



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación de la expresión de enzimas  
ligninocelulolíticas de dos especies de hongos  
saprótrofos aislados de un bosque de *Juniperus* en  
Tlaxcala

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Diana Torres González

**Director:**

Dr. Arturo Estrada Torres





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación de la expresión de enzimas  
ligninocelulolíticas de dos especies de hongos  
saprótrofos aislados de un bosque de *Juniperus* en  
Tlaxcala

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Diana Torres González

**Comité Tutorial**

Dr. Arturo Estrada Torres

Dra. Alba Mónica Montiel González

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

## HOJA DE FINANCIAMIENTO

El presente proyecto se realizó con el apoyo a estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo la asesoría de la Dra. Alba Mónica Montiel González, que comenzó en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) y concluyó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente (CIGyA), de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Este trabajo contó indirectamente con el apoyo, en cuanto a equipamiento a la infraestructura otorgada por medio del fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT para el proyecto “Implicación fisiológica de la inactivación de genes de lacasa de *Pleurotus ostreatus* PoB sobre la morfogénesis y aprovechamiento de fuentes complejas de carbono” No. 167759.

Cabe mencionar que el programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la UAT está registrado en el Programa Nacional de Posgrado-CONACyT (PNP 00-30-03).



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
**Secretaría de Investigación Científica y Posgrado**  
**Posgrado en Ciencias Biológicas**



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Diana Torres González** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Evaluación de la expresión de enzimas lignino-celulolíticas de dos especies de hongos saprótrofos aislados de un bosque de *Juniperus* en Tlaxcala”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 30 DE 2017

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

  
\_\_\_\_\_  
DR. ARTURO ESTRADA TORRES

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOCIO

  
\_\_\_\_\_  
M.C. LAURA VERÓNICA HERNÁNDEZ CUEVAS

  
\_\_\_\_\_  
DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) perteneciente a la Universidad Autónoma de Tlaxcala por el apoyo brindado durante el desarrollo de este estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT por la beca otorgada para realizar estudios de maestría con número de registro 709423 y número de beca 592018.

A la Dra. Alba Mónica Montiel González por la confianza depositada en mí para realizar este proyecto, por el apoyo académico y personal proporcionado. Gracias por las enseñanzas, el conocimiento brindado, sus valiosos consejos y el apoyo incondicional que he recibido siempre de su parte.

Al Dr. Arturo Estrada Torres por la asesoría, por sus valiosos comentarios y por el apoyo brindado.

A la Dra Araceli Tomasini Campocosio por su apoyo incondicional, la disponibilidad y los valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A la M. en C. Laura Verónica Hernández Cuevas por su disposición desde el inicio de este trabajo, por la asesoría, por sus valiosos comentarios y el apoyo incondicional recibido.

Al Dr. René Zempoalteca Ramírez por sus valiosos comentarios y el apoyo brindado en este trabajo.

A la Dra. Aline López López por sus comentarios y disposición para este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A mi hermano Marco por todos estos años de amistad, por estar en las buenas y en las malas, por ser un pilar y levantarme cuando lo necesité, por tus consejos. Gracias por las infinitas pláticas de análisis y discusiones. Mil gracias por todo el apoyo brindado, las lecciones y por estar siempre.

A mi mamá gracias por todo tu cariño, por tu ejemplo, por confiar en mí, por todo el apoyo brindado incondicionalmente, por escucharme y por apoyarme en mis decisiones.

A las chicas, Ana y Rut por su amistad brindada incondicionalmente, por los buenos momentos en el laboratorio, por su disposición tiempo brindado para consultar alguna duda o discutir ciertos temas que enriquecieron este trabajo. ¡Gracias infinitas!

Ana, gracias por ser mi guía en este trayecto, por dedicar tu tiempo a enseñarme y formarme en el manejo del laboratorio, por todas tus asesorías. Gracias por tu apoyo brindado todo este tiempo, por permitirme conocerte, por la confianza brindada y formar una gran amistad que valoro mucho. Gracias por tus valiosos consejos, tus enseñanzas y tu apoyo en los momentos difíciles en que lo necesité, por estar en las buenas y en las malas. Gracias por los momentos de risa, de bullying y de análisis.

Rut, gracias por enseñarme y asesorarme en el laboratorio, por toda tu disposición para escucharme y aclarar dudas. Gracias por tu gran amistad, por estar en los buenos y malos momentos, por tu apoyo incondicional. Gracias por todos tus valiosos consejos, por toda la confianza brindada, por permitirme conocerte y escucharme siempre que lo necesité, por las enseñanzas de la vida que me has compartido y que valoro mucho. Créeme, he aprendido mucho de ti. Gracias por el bullying y las risas. Gracias por acompañarme a la aventura en Perú, una experiencia inolvidable.

A Samuel por tu apoyo en el laboratorio, por la disposición para poder consultarte un tema y tomar tu tiempo para explicarme o discutirlo para enriquecer este trabajo. Gracias por esta gran amistad de varios años, por estar y por tus consejos. Gracias por el bullying, creo que te maltraté mucho durante tu estancia en el laboratorio, fue divertido jejeje.

A Selenia por su ayuda fundamental y enriquecedora en este trabajo, por apoyarme con los experimentos, por todo el apoyo incondicional en el laboratorio y por la bonita amistad formada.

Arcadio, hasta donde te encuentres, gracias por todo tu apoyo al inicio de la maestría, tus consejos y tu gran amistad.

Lily, gracias por ser una gran compañera de grupo y formar una bonita amistad. Gracias por tus consejos y tu motivación en todo momento.



## RESUMEN

Las enzimas ligninocelulolíticas secretadas por los hongos saprótrofos, constituyen un mecanismo de degradación de la materia orgánica y al mismo tiempo de compuestos xenobióticos presentes en esta matriz, realizando un papel importante en los ecosistemas. Debido a esta característica a dicho grupo de hongos se les han atribuido diversas funciones ecológicas, entre ellas, tienen un papel primordial en el ciclo del carbono secretando esta gama de enzimas y permitiendo la disponibilidad de este importante elemento. Las enzimas ligninocelulolíticas tienen diversas aplicaciones por lo que son de interés biotecnológico. Con el fin de conseguir el aprovechamiento masivo y dirigido de dichos compuestos, se ha empezado a considerar que el conocimiento del papel fisiológico que juegan en la vida de los microorganismos es de gran interés. Se ha reportado que la expresión enzimática depende de los ambientes, las condiciones en que se desarrollan los hongos y de la interacción con otros organismos. Los ambientes perturbados imponen un reto de sobrevivencia para ellos, por lo que se puede esperar que los metabolitos producidos por los hongos que logran establecerse, sean distintos y representen nuevas opciones de interés humano, lo cual haría considerar a hongos provenientes de estos ambientes perturbados como nuevos modelos de estudio. Entre estos ambientes, se encuentra el bosque de *Juniperus*, que por su estructura es un ambiente expuesto a la agresión de los agentes abióticos y a las actividades antropogénicas y el cual ha sido un ecosistema pobremente estudiado, por lo que la investigación de diversos fenómenos que ahí se llevan a cabo es de interés.

En el presente estudio, se seleccionaron dos especies de hongos saprótrofos, la cepa OAR002 de *Agrocybe* cf. *pediades* y la cepa OAR006 de *Gymnopus* sp., recolectados y aislados a partir de un bosque de *Juniperus* ubicado en el municipio de Ixtacuixtla en el estado de Tlaxcala.

En una fase inicial del trabajo de investigación, ambas cepas fueron cultivadas en medio sólido con cinco diferentes composiciones de nutrientes. A los diferentes medios, se les añadieron los sustratos: DMP para la determinar la presencia de la enzima lacasa, DMP + MnSO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para evidenciar la presencia de la enzima manganeso peroxidasa y carboximetilcelulosa teñida con rojo Congo, para confirmar la presencia del complejo enzimático de celulasas. Los parámetros de velocidad de crecimiento e índice de potencia fueron evaluados. En esta primera fase del experimento se determinó el medio de cultivo que

se utilizó para realizar los cultivos en líquido. En una segunda fase, se evaluaron los cultivos de ambas cepas de hongos saprótrofos en medio líquido, constituido por un medio mineral y glucosa como fuente de carbono. Se evaluaron los parámetros de biomasa, pH, actividad enzimática lacasa, manganeso peroxidasa y perfil de isoenzimas, usando la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus*, productor conocido de dichas enzimas, como referente. En los resultados de la primera fase, en el cultivo sólido, se confirmó la presencia de las enzimas en ambas cepas. La cepa de *Agrocybe* cf. *pediades* mostró el mayor índice de potencia y la mayor velocidad de crecimiento. En el cultivo líquido, la cepa de *Gymnopus* sp. no fue capaz de crecer bajo las mismas condiciones de cultivo que *Agrocybe* cf. *pediades* y *Pleurotus ostreatus*, por lo que los resultados del cultivo no pudieron ser analizados en conjunto con los obtenidos por estos hongos. Sin embargo, se logró hacerlo crecer en el medio líquido cuando se le proporcionó un soporte, que sugerimos le brindó reservas estáticas de nutrientes y abatió el efecto de las condiciones de oxigenación y movimiento, permitiéndole crecer y producir actividad lacasa a los 30-34 días de cultivo. Con respecto a *Agrocybe* cf. *pediades*, la mayor magnitud de actividad lacasa fue de 16.40 UI/mg y de manganeso peroxidasa de 149.25 UI/mg. Además en *Agrocybe* cf. *pediades*, se expresaron dos isoenzimas de lacasa localizadas a la altura del marcador de peso molecular para proteínas de 72 y 95 kDa y una isoenzima de manganeso peroxidasa posicionada a la altura de 72 kDa del marcador. *Pleurotus ostreatus* expresó una isoenzima de lacasa y una de manganeso peroxidasa localizadas a la altura de 36 kDa en el marcador. Las medias de los parámetros evaluados de la cepa de *Agrocybe* cf. *pediades* y *Pleurotus ostreatus* muestran diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. Las isoenzimas producidas por *Agrocybe* cf. *pediades* aparentemente son de mayor tamaño, lo que podría estar indicado que son proteínas más grandes o cuentan con mayor nivel de glicosilación para protección de la enzima para poder realizar su función, probablemente a consecuencia de las condiciones de perturbación del ambiente del que provienen. Todo esto podría estar indicando otras posibles funciones fisiológicas de esta enzima, distintas a las descritas para *Pleurotus ostreatus*, pero es necesario realizar más estudios para confirmar esta hipótesis. Por lo tanto, la cepa de *Agrocybe* cf. *pediades* puede constituir un nuevo modelo de estudio.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hongos.....	3
1.2. Participación ecológica de los hongos en el ecosistema.....	5
1.3. Características de los hongos saprótrofos.....	6
1.4. Degradación de biopolímeros.....	8
1.4.1. Lignina.....	8
1.4.2. Celulosa.....	9
1.5. Ambientes perturbados.....	10
1.6. Bosque de <i>Juniperus</i> .....	11
2. ANTECEDENTES.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
5. METODOLOGÍA.....	18
5.1. Organismos de estudio.....	18
5.2. Primera fase.....	18
5.2.1. Evaluación de la velocidad media de crecimiento y de la actividad enzimática cualitativa en medio sólido.....	18
5.3. Segunda fase.....	21
5.3.1. Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática lacasa y manganeso peroxidasa en cultivo líquido.....	21
5.3.2. Caracterización del cultivo en medio líquido.....	22
5.4. Tercera fase.....	23
5.4.1. Determinación de isoenzimas mediante zimografía.....	23
5.5. Análisis estadísticos.....	23

