testigo negativo. Se inoculó con una porción miceliar de la cepa y se emplearon cinco repeticiones. Se estableció un diseño experimental completamente al azar. Se consideraron los datos de crecimiento hasta el día 21, y se llevó a cabo el análisis de la tendencia del crecimiento con base en la pendiente.

Esta fase del experimento se llevó a cabo como prueba preliminar para descartar cualquier posible sustrato que inhibiera el crecimiento del hongo.

5. Producción de enzimas lignocelulolíticas

5.1 Cultivo en medio sólido

El hongo se cultivó en frascos de 250 mL usando 15 g de sustrato (A: 100% aserrín de pino; AC: 80% aserrín de pino, 20% cáscara de nuez; AS: 80% aserrín de pino, 20% salvado de trigo; ACS: 80% aserrín de pino, 10% cáscara de nuez, 10% salvado de trigo) con 75% de humedad. Se esterilizó durante 30 min a 121°C y 15 lb/pulg³, y se inoculó con porciones miceliares procedentes de placa equivalentes a

3.2 cm². Los frascos se colocaron en una cámara de incubación a 24±1°C, de manera aleatoria. Se estableció un diseño completamente al azar, con cinco evaluaciones que se realizaron cada siete días. Para cada evaluación enzimática se tomaron tres frascos de cada tratamiento.

5.2 Obtención del extracto crudo enzimático

Para obtener el extracto crudo enzimático (ECE) se añadió un volumen de 100 mL de agua destilada, se colocó el frasco en agitación magnética y baño de hielo durante 30 min. Se filtró y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, y se recuperó el sobrenadante (Ordaz *et al.*, 2012).

5.3 Evaluación de celulasas

Para evaluar la actividad enzimática de celulasas se utilizó el método de Miller *et al.* (1960), que cuantifica la acción de las enzimas midiendo los azúcares reductores liberados por la hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC) por medio de la cuantificación indirecta de azúcares reductores, como la glucosa, que reaccionan con el reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reduciéndolo al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo oscuro, cuya presencia puede detectarse al medir la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm (Chaplin, 1986).

Se utilizó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich ®) al 1%, disuelta en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.0). Se realizó la curva estándar con una solución de glucosa 10 mM (0.18 g/100 mL) disuelta en amortiguador de citrato de sodio (50 mM y pH 5.0).

En tubos de ensayo por triplicado se llevó a cabo la reacción para la determinación de celulasas. El volumen de la mezcla de reacción fue de 1 mL (0.9 mL de CMC y 0.1 mL del ECE). La reacción se realizó a 50°C durante 20 min, posteriormente se interrumpió al agregar 1.5 mL del reactivo DNS. Se usaron blancos de muestra, los cuales llevan el mismo procedimiento, pero el ECE se agregó después del reactivo DNS. El volumen total de reacción se agitó manualmente, los tubos se colocaron en agua en ebullición por 20 min y posteriormente en agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se preparó un blanco, para calibrar el espectro, mezclando

0.9 mL de CMC, 0.1 mL de amortiguador de citratos (50 mM, pH 5) y 1.5 mL de reactivo DNS. Las lecturas se realizaron en celdas de plástico en un espectrofotómetro (UNICAM HELIOS®) a 640 nm. Una unidad internacional (UI) de enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcar reductor (glucosa) por min a 50°C.

5.4 Evaluación de xilanasas

La actividad de las xilanasas se cuantificó por el método del DNS (Miller *et al.*, 1960) con modificaciones de Loera y Córdova (2003). Se utilizó como sustrato una solución de xilano de abedul (Sigma-Aldrich) al 0.5% el cual fue disuelto en amortiguador de citrato de sodio (50 mM, pH 5.3). Se realizó una curva estándar con solución de xilosa a una concentración final de 10 mM (0.15 g/100 mL) disuelta en buffer de citratos (50 mM, pH 5.3). La reacción se realizó en tubos de ensayo por triplicado. El volumen de la mezcla de reacción fue de 1 mL (0.9 mL de xilano de abedul y 0.1 mL del ECE). Se incubó a 50°C por 20 min, posteriormente se adicionó 1.5 mL del reactivo DNS. Al blanco de muestra se le agregó después del DNS, la muestra del ECE. Las muestras se colocaron en agua en ebullición durante 5 min para desarrollar color, posteriormente se colocaron en agua fría. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm. Una Unidad Internacional (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de azúcar reductor (D-xilosa) por min a 50°C (Qinnghe *et al.*, 2004).

5.5 Evaluación de lacasas

La actividad de estas enzimas se evaluó midiendo la oxidación del ácido 2,2-azinobis(3-etilbencenzotiazolinasulfónico) (ABTS). El reactivo ABTS se preparó a una concentración de 0.5 μ M disuelto en amortiguador de citratos (50 mM, pH 5.0). Esta solución se colocó en un frasco color ámbar y se cubrió con papel aluminio, hasta por 10 días. Los tubos de reacción se prepararon con 500 μ L de ECE y se incubaron a 40°C durante 1 min. Al momento de la lectura se adicionaron 500 μ L del reactivo ABTS en cada muestra para dar un volumen total de 1 mL en una dilución 1:1. Los tubos se agitaron con un vórtex y la absorbancia se midió a 420 nm durante 90 s, registrando la absorbancia en intervalos de 10 s. Una Unidad Internacional (UI) se

definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de sustrato oxidado por minuto bajo las condiciones de reacción.

6. Análisis estadístico de los resultados

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se recurrió al paquete estadístico XLSTAT 2021.1 con un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación múltiple de Tukey con un α del 5%.

VII. Resultados y discusión

1. Identificación molecular

Se confirmó que ambas cepas pertenecen a la especie *Hericium erinaceus*, pues cuentan con porcentaje de identidad mayor al 95% (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la identificación de ambas cepas

| | H1 | | H2 | |
|--------------------|---------------------|------|---------------------|---------------------|
| | <i>H. erinaceus</i> | | <i>H. erinaceus</i> | |
| | ITS4 | ITS5 | ITS4 | ITS5 |
| Puntaje | 760 | 869 | 316 | 366 |
| Valor E | 0.0 | 0.0 | 2×10^{-82} | 2×10^{-97} |
| % identidad | 100% | 100% | 95.02% | 99.50% |

Entre menor es el *valor E* y el puntaje es mayor, hay más probabilidades de que la secuencia corresponda a la especie. Cabe mencionar que en esta base de datos un *valor E* de 0.0 es menor a 1×10^{-179} (NCBI, 2020).

Se decidió trabajar con la H1 por dos razones, su porcentaje de identidad es más alto y porque ya se encuentra como parte de la colección de hongos de la UAEH.

2. Velocidad de crecimiento

2.1 En medio de cultivo

Como se puede observar en la Tabla 3, los resultados de la velocidad de crecimiento en medio de cultivo, expresado en mm/día, indica que el mejor medio para *Hericiium erinaceus* es el PDA, seguido del SDA y por último EMA. Esto coincide con datos en la literatura que indican que el mejor medio de cultivo para *Hericiium* es el PDA (Imtiaj *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2005). Analizando los factores por separado la diferencia fue dada por los medios de cultivo, no hubo diferencia entre las temperaturas, lo que indica que esta especie puede desarrollarse en dicho rango de temperatura (Imtiaj *et al.*, 2008).

