

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE MICROORGANISMOS
“SIXTO DAVID ROJO”**



**ESTUDIO DEL POTENCIAL DE *Pleurotus ostreatus* COMO ORGANISMO
PRODUCTOR DE UN SISTEMA LITICO CAPAZ DE FORMAR
ESFEROPLASTOS Y LISAR *Saccharomyces cerevisiae*.**

Tesis de Licenciatura presentada ante la Ilustre Universidad de Los Andes por
Br. Leonel Parra Briceño.

Como requisito parcial para optar al Título de
Licenciado en Biología

Realizado con la Tutoría del
Prof. Balmore Guerrero

Mérida, 2000

INFORME DEL JURADO NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES PARA CONSIDERAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL **BR. PARRA BRICEÑO LEONEL**

En Mérida, a los veinte días del mes de Marzo, a las 9:00 a.m. se reunieron los Profesores **Balmore R. Guerrero Cárdenas**, **Ramón Moreno Rodríguez** y **Guillermo López Corcuera** de la Facultad de Ciencias, miembros del jurado nombrado por el Consejo de la Facultad de Ciencias, para revisar el Trabajo Especial de Grado que sobre el tema “**Estudio del Potencial de *Pleurotus ostreatus* como organismo productor de un sistema lítico capaz de formar esferoplastos y lisar *Saccharomyces cerevisiae***”, presentado por el Bachiller:

PARRA BRICEÑO LEONEL

Titular de la Cédula de Identidad Nro. **V-10.711.729**, para optar al Título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

En la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Acto seguido se procedió a oír la exposición que sobre el tema arriba mencionado realizó el Bachiller **Parra Briceño Leonel**.

Después del correspondiente interrogatorio, el Jurado procedió a deliberar sobre la calificación del trabajo sometido a su consideración.

Finalmente, el Jurado lo declaró **Aprobado** con la Calificación de **Veinte (20) Puntos y Recomendado para su Publicación**.

Prof. Balmore Guerrero C.
(Tutor)

Prof. Ramón Moreno R.

Prof. Guillermo López C.

RESUMEN

ESTUDIO DEL POTENCIAL DE *Pleurotus ostreatus* COMO ORGANISMO PRODUCTOR DE UN SISTEMA LÍTICO CAPAZ DE FORMAR ESFEROPLASTOS Y LISAR *Saccharomyces cerevisiae*.

Parra B. Leonel

Pleurotus ostreatus es un hongo basidiomicete, que se caracteriza por crecer sobre una gran variedad de sustratos en medios de cultivo sumergidos. El medio mineral y *S. cerevisiae*, es un prospecto atractivo para el crecimiento de *P. ostreatus* y producción del sistema lítico. Después de 9 días de crecimiento, *P. ostreatus* excreta su sistema lítico, el sobrenadante se obtiene por centrifugación y filtración asépticamente, en donde se evidencia su existencia por la actividad presente sobre células de *S. cerevisiae* 0.5 g/l inactivadas por luz ultravioleta. Las condiciones de actividad determinadas fueron obtenidas en buffer fosfato de sodio – ácido fosfórico 50 mM pH 6, temperatura 35-40°C, con una actividad entre 50 y 80 U/l. Por otro lado, se logró formar esferoplastos en células de *S. cerevisiae* RC-112, observaciones al microscopio muestran las diferencias morfológicas entre las células tratadas con el sistema lítico y las que no son tratadas. Utilizando 100 µl de sobrenadante contentivo de sistema lítico y una densidad celular entre 5×10^6 y 2×10^7 cel/ml se logró formar esferoplastos en un 83% en células de *S. cerevisiae* RC-112 en una hora, mientras que utilizando una preparación de 100 mg/ml del mismo sobrenadante liofilizado, con 50 microlitros se obtiene un 90% de formación de esferoplastos en 20 minutos. El sobrenadante liofilizado mostró actividad sobre geles SDS-PAGE 7.5% conteniendo 0.4 % de células de *S. cerevisiae* previamente autoclavadas y liofilizadas. Al incubar el gel en las condiciones de actividad lítica determinadas por 16 horas, se observan cuatro bandas claras indicativo de actividad lítica y en geles nativos bajo las mismas condiciones tres bandas.

INDICE GENERAL

RESUMEN	v
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
CAPITULO II. MARCO TEORICO	
1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	3
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.1. La pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	10
2.2. Importancia de <i>S. cerevisiae</i>	10
3. Producción de protoplastos	12
4. Sistemas líticos	15
CAPITULO III. PROBLEMA	
1. Origen de la investigación	20
2. Hipótesis	21
3. Objetivos	21
CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS	
1. Materiales	23
Organismos	23
1.2. Reactivos	23
Medios de cultivo	23
2. Métodos	24
2.1. Producción del sistema lítico de <i>P. ostreatus</i> en diferentes medios de cultivo.....	24
2.2. Obtención del sobrenadante contenido del sistema lítico	25
2.3. Ensayos de la actividad del sistema lítico	25
2.4. Definición de las unidades de actividad lítica (U.A.)	28

2.5. Factores que influyen sobre la actividad del sistema lítico	28
2.6. Formación de esferoplastos en <i>S. cerevisiae</i> RC-112	28
2.7. Cuantificación de esferoplastos en <i>S. cerevisiae</i> RC-112	29
2.8. Detección del sistema lítico por electroforesis en geles de poliacrilamida con y sin SDS	30
2.9. Determinación de proteínas	31

CAPITULO V. RESULTADOS

1. Producción del sistema lítico de <i>P. ostreatus</i> en diferentes medios de cultivo	32
2. Obtención del sobrenadante contentivo del sistema lítico	34
3. Ensayos de la actividad del sistema lítico	35
Preparación del sustrato	35
Ensayo de la actividad	36
4. Factores que influyen sobre la actividad del sistema lítico	37
Efecto del pH	37
Efecto de la temperatura	39
5. Formación de esferoplastos por el sobrenadante contentivo del sistema lítico	43
6. Cuantificación de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> RC-112	46
Efecto del sobrenadante sobre la formación de esferoplastos	47
Efecto del tiempo sobre la formación de esferoplastos	48
7. Detección del sistema lítico de <i>P. ostreatus</i> por electroforesis en geles de poliacrilamida	53

CAPITULO VI. DISCUSION

CAPITULO VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Conclusiones	67
2. Recomendaciones	68

CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69
--	-----------

INDICE DE TABLAS

Tabla

IV.1. Ensayo de la actividad lítica	27
V.1. Crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en diferentes medios	32

INDICE DE FIGURAS

Figura

II.1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	3
II.2. Ciclo de vida de los basidiomicetos	5
II.3. Crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en cultivos sumergidos	7
II.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
V.1. Efecto del tiempo de incubación en el contenido de proteínas solubles en el medio mineral y <i>S. cerevisiae</i>	34
V.2. Tiempo necesario para inactivar diferentes concentraciones de <i>S. cerevisiae</i> por Luz ultravioleta	35
V.3. Efecto del pH sobre la actividad del sistema lítico	38
V.4. Determinación del pH óptimo de actividad del sistema lítico	39
V.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad del sistema lítico	40
V.6. Temperatura óptima del sistema lítico	41
V.7. Restos celulares observados al microscopio	42

V.8.	Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> RC-112	43
V.9.	Células de <i>S. cerevisiae</i> RC-112 tratadas con β -mercaptoetanol	44
V.10.	Células tratadas con el sistema lítico de <i>P. ostreatus</i>	45
V.11.	Lisis de esferoplastos formados tratados con 1 ml de agua destilada estéril.	46
V.12.	Efecto del volumen del sistema lítico en esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> RC-112	47
V.13.	Efecto del tiempo de incubación en la formación de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> RC-112	48
V.14.	Efecto del volumen de sobrenadante liofilizado (100 mg/ml) en la formación de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> RC-112	50
V.15.	Efecto del tiempo de incubación en la formación de esferoplastos en <i>S. cerevisiae</i> RC-112 con sobrenadante liofilizado (100 mg/ml)	51
V.16.	Lisis de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> y aparición de proteínas solubles	52
V.17.	Gel de poliacrilamida 12.5% con 0.2% de células enteras de <i>S. cerevisiae</i> ..	54
V.18.	Gel de poliacrilamida 7.5% con 0.4% de células enteras de <i>S. cerevisiae</i>	55
V.19.	Gel de poliacrilamida sin SDS 7.0% con 0.4% de células enteras de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	56

CAPITULO I

Introducción

La Biotecnología es un campo que se ha venido desarrollando en los últimos años, y consiste en la aplicación multidisciplinaria de conocimientos básicos en microbiología, genética molecular y bioquímica. Su finalidad es explorar nuevas estrategias metodológicas para el estudio y explotación industrial de los organismos.