6. RESULTADOS PRIMERA FASE.....	24
6.1. Estimación de la velocidad media de crecimiento de <i>Agrocybe cf. pediades</i> .....	24
6.1.1. Sin adición de sustrato enzimático .....	24
6.1.2. Sustrato enzimático adicionado con 2,6-dimetoxifenol (lacasa).....	25
6.1.3. Sustrato enzimático adicionado con 2,6-dimetoxifenol, sulfato de manganeso y peróxido de hidrógeno (manganeso peroxidasa).....	26
6.1.4. Sustrato enzimático adicionado con carboximetilcelulosa (celulosa) .....	27
6.2. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de <i>Agrocybe cf. pediades</i> .....	27
6.2.1. Actividad enzimática cualitativa lacasa .....	27
6.2.2. Actividad enzimática cualitativa manganeso peroxidasa.....	28
6.2.3. Actividad enzimática cualitativa celulosa .....	29
6.3. Estimación de la velocidad media de crecimiento de <i>Gymnopus sp.</i> .....	30
6.3.1. Sin adición de sustrato enzimático .....	30
6.3.2. Sustrato enzimático adicionado con 2,6-dimetoxifenol (Lacasa) .....	31
6.3.3. Sustrato enzimático adicionado con 2,6-dimetoxifenol, sulfato de manganeso y peróxido de hidrógeno (manganeso peroxidasa).....	32
6.3.4. Sustrato enzimático adicionado con carboximetilcelulosa (celulosa) .....	33
6.4. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de <i>Gymnopus sp.</i> .....	33
6.4.1. Actividad enzimática cualitativa lacasa .....	33
6.4.2. Actividad enzimática cualitativa manganeso peroxidasa.....	34
6.4.3. Actividad enzimática cualitativa celulosa .....	35
7. RESULTADOS SEGUNDA FASE .....	36
7.1. <i>Gymnopus sp.</i> .....	36
7.2. Caracterización en cultivo líquido de <i>Agrocybe cf. pediades</i> .....	38
7.2.1. Biomasa.....	38

7.2.2. Actividad enzimática.....	39
7.2.3. pH.....	42
7.3. Caracterización en cultivo líquido de <i>Pleurotus ostreatus</i> (PoB).....	43
7.3.1. Biomasa.....	43
7.3.2. Actividad enzimática.....	43
7.3.3. pH.....	46
7.4. Análisis de resultados .....	47
8. RESULTADOS DE LA TERCERA FASE.....	48
8.1. Determinación de isoenzimas lacasa por zimografía de <i>Agrocybe cf. pediades</i> .....	48
8.2. Determinación de isoenzimas manganeso peroxidasa por zimografía de <i>Agrocybe cf. pediades</i> .....	50
8.3. Determinación de isoenzimas lacasa por zimografía de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	52
8.4. Determinación de isoenzimas manganeso peroxidasa por zimografía de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	55
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE .....	58
9.1. <i>Agrocybe cf. pediades</i> .....	58
9.2. <i>Gymnopus sp.</i> .....	60
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA SEGUNDA FASE .....	61
10.1 <i>Gymnopus sp.</i> .....	61
10.2 <i>Agrocybe cf. pediades</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	62
11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA TERCERA FASE.....	63
11.1. Isoenzimas lacasa de <i>Agrocybe cf. pediades</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	63
12. CONCLUSIONES.....	65
13. PERSPECTIVAS.....	65
14. REFERENCIAS .....	66

15. ANEXOS .....	74
16. PUBLICACIONES.....	77

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha realizado diversas investigaciones enfocadas al estudio de microorganismos que producen metabolitos de interés biotecnológico. Con el fin de conseguir el aprovechamiento masivo y dirigido de dichos compuestos, se ha empezado a considerar que el conocimiento del papel fisiológico que juegan en la vida de los microorganismos es de gran interés debido a que pueden funcionar en procesos químicos *in vitro*, de una manera diferente a la forma en la que actúan *in vivo*, es decir, en su ambiente natural, lo que podría hacer que se tengan percepciones limitadas de sus verdaderas potencialidades (Baldrian 2008).

Esta visión, conduce hacia la búsqueda de nuevos modelos microbianos que permitan estudiar más de sus productos metabólicos y sus funciones, lo que podría brindar un mayor conocimiento respecto a las diferentes maneras en las que intervienen en los procesos químicos que forman parte de la biodiversidad, además de evidenciar nuevas potencialidades de uso para el hombre. Dentro de este tipo de estudios, se han determinado algunos puntos que son considerados importantes en la búsqueda de nuevos organismos modelo. En primera instancia, se considera la capacidad que los microorganismos tienen para sobrevivir en diversos ambientes y de producir compuestos que les permitan entrar en competencia, como la producción de antibióticos u otros fármacos. En segundo lugar, a las particularidades que les posibilita establecer interacciones con otros organismos, su facultad para relacionarse de forma simbiótica o antagonista, que se debe, entre otras cosas, a los factores de crecimiento, inhibidores de enzimas, hormonas, etc. Finalmente, al tipo de alimentación que pueden tener, a la capacidad de establecerse en compuestos recalcitrantes y degradarlos para utilizarlos como fuente de carbono, gracias a los complejos enzimáticos que poseen (Brizuela y cols. 1998).

Factores como la historia de vida y la adaptación de los microorganismos a su ambiente, los facultan para participar en una comunidad llevando a cabo todas las interacciones, donde la producción de metabolitos está regulada por las condiciones del ecosistema y de la función ecológica que desempeñan. Los microorganismos constituyen la interfase química entre éstos y el resto del mundo viviente y adicionalmente, por consecuencia, constituyen una fuente inagotable para la obtención de nuevos metabolitos activos (Mosier y cols. 2013).

Dentro de la célula, existen conjuntos de procesos metabólicos que se enfocan en la proliferación y crecimiento celular, que son conocidos como metabolismo primario, donde se incluye a todas las rutas bioquímicas y a todos los intermediarios para que el microorganismo obtenga energía, reproducción celular y viabilidad (Cortés-Sánchez y cols. 2013).

En general, son los metabolitos quienes les permiten a los microorganismos enfrentar y competir con organismos de todo tipo, bacterias, hongos, plantas, insectos. También funcionan como transportadores de metales, participan en la simbiosis entre las bacterias y plantas, nemátodos, insectos y animales superiores; funcionan como efectores de la diferenciación, estimulan o inhiben procesos, entre muchas otras acciones (Demian y Fang 2000). El estudio de estas interacciones entre los organismos y de la función ecológica que desempeñan estos microorganismos, ha posibilitado que en la actualidad se conozca un gran número de metabolitos de origen microbiano y de naturaleza diferente a los antibióticos, que presentan un variado espectro de actividades biológicas.

Sin embargo, a pesar del gran conocimiento acerca del papel de los microorganismos en los ecosistemas, el conocimiento sobre la producción de algún metabolito que se da en forma *in vivo*, con respecto a las condiciones en el laboratorio, *in vitro*, es pobre. Tampoco existe información suficiente de todos los microorganismos que habitan un ambiente determinado, ni de la producción y cantidad de sus diversos metabolitos expresados en diferentes ambientes y condiciones, incluyendo la perturbación del hábitat, ni de la relación del ambiente con el microorganismo, lo que ofrece un amplio campo para la investigación.

Uno de los tipos de metabolitos de interés biotecnológico e industrial son las enzimas, debido a la participación que tienen dentro de los procesos industriales, donde es necesaria la transformación de sustratos a productos o la aceleración de las reacciones en estos procesos. Se está sustituyendo el uso de tratamientos químicos por biocatalizadores que son más eficientes, con más afinidad y especificidad, además de que pueden funcionar en un amplio intervalo de condiciones debido a la naturaleza de las mismas enzimas (Castellanos y cols. 2006). Asimismo, también es interesante saber cuál es la participación de estas enzimas en el organismo y cómo es afectada su expresión por el ambiente, porque esto nos permitirá hacer una mejor búsqueda e implementación de enzimas específicas en estos procesos biotecnológicos.



Dentro de los organismos más estudiados como productores de metabolitos, se encuentran los hongos. Esto se puede deber a su amplia distribución, a que desempeñan una serie de funciones importantes en la dinámica de los ecosistemas dependiendo de sus hábitos alimentarios y a que poseen una gran gama de estrategias para colonizar diversos ambientes. Aún con esto, son sólo un número reducido de especies las que han sido estudiadas con respecto a su metabolismo y producción de compuestos derivados de éste, y a pesar de tener ejemplos de hongos de casi todos los hábitos alimenticios, la biodiversidad es tan grande, que no podemos pretender extrapolar los conocimientos que se tienen de las especies estudiadas a todas las demás que se pueden encontrar en el planeta por lo que seguir investigando a estos organismos nos permitirá seguir conociendo su metabolismo con posibles particularidades que puedan poseer.

### **1.1. Hongos**

Los hongos conforman un grupo de organismos constituidos por células eucariotas, contienen núcleos unidos a la membrana con varios cromosomas y cuentan con los organelos citoplasmáticos unidos a la membrana. Son heterótrofos, es decir que no pueden sintetizar los elementos esenciales para su metabolismo y obtienen sus requerimientos a partir de sustancias orgánicas sintetizadas por otros organismos a los que parasitan o de la materia orgánica inerte disponible a la que suelen degradar para poder adquirir la fuente de energía. Absorben los nutrientes a través de la membrana celular. (Solomon y cols. 2000). Las células de los hongos están rodeadas por una pared celular compuesta principalmente por quitina en combinación con varios polisacáridos, como hemicelulosas y pequeñas cantidades de lípidos. La quitina es un polímero que consta de subunidades de azúcar nitrogenada, que es componente muy resistente que la celulosa con respecto a la degradación por microorganismos (Alexopoulos 1995, Deacon 2013). Carecen de clorofila y cloroplastos, por lo que no realizan el proceso de fotosíntesis pero muchos hongos contienen ciertos pigmentos que les dan diversas coloraciones (Herrera y Ulloa 1998).

Los hongos son organismos uni- o pluricelulares. Las especies de hongos pluricelulares están constituidas por células que forman filamentosas que contienen protoplasma, llamadas hifas. Las hifas son estructuras cilíndricas o tubulares, regularmente ramificadas, cubiertas por una

membrana donde está el protoplasma y fuera de ella, la pared celular. Se conocen dos tipos de hifas, las hifas cenocíticas que tienen sólo un protoplasma con numerosos núcleos. Estas no se dividen en células individuales, sino que adquieren un aspecto de una célula gigante multinucleada alargada; por otra parte están las hifas septadas, que están divididas en intervalos regulares o irregulares por tabiques llamados septos, dividen a las hifas en células; son uninucleadas o multinucleadas, en donde el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que se presenta en el centro de cada septo. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio (Guzmán y cols. 1993, Herrera y Ulloa 1998). Tienen núcleos haploides, una característica de las células eucariotas, pero las hifas fúngicas a menudo tienen varios núcleos dentro de cada compartimiento de hifas y algunas levaduras son diploides.