Tabla 3. Crecimiento radial del micelio en medio de cultivo

| Medio de Cultivo | Temperatura | Crecimiento (mm/día) |
|------------------|-------------|----------------------|
| PDA | 25°C | 8.26 ± 0.15 a |
| | 28°C | 8.43 ± 0.15 a |
| SDA | 25°C | 7.56 ± 0.51 b |
| | 28°C | 7.41 ± 0.28 b |
| MEA | 25°C | 5.72 ± 0.15 c |
| | 28°C | 5.68 ± 0.16 c |

2.2 En medio combinado con residuos agroforestales

En la Tabla 4 se observa que la velocidad de crecimiento en el medio de agar fue aproximadamente 10 veces más lento que en los tratamientos suplementados con residuos, por lo que se decidió no incluirlo en el análisis de datos. La velocidad de crecimiento fue casi la misma en los medios de agar con residuos (5.49 mm/día en ST, 5.28 mm/día en AP y 5.45 mm/día en CN), sin mostrar diferencias significativas entre ellos, pero por debajo del valor obtenido en el medio PDA.

Tabla 4. Crecimiento radial del micelio en medio combinado con sustrato

| Medio de cultivo | Crecimiento (mm/día) |
|------------------|----------------------|
| PDA | 8.50 ± 0.39 a |
| ST | 5.49 ± 0.30 b |
| AP | 5.28 ± 0.44 b |
| CN | 5.45 ± 0.24 b |
| Agar | 0.58 ± |

De forma visual se observó una diferencia en la densidad del micelio, la cual fue mayor en el PDA, seguida del tratamiento C, y seguido por los tratamientos S y A, datos similares a los obtenidos por Ko *et al.* (2005).

Los datos son similares a los obtenidos en el medio EMA (5.72 mm/día). Estos resultados indican que se descarta la posibilidad de que alguno de estos materiales pueda impedir el crecimiento de *H. erinaceus*, situación que ocurre con otros hongos como por ejemplo el género *Pleurotus* cuando se utiliza algún sustrato que contiene corteza de pino, debido al alto contenido de resinas (Naranjo *et al.*, 1998).

Desde un punto de vista productivo, los medios comerciales son más efectivos para el crecimiento micelial, sin embargo, estos residuos molidos en conjunto con un agente gelificante como el agar pueden ser una alternativa.

3. Producción de enzimas lignocelulolíticas

3.1 Producción de enzimas

Durante la producción de enzimas en medio sólido se observó actividad enzimática desde la primera determinación, como se muestra en la Figura 5, de izquierda a derecha: el primer tubo (B) contiene el blanco para calibración, los siguientes cuatro tubos son la reacción de xilanasas en A (1), AS (2), ACS (3), AC (4), y los últimos cuatro tubos son la reacción de celulasas en A (5), AS (6), ACS (7), AC (8).

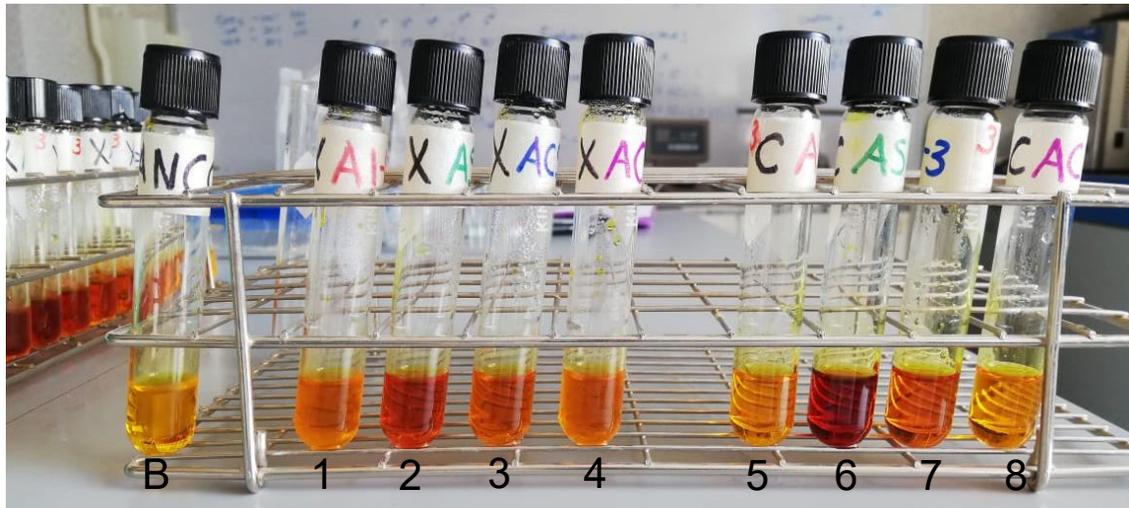


Figura 5. Tubos de reacción al día 7 después de la siembra: B) blanco de calibración; 1 a 4, producción de xilanasas en: 1) A, 2) AS, 3) ASC, 4) AS; 5 a 8, producción de celulasas: 5) A, 6) AS, 7) ASC, 8) AS

El reactivo DNS tiene una coloración amarilla, al reaccionar con la muestra adquiere una coloración que va de anaranjado a rojo. La intensidad de la coloración rojiza en los tubos de reacción, en comparación con el blanco para calibración indica que hay mayor cantidad de azúcares reductores, esto infiere que hubo más actividad enzimática, ya que las enzimas degradan los complejos de carboximetilcelulosa y xilano de abedul en azúcares más simples, y la reacción con el reactivo DNS le provee de la tonalidad cuyo cambio es detectable en el espectrofotómetro (Moreno-Ruiz, 2013).

Los tubos de reacción que presentaron la mayor diferencia en dicha coloración fueron los correspondientes al tratamiento AS, tanto en la evaluación de xilanasas como la de celulasas. Esto puede indicar que la adición del salvado de trigo a la base de aserrín de pino provee de los nutrientes necesarios para que *Hericiium erinaceus* active la maquinaria enzimática para aprovechar el sustrato como alimento más pronto que en los demás tratamientos. Estos datos coinciden con autores que confirman que el salvado de trigo es un suplemento idóneo que puede ser usado en el cultivo de *Hericiium spp.* (Atila *et al.*, 2018; Ko *et al.*, 2005; Wolters *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2010).

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) en el paquete estadístico XLSTAT, el cual es un análisis exploratorio que evalúa la tendencia de los resultados sobre las variables activas; en la Figura 6 se puede observar que este análisis indica que los tratamientos donde hubo una mayor producción de enzimas manteniéndose equilibrio entre las tres variables activas, que son las enzimas, fueron los tratamientos AS y ACS (dentro del óvalo). Estos resultados son similares a los obtenidos por Zhiheng y Shuyun en 1997, que comprobaron que el salvado de trigo es una excelente fuente de carbono y nitrógeno para *Hericium erinaceus*, y en 1998, que comprobaron que, para obtener un mejor rendimiento, el contenido adecuado de aserrín y salvado de trigo en el sustrato era aproximadamente 77% a 88% y 11% a 23% respectivamente.