Todas estas estrategias metodológicas se basan en aislar, identificar y estudiar la fisiología del crecimiento de los organismos y luego manipularlos para extraer de ellos una serie de productos metabólicos primarios y secundarios.

Los microorganismos utilizados en el campo de la biotecnología deben cumplir algunos requisitos, tales como el de producir los metabolitos o sustancias de interés en corto tiempo, a bajo costo y en un sustrato económico y biodegradable. También deben ser fácilmente separables del producto deseado.

Las bacterias, los hongos y las levaduras son los organismos que el hombre más ha explotado. Muchos de ellos cumplen con los requisitos planteados anteriormente, es decir, ofrecen la oportunidad de incrementar la producción de alimentos y también pueden actuar como procesadores biológicos de desechos de origen industrial, agrícola y humano (Halász y Lazstity, 1991).

Pleurotus ostreatus es un hongo que ha sido intensamente estudiado por sus propiedades, tiene un fácil crecimiento sobre residuos y desechos agroindustriales. Su contenido proteico se ha utilizado como alimento de consumo humano y animal.

Saccharomyces cerevisiae, es una levadura utilizada industrialmente en la fermentación de alcohol, elaboración de vinos y obtención de proteínas unicelulares, ampliamente utilizado en los laboratorios de microbiología y en la elaboración de alimentos de consumo humano y animal.

Actualmente el Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, se ha interesado en el estudio de estos dos organismos, debido a sus muchas propiedades de interés. Una de ellas es que *P. ostreatus* es capaz de crecer sobre un medio compuesto sólo por agua y *S. cerevisiae*, comportándose ésta última como única fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento de *P. ostreatus*. Este hecho crea una serie de interrogantes respecto a la fisiología de *P. ostreatus* en cuanto al consumo de levadura, de las cuales se discutirán mas adelante.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

1. Pleurotus ostreatus

Según García (1976), citado por Guerrero (1995), *P. ostreatus* Jacq. ex Fr. es un hongo, formado por sombrero carnoso, convexo o casi aplanado, en forma de lengua, concha o abanico, de 5 a 25 cm de diámetro; fructifica generalmente en grupos imbrincados, insertos por un costado a través de un pie lateral rudimentario. La superficie es lisa, su coloración varía entre gris o pardo ahumado, pardo-violáceo o pizarra, palidece y se pone de color ocre o amarillo cuando envejece.

Las hifas son microscópicas y están bien septadas, éstas penetran en el sustrato para absorber los nutrientes. Son fácilmente visibles cuando forman conjuntos (Alexopoulos y Mims, 1987).

Los mismos autores clasifican el hongo *P. ostreatus* de la siguiente manera:

Reino: Fungi
División: Amastigomycota
Sub-División: Amastigomycotina
Clase: Basidiomycete
Orden: Agaricales
Familia: Tricholomataceae
Género: *Pleurotus*
Especie: *ostreatus*.

Además, exponen que el micelio de los basidiomicetes durante su ciclo de vida pasa por tres estados o etapas de desarrollo de la siguiente manera:

El micelio primario: se inicia con la germinación de las basidiosporas, El micelio producto de la germinación se da de forma multinucleada, ya que el núcleo o los núcleos haploides de las basidiosporas se dividen muchas veces a medida que emergen del tubo germinativo. Como la fase multinucleada del micelio es corta se lleva a cabo la formación de los tabiques que dividen al micelio en células uninucleadas.

El micelio secundario: se origina del micelio primario, a través de la fusión de los protoplasmas de dos células uninucleadas haploides sin que ocurra cariogamia. Las células binucleadas que se forman, producen una rama a la cual migra el par de núcleos; estos dos núcleos hermanos se convierten en las dos células hijas para dar inicio a la formación del micelio binuclear.

El micelio terciario: representado por los tejidos especializados que se originan para formar el pleuroma de *P. ostreatus*. Las células del micelio terciario son binucleadas, los esporangios se originan realmente cuando el micelio secundario forma tejidos complejos.

En medios de cultivo sólidos, aunque son más económicos, generalmente sirven para producir cuerpos fructíferos (micelio terciario) y para enriquecer los desechos y residuos agroindustriales, como lo han obtenido Guerrero (1995) y Nicolini y col. (1987).

Los sustratos generalmente utilizados para producir *P. ostreatus* han sido el pedúnculo de la uva, conchas de naranja, (Nicolini y col. 1987), pulpa de café y fibra de coco (Chocooj y col. 1988; González y col. 1993), mezclas de aserrín (Yoshida y col. 1993), algodón (Jeong y col. 1996), salvado y paja de arroz y de cebada (Ortega y col, 1986), bagacillo de caña de azúcar (Guerrero, 1995). Sus rendimientos han dependido de la calidad del sustrato y de la cepa utilizada.

Recientemente, los medios de cultivo líquidos se han convertido en un prospecto atractivo para la obtención y producción de micelio secundario de basidiomicetos; en estas condiciones los hongos se desarrollan formando grumos o esférulas cuyos tamaños pueden variar.

Humfeld y sugihara (1952) describen un proceso para la producción de micelio comestible de *Agaricus campestris* en cultivos sumergidos. Sus resultados indican que los requerimientos nutritivos para el crecimiento del hongo en estas condiciones son: (nitrógeno 1.5 a 2, fósforo 0.3 a 0.4, potasio 0.1 a 0.3, azufre 0.2, magnesio 0.02 y 0.002 g/l de hierro y zinc). Se emplea la glucosa como la mejor fuente de carbono.

Hadar y Cohen (1986), estudian la composición química del micelio de *P. ostreatus* en cultivos sumergidos y, al compararla con la de los cuerpos fructíferos, no observan diferencia alguna. Existe una gran similitud en cuanto al contenido de nitrógeno, proteínas, glicógeno, ácidos grasos totales y contenido de aminoácidos, lo que cataloga a *P. ostreatus* como un hongo con propiedades nutritivas cuando es crecido en medios líquidos.

Pazos (1999), cultivó *P. ostreatus* en agua con levadura inactivada por calor. En su trabajo no observó diferencias morfológicas significativas en la producción de esférulas del hongo con las obtenidas en medios convencionales (M-200).

De esto se puede inferir que el crecimiento de *P. ostreatus* en cultivos sumergidos, con *S. cerevisiae* como sustrato no convencional, no altera significativamente el crecimiento del hongo y, que este sustrato se puede convertir en una fuente de carbono y nitrógeno para la producción de micelio secundario, metabolitos y enzimas de interés industrial.

La importancia y utilidad del micelio de *P. ostreatus* no sólo se deben al potencial que tiene para crecer sobre la variedad de sustratos nombrados anteriormente, sino porque su cuerpo fructífero es comestible.

Otras razones por las que *P. ostreatus* es un hongo de gran importancia son los resultados de estudios en biodegradación y biorremediación, en los que se ha encontrado que puede crecer en suelos contaminados con petróleo y compuestos aromáticos, lográndose disminuir de un 47% a un 10 y 12% el grado de contaminación (Yateem y col. 1998; Martens y Zadrazil, 1998).

Por otra parte, Bobek y col. (1998), estudiaron el efecto de la inclusión de micelio de *P. ostreatus* en la dieta de ratones con cáncer de colon, y encontraron una supresión de los tumores entre 40 y 50%.

También en ratas enfermas alimentadas con cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* se observa disminución de los efectos anti-hiperlipidémicos, antihipocolesterolémicos, colesterolémicos, (Opletal y col. 1997; Bajaj y col. 1997).

P. ostreatus se ha utilizado en la producción de enzimas y metabolitos de interés industrial (Tan col. 1997; Shin y col. 1997; Palmieri y col. 1997) y por último, a nivel molecular en la caracterización de genes involucrados en la producción de enzimas (Mandal y col. 1998; Sarkar y col. 1997; Bezalel y col. 1997; Matsumoto y Fukumasa, 1996).

Pazos (1999), logró producir micelio secundario de *P. ostreatus* en un medio contentivo de agua y *S. cerevisiae*, variando la concentración de ésta desde 0.1 hasta 40 g/l, la mayor cantidad de micelio secundario (1.6 g/l) la obtuvo en el medio agua y *S. cerevisiae* a 10 g/L. A concentraciones de *S. cerevisiae* inferiores a 10 g/L el crecimiento de *P. ostreatus* es menor, inhibiéndose a concentraciones superiores.

Estos resultados indican que *P. ostreatus* puede utilizar *S. cerevisiae* como única fuente de carbono y nitrógeno; sin embargo en la bibliografía consultada no se encontraron referencias al respecto.

2. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae, es descrita como un hongo unicelular, eucariote, de forma redonda u ovalada, de dimensiones microscópicas. Su diámetro oscila entre 6 y 10 micras (Benion, 1980). Su citoplasma está cubierto por una envoltura celular que consta de membrana plasmática y pared celular (Rainbow y Rose, 1963).