Los hongos se reproducen de forma vegetativa o por medio de esporas microscópicas, carecen de flagelos, pueden tener vida latente y soportar condiciones muy adversas. Son estructuras inmóviles y por esa razón son transportadas y dispersadas por las corrientes del viento a distintos lugares. Tienen hifas aéreas que están en contacto con la atmósfera y permiten que las esporas sean dispersadas a través del aire. En algunos hongos, estas hifas, forman estructuras reproductoras complejas y de gran tamaño en donde se producen las esporas. Estas estructuras son conocidas como cuerpos fructíferos o esporocarpos (Herrera y Ulloa 1998, Solomon y cols. 2000). Todas estas estructuras y estrategias hacen efectiva su participación en la interacción con el ambiente.

La mayoría de los hongos son de amplia distribución, es decir, que se distribuyen en prácticamente todo el mundo pero se desarrollan mejor en lugares oscuros y húmedos, debido a que necesitan humedad para obtener agua de la atmósfera, así como del medio donde viven. Existen otros hongos que son endémicos, esto es, que tienen una distribución geográfica restringida. Otras especies de estos organismos se llegan a encontrar en ambientes secos o temperaturas bajas y cuando esto sucede, sobreviven entrando en fase latente o producen esporas resistentes a la desecación (Herrera y Ulloa 1998). Estos hongos se desarrollan a una temperatura de 25 °C, aunque crecen en un amplio intervalo de temperaturas; el pH óptimo suele ser de 5.6, sin embargo algunos hongos resisten en ambientes con pH desde 2 hasta 9 (Guzmán y cols. 1993).

## **1.2. Participación ecológica de los hongos en el ecosistema**

Debido a que los hongos son organismos heterótrofos (químico-organótrofos), tienen una participación ecológica fundamental en el ambiente. La estructura y función de las comunidades fúngicas se ven influidas por los cambios de flora y fauna, por las perturbaciones naturales y antropocéntricas, por los fenómenos de sucesiones primarias y secundarias, por el tipo de suelo y por otros componentes del ecosistema. Algunos hongos provienen del desarrollo de asociaciones con varios tipos de vegetación y dependen de una serie de sucesiones asociadas con sustratos específicos (Morris y cols. 2007).

Los hongos desempeñan diversas funciones importantes en la dinámica de los ecosistemas con base en su tipo de alimentación:

- Los hongos micorrízicos o mutualistas viven en asociación con especies vegetales, donde ambos obtienen un beneficio mutuo, se desarrollan rodeando las partes finas de las raíces de las plantas y se alimentan de exudados radiculares y a su vez, ayudan a la captura de nutrientes para las plantas.
- Los hongos parásitos o comensales se desarrollan en otros organismos que constituyen a sus hospedantes, viven a expensas de éstos, sin darles un beneficio a cambio; pueden producirles daños de diversas magnitudes, desde pasar desapercibidos en el hospedante, hasta causarle enfermedades graves o la muerte. Parasitan plantas, animales u otros hongos.
- Los hongos saprótrofos, se desarrollan en materia orgánica, muchas veces en descomposición, que pueden ser reservas de otros organismos, productos de excreción, los excrementos mismos, la madera de los árboles y el suelo con materia orgánica. Estos hongos son descomponedores primarios de sustratos, lo que logran gracias a una maquinaria compuesta por metabolitos proteicos, es decir, las enzimas que degradan estos compuestos y permiten su disponibilidad en el ecosistema (Herrera y Ulloa 1998, Morris y cols. 2007). Las enzimas que tienen la capacidad para degradar estos compuestos son de interés biotecnológico.

La gran mayoría de los hongos son saprótrofos y están representados en casi todos los grupos taxonómicos. Estos se pueden encontrar en agua, tanto continental como marina, pero los más conocidos son los terrestres (Herrera y Ulloa 1998).

Los hongos saprótrofos se encargan de la descomposición de la hojarasca y son los principales participantes centrales en los balances globales del carbono en ecosistemas forestales (Schlesinger y Andrews 2000). No obstante, la mayoría de las investigaciones que han analizado los ciclos de nutrientes, no hacen énfasis en la ecofisiología de los hongos en la hojarasca, además tratan a todos los microorganismos como una sola entidad funcional, lo cual limita la visión de la verdadera participación de los hongos. Por ello, desde hace algunos años se ha comenzado a estudiar el espacio temporal que ocupan estos organismos a través de su identificación molecular para poder investigar sobre su sucesión, identificando los organismos presentes en algún sustrato en particular (Lindahl y Boberg 2008).

En este sentido, se ha reportado que los primeros en colonizar son los ascomicetos y dominan las primeras etapas de la descomposición, por el contrario, no son los principales degradadores (Frankland 1998). Posteriormente los basidiomicetos, particularmente los saprótrofos, colonizan estos sustratos para continuar con la degradación de polímeros como la lignina. Los basidiomicetos entran en competencia con los ascomicetos. Se ha encontrado la presencia de más taxones de ascomicetos que de basidiomicetos (70 – 50%), pero el hecho de que se encuentre una fracción importante de biomasa de ascomicetos, no implica necesariamente que sean responsables de la descomposición de la hojarasca, siendo los basidiomicetos los que tienen un papel fundamental en este proceso (Lindahl y Boberg 2008).

### **1.3. Características de los hongos saprótrofos**

Los hongos saprótrofos se desarrollan mayormente sobre los suelos húmedos de los bosques, campos y praderas ricos en restos orgánicos, también abundan debajo del suelo o en maderas en descomposición. Prefieren los sitios sombríos, aunque también se encuentran en praderas muy iluminadas, crecen en el pasto, entre zacates, hierbas y plantas cultivadas. Su presencia depende de la humedad, de la riqueza de los restos orgánicos, de la aireación, el pH y otros factores del medio (Herrera y Ulloa 1998).

Estos organismos se encuentran en interacción con otros hongos y otros grupos de organismos, debido a que tienen la capacidad de limitar y defender su territorio, lo que consiguen mediante los mecanismos de antagonismo que presentan (Donnelly y Boddy 2001). Todas estas interacciones y sustituciones promueven cambios en las comunidades a través del tiempo y

permiten tener estrategias que les confieren ciertas características para competir entre comunidades. Las interacciones pueden ser medidas de acuerdo con la distancia, después de que hubo contacto entre hifas o después de un contacto a nivel micelio (Boddy 2000). Esta interacción se puede dar entre especies, incluso entre cepas; la competencia se presenta cuando existe una superposición entre los nichos.

Esto es determinante en el desarrollo de las comunidades de hongos y afectan directamente a la renovación del carbono en los ecosistemas forestales (Owens y cols. 1994, Boddy 2000). Hay dos tipos de resultados en la interacción: la sustitución total, en la que un organismo desplaza a otro completamente y obtiene un territorio y el bloqueo mutuo, cuando no hay ganancia de ningún hongo. Dentro de estos se puede encontrar, sustituciones parciales seguidas por bloqueo mutuo (Hiscox y cols. 2010). Por otra parte, el antagonismo conduce a cambios morfológicos y cambios metabólicos, traducidos estos últimos en la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares (Iakovlev y cols. 2004). Se tiene evidencia de que durante las interacciones antagónicas entre especies de pudrición de madera, se da una regulación en las enzimas oxidativas y que la magnitud de la actividad depende de la capacidad innata de la especie, la combinación entre especies y los factores ambientales (Chi y cols. 2007).

La secreción de enzimas extracelulares, degradadoras de polímeros recalcitrantes, es una característica nativa de los hongos saprótrofos y les confieren ventajas en el momento de colonizar diferentes ambientes. Estos organismos utilizan la materia orgánica muerta compuesta principalmente de polisacáridos y otros biopolímeros de la pared celular de origen vegetal, incluyendo celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, polisacáridos de la pared celular de hongos como la quitina y polisacárido de reserva de nutrientes como el almidón además de las proteínas.

La descomposición de algunos biopolímeros, celulosa, almidón y hemicelulosas proporciona el carbono y la energía para el crecimiento, mientras que otros, sobre todo de la lignina, son degradados sólo para obtener acceso a nuevos sustratos (Baldrian 2008). Esta asimilación de compuestos recalcitrantes permite la disponibilidad y reciclaje de nutrientes en el ecosistema, ya que a partir de ello, se biosintetizan moléculas de bajo peso molecular con diversas funciones biológicas. Las moléculas que les permiten realizar esta función son una gama de

enzimas ligninolíticas e hidrolíticas de gran importancia tanto biológica como biotecnológica; son enzimas inespecíficas, lo que les permite catalizar una gran cantidad de compuestos aromáticos, son intracelulares y extracelulares, estas últimas las excreta el hongo ante la presencia de sustratos recalcitrantes, como la lignina o la celulosa y utiliza a los compuestos transformados, como única fuente de carbono (Ortiz-Moreno 2010).

## **1.4. Degradación de biopolímeros**

### **1.4.1. Lignina**

La lignina es el segundo polímero más abundante en la composición vegetal y la forma más abundante de material aromático en el planeta. Los tejidos vegetales y la madera tienen aproximadamente entre 20-30% de lignina, la mayor parte se encuentra mezclada con hemicelulosa, formando una matriz que rodea a la celulosa. Esto indica que la lignina protege a los carbohidratos degradables, sin embargo, es necesario disponer de estos carbohidratos para el reciclaje en la naturaleza, por ello, los microorganismos cuentan con una maquinaria enzimática que ayuda a degradar a la lignina (Flores-Herrera y cols. 2006, Baldrian 2008). La maquinaria enzimática consta de oxidasas y peroxidasas principalmente, entre las oxidasas, se encuentran las lacasas (EC 1.10.3.2), que son enzimas que tienen la capacidad de reducir el oxígeno molecular a agua y oxidan un electrón de una gama de compuestos aromáticos (Thurston 1994). Estas enzimas se han encontrado en plantas, hongos, insectos y bacterias, donde posiblemente esté participando en la síntesis de pigmentos, en la morfogénesis o en la desintoxicación, dependiendo del organismo que las produce (Thurston 1994, Riva 2006).

Entre las peroxidasas tenemos a la enzima manganeso peroxidasa (MnP), que es una hemoproteína glicosilada que es capaz de oxidar compuestos fenólicos. Es dependiente del cambio de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , que es establecido por ácidos orgánicos, lo que permite que oxide una amplia gama de sustratos fenólicos, grupos aromáticos no fenólicos y compuestos alifáticos. La oxidación inicial de la lignina es seguida por una secuencia de reacciones basadas en radicales oxidativos que generan la mineralización de este polímero en donde intervienen estas enzimas oxidasas (Hatakka 2001, Hofrichter 2002). La producción de MnP y lacasa está muy extendida entre los basidiomicetos de la pudrición blanca, quienes producen, por lo general, en varias isoformas (Hofrichter 2002).

La regulación y la magnitud de la expresión de las enzimas en los hongos saprófitos, dependen de las condiciones del medio donde se encuentren, del grado de adaptación que han logrado por la historia de vida que tengan y esto los hace resistentes para establecerse en lugares perturbados, hostiles o sobrevivir en condiciones en estrés. Esto influye en la participación de los hongos en los ecosistemas (Morris y cols. 2007).