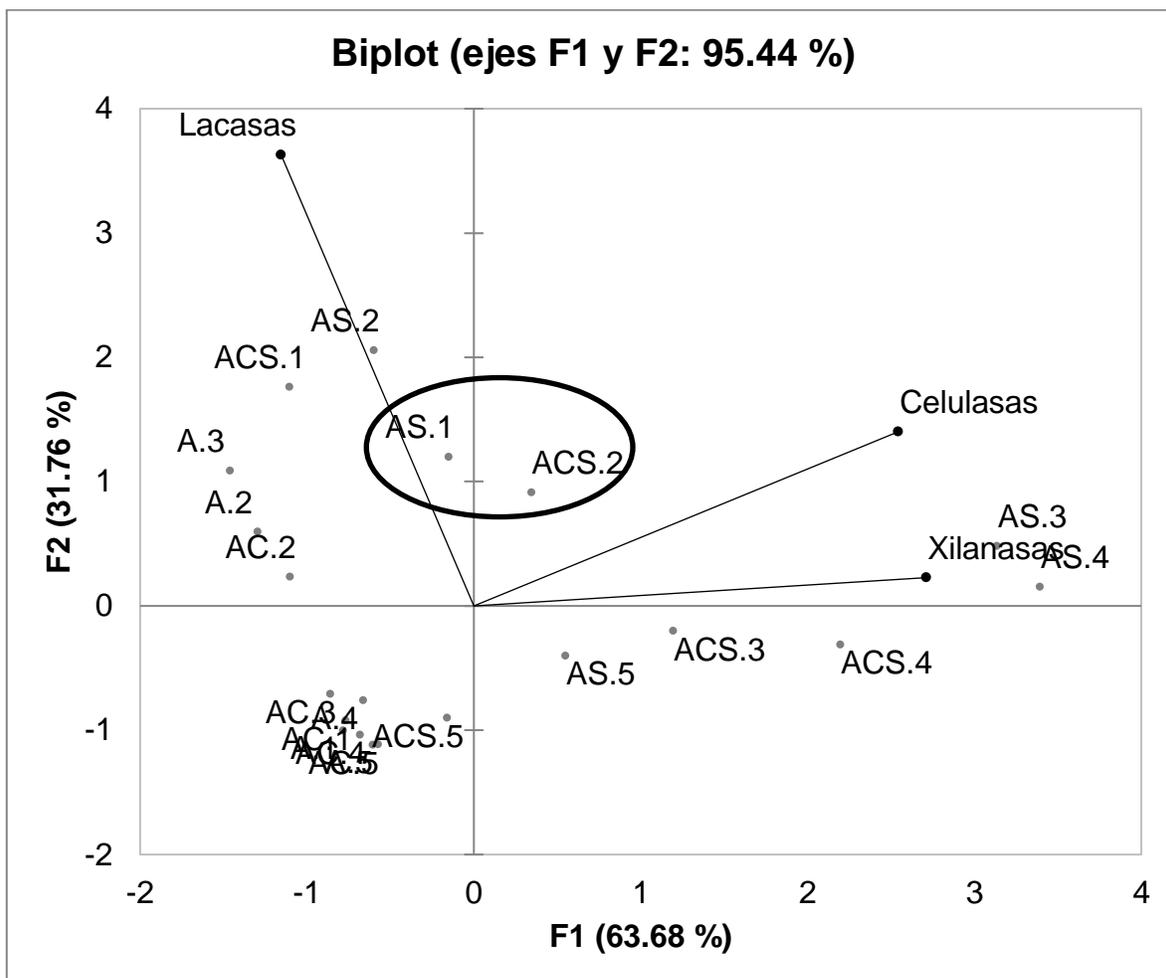


Figura 6. Análisis de componentes principales de la producción de enzimas

De igual modo, empleando el mismo programa, los resultados analizados con la prueba de comparación múltiple de Tukey mostraron que la producción de enzimas lignocelulolíticas de *Hericiium erinaceus* presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Como se observa en la Figura 7, se muestra la estimación media de la producción de enzimas en cada sustrato ilustrada en columnas, en la parte superior de cada columna se identifica una letra, las letras diferentes expresan diferencias estadísticamente significativas. Para las tres enzimas, los tratamientos AS y ACS no presentaron diferencias significativas, y a la vez, el tratamiento ACS no tuvo diferencias con los tratamientos A y AC, pero el tratamiento AS fue estadísticamente diferente a los últimos dos.

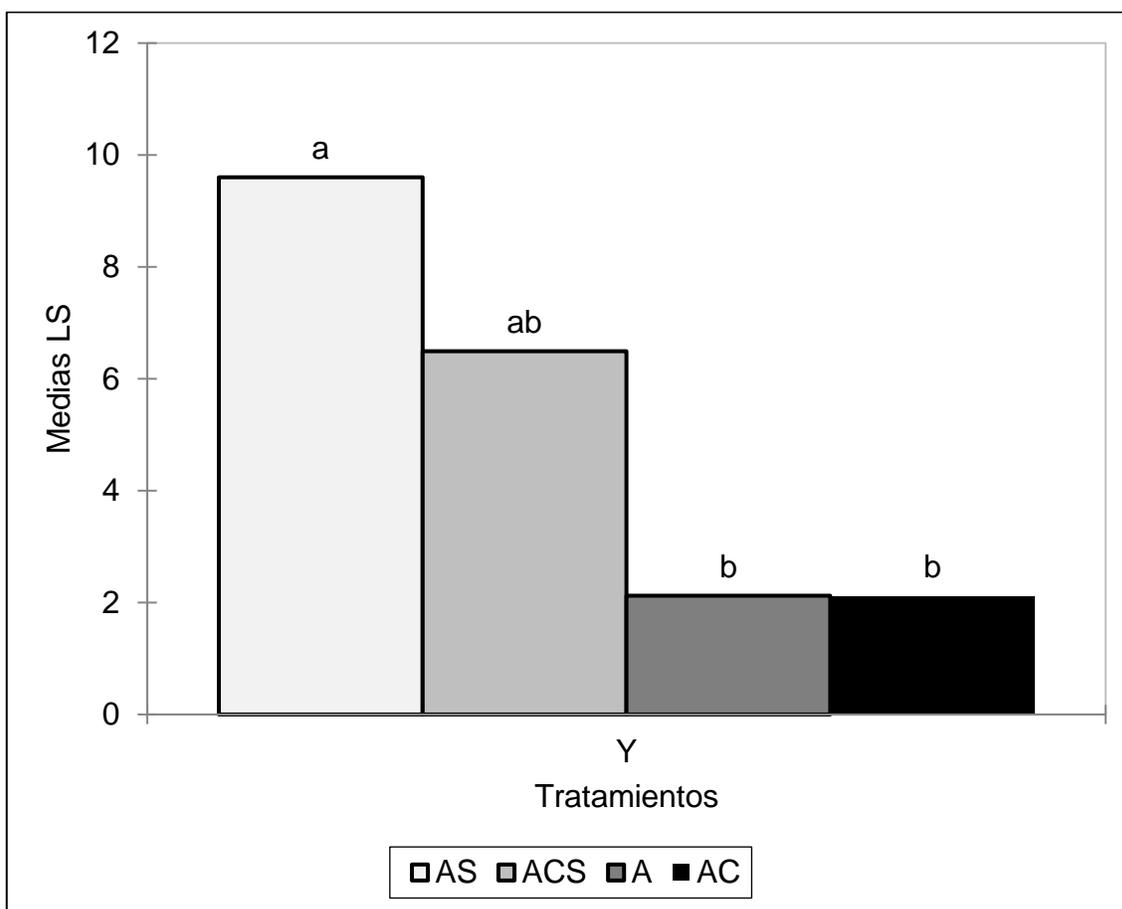
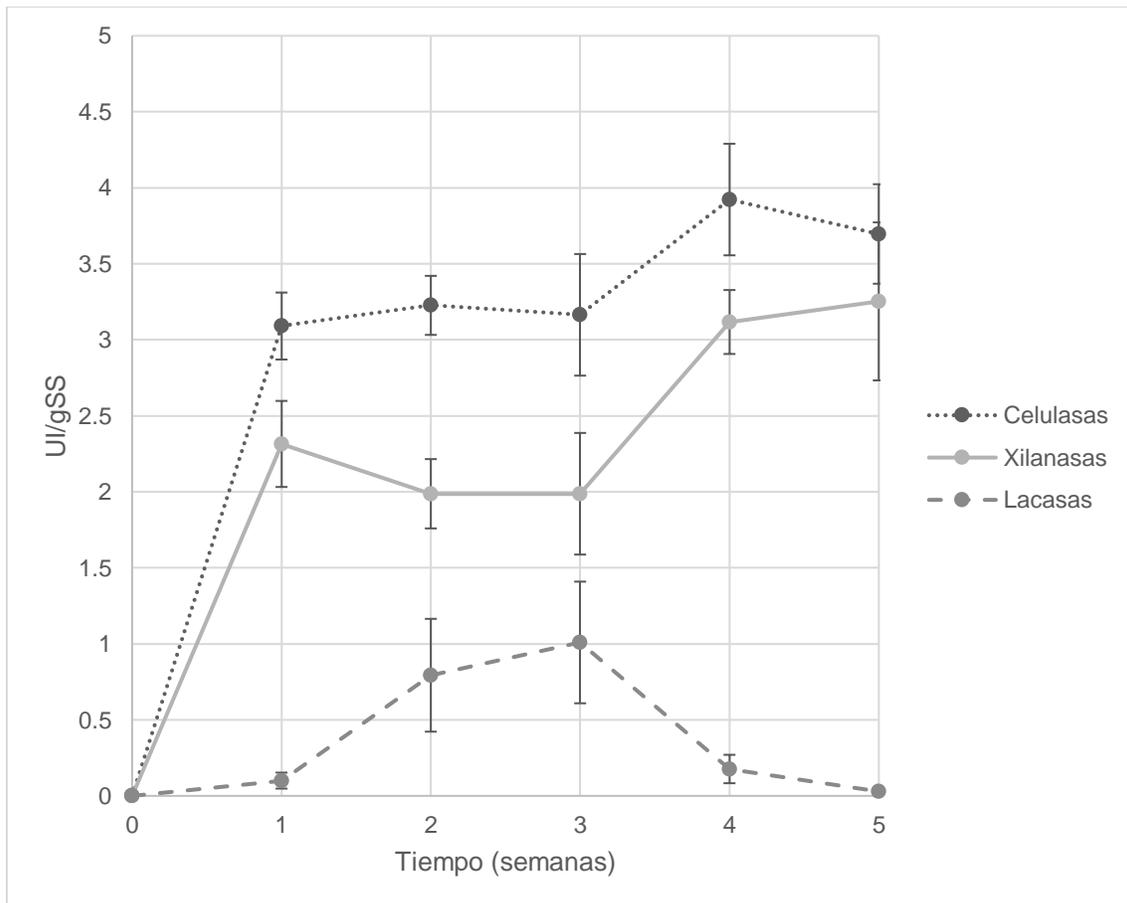