2.1. La pared celular de *S. cerevisiae*

Constituye un 15 a 20% del peso seco de la célula, y químicamente consta de una capa interna de glucán y una pared externa compuesta por glucán, manán, algunas proteínas y quitina. Los carbohidratos varían entre 60 y 91%, proteínas de 6 a 13% y lípidos de 2 a 8,5% (Rainbow y Rose, 1963).

Tiene como función: proteger mecánicamente la célula del ambiente, evitando su ruptura osmótica por efecto de la presión de turgor; actuar como red protectora de la membrana celular (Cabib y col. 1988), servir como reserva metabólica de nutrientes, tales como: carbohidratos, aminoácidos, grupos fosfatos y cationes. También es el sitio donde se localizan los antígenos somáticos y, participa en las interacciones con otros organismos durante el apareamiento y la aglutinación, y el medio ambiente (Farkas, 1990).

2.2. Importancia de *S. cerevisiae*

Entre las levaduras, *S. cerevisiae* ha sido la más exhaustivamente estudiada. Su aplicación tradicional incluye la elaboración de importantes productos tales como pan, vino, cerveza, sake, bebidas destiladas, etc., todo lo cual es el resultado de la fermentación llevada a cabo por ciertas cepas (Hinchliffe, 1998; James y Murray 1995).

Actualmente, existe la necesidad de producir grandes cantidades de proteínas para consumo humano y animal, para resolver este problema han surgido varias opciones. La proteína unicelular (PUC) es una de ellas, se ha convertido en una de las fuentes no convencionales más importantes de proteínas (Kharatyan, 1978).

Entre los microorganismos útiles al hombre para tal fin se encuentran las levaduras, muy empleados en la producción de proteínas para consumo animal. Pueden ser utilizadas como células intactas o exponiendo sus componentes por destrucción parcial o total de la pared celular (Halász y col. 1991).

Su genética ha sido más estudiada entre los eucariotas, de tal manera que puede ser manipulada genéticamente con gran facilidad casi tanto o igual que *Escherichia coli*.

Alguna de las propiedades que la hacen adecuada para estos estudios biológicos son su rápida tasa de crecimiento en medios de cultivo sencillos y su genoma relativamente pequeño del que se ha tenido una gran cantidad de información (Molzahn, 1993).

Para llevar a cabo su manipulación genética en la Biología Molecular e Ingeniería Genética, se requiere de un método que permita insertar y transportar el ADN a las células de levadura a ser transformadas. Actualmente, el método utilizado incluye la formación de protoplastos y esferoplastos. El método de generación de esferoplastos se hace removiendo la pared celular de las levaduras con tratamientos enzimáticos (utilizando liticasas o zimoliasas), posteriormente las levaduras son colocadas en presencia de iones de calcio y polietilenglicol (PEG), en soluciones isotónicas con sorbitol 1 M (Hinnen y col., 1978). La eficiencia de transformación por este método no depende en sí del método sino de la capacidad que tenga la levadura de regenerar su pared celular y de su resistencia a la metodología aplicada.

3. Producción de Protoplastos

El término protoplasto se utiliza frecuentemente como sinónimo de esferoplasto, aunque las dos palabras poseen significados distintos: los protoplastos por lo general carecen de restos de pared celular, a diferencia de los esferoplastos en los que habitualmente existen porciones de pared unidas a la membrana (Mandigan y col. 1997).

Los protoplastos han sido preparados de bacterias, levaduras, hongos y plantas superiores. En levaduras y hongos se inició con *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, considerados como organismos patógenos. Los tratamientos para la formación de protoplastos se realizaron con la finalidad de estudiar la composición de la membrana plasmática y la identificación de agentes causantes de sensibilidad y resistencia a antibióticos (Peberdy y col., 1976). Además, como los protoplastos han formado parte de las investigaciones micológicas, los trabajos que se iniciaron con levaduras consistieron en remover la pared celular y así obtener organelas de interés para realizar estudios fisiológicos, dirigidos hacia la regeneración de la pared celular y reversión de la forma celular normal (Peberdy y Ferenczy, 1985).

Con el nacimiento de la biología molecular y la genética, la formación de protoplastos se ha intensificado en los procesos de transformación.

Saccharomyces cerevisiae (Murai y col. 1997), *Candida maltosa* (Sasnauskas y col. 1992; Ohkuma y col. 1993), *C. tropicalis* (Sanglard y Fiechter, 1992), *Hansenula anomala* (Ogata y col. 1995), *H. polymorfa* (Gleeson y col. 1986), *Sporobolomyces salmonicolor* (Kaul y col. 1993), han sido sólo algunas de las levaduras estudiadas para llevar a cabo procesos de transformación, inserción y expresión de genes utilizando vectores de expresión con características integrativas y replicativas, y para desarrollar mutantes conteniendo genes de expresión de enzimas de interés.

Kaul y col (1993), lograron obtener después de 60 minutos de incubación entre 80 y 90% de esferoplastos en *Rhodotorula rubra* DSM70403 y *Sporobolomyces salmonicolor* DSM70851. Hasta entonces en *S. salmicolor* no se había logrado obtener protoplastos con enzimas líticas comerciales. En el proceso se utilizaron simultáneamente 100 µL de sobrenadantes de cultivos de *Streptomyces* y de *Acremonium*.

En los hongos filamentosos los estudios se han dirigido a la síntesis y arquitectura de la pared celular, la biosíntesis de metabolitos y la consecuencia que tiene la falta de ellos. La formación de protoplastos depende de una degradación parcial o total de la pared hifal por las enzimas líticas utilizadas (Peberdy y col. 1976).

En *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *Aspergillus nidulans*, *Agaricus bisporus*, *A. Bitorquis*, *A. Arvensis*, *Scytalidium thermophilum* se han logrado obtener protoplastos para estudios de transformación, y demostrar que las enzimas líticas utilizadas y puestas en venta por las casas comerciales, puedan ser específicas o de amplio espectro (<http://www.agro.nl/appliedresearch/PC/enzy-me.htm>).

Los basidiomicetes *Collybia veltipes* y *Pleurotus ostreatus* son los mas estudiados con respecto a la formación de protoplastos, al respecto Yamada y col. (1983), encuentran que la proporción en formación y regeneración de protoplastos miceliales del micelio joven es mayor que la del micelio viejo. Para estos casos la cantidad de enzima y la edad de los cultivos juega un papel importante.

En las plantas para llevar a cabo la formación de protoplastos, se requiere de enzimas tales como celulasas y hemicelulasas, las células utilizadas han sido aisladas de las hojas del mesófilo o de los callos, las técnicas desarrolladas son efectivas en plantas de tabaco, belladona, tomate, papa, arveja, espárragos, alfalfa y naranja (Gleba y col. 1984).

La finalidad de hacer protoplastos en plantas es la de producir mediante la fusión de los mismos híbridos con resistencia a una gran cantidad de enfermedades.

Según Odreman (1996) los métodos empleados para la obtención de esferoplastos en levaduras consumen mucho tiempo. Pero, actualmente se han encontrado enzimas líticas y sistemas líticos que logran disminuir este tiempo, y tienden a ser más específicos.

4. Sistemas líticos

Los sistemas líticos tienen como función principal digerir las paredes celulares de las bacterias, hongos, levaduras y células vegetales.

La lisis o la formación de protoplastos utilizando enzimas líticas, es una técnica que ha recibido atención en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones en las industrias biotecnológica y alimenticia. Han sido ampliamente aceptados en los laboratorios para la formación y producción de protoplastos de bacterias y levaduras (De Vries y Wessels, 1972; Corner y Marquis, 1969).

Las enzimas con acción lítica sobre paredes celulares de levadura son producidas por una amplia variedad de microorganismos, sin embargo no todos los sistemas enzimáticos capaces de solubilizar paredes celulares logran lisar células intactas de levadura (Vrsanská y col., 1985).

Un ejemplo de ello es el funcionamiento de las enzimas líticas y sistemas líticos que recientemente se han aislado. Estos pueden actuar de manera individual o formando complejos. La mayor parte de las enzimas líticas aisladas, tales como: novozynas, glucosidasas, zymoliasas y helicasas, glucanasas, quitinasas, manasas, manosidasas y proteasas pueden mostrar una alta actividad de forma individual, pero cuando se

encuentran en conjunto la actividad es mucho mayor al momento de digerir paredes celulares.

Los sistemas líticos con actividad sobre paredes celulares provienen de diferentes especies de *Actinomycetes*, *Artrhobacter*, *Candida*, *Helix pomatia*, *Micromonospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Streptomyces*, *Oerskovia santhineolytica*, *Trichoderma reesei* (Peberdy y col. 1976; Peberdy y Ferenczy, 1985; Moreno, 1991; Hernández, 1995)

Otras especies son reconocidas por su producción de enzimas líticas, que pueden actuar sobre alguno de los componentes de las paredes celulares de las bacterias, hongos, levaduras y células vegetales.