#### **1.4.2. Celulosa**

La celulosa es el biopolímero más abundante que compone la mayor parte de la biomasa terrestre. Es un hidrato de carbono compuesto por unidades de D-glucosa unidas por un enlace  $\beta$ -(1-4), cada monómero de glucosa tiene una rotación de 180 grados, esta estructura es estabilizada por la formación de enlaces intermoleculares y puentes de hidrógeno, impidiendo la flexión entre moléculas formando así una agregación con alto grado de ordenamiento en forma de una malla cristalina, la cual impide el ataque enzimático. Al conjunto de mallas cristalinas se les denomina “micelas”, éstas por su alto grado de formación y ordenamiento, resultan ser insolubles en agua (Marquina 1991). Aunque aparentemente la composición de la celulosa es simple, todo el patrón intermolecular forma una estructura cristalina que puede constituir una molécula muy compleja, para formar cadenas poliméricas lineales de más de 10,000 residuos de glucosa (Baldrian 2008, Llacza 2012).

Es por esta razón que la descomposición de la celulosa es un proceso complejo que requiere de moléculas eficientes que permitan separarla. Por ello, ciertos microorganismos liberan enzimas que permiten la mineralización de la celulosa en componentes de fácil asimilación. El complejo enzimático que degrada este polímero se denomina celulasa, enzimas que ejercen su función catalítica mediante la acción de agua, es decir que son hidrolíticas. El complejo se clasifica de acuerdo con sus sitios de acción sobre el sustrato celulósico y se dividen en tres grandes grupos: Endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasa (EC 3.2.1.4), exo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasa (EC 3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21). Las actividades de estas enzimas actúan sinérgicamente (Dashtban y cols. 2010).

La endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasa hidroliza uniones de fibra celulósica generando oligosacáridos de varias longitudes, actúa de forma aleatoria sobre los enlaces  $\beta$ -(1,4)-glucosídico en la superficie amorfa de la celulosa o sobre la superficie de las fibrillas de la celulosa, lo cual genera la disminución de la polimerización de este polímero, para dejar disponibles nuevos

extremos que sirven de sustrato para las exoglucanasas. Las exo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanasas o celobiohidrolasas (CBH), son enzimas que atacan a los sitios disponibles que dejaron las endoglucanasas, es decir la nueva parte externa de la cadena de celulosa, lo cual provoca la formación de celobiosa. Después de la degradación de las partes externas de la celulosa por la hidrólisis de las regiones cristalinas, actúan las  $\beta$ -(1,4)-glucosidasas quienes degradan la celobiosa a glucosa y como mecanismo de regulación producen la inhibición de las endo y exoglucanasas (Chacón y Waliszewski 2005).

La producción de enzimas con capacidad para biotransformar estos materiales suele estar asociada con las características del ambiente en el que el organismo productor se desarrolle, confiriendo en algunos casos, diferencias en la estructura de las proteínas debido a la presencia de genes codificantes diferentes o cambios en su estructura obtenidos por modificaciones postraduccionales que responden a nuevas exigencias ambientales (Zumárraga, 2007). En este sentido, en el caso de enzimas con actividad lacasa, se ha reportado que un incremento en el número de glicosilaciones de la proteína les brinda una mayor protección para poder realizar su función (Vite Vallejo y cols. 2009). A pesar de esta información, existen pocos estudios en los que se determinen puntualmente las diferencias estructurales entre metabolitos enzimáticos de hongos que habitan sitios con una estructura conservada, con respecto a los que producen hongos que están presentes en sitios con diferentes grados de perturbación.

### **1.5. Ambientes perturbados**

Una perturbación es cualquier evento que, en determinado momento, altera al ecosistema, a la comunidad o a la estructura de una población, al cambio de recursos, a la disponibilidad de sustratos o al medio físico. El papel y la función de los hongos son influidos por estas perturbaciones debido a que les generan estrés (Morris y cols. 2007). Esta perturbación afecta a nivel individuo y a nivel de comunidad a los hongos y por consecuencia se presenta alteraciones de estos organismos en la dinámica de los ecosistemas, y siempre se verá reflejada en la biomasa y diversidad fúngica. La magnitud en la que altera las características de los ecosistemas depende del evento de perturbación, de los sustratos presentes después de dicho evento, las posteriores condiciones ambientales y la capacidad que tengan los organismos de adaptarse a estos ecosistemas (Morris y cols. 2007). Por otro lado, en este



proceso de adaptación podemos encontrar a los hongos saprótrofos que tiene características que les confieren ventajas en este tipo de ambientes, entre ellas, la secreción de enzimas extracelulares ligninocelulósicas les permite competir y adaptarse a los sustratos disponibles después de una perturbación (Baldrian 2008). Existen diversos factores que pueden promover este estado alterado en los ecosistemas, entre ellos los desastres provocados por fenómenos naturales, cambios en el uso de suelo y otras actividades antropogénicas suelen estar presentes simultáneamente en ecosistemas con una estructura particular, como por ejemplo en los bosques de *Juniperus* en el estado de Tlaxcala.

### **1.6. Bosque de *Juniperus***

Dentro del territorio mexicano existen cuatro tipos de bosques: el bosque de coníferas, los bosques de encinos, los bosques mixtos y el bosque de niebla. En el bosque de coníferas, el género *Juniperus* tiene una alta distribución en el territorio, además de contar con un número considerable de especies y variedades. Ocupa un lugar destacado por su distribución, utilización y valor ecológico. Forma bosques poco extensos en asociación con otras coníferas o con pastizales (Reyes 2003).

El género *Juniperus* se encuentra generalmente en terrenos pobres y frecuentemente calizos, en lugares abiertos, expuestos al viento y al sol; su crecimiento es muy lento. Está localizado sobre una gran variedad de rocas madre y varios tipos de suelo, incluyendo los alcalinos, así como también con un contenido moderado de sales solubles y yeso, con un moderado drenaje y por esa razón, se observan en suelos poco profundos y pedregosos de laderas de los cerros. En el Valle de México se señalan bosquetes de *Juniperus deppeana* y matorrales de *Quercus microphylla* como posibles comunidades secundarias derivadas del pinar, a consecuencia de los incendios (Rzedowski 1981). Todas estas características hacen del bosque de *Juniperus* un ambiente perturbado.

En México, los *Juniperus* se distribuyen en casi todo el territorio excepto en Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo y Baja California Sur y prosperan en condiciones ecológicas diversas. Se encuentra en alturas desde los 1500 a los 4600 metros sobre el nivel del mar (Martínez 1963). Existen pocos estudios en donde se determine la presencia de hongos en este tipo de bosques a pesar de que México es un país megadiverso, ocupa el quinto lugar

en el mundo gracias al gran número de especies y endemismos que tiene y cuenta con el 10% de la diversidad terrestre del planeta. Para el caso de los hongos, se han hecho diversos análisis para tener una aproximación acerca del conocimiento y la cantidad de especies que se hayan registrado en el país. Guzmán (1998) estima que se conocen 4500 especies de macro-hongos y 2000 de micro-hongos, basado en revisiones bibliográficas, con estos datos se calcula que en México sólo se conoce el 3.2% de los hongos que existen en el país. Estos datos sugieren que es necesario hacer estudios taxonómicos de los diferentes grupos de hongos y de los diferentes ecosistemas, y sobre todo en ambientes en los cuales hay pocos o no hay registros (Aguirre-Acosta y cols. 2014). Respecto a la información del bosque de *Juniperus* en Tlaxcala, sólo se tienen algunos estudios de la presencia de hongos saprótrofos, los cuales fueron identificados (Ramírez 2000), sin embargo no se tiene conocimiento acerca de la producción y magnitud de la actividad de las enzimas que producen que puedan darnos pauta para empezar a indagar sobre la ecofisiología de estos hongos y además de hacer propuestas para su potencial uso biotecnológico.

## **2. ANTECEDENTES**

Adrio y Demain (2003) hacen una recopilación de la participación de los hongos en la biotecnología. Se ha reportado que los hongos se han utilizado para la producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, alcoholes polihídricos, pigmentos, lípidos y glicolípidos. Los metabolitos secundarios, como antibióticos, agentes antitumorales, pigmentos, entre otros, han tenido un papel importante en el sector farmacéutico y de nutrición. Los hongos son una de las principales fuentes de enzimas recombinantes para aplicaciones industriales. Tienen un impacto económico importante debido a su participación en manipulaciones moleculares que permiten el mejoramiento de procesos microbianos. Algunos de estos compuestos se producen ya comercialmente mientras que otros tienen potencial en la biotecnología.

Con respecto a los metabolitos, las enzimas ligninocelulolíticas secretadas por hongos tienen utilidad en la biotecnología por sus diferentes aplicaciones. Las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa han sido estudiadas en diversos hongos por el potencial que tienen. Hofrichter (2002), Baldrian (2006), Brijwani y cols. (2010) reportaron la presencia de la enzima lacasa y

manganeso peroxidasa en casi todos los basidiomicetos de podredumbre blanca y otros grupos de macromicetos saprótrofos. Entre algunos géneros utilizados como modelos de estudio se han encontrado enzimas con diferentes pesos moleculares. En *Trametes* se han reportado intervalos de pesos moleculares entre 60 - 70 kDa para lacasa y entre 38 - 45 kDa para manganeso peroxidasa. En *Ganoderma* se ha reportado un peso molecular para lacasa de 67 kDa y se ha reportado la presencia de manganeso peroxidasa. En *Pleurotus* se han reportado intervalos de pesos moleculares de la enzima lacasa entre 65 - 85 kDa y 42 - 45 kDa para manganeso peroxidasa. En *Phanerochaete* se han reportado intervalos entre 55 y 94 kDa para lacasa y 45 - 46 kDa para manganeso peroxidasa. En *Agaricus*, se han citado intervalos entre 66 - 96 kDa para lacasa y 40 kDa para manganeso peroxidasa. En *Lentinula* se han reportado intervalos entre 65 - 72 kDa para lacasa y 49 kDa para manganeso peroxidasa. Todo esto se ha informado en condiciones de cultivo líquido o en cultivo en estado sólido.

Entre estos hongos, Baldrian y Gabriel (2002), Karas y cols. (2011), Sławińska y Kalbarczyk (2011) y Farizah (2016) han estudiado ampliamente a *Pleurotus ostreatus* desde hace varios años debido a que es un hongo comestible y tiene diversas aplicaciones biotecnológicas. Se ha estudiado a este hongo en el ámbito de la biorremediación por las habilidades que tiene en estos procesos, teniendo un excelente desempeño. El complejo enzimático de este hongo está bien caracterizado, se sabe que está compuesto principalmente por oxidasas (lacasa y manganeso peroxidasa) e hidrolasas (celulasa y hemicelulasa). Además su capacidad de crecer en diferentes sustratos y su rápido crecimiento, han hecho a *Pleurotus ostreatus* un modelo de estudio de estas enzimas para la degradación de xenobióticos

Acerca de la posible relación del papel de las enzimas ligninocelulolíticas con diferentes condiciones o ambientes, Jaszek y cols. (2014) señalaron que el desarrollo de los hongos en el medio natural puede estar regulado por diversas condiciones de estrés, donde permite que estos desarrollen estrategias de tolerancia para colonizar ambientes hostiles a través de la excreción de enzimas lignolíticas. Por lo anterior, sometieron a condiciones de estrés oxidativo al hongo *Phellinus pini* con la adición de menadiona. Reportaron un incremento en la actividad manganeso peroxidasa y quitinasa extracelular, hasta diez veces más alto que el control, en el día 5 y 10, respectivamente, después de la adicción de menadiona. Los resultados indican un método de estimulación para aumentar la actividad y una relación entre

la secreción de enzimas lignícolas e hidrolíticas y la adaptación del metabolismo del hongo a condiciones de estrés.