Figura 7. Prueba de comparación múltiple de Tukey con un α del 5% por tratamientos

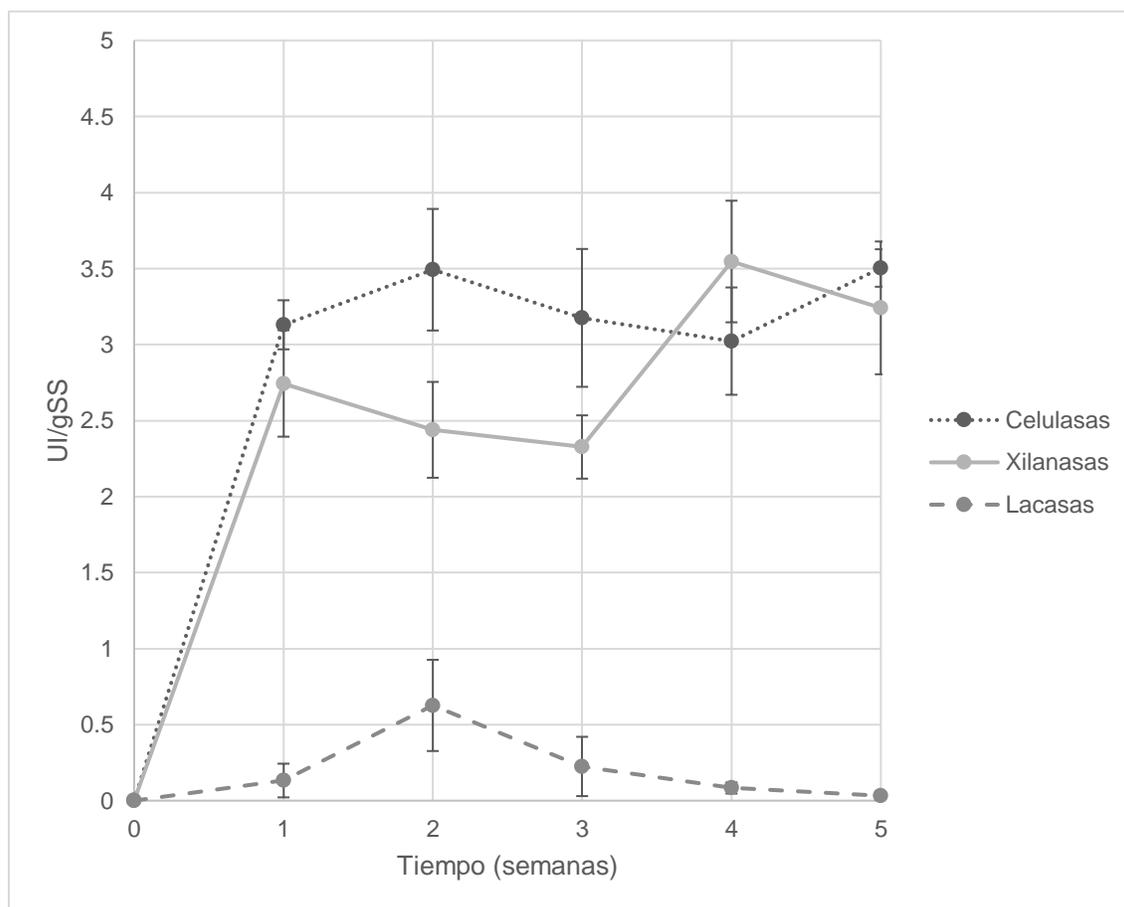
3.2 Comportamiento enzimático en cada sustrato

Respecto al comportamiento de las enzimas en los sustratos, en la Gráfica 1 en A, se puede observar que la expresión de celulasas se detectó en la primera semana con 3.1 UI/gSS (Unidades Internacionales por gramo de sustrato seco), que se mantuvo estable hasta la semana 3 y aumentó a 3.9 UI en la semana 4 y disminuyó a 3.7 UI en la semana 5. La expresión de xilanasas también se detectó en la semana 1 con 2.3 UI, que disminuyó ligeramente y volvió a aumentar a 3.1 y 3.2 UI en la semana 4 y 5. La actividad de las lacasas se detectó en la semana 1 pero aumentó a 0.8 UI en la semana 2 y mayor expresión en la semana 3 con una UI para después descender en la semana 4.