Al respecto, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, produce una enzima degradadora de peptidoglicano que tiene una alta actividad sobre las paredes celulares de *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* y *Pediococcus damnosus*. El gen que codifica esa enzima ha sido identificado y clonado en *E. coli*, la cual una vez purificada y caracterizada bioquímicamente fue catalogada como una enzima perteneciente al grupo de las L-lisinas Mur. (Vasala y col. 1995).

Pseudomonas aeruginosa produce una enzima lítica específica, que al ser tratada con inhibidores de la lisozima no pierde su actividad, ésta logró lisar células de *P. aeruginosa*, *Micrococcus lysodeikticus* y *S. cerevisiae*. Su estudio se realizó con la finalidad de buscar las condiciones óptimas para producirla, y obtener información concerniente a su aplicación industrial para la preservación de alimentos (Wang y col. 1995).

Especies de *Arthrobacter* se han estudiado por producir enzimas líticas con actividad sobre los componentes de la pared celular de levaduras. Al utilizar como fuente de carbono la laminarina, el manán y paredes celulares de levadura, para el crecimiento de

Arthrobacter, se demostró el carácter inducible de la β -glucanasa y la α -mananasa. Esto hace pensar que, las glucanasas y diferentes sistemas enzimáticos se sintetizan en respuesta a carbohidratos inductores específicos (John y Hampel, 1991, Hernández, 1995,).

Latzko y Hampel (1995) cultivaron especies de *Arthrobacter* sobre diferentes medios de crecimiento para inducir actividad endoquitinasa (quitina coloidal, pared celular de levadura, micelio de *Trichoderma reesei*, N-acetilglucosamina, y mezclas de N-acetilglucosamina con acetato) como fuente de carbono, la velocidad de crecimiento en cada medio varió. En los cultivos con quitina coloidal se obtuvo mejor crecimiento y se produjo la máxima actividad de la enzima, el valor de $\mu_{\text{máx}}$ fue de 0.23 h^{-1} y produjo 2700 mU L^{-1} . Ambos autores concluyen que los sustratos juegan un papel importante durante la producción de las enzimas, es decir, la formación de enzima es fuertemente inducida por la quitina coloidal pura.

Los medios de producción de enzimas y sistemas líticos también juegan un papel muy importante. Moreno (1991) estudiando la producción de enzimas líticas por *Trichoderma reesei* QM9414, encontró que el medio contentivo de sales minerales tales como fosfato de potasio monobásico, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio y células muertas de *Candida utilis* resultó ser satisfactorio.

En las especies de *Arthrobacter*, los medios de cultivo para la producción de enzimas líticas han sido preparados con paredes celulares de levadura como fuente de carbono y una fuente de sales minerales compuesta por sulfato de amonio, fosfato de potasio monobásico y dibásico, sulfato de magnesio, tiamina y biotina (John y Hampel 1991-1992; Latzko y Hampel, 1995).

En la actualidad, no se disponen de métodos únicos para la detección de la actividad de enzimas y sistemas líticos. Moreno (1991), propone un método para hacer determinaciones de actividad del sistema lítico de *Trichoderma reesei* QM9414 en el que utiliza una mezcla del sobrenadante del cultivo y una suspensión de *Candida utilis* tratada por calor y/o por solventes orgánicos, y sigue el proceso por el descenso en la absorbancia a 540 nm.

Østlie y col. (1995) detectaron enzimas líticas de cepas de lactococos por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo células enteras de *Micrococcus luteus*.

Tradicionalmente se ha efectuado la lisis de *S. cerevisiae* mediante métodos de sonicación o prensado, sin embargo, la eficiencia es muy baja o resulta costoso ya que las levaduras como fue indicado, presentan una pared celular muy compleja que impiden el libre acceso de agentes químicos y físicos, ácidos nucleicos, antibióticos y otras macromoléculas (Tuite y Oliver. 1991). Sin embargo, se han convertido en blancos perfectos para ser lisadas por enzimas líticas.

Como ya hemos indicado, los métodos químicos por solventes orgánicos e inorgánicos y detergentes utilizados industrialmente, a pesar de generar buenos resultados son contaminantes y costosos. Es por ello que, si se dispusiera de un método enzimático tal como el que se propone en este trabajo, sería más ventajoso al disminuir el grado de contaminación generado por los métodos mecánicos y químicos, y sería más económico.

CAPITULO III

PROBLEMA

1. Origen de la investigación

Este trabajo se origina como consecuencia de la contaminación de hongos en un cultivo de *S. cerevisiae* en M-200.

Como las características de los contaminantes no se conocían, se hicieron pruebas utilizando a *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus*, para ver si presentaban el mismo comportamiento (trabajo no publicado).

En un medio compuesto por agua y *S. cerevisiae* inactivadas por calor, los hongos crecieron después de tres días, utilizando la levadura como fuente de carbono y nitrógeno.

Los siguientes estudios se realizaron con *P. ostreatus* por presentar características y propiedades interesantes, las cuales ya se mencionaron en el contexto de este trabajo.

De acuerdo a las pruebas anteriores, Pazos (1999), optimizó un medio no convencional compuesto sólo por agua y *S. cerevisiae* inactivada por calor, para la producción de biomasa de *P. ostreatus* utilizando el modelo estadístico de superficie de respuesta Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR).

Sin embargo, quedaron algunas interrogantes por responder tales como: ¿bajo qué condiciones se lleva a cabo el crecimiento de *P. ostreatus* sobre este medio?, ¿Hay alguna sustancia o sustancias excretadas por el hongo involucradas en la lisis de la levadura?, ó sólo ¿ocurre una autólisis en las levaduras la cual, es aprovechada por el hongo? .

En la bibliografía consultada no se encontraron referencias de que *P. ostreatus* sea capaz de producir metabolitos, enzimas ó sistemas líticos para digerir paredes celulares de bacterias, hongos, levaduras y células vegetales. Sin embargo, se podría inferir que el hongo excreta sustancias que digieren la pared de *S. cerevisiae*.

Es por ello que nos hemos planteado la siguiente hipótesis.

2. Hipótesis

Pleurotus ostreatus puede crecer en cultivos sumergidos en medio mineral y con *S. cerevisiae* como fuente de carbono y nitrógeno. En este medio, *P. ostreatus* debe excretar sistemas líticos, los cuales podrían digerir la pared celular de *S. cerevisiae* hasta obtener esferoplastos y producir lisis en condiciones controladas.

3. Objetivos

Para verificar la hipótesis, se plantean los siguientes objetivos:

- Producir el sistema lítico de *Pleurotus ostreatus* en un medio compuesto por sales minerales y células enteras de *S. cerevisiae* comercial inactivadas por calor.
- Determinar las condiciones óptimas de temperatura y pH para la actividad del sistema lítico de *P. ostreatus* sobre células enteras de *S. cerevisiae* comercial inactivadas por luz ultravioleta de onda corta.
- Formar esferoplastos de *S. cerevisiae* RC-112 con el sistema lítico de *P. ostreatus*.
- Detectar la actividad lítica a través de electroforesis en geles de poliacrilamida, con y sin SDS, contentivos de células enteras de *S. cerevisiae* comercial.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Organismos

- *Pleurotus ostreatus* ATCC 9415, del cepario de Biotecnología de Microorganismos. El hongo se mantiene en cuñas de M-200 de composición mencionada en el punto IV.1.3. Se conserva en la oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.
- *Saccharomyces cerevisiae* distribuida comercialmente por LEVAPAN..
- *Saccharomyces cerevisiae* RC-112, donada por el profesor Julio Delgado de la Pontificie Universidad de Javeriana. Se conserva en cuñas con medio YPD mencionado en IV.1.3 a 4 °C.

1.2. Reactivos

Las sales minerales para preparación de medios y sistemas buffer son de grado analítico. Para la preparación de geles de poliacrilamida con y sin SDS se utilizan reactivos de grado electroforético.

1.3. Medios de cultivo

- **Medio YPD:** Contiene por litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa. (The American Type Culture Collection, 1978)

- **Medio 200:** Contiene por litro: 3 g de extracto de levadura, 3 g de extracto de malta, 5 g de peptona de caseína y 10 g de glucosa. El medio sólido contiene 20 g de agar. pH 6.0 (The American Type Culture Collection, 1978).
- **Medio mineral sin fuente de carbono:** Contiene por litro: KH_2PO_4 2g., CaCl_2 0.3g., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g. y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g. pH 6.0 (Moreno, 1991)
- **Medio mineral con glucosa como fuente de carbono:** Contiene todos los ingredientes del medio mineral y 20 g/L de glucosa. pH 6.0.
- **Medio agua y *S. cerevisiae*:** Medio líquido preparado con agua y 10 g/L de *S. cerevisiae* comercial. pH 6.0 (Pazos, 1999).
- **Medio mineral y *S. cerevisiae*:** Contiene todos los ingredientes del medio mineral y 10 g/L de *S. cerevisiae*. pH 6.0.