Hiscox y cols. (2010) evaluaron la interacción entre micelios de hongos xilófagos y *Trametes versicolor*. Midieron actividad lacasa, manganeso peroxidasa antes y durante la interacción de los micelios de los hongos. Observaron los tipos de interacción, sustitución de los hongos xilófagos, bloqueo mutuo, sustitución parcial y sustitución de *Trametes versicolor*. Cuando se observó la sustitución de *Trametes versicolor*, encontraron ausencia de  $Mn^{2+}$ , en cambio, cuando *Trametes versicolor* estableció interacción con otros hongos se incrementó la actividad lacasa, por lo que sugieren que los hongos saprótrofos como colonizadores primarios, al estar dentro de una competencia en los ecosistemas expresan actividad lacasa con diferente magnitud.

Con respecto a los estudios de hongos aislados de algunos ecosistemas en México, Antonio Revuelta (2013) aisló e identificó macromicetos lignícolas nativos de la región centro de Veracruz. Seleccionó a los hongos con mayor potencial y evaluó la capacidad enzimática para producir lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa. Encontró respuesta positiva para la enzima lacasa en todas las cepas, mientras que actividades manganeso y lignina peroxidasa solamente se observaron en cinco y dos cepas respectivamente. De las cepa seleccionadas, utilizó el índice de potencia para determinar cualitativamente la producción enzimática, encontrando una mayor producción en *Ganoderma* sp., *Panus* sp., *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes villosa* y *Trametes versicolor*. Creció estas especies a cultivo líquido y evaluaron la producción de lacasa y manganeso peroxidasa, encontrando que *Trametes villosa* produjo mayor actividad lacasa y manganeso peroxidasa, indicando que las cepas aisladas de ambientes naturales brindan las bases para futuras investigaciones de macromicetos lignícolas con potencial.

Ramírez (2000) aisló hongos saprótrofos del bosque de *Juniperus* en Ixtacuixtla, Tlaxcala con la finalidad de detectar aquellos que tuvieran la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Identificó la presencia en este bosque de los géneros *Lepista*, *Agaricus*, *Collybia*, *Coprinus*, *Cyathus*, *Lepiota*, *Psathyrella*, *Ramaria*, *Tricholoma*, *Clitocybe*, *Agrocybe*, *Geastrum*, y *Marasmius*. Las cepas de los géneros *Agrocybe* y *Clitocybe* inhibieron el crecimiento de seis cepas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium* y *Heterobasidion*.

Entre los hongos que se trabajaron en este estudio se encuentra el género *Agrocybe*. En este sentido, Reyes y cols. (2014) trabajaron con el hongo comestible en Guatemala, *Agrocybe cylindracea*. Analizaron el crecimiento micelial de cinco cepas nativas de esta especie en diferentes medios de cultivo y pH para obtener la mejor condición de su cultivo a nivel de laboratorio. Encontraron que a 26 °C, en EMA y pH 6 se favoreció el crecimiento de la mayoría de las cepas estudiadas. Además, al evaluar las interacciones entre las cepas, el medio de cultivo y el pH se obtuvo un mejor crecimiento micelial en PDA y EMA a pH de 6.

Kim y cols. (2005) reportaron estudios acerca de la optimización en la producción de biomasa y exopolisacáridos en *Agrocybe aegerita*. Se ha reportado que este hongo tiene actividades fisiológicas antitumorales, hipoglucémicas, inhibición de la peroxidación de lípidos y actividad inmunoestimulante, lo que lo hace un buen alimento a nivel de salud. Observaron mejor producción de biomasa de micelio y de exopolisacáridos en cultivos sumergidos de este hongo, considerándolo una buena propuesta, para la obtención de compuestos bioactivos o metabolitos primarios y secundarios.

Lassen y cols. (2001) trabajaron con la enzima fitasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfomonoéster del fitato y forma compuestos de fosfatos de mio-inositol y fosfato inorgánico. Construyeron una biblioteca de expresión de cDNA de esta enzima proveniente de cuatro basidiomicetos *Peniophora lycii*, *Ceriporia* sp., *Trametes pubescens* y *Agrocybe pediades*. Del hongo *Ceriporia* sp., encontraron dos cDNA de fitasa. Las cinco fitasas se expresaron en *Aspergillus oryzae*, se purificaron y caracterizaron. La enzima fitasa de *Agrocybe pediades* tuvo una longitud de 453 aminoácidos, un potencial de glicosilación de 6, un pH óptimo entre 5.0 y 6.0, una temperatura óptima de 50 °C. Encontraron una actividad enzimática específica de 400 U/mg. Las cinco enzimas mostraron una preferencia actuando inicialmente en el grupo 6-fosfato del ácido fítico, una característica que no se había reportado para fitasas fúngicas.

Respecto al género *Gymnopus* se han reportado pocos estudios. Valášková y cols. (2007) evaluaron la actividad de enzimas lignícolas de basidiomicetos aislados de un bosque de *Quercus petraea* que podría degradar la hojarasca seca. Los hongos fueron identificados como *Hypholoma fasciculare*, *Rhodocollybia butyracea* y *Gymnopus* sp. Los tres hongos produjeron las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa y ninguno produjo lignina peroxidasa o alguna otra peroxidasa dependiente. *Gymnopus* sp., mostró una tasa estable de pérdida de masa de la

hojarasca durante todo el período de incubación con el inicio posterior a la producción de enzimas ligninolíticas. Este hongo disminuyó de forma sustancial el contenido de lignina. Tuvo una mayor actividad manganeso peroxidasa en la sexta semana con 580 U.g<sup>-1</sup> y una mayor actividad lacasa de 240 U.g<sup>-1</sup> que se mantuvo hasta la doceava semana.

Větrovský y cols. (2013) caracterizaron la actividad de diversas enzimas de *Fomes fomentarius* comparado con siete basidiomicetos saprótrofos *Rhodocollybia butyracea*, *Hypholoma fasciculare*, *Irpex lacteus*, *Fomitopsis pinicola*, *Pleurotus ostreatus*, *Piptoporus betulinus* y *Gymnopus erythropus*. Con respecto a *Gymnopus*, encontraron una actividad lacasa de 4.2 mUml<sup>-1</sup> y una actividad manganeso peroxidasa de 5.9 mUml<sup>-1</sup>.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Considerando el hecho de que diversos ecosistemas imponen retos de sobrevivencia para los organismos en general y los hongos en particular, dando paso incluso al establecimiento de especies de hongos distintas a los originales; se puede esperar que los metabolitos producidos en respuesta a condiciones estresantes, puedan tener un valor agregado para el desarrollo humano, lo que haría considerarlos buenos modelos de estudio. Es por ello que la búsqueda de posibilidades futuras basadas en indicios presentes permite explorar diversos ambientes como fuente de recursos, evaluando la expresión de metabolitos en nuevos modelos de estudios, proporcionando nueva información sobre recursos biotecnológicos del país.

Además, ambientes perturbados, como los bosques de *Juniperus* en México, han sido pobremente estudiados en cuanto a la variedad de hongos saprótrofos cultivables y los metabolitos que dichos hongos producen, tales como las enzimas del complejo de degradación de celulosa o lignina (compuestos recalcitrantes de origen vegetal), que podrían mostrar diferencias en cuanto a sus características físicas, magnitud en actividades enzimáticas e incluso en cuanto a su papel fisiológico dentro de estos organismos y en el ambiente, al compararse con las enzimas ya descritas provenientes de modelos de hongos saprótrofos previamente caracterizados. Por tales razones, el presente trabajo podría contribuir de manera importante al conocimiento de la producción de enzimas ligninocelulolíticas extracelulares a

partir de especies fúngicas que forman parte de los recursos cultivables con que contamos en hábitats cercanos y poco estudiados como los bosques de *Juniperus* en el estado de Tlaxcala.

Por tanto, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Los hongos saprótrofos aislados de un bosque de *Juniperus* expresan las enzimas lacasa, manganeso peroxidasa y celulasa en cultivo sólido?
- ¿En qué magnitud se presenta la actividad de las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa en dichos hongos cuando son cultivados en medio líquido con respecto a hongos productores conocidos como *Pleurotus ostreatus*?
- ¿Los hongos saprótrofos cultivados en medio líquido expresan diferentes isoenzimas de lacasa y manganeso peroxidasa?

#### **4. OBJETIVOS**

Objetivo general

Determinar la expresión de enzimas ligninolíticas e hidrolíticas de dos especies de hongos saprótrofos de un bosque de *Juniperus*.

Objetivos específicos

1. Determinar cualitativamente las actividades enzimáticas lacasa, manganeso peroxidasa y celulasa en medio sólido producidas por cepas pertenecientes a dos especies de hongos saprótrofos provenientes de un bosque de *Juniperus*.
2. Evaluar cuantitativamente la actividad de las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa en medio líquido producidas por dos cepas de dos especies de hongos saprótrofos provenientes de un bosque de *Juniperus*.
3. Determinar los perfiles de expresión de las isoenzimas de lacasa y manganeso peroxidasa de dos cepas de dos especies de hongos saprótrofos provenientes de un bosque de *Juniperus*.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Organismos de estudio**

Se seleccionaron dos especies de hongos saprótrofos, la cepa OAR002 de *Agrocybe* cf. *pediades* y la cepa OAR006 de *Gymnopus* sp., recolectados de un bosque de *Juniperus* ubicado en el municipio de Ixtacuixtla en el estado de Tlaxcala, mismas que forman parte de la colección de cepas fúngicas del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

### **5.2. Primera fase**

#### **5.2.1. Evaluación de la velocidad media de crecimiento y de la actividad enzimática cualitativa en medio sólido**

A partir de las dos cepas de las especies seleccionadas, *Agrocybe* cf. *pediades* y *Gymnopus* sp., se probaron cinco medios de cultivo con diferente composición para determinar las mejores condiciones de crecimiento en condiciones de laboratorio (tabla 1). Para ello se trabajó con un diseño completamente aleatorizado de un factor con tres réplicas, donde los tipos de medios de cultivo representan un nivel del tratamiento (tabla 2). El inóculo estuvo conformado por pellets de micelio propagado en cajas de Petri. La inoculación de los pellets en las cajas de Petri con los diferentes medios de cultivo se realizó de manera aleatoria. Cada caja de Petri se inoculó con un fragmento de 6 mm de diámetro de micelio procedente de la periferia de una de las colonias de las cepas de hongos saprótrofos seleccionadas al azar. Las colonias se desarrollaron en los cinco diferentes medios de cultivo en estado sólido durante el tiempo que les tomó llenar la caja de Petri. Se mantuvieron a una temperatura constante en una incubadora a 25 °C en completa oscuridad. Cada 24 horas, se hizo la medición del diámetro del crecimiento micelial (mm) con un vernier digital marca Surtek. El crecimiento del micelio se evaluó estimando la velocidad media de crecimiento (VMC). Para ello, se graficaron los datos y se realizó una regresión lineal, utilizando la ecuación de la recta. Se obtuvo el valor de la pendiente que indica los promedios de velocidad de crecimiento.