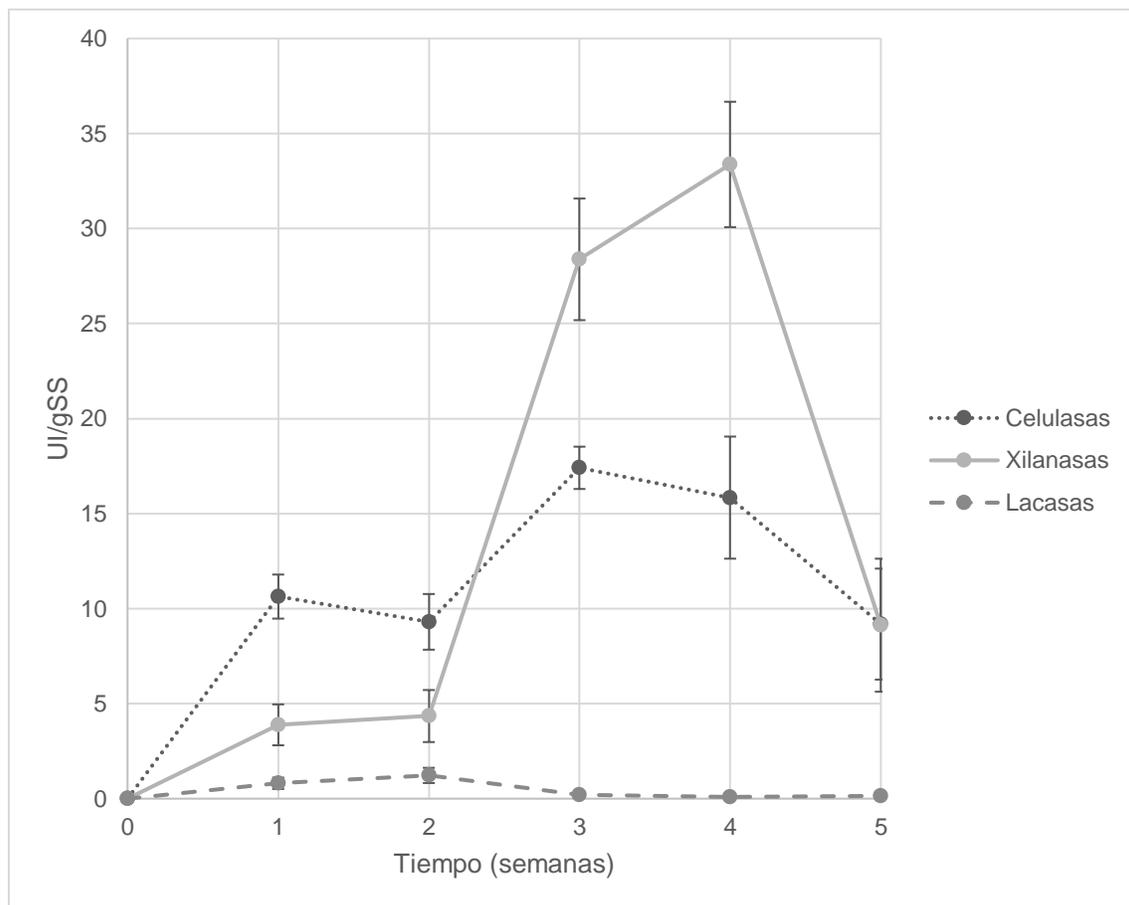
Gráfica 1. Comportamiento enzimático en sustrato de Aserrín

En la Gráfica 2 en sustrato AC, se tuvo una producción de celulasas en la primera semana con 3.1 UI, que aumentó a 3.5 UI en la segunda semana y se mantuvo en este rango en las siguientes semanas. La producción de xilanasas en la primera semana fue de 2.7 UI, que disminuyó en las semanas 2 y 3 para después aumentar en la semana 4 hasta 3.5 UI y nuevamente descender en la semana 5. Y la producción de lacasas se detectó en la primera semana, con un pico de producción en la segunda semana con 0.6 UI, y disminuyó en las siguientes semanas.



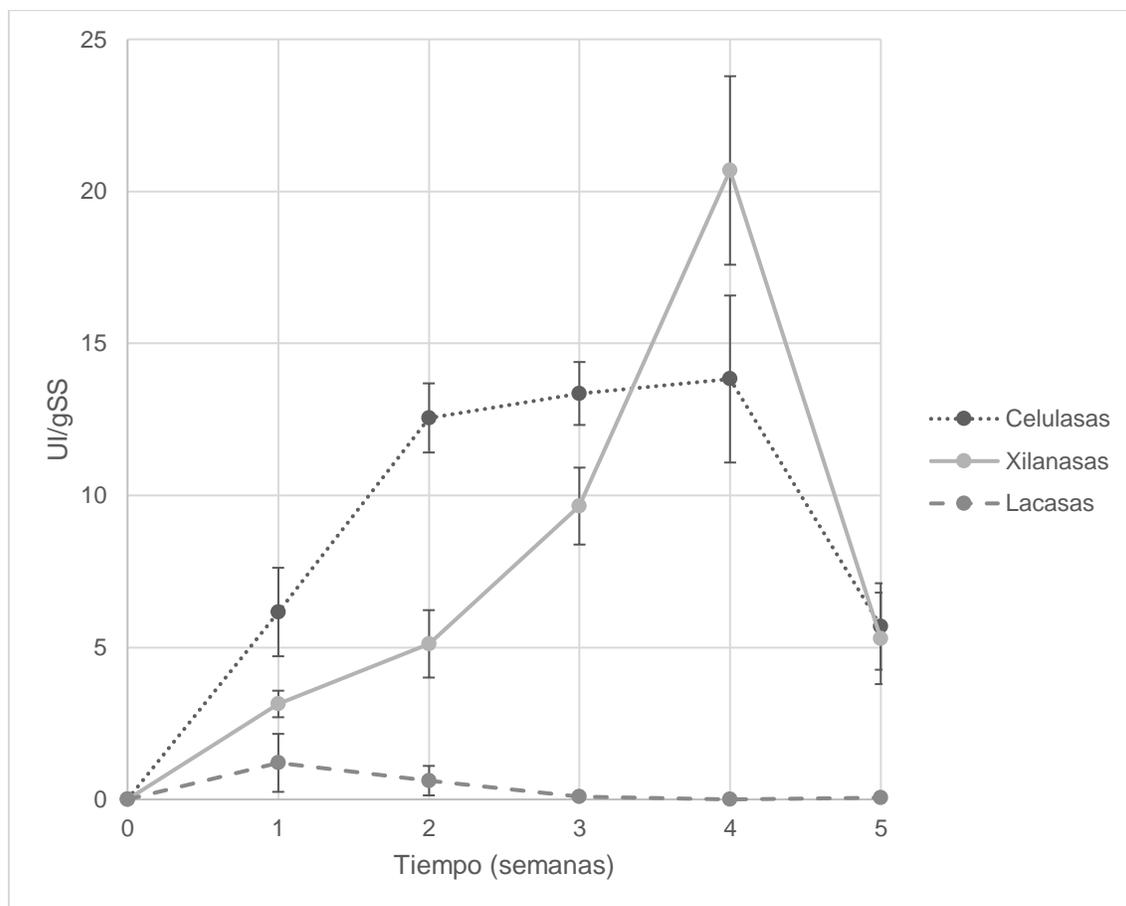
Gráfica 2. Comportamiento enzimático en sustrato Aserrín-Cáscara

En el tratamiento AS, en la Gráfica 3, se tuvo una producción de celulasas de 10.6 UI en la primera semana, disminuyó ligeramente en la segunda, aumentó a 17.4 UI en la tercer semana y nuevamente disminuyó hasta 9.1 UI en la semana 5. La producción de las xilanasas fue de 3.8 y 4.3 UI en las semanas 1 y 2, que aumentó hasta 28.3 y 33.3 UI en las semanas 3 y 4, y disminuyó a 9.1 UI en la semana 5. Y la producción de lacasas fue de 0.8 y 1.2 UI en las semanas 1 y 2, que disminuyó en las 3 semanas posteriores.