Los medios se esterilizan a 121°C por 15 minutos.

2. Métodos

2.1. Producción del sistema lítico de *P. ostreatus* en diferentes medios de cultivo

Para la producción del sistema lítico se prepara en matraz erlenmeyer 25ml de preinóculo en M-200 , en el que se obtienen esférulas del hongo. Después de crecido en agitación a 30°C por 4 días, se toman dos esférulas y se inocula cada uno de los medios de cultivo (medio mineral sin fuente de carbono, medio mineral y glucosa, medio mineral y *S. cerevisiae*, medio agua y *S. cerevisiae*), preparados en matraces erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio. Se incuba en agitación a 240 rpm durante 9 días a 30°C.

Se observa macroscópicamente el crecimiento del hongo.

2.2. Obtención del sobrenadante contentivo del sistema lítico

De la experiencia anterior, se escoge el medio donde se obtiene el crecimiento más abundante. Se preparan 1200 ml de medio de cultivo, repartidos en matraces erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio, y se inoculan con dos esferulas de *P. ostreatus*. Luego, se incuban en las condiciones indicadas.

Al final de la incubación, los cultivos se filtran asépticamente con un tamiz, el sobrenadante obtenido se centrifuga a 9000 rpm (Labofuge II RC-5B) por 15 minutos, para precipitar células y restos celulares. Este sobrenadante se filtra a través de filtro millipore con membrana de 0.45 micras (Ester de celulosa 0.45 μ m, diámetro 25 mm, modelo A045A025A) y, se divide en dos partes.

200 ml, se almacenan a 4°C y el resto se liofiliza. El liofilizado en hojuelas, se guarda a -10°C. Ambos se utilizan en experiencias posteriores.

2.3. Ensayos de la actividad del sistema lítico

2.3.1. Preparación del sustrato

Para detectar la actividad lítica se utiliza como sustrato la levadura *S. cerevisiae* comercial, previamente tratada como se indica a continuación:

S. cerevisiae se resuspende en agua estéril a concentraciones que varían entre 0.5 y 8 g/L. Volúmenes de 50 ml se transfieren a una caja de petri de 13.3 x 2 cm y se agita. La suspensión agitada, se irradia por dos horas con luz ultravioleta de onda corta (Minerallight R-52G, 60 Hz. 0.90 Amp. 254 nm), a una distancia de 6.5 cm de altura. Para determinar el porcentaje de mortalidad (inactivación), se toma 0.1 ml de la suspensión irradiada a diferentes tiempos y se siembra en placas con M-200 en agar. Las placas sembradas se

incubaban a 30°C por 36 horas aproximadamente hasta observar presencia y ausencia de colonias en los diferentes tiempos.

Se observa al microscopio (FOTOMICROSCOPIO ULTRAPHOT Zeizz) la morfología de las células irradiadas y se determina contenido de proteínas solubles por Lowry (1951) en el sobrenadante de las células irradiadas.

2.3.2. Sistemas Buffer.

Los sistemas buffer que se preparan para detectar el pH óptimo del sistema lítico son los siguientes:

- Buffer con pH entre 3.7 y 5.0:

Acetato de sodio – Acido acético 50 mM.

- Buffer con pH entre 6.0 y 8.0:

Fosfato de sodio dibásico – fosfato de sodio monobásico 50 mM.

2.3.3. Ensayo de la actividad

Para detectar la actividad lítica del sobrenadante preparado en IV.2.2., se sigue el método empleado por Moreno (1991), con algunas modificaciones. Las condiciones de ensayo se indica en la tabla IV.1.

Tabla IV.1. Ensayo de la actividad lítica

Mezclas de reacción	<i>S. cerevisiae</i> 0.5 g/L Irradiada por Luz UV	Buffer pH 3.7 – 8.0	Sobrenadante Actividad Lítica
Muestra	3	3	3
Blanco 1	3	6	0
Blanco 2	0	6	3
Blanco 3	3	3	3*

* Sobrenadante hervido por 5 minutos.

El Blanco 1 se prepara para descartar autólisis de *S. cerevisiae*. El Blanco 2 para descartar variación de la absorbancia a 540 nm por cambios de color en el sobrenadante y el Blanco 3 con sobrenadante hervido por 5 minutos como valor inicial de absorbancia. Las mezclas se incuban a 30°C en agitación por un tiempo de 6 horas y la actividad lítica se sigue por disminución de la absorbancia a 540 nm.

Se observan al microscopio las mezclas de reacción después de 6 horas, para diferenciar cambios morfológicos o lisis del sustrato en las mezclas con actividad y sin actividad.

2.4. Definición de las unidades de actividad lítica (U.A.)

Una unidad de actividad lítica provoca la disminución de absorbancia a 540 nm de 0.01 unidad/hora en una suspensión de *S. cerevisiae* en las condiciones indicadas.

2.5. Factores que influyen sobre la actividad del sistema lítico

Los factores estudiados en este trabajo son pH y temperatura.

Las mezclas para los análisis de actividad del sistema lítico se incuban en buffer acetato de sodio y fosfato de sodio 50 mM con valores de pH comprendidos entre 3.7 y 8.0.

Una vez determinado el pH óptimo de actividad del sistema lítico, se procede a determinar la temperatura óptima.

La temperatura se varía entre 25 y 50 °C. Las mezclas se preparan al pH determinado y como se describe en IV.2.3.3.

2.6. Formación de esferoplastos en *S. cerevisiae* RC-112.

A partir de una colonia de *S. cerevisiae* RC-112, se prepara un precultivo en 5 ml de medio YPD. Se deja incubar con agitación a 150 rpm a 30°C durante toda la noche. Al día siguiente, en un erlenmeyer de 100 ml se preparan 20 ml de medio YPD y se inocula con 1 ml del precultivo. Se incuba en agitación a 30 °C hasta alcanzar una densidad celular entre 5×10^6 y 2×10^7 cel/ml.

Las células se observan al microscopio para descartar contaminación, luego se colectan por centrifugación durante 10 minutos a 4000 rpm (Centrífuga Eppendorff 5415C) en tubos eppendorf. Se lavan con 1ml de agua destilada esteril. Se centrifuga nuevamente a 4000 rpm por 10 minutos y las células se resuspenden en 1 ml de sorbitol 1M. Se añade 0.05 ml de β -mercaptoetanol y diferentes volúmenes de sobrenadante contenido del sistema lítico entre 25 y 300 μ L. Se incuba por 2 horas en agitación a 37.5°C.

La aparición de los esferoplastos se sigue observando al microscopio la morfología de las células con y sin tratamiento.

2.7. Cuantificación de esferoplastos en *S. cerevisiae* RC-112.

Las células tratadas como se indicó anteriormente, se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos, un grupo se resuspende en condiciones isotónicas en 1 ml de sorbitol 1M y el otro grupo en condiciones hipotónicas en 1ml de agua destilada estéril.

Se mide la variación de la absorbancia a 540 nm de las células resuspendidas en sorbitol 1M y las resuspendidas en agua destilada estéril.

Finalmente, el contenido de proteínas solubles después de la lisis también es medido.

El porcentaje de esferoplastos formados se cuantifica a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Esferoplastos} = \frac{(\text{D.O. Células Sorbitol 1M})_{540\text{nm}} - (\text{D.O. Células H}_2\text{O})_{540\text{nm}}}{(\text{D.O. Sorbitol 1M})_{540\text{nm}}} \times 100$$

2.8. Detección del sistema lítico por electroforesis en geles de poliacrilamida con y sin SDS.

Los geles de poliacrilamida 12.5 y 7.5% se preparan según Østlie y col. (1995), con 0.2% y 0.4% de células de *S. cerevisiae* autoclavadas y liofilizadas como sustrato para detectar actividad lítica. El gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) 12.5% y 7.5% se lleva a cabo tal como lo describe Laemmli (1970). El gel nativo 7% como lo describe Davis (1970). Las electroforesis se realizan a temperatura ambiente, 20 mAmp/gel.

En cada uno de los pozos, se coloca sobrenadante sin hervir y hervido. Después de la electroforesis, los geles se lavan con 250 ml de agua destilada con baja agitación por 1 hora, luego se incuban entre 16 y 20 horas en las condiciones de temperatura y pH

determinados en el punto IV.2.5, conteniendo 1% de tritón X-100. El gel se revela con la solución colorante de azul de comassie y la actividad lítica se detecta como bandas claras en el gel opaco.

Para conservar el gel, se seca en un secador de geles. Se fotografía y se invierte el fotografiado para obtener un “fondo negro”.