**Tabla 1.** Composición de los cinco medios de cultivo

<b>Medio 1</b> (Téllez y cols. 2008)	<b>Medio 2</b> (Rojas y col. 2010)	<b>Medio 3</b> (Maziero y cols. 1999)	<b>Medio 4</b> (Fang y Zhong 2002)	<b>Medio 5</b> (Radha 2005)
Glucosa 10 g/L	Glucosa 10 g/L	Glucosa 39 g/L	Sacarosa 35 g/L	
Extracto de levadura 0.6 g/L	Extracto de levadura 1 g/L	Extracto de levadura 2.0 g/L	Extracto de malta 2.5 g/L	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.6 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.0 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5 g/L	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.2 g/L	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1.0 g/L	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.4 g/L	KCl 0.5 g/L	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5.0 g/L	Peptona 5 g/L	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.1 g/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05 g/L	Agar 15g/L	Peptona 1.0 g/L	Agar 15 g/L	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 0.5 g/L
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 0.05 g/L		Agar 15g/L		FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.1 g/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.001 g/L				ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.001 g/L
Agar 15g/L				Agar 15g/L
<b>Relación C/N *</b>				
4/0.0156 = 77.5 C/N	4/0.086 = 46.51 C/N	15.6/1.272 = 12.26 C/N	16.91/0.200 = 84.55 C/N	N = 1.06

\* Relación carbono nitrógeno (ver Anexo 1)

**Tabla 2.** Diseño experimental completamente aleatorizado para el crecimiento del micelio

<b>Medios de cultivo</b>				
Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
Tres réplicas	Tres réplicas	Tres réplicas	Tres réplicas	Tres réplicas

La variable X: los medios de cultivo

Indicador: crecimiento radial

Variable respuesta (Y): velocidad media de crecimiento

Para la evaluación cualitativa de la actividad enzimática, se sometieron los dos hongos saprótrofos en los cinco diferentes medios de cultivo en cajas de Petri. También se trabajó con un diseño completamente aleatorizado de un factor, donde los tipos de medios de cultivo representan un nivel del tratamiento con cinco réplicas. En esta etapa, a los medios de cultivo se les añadió el sustrato que utiliza la enzima de interés para evidenciar su actividad (tabla 3).

Para lacasa se añadió 2,6-dimetoxifenol (DMP) 4 mM; para manganeso peroxidasa se añadió DMP más sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>) 4 mM y peróxido de hidrógeno 30% 0.1 mM; en

ambas pruebas la reacción positiva produjo un halo de oxidación de color amarillo a anaranjado. Para la actividad celulasa se sustituyó la fuente de carbono de los medios de cultivo por carboximetilcelulosa al 1% (p/v), y se incubaron a 25 °C entre 8 y 15 días (dependiendo del hongo). Posteriormente en condiciones estériles se retiró la tapa de la caja de Petri y se agregaron 5 ml del colorante rojo Congo 0.5 g/L que actuó como revelador durante 15 minutos. Después de este tiempo, se retiró el exceso y se agregaron 5 mL de NaCl 40 g/L para terminar la reacción y lavar el rojo Congo. Se hicieron dos lavados y se observó un halo blanco de hidrólisis en contraste con el colorante. Posteriormente se midió el diámetro de los halos de hidrólisis y el crecimiento micelial, para ambos hongos, los parámetros fueron medidos con un vernier digital marca Surtek (mm).

Para determinar la actividad enzimática cualitativa se calculó el índice de potencia (IP), definido como la razón entre el área del crecimiento del halo de oxidación y el área de crecimiento de la colonia. Para estimar la magnitud real del halo de oxidación considerando a la velocidad de crecimiento del micelio, se realizó el cálculo del índice de potencia (IP) evaluado a un mismo tiempo en ambas cepas, utilizando la siguiente fórmula:

$$IP = \text{halo de oxidación} / \text{diámetro del crecimiento del micelio}$$

**Tabla 3.** Diseño experimental completamente aleatorizado para la evaluación cualitativa de la actividad enzimática

<b>Enzima lacasa</b>				
<b>Composición de medios de cultivo más DMP (4mM)</b>				
Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas
<b>Enzima manganoso peroxidasa</b>				
<b>Composición de medios de cultivo más DMP (4mM) más MnSO<sub>4</sub> (4mM) más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (0.1 mM)</b>				
Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas
<b>Enzima celulasa</b>				
<b>Composición de medios de cultivo más carboximetilcelulosa (1% p/v)</b>				
Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas	Cinco réplicas

### 5.3. Segunda fase

#### 5.3.1. Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática lacasa y manganeso peroxidasa en cultivo líquido

Para esta fase, se sometieron las dos cepas de hongos (*Agrocybe cf. pediades* y *Gymnopus* sp.) en un medio de cultivo seleccionado a partir de la primera fase, en donde se observó un índice de potencia alto, para poder determinar la actividad enzimática. Se planteó comparar a los hongos saprótrofos aislados del presente estudio con un hongo modelo bastante estudiado en cuanto a la producción de este tipo de enzimas, *Pleurotus ostreatus* (cepa PoB), para contar con un referente para comparar la magnitud de las actividades enzimáticas utilizando el medio de cultivo seleccionado. El diseño planteado es en bloques al azar, donde el tratamiento es el medio de cultivo y los bloques son determinados por el tiempo. Se trabajaron cinco tiempos. Dentro de cada bloque se tienen los hongos a evaluar y *Pleurotus ostreatus* (tabla 4).

De las dos cepas de hongos saprotrófos y de *Pleurotus ostreatus*, se tomaron de la periferia de las colonias como inóculo tres pellets con un diámetro de 6 mm obtenidos mediante el corte con un horador que se añaden de manera aleatoria dentro de matraces Erlenmeyer de 125 mL, conteniendo 50 mL del medio e incubados con agitación orbital constante a 115 rpm a 25 °C en oscuridad, durante 20 días. Cada 24 horas se hizo un muestreo, seleccionando de manera aleatoria un matraz, del cual fue filtrado el micelio empleando papel filtro Whatman No.1 estéril y una bomba de vacío en un matraz Kitasato, para obtener el extracto crudo enzimático (ECE).

**Tabla 4.** Diseño experimental en bloques al azar para la evaluación cuantitativa de actividad enzimática

	<i>Agrocybe cf. pediades</i>	<i>Gymnopus</i> sp.	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Bloque 1	21 matraces	21 matraces	21 matraces
Bloque 2	21 matraces	21 matraces	21 matraces
Bloque 3	21 matraces	21 matraces	21 matraces
Bloque 4	21 matraces	21 matraces	21 matraces
Bloque 5	21 matraces	21 matraces	21 matraces

### 5.3.2. Caracterización del cultivo en medio líquido

Del muestreo de cada 24 horas, el micelio obtenido por filtración fue separado en el papel filtro y se colocó en platos de papel aluminio para poder secar y realizar la cuantificación de biomasa, mientras que el extracto crudo enzimático (ECE) obtenido fue almacenado en tubos falcón de 50 mL de capacidad a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Para evaluar la actividad enzimática extracelular se utilizó el ECE. La actividad se midió a través del cambio de absorbancia de luz por el sustrato, detectado en un espectrofotómetro marca SmartSpect<sup>TM</sup> Plus (BIO-RAD).

La cuantificación de la actividad enzimática es indicada en Unidades Internacionales (UI), donde 1 UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de  $1\text{ }\mu\text{M}$  de sustrato en producto por minuto. Para la cuantificación de la actividad lacasa volumétrica se utilizó un blanco de calibración que consta de  $200\text{ }\mu\text{L}$  del medio de cultivo sin inocular y  $800\text{ }\mu\text{L}$  de 2,6-dimetoxifenol (DMP)  $2\text{ mM}$ . La mezcla de reacción consiste en  $200\text{ }\mu\text{L}$  de ECE y  $800\text{ }\mu\text{L}$  de DMP al  $2\text{ mM}$  en buffer de fosfatos  $0.1\text{ M}$  y pH de 6.5, incubando 4 minutos a  $39\text{ }^{\circ}\text{C}$  y leyendo a  $468\text{ nm}$ , utilizando el coeficiente de extinción molar de  $49.6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (Sharma y cols. 2016). Para la cuantificación de la actividad manganeso peroxidasa volumétrica se utilizó como blanco una mezcla con todos los reactivos de la mezcla de reacción, menos  $\text{MnSO}_4$  y de igual manera que con la enzima lacasa, el medio sin inocular, almacenado bajo las mismas condiciones que el ECE. En este caso, tanto el blanco como el ECE se diluyeron 5 veces, es decir, se utilizaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  de ECE (o blanco) y  $400\text{ }\mu\text{L}$  de agua. La mezcla de reacción medida indirectamente estuvo compuesta por  $300\text{ }\mu\text{L}$  de buffer de tartrato de sodio  $0.1\text{ M}$  y pH de 5,  $100\text{ }\mu\text{L}$  de ECE y  $400\text{ }\mu\text{L}$  de agua,  $100\text{ }\mu\text{L}$  de DMP  $2\text{ mM}$ ,  $50\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$   $0.5\text{ mM}$  y  $50\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30\%$   $0.1\text{ mM}$ , incubando 10 minutos a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se leyó a  $469\text{ nm}$ , con un coeficiente de extinción molar de  $27.5\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (Camarero y cols. 1999). Como control, se utilizaron los componentes de la reacción, menos  $\text{H}_2\text{O}_2$  al  $30\%$ , observando que no hubiera un cambio en la reacción. Para determinar la actividad específica se evaluó la proteína total soluble en el ECE. Se utilizó el método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina para la construcción de la curva patrón. La reacción se llevó a cabo en un volumen de  $15\text{ }\mu\text{L}$  de la muestra de ECE a la cual se adicionaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (BIO-RAD). La mezcla de reacción se agitó en vórtex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se midieron los valores de absorbancia

a 595 nm en un espectrofotómetro. La actividad específica se calculó utilizando los datos de actividad enzimática volumétrica (UL/mL) y la concentración de proteína (UI/mg). Para la determinación de la cantidad de biomasa producida se utilizó el método de peso seco. El micelio fue separado del papel filtro, colocado en platos de aluminio y secado en horno a 40 °C durante 48 h, posteriormente se registró el peso en gramos utilizando una balanza analítica.

#### **5.4. Tercera fase**

##### **5.4.1. Determinación de isoenzimas mediante zimografía**

A partir de los ECE obtenidos en la fase anterior y de acuerdo con magnitud de la actividad se hizo la búsqueda de isoenzimas de la enzima lacasa y manganeso peroxidasa. Para ello, se utilizó la técnica de electroforesis de proteínas en geles de acrilamida en condiciones semi desnaturalizantes. La concentración de la acrilamida fue del 4 % en el gel de empaquetamiento; y 11 y 12 % en el gel de corrimiento para *Agrocybe cf. pediades* y *Pleurotus ostreatus*, respectivamente. Para revelar, se utilizó el sustrato que evidencia la actividad de la enzima de interés. Para lacasa, se utilizó el sustrato 2 6-dimetoxifenol (DMP) 2 mM en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5, y para manganeso peroxidasa se utilizó DMP 2 mM en buffer de tartrato de sodio 0.1 M y pH 5.0, MnSO<sub>4</sub> 2 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % 0.1 mM para iniciar la reacción.