Gráfica 3. Comportamiento enzimático en sustrato de Aserrín-Salvado

Y en el caso del tratamiento ACS (Gráfica 4), se observa que la producción de celulasas aumentó progresivamente hasta 12.5 UI en la semana 2, para después aumentar ligeramente hasta la semana 4, con 13.8 UI, y disminuyó a 5.7 UI en la semana 5, con un comportamiento de campana de Gauss. La producción de xilanasas aumentó progresivamente hasta la semana 3 con 9.6 UI, hasta 20.6 UI en la semana 4 y disminuyó hasta 5.2 UI en la semana 5. Y finalmente, se tuvo un pico de producción de lacasas en la semana 1 con 1.2 UI que disminuyó a 0.6 UI en la segunda semana, y fue casi imperceptible en las siguientes semanas con valores muy cercanos al 0.



Gráfica 4. Comportamiento enzimático en sustrato de Aserrín-Cáscara-Salvado

El beneficio que aporta el salvado de trigo a la formulación del sustrato para que *Hericiium erinaceus* produzca mayor cantidad de enzimas se observa tanto estadística como numéricamente, ya que la producción de enzimas en los tratamientos que contienen salvado de trigo fue mucho más alta, con una mayor diferencia en las semanas 1 y 2 para lacasas y las semanas 3, 4 y 5 para celulasas y xilanasas.

Los resultados de la producción de enzimas muestra que *Hericiium erinaceus* es capaz de producir celulasas, xilanasas y lacasas en las condiciones establecidas. La producción de celulasas llegó hasta 17.4 UI en la semana 3 en el tratamiento AS, brindando al organismo la capacidad de degradar la celulosa como reportan Fen *et al.* (2014) quienes evaluaron a 10 especies de basidiomicetos y concluyeron que *Hericiium erinaceus* presentó mejores resultados al degradar la CMC y papel filtro. Por otra parte, la producción de xilanasas y lacasas fueron similares a los reportados por Schimpf y Schulz (2016) en paja de trigo (25 l/g de xilanasas y 1 UI/g de lacasas), cuyos valores se acercan a los obtenidos en el tratamiento ACS (20.6 UI de xilanasas en la semana 4 y 1.2 UI de lacasas en la semana 1).

Pelaez-Acero *et al.* (2009) evaluaron la actividad enzimática de 2 especies de *Pleurotus* en bagazo de caña de azúcar y encontraron que al aumentar el pH del sustrato con hidróxido de calcio (aumento de pH de 7.70 a 8.13) se mejora la actividad enzimática (al día tres tuvieron una diferencia de 2.46 UI hasta 5.64 UI de celulasas; de 10.39 hasta 18.49 UI de xilanasas; y de 9.60 UI hasta 50.55 UI de lacasas). Por lo que se considera que los tratamientos de A y AC pudieron presentar menor actividad enzimática debido al pH del sustrato, ya que el pH de la cáscara de nuez es neutro (Miranda, 2018) y el pH del aserrín de pino está por debajo de 5 (Sánchez-Córdova *et al.*, 2008).

Ibarra Islas (2019) observó el mismo comportamiento con *Lentinula edodes* y *Ganoderma lucidum* en paja de cebada con residuo de cáscara de nuez para la actividad de celulasas y xilanasas, y de lacasas fue similar a *Ganoderma* y *Pleurotus ostreatus*, con diferencia en la cantidad de unidades que fue mayor y el

periodo de tiempo que fue más reducido que lo presentado aquí con *Hericiium erinaceus*.

En el caso del basidiomiceto *Agaricus bisporus*, Arce-Cervantes *et al.* (2015) encontraron que existe una correlación positiva entre los valores de producción y el aumento de celulasas y xilanasas. Al igual que se presenta la formación de primordios, es decir, el inicio de la producción del cuerpo fructífero, al momento de mayor producción de lacasas, que posteriormente desciende durante el crecimiento del hongo, y vuelve a aumentar en la siguiente etapa de producción de primordios. En este estudio realizado con *Hericiium erinaceus* se llegó hasta el día 35, sin embargo al prolongar el análisis se podría encontrar un nuevo aumento en la producción de lacasas.

VIII. Conclusiones

- Se identificó a la especie *Hericiium erinaceus* mediante el uso de los primers ITS4 e ITS5.
- El medio hongo creció más rápido *in vitro* en el medio PDA sin diferencia entre temperatura (25 y 28°C).
- La adición de residuos molidos de aserrín de pino, cáscara de nuez o salvado de trigo en agar permitió el crecimiento *in vitro* de *H. erinaceus* con una velocidad de crecimiento similar a la obtenida en medio MEA
- *H. erinaceus* es capaz de producir enzimas lignocelulolíticas extracelulares en los residuos de aserrín de pino y cáscara de nuez pecanera con la adición de salvado de trigo
- La descripción de la producción de enzimas lignocelulolíticas de *Hericiium erinaceus* a través del tiempo podría ayudar a predecir el comportamiento de la producción de los cuerpos fructíferos, similar al comportamiento de *A. bisporus*, al obtener un pico de producción de lacasas es el momento en que se forman los primordios, y la cantidad de celulasas y xilanasas está directamente relacionada a la eficiencia biológica, es decir, a mayor cantidad

de estas dos enzimas, se obtiene una mayor producción de los cuerpos fructíferos.

- *Se propone evaluar diferentes formulaciones de los residuos (80% a 90% aserrín de pino y cáscara de nuez, 10 a 20% salvado de trigo) para la fructificación de *Hericiium erinaceus*.*

IX. Referencias

- Abbate, P. E., Cardós, M. J., y Campaña, L. E. (2017). El trigo, su difusión, importancia como alimento y consumo. . En G. A. Divito, y F. O. García, *Manual del cultivo de trigo*. (págs. 7-21). Buenos Aires, Argentina: International Plant Nutrition Institute.
- Alonso-Gutiérrez, M. S., Ramírez-Cortina, C. R., y Rigal, L. (2012). Valorización de residuos agroindustriales del tequila para alimentación de rumiantes. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 449-457.
- Álvarez-Castillo, A., García-Hernández, E., Domínguez-Domínguez, M. M., Granandos-Baeza, J., Aguirre-Cruz, A., & Morales-Cepeda, A. (2012). Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 13(4), 140-150.
- Álvarez-Rodríguez, A., Pizarro-García, C., y Folgueras-Díaz, M. B. (2013). Caracterización química de biomasa y su relación con el poder calorífico. *Universidad de Oviedo, España.* , 12.
- Antal, M. J., Allen, S. G., Dai, X., Shimizu, B., Tam, M. S., y Gronli, M. (2000). Attainment of the Theoretical Yield of Carbon from Biomass. *Industrial y engineering chemistry research*, 4024-4031.
- Arce-Cervantes, O., Saucedo-García, M., Lara, H. L., Ramírez-Carrillo, R., Cruz-Sosa, F., y Loera, O. (2015). Alternative supplements for *Agaricus bisporus* production and the response on lignocellulolytic enzymes. *Scientia Horticulturae*, 192, 375-380.
- Arora, D. (1986). *Mushroom Demystified*. Berkeley: Ten Speed Press.
- Arora, D. S., Chander, M., y Gill, P. K. (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration y Biodegradation* , 115-120.