2.9. Determinación de proteínas

En todos los casos, el contenido de proteínas solubles en los sobrenadantes se determina por el método de Lowry (1951).

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

Actualmente, los sistemas líticos y los microorganismos que los produce han recibido mucha atención, este estudio nos permite iniciar el conocimiento del sistema lítico del hongo *P. ostreatus*, punto sobre el cual no se encontró referencias en la bibliografía estudiada.

P. ostreatus se caracteriza por crecer sobre una gran variedad de sustratos, sin embargo, para la producción del sistema lítico se utilizó como sustrato *S. cerevisiae* comercial granulada, ya que este hongo puede utilizarla como única fuente de carbono y nitrógeno (Pazos, 1999) y, es de suponer que la presencia de levaduras intactas induce en el hongo la producción del sistema que digiere la pared de ésta.

Esto último estaría de acuerdo con lo reportado por Garzillo y col. (1994), los cuales estudiaron las propiedades hidrolíticas de celulasas extracelulares de *P. ostreatus*, y encontraron que la actividad celulasa se induce cuando *P. ostreatus* es cultivado sobre paja. Cuando el hongo se cultiva en medios con glucosa, una mezcla de sales y extracto de levadura, la celulasa no se evidencia.

En la búsqueda de una mayor producción del sistema lítico, se suplementó el medio agua y *S. cerevisiae* con sales minerales empleadas por Moreno (1991). Sin embargo, durante pruebas preliminares realizadas bajo las mismas condiciones de cultivo con y sin sales no se observó ese aumento.

Los cultivos de *P. ostreatus* en los diferentes medios (agua y *S. cerevisiae*, mineral y *S. cerevisiae*, mineral, y mineral y glucosa) se observaron diferencias significativas en el

número de esférulas (Tabla V.1). Sin embargo en los medios agua y *S. cerevisiae* y mineral y *S. cerevisiae*, las diferencias en el número de esférulas están compensadas por el tamaño.

A pesar de que, en los ensayos preliminares no se observa ese aumento de la actividad lítica en el sobrenadante del medio de cultivo mineral y *S. cerevisiae* (Tabla V.1), se piensa que el uso de las sales minerales se hace necesario para mejorar las condiciones de crecimiento del hongo y producción del sistema lítico.

Es por eso, que se utilizó el medio de sales minerales y *S. cerevisiae* sin fuente de carbono adicional, para así obligarlo a utilizar la levadura como única fuente de carbono.

Moreno (1991), empleó el medio mineral y células de *Candida utilis* en la producción del sistema lítico de *T. reesei*, éste medio logró satisfacer las exigencias mínimas para el crecimiento del hongo.

P. ostreatus crece muy poco en medios de cultivo preparados con glucosa y sales minerales, lo que nos permite inferir que el hongo requiere de otros factores de crecimiento tales como vitaminas, aminoácidos y otras fuentes minerales. Sin embargo, se requiere realizar otros estudios para demostrar las causas por las cuales el hongo no crece bien en estas condiciones.

Por otro lado, las variaciones en el contenido de proteínas encontrado a lo largo del crecimiento (figura V.1), podría reflejar el comportamiento del hongo con respecto a la producción del sistema lítico. En las etapas iniciales del cultivo, el hongo crece a espensa de las proteínas solubles y fuente de carbono hasta su agotamiento, a continuación la disminución de sustancias carbonadas y la presencia de posibles inductores solubles dispara la producción del sistema lítico, produciéndose lisis de la levadura con liberación del contenido citoplásmico, lo que hace incrementar el contenido de proteínas y fuente de carbono en el caldo de cultivo. Sin embargo, se requieren de otras pruebas para explicar las

causas por las cuales se encuentran estas variaciones ya que, en la bibliografía consultada no se encontraron referencias al respecto.

Durante el crecimiento de *P. ostreatus* en este medio, se observó un aumento del pH al final de la incubación. Esta variación del pH no puede atribuirse a contaminación, ya que observaciones al microscopio y. alícuotas de este sobrenadante sembrados en placas de M-200 con agar, no mostraron la presencia de microorganismos, descartando así contaminación de los medios.

Estos resultados son similares a los reportados por Pazos (1999), por lo que se puede atribuir a procesos fisiológicos propios del hongo.

Durante los ensayos preliminares de la actividad del sistema lítico, utilizando células enteras de *S. cerevisiae* inactivadas por calor a 121°C no se encontró una actividad lítica significativa cuando las mezclas de reacción se incubaron a pH 6.0 y 7.0, 30°C durante las primeras horas. Al principio se pensó que el consumo de *S. cerevisiae* por *P. ostreatus* se hacía empleando otros mecanismos. Sin embargo, esto fue descartado cuando se detectó actividad en los ensayos a partir de las 6 horas. Aunque no se realizaron más ensayos para demostrarlo, se piensa que, en *S. cerevisiae* inactivada por calor, su citoplasma se coagula debido a los cambios físicos que ocurren durante la desnaturalización de las proteínas y del material genético, lo que implicaría una lisis muy lenta y una baja liberación del contenido citoplásmico hacia el exterior.

En todo caso, en este trabajo se utiliza *S. cerevisiae* tratada con luz ultravioleta de onda corta, ésta solo provocaría su inactivación a través de los daños parciales provocados en proteínas y en el material genético sin que ocurran cambios físicos importantes en las mismas evitando así, los problemas mencionados anteriormente.

Durante la construcción de la curva de inactivación (Figura V.2), se encontró que en las suspensiones con concentraciones mayores de 8 g/l, disminuye el efecto de la luz ultravioleta sobre las células, esto puede deberse a que la densidad celular es muy alta y sólo algunas células son afectadas. Solo se logra un efecto importante prolongando los tiempos de irradiación, sin embargo, esto en la práctica ocasiona el calentamiento de la suspensión y el resultado es impreciso.

Para descartar que la luz ultravioleta puede provocar la lisis de la levadura, se hicieron observaciones al microscopio periódicamente y se prepararon controles, los cuales resultaron negativos.

En cuanto al efecto del pH en la actividad lítica (Figura V.3), se encontró que a pH menores de 5.0, el sistema lítico se inhibe. Mantiene su actividad entre pH 5.0 y 8.0, siendo óptima a pH 6.0 y 7.0, los cuales coinciden con el pH óptimo de crecimiento para el hongo reportado por Pazos (1999), este hecho es importante porque permitiría el uso del sistema lítico sobre levadura resuspendida en agua destilada

Como se dijo anteriormente, la actividad del sistema lítico es máxima a pH 6.0 y 7.0 encontrándose entre 33 y 31 U/L (Figura V.4). Cuando se estudió el efecto de la temperatura se observó que la actividad se mantiene entre 25 y 50 °C, siendo óptima entre 35 y 40 °C, en donde se encontró 50 y 80 U/L respectivamente. Estos resultados difieren de los reportados por Moreno (1991), donde la máxima actividad del sistema lítico de *T. reesei* QM9414 se obtuvo a pH (2-4) y con una temperatura entre 55 y 65°C, valores muy diferentes a los reportados por Rombouts y Phaff (1976), para el sistema lítico de *Bacillus circulans* (pH 6.0 y temperatura 30°C) y, por Hunter y Asenjo (1987) quienes miden la actividad de las enzimas líticas de *Cytophaga* NCIB9497 y *Oerskovia xanthineolytica* LLG109 a pH 7.4 y 70-75°C.

Es importante aclarar dos puntos, por una parte existe diversidad en cuanto a la definición de las unidades enzimáticas por los diferentes autores, y por la otra, los sistemas líticos de los diferentes microorganismos difieren en cuanto a la actividad y sustrato utilizado y, por ende, en su comportamiento, esto queda confirmado en los trabajos de Moreno, 1991; Kaul y col. 1993; Labeca, 1995; Latzcko y Hampel, 1995; Østlie y col. 1995; quienes definen las unidades enzimáticas arbitrariamente.

Observaciones al microscopio muestran restos y agregados celulares, los cuales son indicativos de la actividad lítica, ya que, en controles no se observaron dichas estructuras

Durante la obtención de esferoplastos, se estudió el efecto del sistema lítico sobre células de *S. cerevisiae* RC-112 en fase exponencial y estacionaria, observándose que las primeras son más sensibles que las últimas (Datos no mostrados) obteniéndose en ésta sólo 50% de esferoplastos en comparación al 87,3% en las primeras. Esto probablemente es consecuencia de cambios que ocurren en la estructura de la pared cuando las células entran en fase estacionaria. Esto confirma lo reportado por Kitamura y Yamamoti (1972).

Estos autores indican que, las células en fase estacionaria sufren engrosamiento de la pared haciéndose más resistentes al ataque de las enzimas líticas. Cuando las células se encuentran en fase exponencial, se hacen menos resistentes a las enzimas líticas.