##### **5.5. Análisis estadísticos**

En la primera fase, se utilizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para evaluar si había diferencias en las velocidades medias de crecimiento (VMC) de los diferentes medios, con y sin la presencia de sustratos para las enzimas. Para verificar entre que medias de los datos de los medios de cultivo había diferencias, se realizó una prueba pos hoc de Tukey.

En la segunda fase, se aplicó una prueba de t de student para datos pareados para evaluar si había diferencias significativas entre las medias de biomasa, actividad lacasa y manganeso peroxidasa en *Agrocybe cf. pediades* y *Pleurotus ostreatus*.

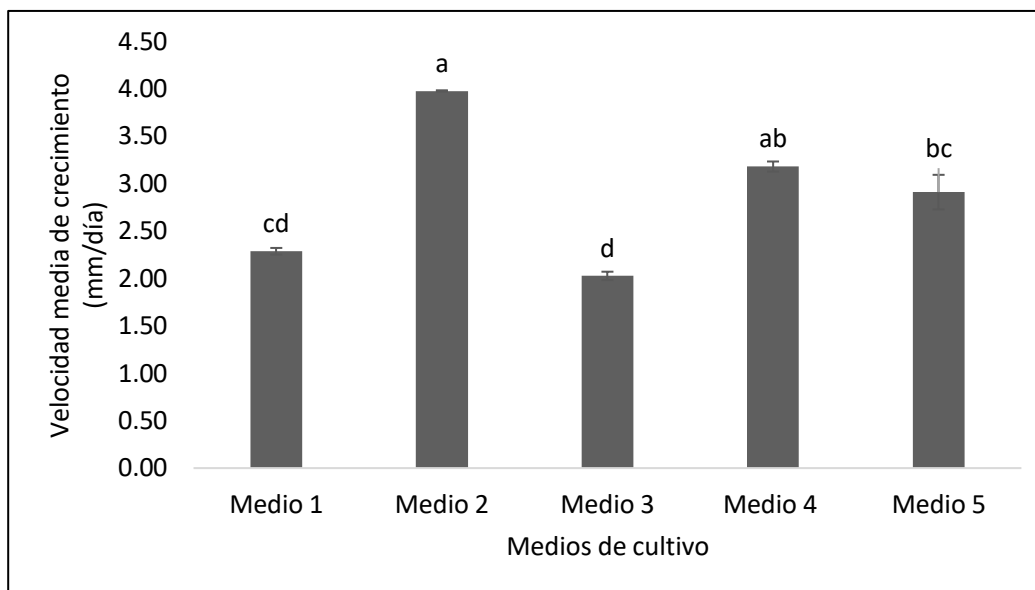
Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software estadístico XLSTAT 2016 como complementos analíticos para Microsoft Excel 2013.

## 6. RESULTADOS PRIMERA FASE

### 6.1. Estimación de la velocidad media de crecimiento de *Agrocybe cf. pediades*

#### 6.1.1. Sin adición de sustrato enzimático

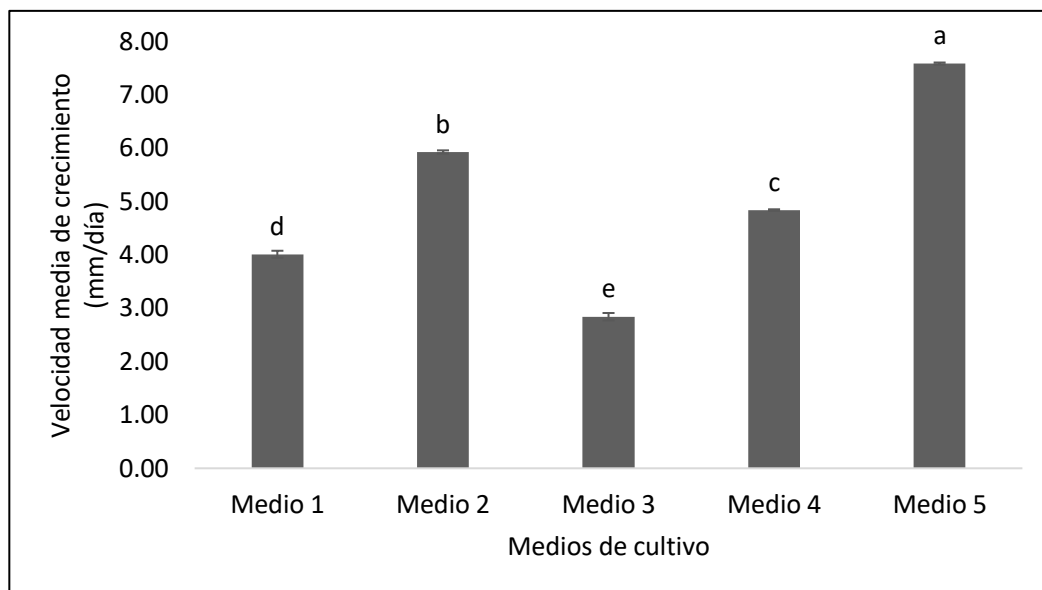
La mayor velocidad media de crecimiento (VMC) en medios sin adición de sustrato enzimático para *Agrocybe cf. pediades* se obtuvo en los medios 2 y 4, en el primero, la VMC fue de 3.98 mm/día y en el segundo la VMC fue de 3.18 mm/día. El tiempo en que el hongo logró invadir la totalidad de la caja de Petri en estos medios de cultivo (2 y 4) también fue menor, en comparación con el tiempo registrado para los medios restantes, 20 y 26 días respectivamente. Las VMC en los demás medios de cultivo fueron: medio 1, 2.29 mm/día; medio 3, 2.03 mm/día y medio 5 tuvo 2.91 mm/día. De acuerdo con el análisis pos hoc de Tukey realizado, estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los promedios de VMC de los medios 2 y 4 con 1, 3 y 5 ( $F_{4, 10} = 21.309$ ,  $p < 0.0001$ ). (Figura 1).



**Figura 1.** Velocidad media de crecimiento de *Agrocybe cf. pediades* en cinco medios de cultivo sin adición del sustrato enzimático. Cada barra representa la media de tres réplicas  $\pm$  EE. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

### 6.1.2. Sustrato enzimático adicionado con 2,6-dimetoxifenol (lacasa)

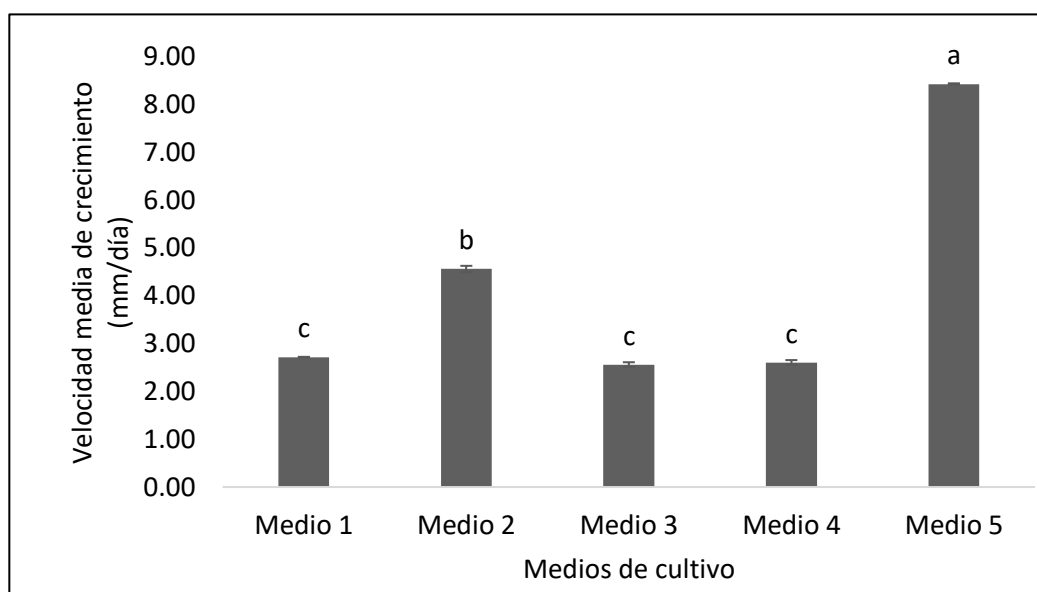
La adición del 2,6-dimetoxifenol (DMP) a los medios de cultivo influyó positivamente en el crecimiento micelial. El medio 5 promovió la mayor velocidad media de crecimiento (VMC) con respecto a los demás medios, en este medio el hongo alcanzó una VMC de 7.58 mm/día y terminó de invadir totalmente la caja de Petri en el día 11. La VMC en los demás medios de cultivo fueron: 4.01 mm/día para el medio 1, 5.93 mm/día para el medio 2 de, 2.84 mm/día para el medio 3 de y 4.84 mm/día para el medio 4 de. De acuerdo con el análisis pos hoc de Tukey realizado, estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre todos los promedios de VMC de los cinco medios de cultivo ( $F_{4, 20} = 306.458$ ,  $p < 0.0001$ ). (Figura 2).



**Figura 2.** Velocidad media de crecimiento de *Agrocybe cf. pediades* en cinco medios adicionados con sustrato DMP. Cada barra representa la media de cinco réplicas  $\pm$  EE. Letras diferentes indican diferencias significativas.

### 6.1.3. Sustrato enzimático adicionado con 2,6-dimetoxifenol, sulfato de manganeso y peróxido de hidrógeno (manganeso peroxidasa)

La adición de los sustratos 2,6-dimetoxifenol (DMP) o sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) influyó positivamente con respecto a los medios que no se les añadió un sustrato enzimático pero influyó negativamente el añadir DMP con  $\text{MnSO}_4$  en comparación con la adición de DMP solamente. El medio en que se obtuvo una mayor velocidad media de crecimiento (VMC) fue en el medio 5, con un valor de 8.43 mm/día y logró la invasión total de la caja de Petri al día 10. El medio con el que se obtuvo el siguiente valor más alto de VMC fue el medio 2 con 4.56 mm/día, luego le siguió el medio 1, medio 4 y medio 3 con valores de VMC similares, 2.72 mm/día, 2.61 mm/día y 2.56 mm/día, respectivamente. El análisis pos hoc de Tukey realizado indica diferencias estadísticamente significativas entre las velocidades de crecimiento promedio obtenidas en los medios 5, 2 y 1 ( $F_{4, 20} = 669.170$ ,  $p < 0.0001$ ). (Figura 3).