- Balandrán-Quintana, R. R., Mercado-Ruiz, J. N., y Mendoza-Wilson, A. M. (2015). Wheat Bran Proteins: A Review of Their Uses and Potential. *Food Reviews International*, 279-293.
- Balderrama-Castañeda, S., Luján-Álvarez, C., Lewis, D. K., Ortega-Gutiérrez, J. A., de Jong, B. H., y Nájera-Ruiz, T. (2011). Factibilidad de generación de electricidad mediante gasificación de residuos de aserradero en el norte de México. *Madera y bosques*, 67-84.
- Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social y Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. (2008). *Bioetanol de la caña de azúcar: Energía para el desarrollo sostenible*. Río de Janeiro: BNDES.
- Chang, H.-Y., y Roh, M.-G. (1999). Physiological Characteristics of *Hericium erinaceus* in Sawdust Media. *Korean Journal of Mycology*, 252-255.
- Chaplin, M. F. (1986). Monosaccharides. Carbohydrate analysis. A practical approach. *Press England*, 1-36.
- Chaquilla-Quilca, G., Balandrán-Quintana, R. R., Mendoza-Wilson, A. M., y Mercado-Ruiz, J. N. (2018). Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo. *CienciaUAT*, 137-147.
- Chen, G., y Leung, D. Y. (2003). Experimental Investigation of Biomass Waste, (Rice Straw, Cotton Stalk, and Pine Sawdust), Pyrolysis Characteristics. *Energy Sources*, 331-337.
- Cerda-Mejía, L. (2016) Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelero. Tesis para obtener el grado de doctorado. Programa De Doctorado Microbiología Ambiental y Biotecnológica. Departamento de Microbiología. *Facultad de Biología. Universidad de Barcelona*. P 13.
- Corke, H. (2015). Grain: morphology of internal structure. *Encyclopedia of Food Grains*, 41-49.

- Cuervo, L., Folch, J. L., y Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTecnología*, 11-25.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T., y Agathos, S. N. (2010). Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 1091-1096.
- Fen, L., Xuwei, Z., Nanyi, L., Puyu, Z., Shuang, Z., Xue, Z., Pengju, L., Qichao, Z., Haiping, L. (2014). Screening of lignocellulose-degrading superior mushroom strains and determination of their CMCase and laccase activity. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Flores-Córdova, M., A., y Sánchez-Chávez, E. (2016). Fitoquímicos y nutrientes en almendra y cáscara de nuez pecanera. *RIIT. Revista internacional de investigación e innovación tecnológica*, (18), 1-10.
- FORDECYT. (3 de Mayo de 2016). Estrategia para fortalecer la competitividad de la cadena agroalimentaria microbiana emergente de los hongos comestibles, funcionales y medicinales, en los Estados de Puebla, Veracruz y Oaxaca. Obtenido de Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación: <https://www.conacyt.gob.mx/index.php/el-conacyt/convocatorias-y-resultados-conacyt/convocatorias-fordecyt/convocatorias-cerradas-fordecyt/fordecyt-2016-01>
- Fregoso-Madueño, J. N., Goche-Télles, J. R., Rutiaga-Quiñones, J. G., González-Laredo, R. F., Bocanegra-Salazar, M., y Chávez-Simental, J. A. (2007). Usos alternativos de los residuos de la industria del aserradero. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 243-260.
- Gaitán-Hernández, R. (12 de octubre de 2019). Cultiva hongos comestibles. Obtenido de Instituto Nacional de Ecología: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/etica-conflictos-intereses/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles>

- González-Álvarez, D. O. (2013). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal. *Trabajo de grado, Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia.*
- Gusakov AV, Punt PJ, Verdoes JC, van der Meij J, Sinitsyn AP, Vlasenko E, Hinz SW, Gosink M, Jiang Z (2011) Enzimas fúngicas. Patente de EE. UU. No 7,923,236.
- Guzmán-Silva, J. A., Ramírez-Arango, A. M., Fuentes-Talavera, F. J., Rodríguez-Anda, R., Turrado-Saucedo, J., y Richter, H. G. (2007). Diagnóstico de la industria de transformación primaria de las maderas tropicales de México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 202-221.
- Hassan, F. (2007). Cultivation of the Monkey Head Mushroom (*Hericium erinaceus*) in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research*, 1229-1233.
- He, X., Wang, X., Fang, J., Chang, Y., Ning, N., Guo, H., Huang, L., Huang, X., Zhao, Z. (2017). Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 228-237.
- Hernández-León, S., Little, D. P., Acevedo-Sandoval, O., Gernandt, D. S., Rodríguez-Laguna, R., Saucedo-García, M., Arce-Cervantes, O., Razo-Zárate, R., Espitia-López, J. (2018). Plant core DNA barcode performance at a local scale: identification of the conifers of the state of Hidalgo, Mexico. *Systematics and Biodiversity*, 16(8), 791-806.
- Hernández-Montoya, V., Mendoza-Castillo, D. I., Bonilla-Petriciolet, A., Montes-Morán, M. A., y Pérez-Cruz, M. A. (2011). Role of the pericarp of *Carya illinoensis* as biosorbent and as precursor of activated carbon for the removal of lead and acid blue 25 in aqueous solutions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 143-151.
- Hu, S. H., Wang, J. C., Hsieh, S. L., Chen, K. S., y Chang, S. J. (2008). Bioconversion of Agro Wastes for the Cultivation of the Culinary-Medicinal Lion's Mane

Mushrooms *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. and *H. laciniatum* (Leers) Banker (Aphylophoromycetidae) in Taiwan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 385-398.

Ibarra Islas, A. (2019). Aprovechamiento de residuos agroforestales en el cultivo de hongos Basidiomicetos.

Imtiaj, A., Jayasinghe, C., y Lee, G. W. S. (2009). Comparative Study of Enviromental and Nutritional Factors on the Mycelial Growth of Edible Mushrooms. *Journal of Culture Collections*, 97-105.

Imtiaj, A., Jayasinghe, C., Lee, G. W., Shim, M. J., Rho, H. S., Lee, H. S., Hur, H. Lee, M. W., Lee, U. Y., Lee, T.S. (2008). Vegetative Growth of Four Strains of *Hericium erinaceus* Collected from Different Habitats. *Mycobiology*, 88-92.

Israilide, C., y Philippoussis, A. (2003). Bio-technologies of recycling agro-industrial wastes for the production of commercially important fungal polysaccharides and mushrooms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 247-260.

Itahi, B. B., y Aguilar, R. H. (2019). Los hongos en Oaxaca. *Arqueología Mexicana*, 66-67.

Jalc, D., Siroka, P., y Ceresnakova, Z. (1997). Effect of six species of white-rot basidiomycetes on the chemical composition and rumen degradability of wheat straw. *The Journal of general and applied microbiology*, 133-137.

Ko, H. G., Park, H. G., Park, S. H., Choi, C. W., Kim, S. H., Park, W. M. (2005). Comparative study of mycelial growth and basidiomata formation in seven different species of the edible mushroom genus *Hericium*. *Bioresource Technology*, 1439–1444.

Ko, H. G., Park, S. H., Kim, S. H., Park, H. G., y Park, W. M. (2005). Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species. *Folia microbiologica*, 103-106.

Lett, L. A. (2014). Las amenazas globales, el reciclaje de residuos y el concepto de economía circular. *Revista argentina de microbiología*, 1-2.