Como se aprecia en la figura V.12, cuando las células en fase exponencial son tratadas con 100 μ L de sobrenadante contenido del sistema lítico, se obtiene un 87.3% de formación de esferoplastos y se mantiene constante a medida que se tratan el mismo número de células con volúmenes mayores de sobrenadante. En este caso, se esperaría que el porcentaje de esferoplastos formados fuese mayor aproximándose al 100%, sin embargo, dos factores podrían estar afectando este resultado, uno es que los componentes citoplásmicos liberados al medio interfieren con las medidas de absorbancia a 540 nm y por

ende, que esta llegue a cero. El otro, es que puede existir un porcentaje de células que por alguna razón sean resistentes o no son afectadas por el sistema lítico, en todo caso estas interrogantes deben ser confirmadas experimentalmente.

En la figura V.13, con 100 μ L del sobrenadante, en una hora se obtuvo 83% de esferoplastos formados, y a las dos horas se incrementó a 91.7%. No se vió aumento en el porcentaje de formación de esferoplastos a las cinco horas. Lo que pone en evidencia que, los factores mencionados anteriormente podrían estar afectando el aumento del porcentaje de formación de esferoplastos.

Como se observó en las figuras V.14 y V.15, el proceso de liofilizado no afecta la actividad del sistema lítico, por el contrario, mediante esta técnica se logra concentrar. Esto se pone en evidencia cuando 50 μ L de la solución de sobrenadante preparado (100 mg/ml), se logra obtener 84.4% de formación de esferoplastos en 20 minutos.

La lisis de la levadura fue seguida midiendo el contenido de proteínas solubles en el sobrenadante antes y después del tratamiento. Se encontró un aumento progresivo en el contenido de proteínas en el medio, lo que confirma la liberación de contenido citoplásmico de la levadura (Figura V.16).

El liofilizado conservado (-10°C), se utilizó por varios meses, sin observar pérdida en la actividad, lo que indica que el sistema es estable y fácil de conservar en este estado, por el contrario, el sobrenadante sin liofilizar tiene una duración más corta, su actividad disminuye lentamente y se contamina fácilmente. Esto podría deberse al pH en que se obtiene (6.0 y 7.0), el cual es óptimo para el crecimiento de bacterias y hongos, su color cristalino se ve afectado producto de la contaminación. Su actividad decae lentamente producto de la contaminación, por lo que no es recomendable utilizarlo.

En cuanto a la detección de la actividad lítica en geles de poliacrilamida 12.5% con 0.2% de células de *S. cerevisiae* autoclavadas y liofilizadas, no se encuentra actividad en el sobrenadante sin liofilizar, esto puede ser debido a que en el mismo la concentración del sistema lítico es bajo.

Sin embargo, cuando se utilizó el liofilizado, al preparar una solución de 100 mg/ml, con 40 μ L de la solución se logró detectar bandas claras en el gel opaco, y bandas oscuras después que el gel se fotografió en “fondo negro”.

Es importante destacar que las modificaciones realizadas al método de Østlie y col. (1995) en cuanto al tipo de células y el porcentaje de acrilamida a utilizar para la elaboración de los geles resultaron acertadas, observándose que la migración fue mejor en geles al 7.5% que en los de 12.5% (Figura V.17 y V.18). Esto puede deberse a que el tamaño de la levadura es mayor que el de las bacterias utilizadas por Østlie y col. (1995), lo que afectaría permeabilidad del gel.

En el gel sin SDS (figura V.19), se observaron tres bandas muy seguidas, la última no se evidencia claramente en la fotografía, ya que se perdió en el secado del gel.

El número y la posición de las bandas de actividad observadas en los geles con SDS (12.5% y 7.5%), fueron completamente diferentes a las del gel sin SDS (7.0%), esto nos podría indicar que los reactivos para geles con SDS, afecta la composición del sistema lítico. Por considerar que hace falta realizar otros ensayos no se puede hacer mayores precisiones acerca de la composición del sistema lítico.

Aunque no se conoce cuales son los efectos que provoca durante la incubación de los geles el tritón X-100 sobre las células de *S. cerevisiae*, se piensa que después de actuar el sistema lítico sobre la pared, actúa el tritón X-100 sobre la membrana de la célula

solubilizándola y posteriormente desintegrando toda la estructura celular, seguido de una liberación citoplásmica y otros.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Conclusiones

- Existen evidencias suficientes que demuestran la producción de un sistema lítico por *P. ostreatus* cuando es cultivado en un medio con sales minerales y *S. cerevisiae* como única fuente de carbono y nitrógeno.
- La actividad del sistema lítico se logró detectar a través de:
 - Ensayos con células enteras de *S. cerevisiae* inactivadas por luz ultravioleta de onda corta.
 - Formación de esferoplastos en *S. cerevisiae* RC-112.
 - Geles de poliacrilamida con SDS (12.5% y 7.5%) y sin SDS 7,0% con células enteras de *S. cerevisiae* autoclavadas y liofilizadas.
- Las condiciones óptimas de actividad del sistema lítico, fueron pH (entre 6.0 y 7.0) y temperatura (entre 35 y 40 °C).
- De acuerdo al comportamiento observado en cada una de los ensayos realizados, se piensa que el sistema lítico pueda estar conformado por enzimas, sin embargo, es necesario demostrarlo a través de otros ensayos.

2. Recomendaciones

Más que recomendaciones, son sugerencias dada la importancia que este sistema lítico presenta:

- Estudiar otras condiciones de producción del sistema lítico.

- Estudiar la estabilidad y duración del sobrenadante sin liofilizar y del sobrenadante liofilizado.
- Determinar e identificar los azúcares, aminoazúcares, aminoácidos y demás componentes liberados de la pared celular de *S. cerevisiae*
- Ensayar la formación de esferoplastos en otros microorganismos con la finalidad de evidenciar si éste funciona como un sistema de amplio espectro.
- Estudiar los procesos de transformación y regeneración de esferoplastos y protoplastos.
- Estudiar la conformación del sistema lítico de *P. ostreatus*.
- Llevar a cabo una purificación parcial del sistema lítico.

CAPITULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C. y Mims, C.W. (1987). Introductory micology. 3ra ed. Editorial Wiley. Estados Unidos
- Bajaj, M., Vadhera, S., Brar A.P.S., y Soni G.L. (1997). Role of oyster mushroom *Pleurotus florida* as hypocholesterolemic-antiatherogenic agent. Indian Journal of Experimental Biology: 35 (10): 1070-1075.
- Benion, E.B. (1980). Fabricación de pan. Ed. Acribia, S.A. España, Zaragoza.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E. (1997). Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology: 63 (7): 2495-2501.
- Blondin, B. y Dequin, S. (1998). La levure, le vin et le gene génétique. Biofutur: 182: 16-20.
- Bobek, P. Galbavy S. y Ozdin, L. (1998). Effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on pathological changes in dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. Oncology Reports: 5 (3): 727-730.
- Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A. y Silverman, S.J. (1988). Fungal cell wall síntesis: The construction of biological structure. Microbiol. Science: 5 (12): 370-375.
- Chocooj, R., Guzmán, G., Martínez, C.D. (1988). Planta productora de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) en Guatemala. Rev. Mex. Micol.: 4: 297-301.
- Corner, R.E. y Marquis, R.E. (1969). Why do bacterial protoplasts burst in hypotonic solutions?. Biochim. Biophys. Acta.: 183: 544-558.

- De Vries, O.H.H. (1972). Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.*: 73: 13-22.
- Farkas, V. (1990). Fungal cell walls: Their structure, biosíntesis and biotechnology aspects. *Acta Biotechnology*: 10 (3): 225-238.
- García, R. M. (1976). Hongos de la madera. (Basidiomicetos). Gráficas Ajenjo S.A. Madrid.
- Garzillo, A.M.V. Di Paolo S., Ruzzi, M. y Buonocore, V. (1994). Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: 42: 476-481.
- Gleba, Y.Y. y Sytnik, K.M. (1984). Protoplast fusion. Alemania: Edit. Springer-Verlag.
- Gleeson, M.A., Ortori, G.S. y Sudbery, P.E. (1986). Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Journal of General Microbiology*: 132: 3459-465.
- González, B. T., Domínguez R. M. Y Bautista B. Serafín A. (1993). Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* var. *Florida* sobre fibra de coco y pulpa de café. *Rev. Mex. Micol*: 9: 13-8.
- Guerrero, B. (1995). Enriquecimiento del bagacillo de caña en proteínas de *Pleurotus ostreatus* crecido por fermentación en medio sólido. (Tesis de maestría). Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Venezuela.
- Hadar, Y. y Cohen, A. E. (1986). Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*: 51 (6): 1352-1354.
- Halász, A. y Laszity, R. (1991). Use of yeast biomass in food production. USA: CRC Press.