- Litthauer, D., van Vuuren, M. J., van Tonder, A., y Wolfaardt, F. W. (2007). Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbial Technology*, 563-568.
- Loera, O., y Córdova, J. (2003). Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 177-181.
- Martínez-Carrera, D., Larqué-Saavedra, A., Aliphat, M., Aguilar, A., Bonilla, M., y Martínez, W. (2000). La biotecnología de hongos comestibles en la seguridad y soberanía alimentaria de México. *Memorias II foro nacional sobre seguridad y soberanía alimentaria* (págs. 193-207). México: Academia Mexicana de Ciencias-CONACYT.
- Méndez-Hernández, J. E., Loera, O., Méndez-Hernández, E. M., Herrera, E., Arce-Cervantes, O., y Soto-Cruz, N. Ó. (2019). Fungal Pretreatment of Corn Stover by *Fomes* sp. EUM1: Simultaneous Production of Readily Hydrolysable Biomass and Useful Biocatalysts. *Waste and Biomass Valorization volume*, 2637–2650.
- Milena-Yepes, S., Montoya-Naranjo, L. J., y Orozco-Sánchez, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales – frutas – en Medellín y el sur del valle del aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 4422-4431.
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., y Burton, A. L. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 127-132.
- Miranda, D. P. (2018). Material compuesto a partir del residuo cáscara de nuez *Juglans regia*. *RChD: creación y pensamiento*, 3(5).
- Mishra, R. K., y Mohanty, K. (2018). Pyrolysis kinetics and thermal behavior of waste sawdust biomass using thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*, 63-74.
- Montoya, B. S., Gallego, A. J., Sucerquia, G. Á., Peláez, B. B., Betancourt, g. Ó., y Arias, M. D. (2010). Macromicetos observados en bosques del

departamentode caldas: su influencia en el equilibrio y la conservación de la biodiversidad. *Boletín científico Centro de museos Museo de Historia Natural*, 57-73.

Montoya, B. S., Sánchez, T. Ó., y Levin, L. (2014). Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria*, 115-124.

Moreno Ruiz, N. A. (2013). Aislamiento de hongos y bacterias celulolíticos a partir del bagazo de caña de azúcar. Tesis para obtener el Título Profesional de Biólogo – Microbiólogo. *Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo*.

Naranjo, J. N., Almaraz, A. N., Herrera, C. J., y Ávila, R. J. (1998). Corteza de pino en el cultivo de hongo *Pleurotus sp.* In *II Congreso Mexicano de Productos Forestales. Morelia, Mich.*

NaturaLista. (15 de Octubre de 2019). Género *Hericium*. Obtenido de NaturaLista: <https://www.naturalista.mx/taxa/49158-Hericium-erinaceus>

NCBI. (2 de Noviembre de 2020). National Center for Biotechnology Information. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Ordaz, A., Favela, E., Meneses, M., Mendoza, G., & Loera, O. (2012). Hyphal morphology modification in thermal adaptation by the white-rot fungus *Fomes sp.* EUM1. *Journal of basic microbiology*, 52(2), 167-174.

Ozcariz-Fermoselle, M. V., Fraile-Fabero, R., Girbés-Juan, T., Arce-Cervantes, O., de Rueda-Salgueiro, J. A. O., & Azul, A. M. (2018). Use of lignocellulosic wastes of pecan (*Carya illinoensis*) in the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Revista iberoamericana de micología*, 35(2), 103-109.

Ozcariz-Fermoselle, M. V., de Vega-Luttman, G., Lugo-Monter, F. J., Galhano, C., & Arce-Cervantes, O. (2019). Promoting Circular Economy Through Sustainable Agriculture in Hidalgo: Recycling of Agro-Industrial Waste for

Production of High Nutritional Native Mushrooms. In *Climate Change-Resilient Agriculture and Agroforestry* (pp. 455-469). Springer, Cham.

Peláez, A., Meneses, M., Miranda, L., Loera, O., González, S., Alarcón, B., y Crosby, M. M. (2009). PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS POR CULTIVO SÓLIDO EN BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR CON DOS ESPECIES DE *Pleurotus*.

Philippoussis, A. N. (2009). Production of Mushrooms Using Agro-Industrial Residues as Substrates. En P. Singh-Nee Nigam, y A. Pandey, *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (págs. 163-196). Dordrecht: Springer.

Qinnghe, C., Xiaoyu, Y., Tiangui, N., Cheng, J., y Quiugang, M. (2004). The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, 1561-1566.

Rain, Noe. ¿Tirar aserrín es malo para el medio ambiente?

25 de Enero de 2016. <https://www.core77.com/posts/45618/Is-Dumping-Sawdust-Bad-for-the-Environment> (último acceso: 16 de Agosto de 2021).

Reyes-Reyes, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V. M., y López-Upton, J. (2005). Producción de plántulas de *Pinus pseudostrobus* var. apulcensis en sustratos a base de aserrín. *Revista Chapingo ser Ciencias Forestales y del Ambiente*, 105-110.

Rojas, R. L. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoría con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, 49-55.

Rosas-Calleja, D., Ortiz-Laurel, H., Herrera-Corredor, J., y Leyva-Ovalle, O. (2016). Revalorización de algunos residuos agroindustriales y su potencial de aplicación a suelos agrícolas. *Agroproductividad*, 18-23.

Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., y Taylor, P. (2012). The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 687-709.

- Royse, D. J., y Sánchez, J. E. (2017). Producción mundial de setas *Pleurotus spp.* con énfasis en países iberoamericanos. *El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula*, 17-25.
- SAGARPA. (2017). *Planeación agrícola Nacional 2017-2030*. México: SAGARPA.
- Sánchez-Córdova, T., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V. M., y López-Upton, J. (2008). Caracterización de medios de crecimiento compuestos por corteza de pino y aserrín. *Madera y bosques*, 14(2), 41-49.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 14-46.
- Schimpf, U., y Schulz, R. (2016). Industrial by-products from white-rot fungi production. Part I: Generation of enzyme preparations and chemical, protein biochemical and molecular biological characterization. *Process Biochemistry*, 2034-2046.
- SIAP. (2019). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Obtenido de Ficha por estado: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/FichaPorEstado.do
- Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Berkeley: Ten Speed Press.
- Stevenson, L., Phillips, F., O'sullivan, K., y Walton, J. (2012). Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *International journal of food sciences and nutrition*, 1001-1013.
- Suárez-Jacobo, A., Urzúa-Esteva, E., Cervantes-Martínez, J., García-Fajardo, J. A., Reytez-Vázquez, N. D., y Urrea-López, R. (2016). Retos y oportunidades para el aprovechamiento de la Nuez pecanera en México. Jalisco: CIATEJ.
- Thongbai, B., Rapior, S., Hyde, K. D., Wittstein, K., y Stadler, M. (2015). *Hericium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom. *Mycological Progress*, 14(10).

- Tovar-Herrera, O. Eduardo. Evaluación de un material lignocelulósico para la producción de celulasas, xilanasas y lacasas por basidiomicetos del Noreste de México. San Nicolás de los Garza, Noviembre de 2013.
- Vargas-Corredor, Y. A., y Pérez-Pérez, L. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 59-72.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Xiao, G., y Chapman, B. (1997). Cultivation of *Hericium abietis* on conifer sawdust. *Canadian Journal of Botany*, 1155-1157.
- Zhiheng, J. X. Y. Y. L., & Shuyun, F. (1997). A Study on the Optimum Vegetative Growth Conditions of *Hericium erinaceus*. *Acta Edulis Fungi*, 4(03), 35.
- Zhiheng, J. X. Y. Y. L., Shuyun, F. (1998). Studies on Regression Relation of Component Content in Sawdust Substratum to the Yield and Cultivation Period of *Hericium erinaceus* and the Best Combination of Substratum Component. *Acta Edulis Fungi*, 5(01), 27.

“Desde la materia vegetal muerta hasta los nemátodos y las bacterias, ¡nunca subestimes la inteligencia de los hongos para encontrar nuevos alimentos! Los hongos son los grandes recicladores del planeta y las especies de vanguardia en la restauración del hábitat.”

- Paul Stamets