Hernández C. (1995). Producción del sistema lítico de *Trichoderma reesei* QM9414. (Tesis de grado). Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Venezuela.

Hinnen, A., Hicks, J.B., y Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 1929.

Hinchliffe, E. (1988). Yeast biotechnology. IBBG Meeting: 16:1077-1079.

Humfeld, H., y Sugihara, F. (1952). The nutrient requirements of *Agaricus campestris* grown in submerged culture. Mycologia: 44: 605-20.

Hunter, J.B. y Asenjo, J.A. (1987). Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells: I evaluation of two lytic systems with different properties. Biotechnol. Bioeng.: 30: 471-481.

<http://www.agro.ne/appliedresearch/pc/enzyme.htm>

<http://www.uco.es/~b52ferij/basidiomicetes.html>

James H. y Murray A. (1995). Yeast: an organism for all seasons. Methods in Molecular an Cell Biology: 5:247-248.

Jeong R., Jung G.T., Na J.S. y Hwang, C.J. (1996). Studies on the media development of *Pleurotus ostreatus* by waste cotton stuff. Korean Journal of Mycology: 24 (3): 176-179.

John, E. y Hampel, W.A. (1991). Enzyme formation by a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species: formation of α -mannanase. Appl. Microbiol. Biotechnol.: 35: 60-64.

John, E. y Hampel, W.A. (1992). Enzyme formation by a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species: formation of amylase. Appl. Microbiol. Biotechnol.: 38: 214-219.

Kaul, W., Rossow, U. Y Emeis C.C. (1993). Screening for microorganisms with cell wall lytic activity to produce protoplast-forming enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol.: 39: 574-576.

- Kharatyan, S.G. (1978). Microbes as food for humans. *Ann. Rev. Microbiol.*: 32: 301, 327.
- Kitamura, K. y Yamamoti, Y. (1972). Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. *Arch. Biochem. Biophys.*: 153: 403-406.
- Kocková-Kratochvilová, A. (1990). *Yeast and yeast-like organisms*. New York: VCH publishers.
- Kuznik (1999). <http://www.image.dk/~labore/svpic/PleOstre.jpg>.
- Labeca, H. Yniride, B. (1995). Sistema lítico de *Candida utilis*. Aislamiento y purificación parcial de la proteasa lítica. (Tesis de maestría). Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Venezuela.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*: 227: 680-685.
- Latzko, E. y Hampel, W. (1995). Enzyme formation by a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species: chitinolytic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: 44: 185-189.
- Lowry, O., Rosenbrough, N.J., Farr, A. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*: 193: 265-275.
- Mandal, T.K., Valdrían, P., Gabriel, G., Nerud, F. y Zadrazil, F. (1998). Effect of mercury on the growth of wood-rotting basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Serpula lacrymans*. *Chemosphere*: 36 (3): 435-440.
- Mandigan, T. M., Nartinko, J.M. y Parker, J. (1997). *Biología de los microorganismos*. 8va. Ed.: Prentice Hall. Iberia. España.
- Martens, R. y Zadrazil F. (1998). Screening of white-rot fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Folia microbiológica*: 43 (1): 97-103.
- Matsumoto, T. y Fukumasa, N. Y. (1996). Mitochondrial DNA inheritance in sexual crosses of *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics*: 30 (6): 549-552.

- Molzahn S.W. (1993). Developments in yeast science and technology. EBC congress: 203-219.
- Moreno, R. (1991). El sistema lítico de *Trichoderma reesei* QM9414. (Trabajo de Ascenso). Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Venezuela.
- Murai, T., Ueda, M., Atomi, H., Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Osumi, M., Kawaguchi, T., Arai, M. y Tanaka, A. (1997). Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol.: 48: 499-503.
- Nicolini, L., Hunostein, C. y Carilli, A. (1987). Solid state fermentation of orange peel and grape stalks by *Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe aegerita*, and *Armillariella mellea*. Applied Microbiology and Biotechnology: 26: 95-98.
- Odreman, F. (1996). Diseño y construcción de un vector de expresión para *Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de Grado). Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Venezuela.
- Ogata, T., Okumura, Y., Iimura Y. y Obata, T. (1995). Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Hansenula anomala*. Journal of Fermentation and Bioengineering: 79 (1): 1-5.
- Ohkuma, M., Muraoka S., Hwang C.W., Ohta, A. y Takagi M. (1993). Cloning of the *C-URA3* gene and construction of a triple auxotroph (*his5, ade1, ura3*) as a useful host for the genetic engineering of *Candida maltosa*. Curr. Genet.: 23: 205-210.
- Opletal, L., Jahodar, L., Chobot, V., Zdansky, P., Lukes, J., Bratova, M., Solichova, D., Blunden, G., Dacke, C.G. y Patel, A.V. (1997). Evidence for the anti-hyperlipidaemic activity of the edible fungus *Pleurotus ostreatus*. British Journal of Biomedical Science: 54 (4): 240-243.

- Ortega C. María E., Can A. Braulio., Patiño, F. P. y Pérez G. Romo F. (1986). Efecto de la inoculación del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en la composición química y digestibilidad de la paja de cebada. Arch. Latinoam. Nutr.: 36 (2): 345-50.
- Østlie, H.M., Vegarud, G. y Langsrud T. (1995). Autolysis of *Lactococci*: Detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel Electrophoresis and characterization in buffer systems. Applied and environmental microbiology: 61 (10): 3598-3603.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. y Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. Journal of Biological Chemistry: 272 (50): 31301-307.
- Pazos, A. (1999). Optimización a través del diseño compuesto central rotatable (DCCR) de un medio para la producción de biomasa de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida. (Tesis de grado). Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Venezuela.
- Peberdy, J.F., Rose, A.H., Roger, J.H. y Cocking E.C. (1976). Microbial and plant protoplasts. Academic Press Inc. Edit. Londres.
- Peberdy, J.F. y Ferenczy, L. (1985). Fungal protoplasts. (Vol. 6: Micology de la serie Dekker). Ed. Marcel Dekker, Inc. Estados Unidos.
- Rainbow, C. y Rose, A.H. (1963). Biochemistry of industrial microorganisms. Baker's Yeast Academic Press London and New York.
- Rombouts, F.M. y Phaff, H.H.J. (1976). Lysis of yeast cell wall: lytic β -(1,6)-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. Eur. J. Biochem. 63: 109-120.
- Sarkar, S., Martínez, A.T., y Martínez, M.J. (1997). Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. (6): 1570-1581.

- Sanglard, D. y Fiechter, A. (1992). DNA transformations of *Candida tropicalis* with replicating and integrative vectors. *Yeast*: 8: 1065-1075.
- Sasnauskas, K., Jomantiené, R., Lebediené E., Lebedys J., Januska, A. y Janulaitis A. (1992). Molecular cloning and análisis of autonomous replicating séquence of *Candida maltosa*. *Yeast*: 8: 253-259.
- Shin, K. S., Oh, I.K. y Kim, C.J. (1997). Production and purification of remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*: 63 (5): 1744-1748.
- Tan, Y. H., y Wahab, M. N. (1997). Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor_caju*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 13 (6): 613-617.
- The American Type Culture Collection (ATCC). (1978). Catalogue of strains I. 30va. Edición.
- Tuite, M. F. y Oliver, S.G. (1991). *Saccharomyces*: Biotechnology Handbooks 4. Salisbury, Willshire, Englad: Plenium Press (Vol. 4).
- Vasala, A., Väلكkilä, M., Caldentey, J. y Alatosava, T. (1995). Genetic and biochemical characterization of de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* bacteriophage LL-H lysin. *Applied and Environmental Microbiology*: 61 (11): 4004-4011.
- Vrsanská, M., Biely, P. y Hrmová, M. (1985). Production of yeast-lysing enzymes by microorganisms on yeast cell walls. *Biología (Bratislava)*: 40 (3): 259-265.
- Wang, S.L., Pai, C.S. y Shieh, S.T. (1995). Production of lytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* M-1001. *Proceedings of the National Science Council, ROC: (Parte B: Life Science)*: 19 (4): 216-224.

- Yamada, O., Magae, Y., Kashiwagi, Y., Kakimoto, Y. y Sasaki, T. (1983). Preparation and regeneration of mycelial protoplasts of *Collybia veltipes* and *Pleurotus ostreatus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.: 17: 298-300.
- Yateem, A., Balba, M. T., Al Awadhi, N. y El Nawawy, A.S. (1998). White rot fungi and their role in remediating oil-contaminated soil. Environment International: 24 (1-2): 181-187.
- Yoshida, N., Takahashi T., Nagao T. y Chen, J. (1993). Effect of edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation on in vitro digestibility of wheat straw and sawdust substrate. Journal of Japanese Society of Grassland Science: 39 (2): 177-182.