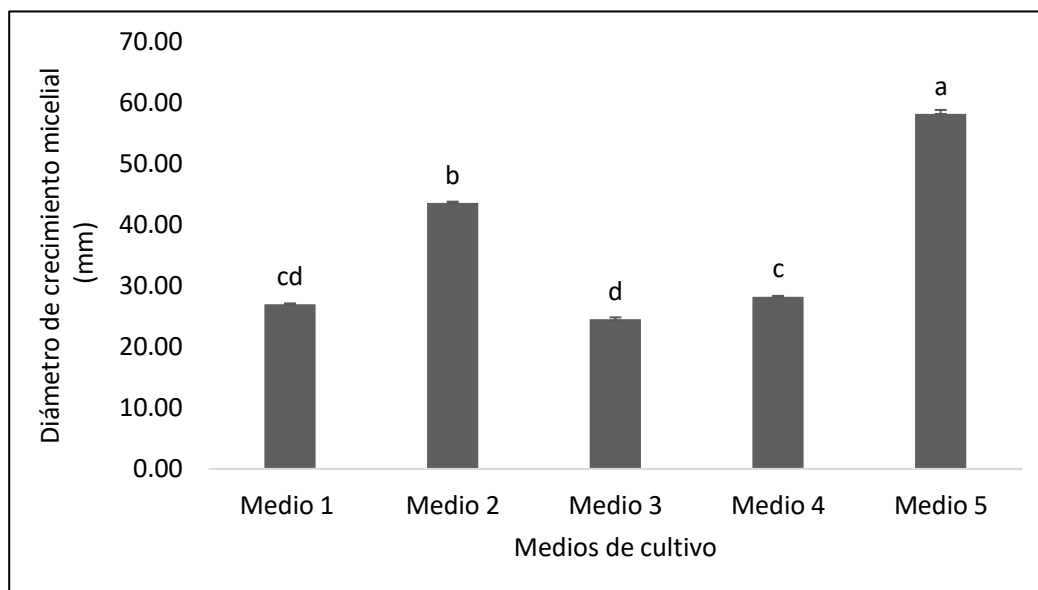
**Figura 3.** Velocidad media de crecimiento de *Agrocybe cf. pediades* en cinco medios adicionados con DMP +  $\text{MnSO}_4$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cada barra representa la media de cinco réplicas  $\pm$  EE. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.



#### 6.1.4. Sustrato enzimático adicionado con carboximetilcelulosa (celulasa)

Para determinar la actividad enzimática celulasa de *Agrocybe cf. pediades*, se eligió el día 8 del cultivo para hacer la reacción en un único tiempo. Se midió el diámetro del crecimiento micelial en este día en los 5 medios de cultivo.

Se encontró el mayor diámetro de crecimiento en el medio 5 con 58.17 mm, seguido del medio 2, medio 4, medio 1 y medio 3 con 43.61 mm, 28.23 mm, 27.02 mm y 24.52 mm, respectivamente. El análisis pos hoc de Tukey mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre los diámetros de crecimiento en el medio 5 con el medio 2, 3 y 4 ( $F_{4, 20} = 331.33, p < 0.0001$ ). (Figura 4).



**Figura 4.** Diámetro de crecimiento micelial de *Agrocybe cf. pediades* en el día 8 en cinco medios adicionados con el sustrato carboximetilcelulosa. Cada barra representa la media de cinco réplicas  $\pm$  EE. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

## 6.2. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de *Agrocybe cf. pediades*

### 6.2.1. Actividad enzimática cualitativa lacasa

El sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP) reveló un halo de oxidación color anaranjado el cual era mayor respecto al diámetro de crecimiento. La mayor velocidad media de incremento del halo de oxidación en *Agrocybe cf. pediades* se obtuvo con el medio 5 con respecto al obtenido con los demás medios. El promedio de la velocidad de incremento del halo fue de 7.02 mm/día y llegó al límite de la caja de Petri al día 10. Las velocidades de incremento de halo de

oxidación en los otros medios de cultivo fueron: en el medio 1 se obtuvo una velocidad promedio de 4.59 mm/día, el medio 2 de 5.98 mm/día, el medio 3 de 4.76 mm/día y en el medio 4 de 4.35 mm/día. De estos datos del halo y de la velocidad de crecimiento se tomó el día 10 de cada medio y se determinó el índice de potencia (IP). Los resultados indican que el mayor IP se presentó en el medio 3 con un valor de 1.76, mostrando mayor actividad cualitativa lacasa con respecto al crecimiento micelial, teniendo un dato representativo que evidencia una buena magnitud de actividad enzimática. Con respecto al crecimiento micelial (con sustrato), este es muy lento (VMC de 2.83 mm/día) y tardó 27 días en invadir completamente la caja de Petri. En los demás medios de cultivo se encontraron valores de IP de 1.52, 1.20, 1.28 y 1.14 para los medios 1, 2, 4 y 5 respectivamente. El análisis pos hoc de Tukey mostró que hay diferencias estadísticamente significativas en el IP del medio 3 con respecto a los demás medios ( $F_{4, 20} = 170.973$ ,  $p < 0.0001$ ). (Tabla 5).

**Tabla 5.** Determinación del índice de potencia de *Agrocybe cf. pediades* en cinco medios de cultivo con sustrato DMP

Medios de cultivo	Halo de oxidación (mm)	Velocidad media de crecimiento (mm)	Índice de potencia
Medio 1	65.89	43.38	1.52 <sup>b</sup>
Medio 2	80.41	67.21	1.20 <sup>cd</sup>
Medio 3	50.95	28.93	1.76 <sup>a</sup>
Medio 4	62.93	49.25	1.28 <sup>c</sup>
Medio 5	84.00	73.98	1.14 <sup>d</sup>

Cada dato representa la media de cinco réplicas. Los datos corresponden al día 10 de crecimiento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

### 6.2.2. Actividad enzimática cualitativa manganeso peroxidasa

La adición de los sustratos 2,6-dimetoxifenol (DMP), sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) reveló un halo de oxidación entre anaranjado y amarillo. El medio con mayor velocidad media de incremento del halo de oxidación es el medio 2 con 6.99 mm/día. El halo llegó al límite de la caja de Petri el día 10. El medio que le sigue en valor fue el medio 5 donde se obtuvo una VMC de 6.44 mm/día. El halo de oxidación alcanzó el límite de la caja de Petri el mismo día. En los demás medios de cultivo, encontramos velocidades de 4.93 mm/día, 4.53 mm/día y 3.83 mm/día de los medios 1, 3 y 4 respectivamente. De estos

datos del halo y de la velocidad de crecimiento se tomó el dato del día 10 de cada medio y se determinó el índice de potencia (IP). Se encontró el mayor IP en el medio 1 con un valor de 1.53 indicando que la mayor actividad manganeso peroxidasa se encontró en este medio con respecto al crecimiento micelial. En los demás medios de cultivo, 2, 3, 4 y 5 se obtuvieron un IP de 1.26, 1.16, 1.40 y 1.00 respectivamente. El análisis pos hoc de Tukey mostró que hay diferencias estadísticamente significativas el IP entre el medio 1 y los demás medios de cultivo ( $F_{4,20} = 43.538$ ,  $p < 0.0001$ ) (tabla 6).

**Tabla 6.** Determinación del índice de potencia de *Agrocybe cf. pediades* en cinco medios de cultivo con los sustratos DMP,  $MnSO_4$  y  $H_2O_2$

Medios de cultivo	Halo de oxidación (mm)	Velocidad media de crecimiento (mm)	Índice de potencia
Medio 1	54.64	35.82	1.53 <sup>a</sup>
Medio 2	84.00	66.72	1.26 <sup>b</sup>
Medio 3	33.99	29.48	1.16 <sup>b</sup>
Medio 4	36.98	26.43	1.40 <sup>b</sup>
Medio 5	84.00	84.00	1.00 <sup>c</sup>

Cada dato representa la media de cinco réplicas. Los datos corresponden al día 10 de crecimiento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

### 6.2.3. Actividad enzimática cualitativa celulasa

La reacción de sustrato carboximetilcelulosa con el rojo Congo reveló un halo de hidrólisis blanco en un único tiempo (día 8) el cual era mayor que el crecimiento micelial. Se encontró una mayor actividad en el medio 5, el halo de hidrólisis se observaba en toda la superficie del medio de cultivo dentro de la caja de Petri, coincidiendo con el diámetro de crecimiento de 84 mm e invadió por completo la caja de Petri en el día 8. En los demás medios tenemos diámetros diferentes, en el medio 1 se obtuvieron 43.39 mm, en el medio 2, 45.90 mm; en el medio 3, 39.73 mm y en el medio 4, 32.15 mm. De estos datos del halo y de la velocidad de crecimiento se eligió el día 8 de cada medio y se determinó el índice de potencia (IP). El IP muestra que la mayor actividad enzimática con respecto al crecimiento es de 1.62 en el medio 3. En el medio 1 se obtuvo un IP de 1.61, en el medio 2, 1.05; en el medio 4, 1.14 y en el medio 5, 1.45. El análisis pos hoc de Tukey mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre el IP entre los medios 3 con 2 y 5 ( $F_{4,20} = 127.618$ ,  $p < 0.0001$ ). (Tabla 7).

**Tabla 7.** Determinación del índice de potencia de *Agrocybe cf. pediades* en cinco medios de cultivo con el sustrato carboximetilcelulosa

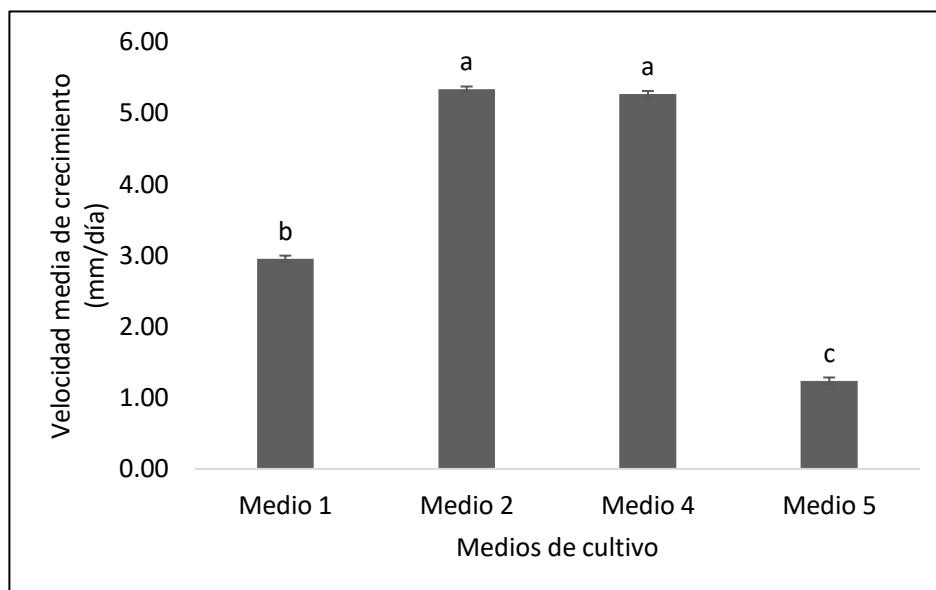
Medios de cultivo	Halo de hidrólisis (mm)	Diámetro de crecimiento (mm)	Índice de potencia
Medio 1	43.40	27.02	1.61 <sup>a</sup>
Medio 2	45.91	43.61	1.05 <sup>c</sup>
Medio 3	39.74	24.52	1.62 <sup>a</sup>
Medio 4	32.15	28.23	1.14 <sup>c</sup>
Medio 5	84.00	58.51	1.45 <sup>b</sup>

Cada dato representa la media de cinco réplicas. Los datos corresponden al día 8 de crecimiento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

### 6.3. Estimación de la velocidad media de crecimiento de *Gymnopus* sp.

#### 6.3.1. Sin adición de sustrato enzimático

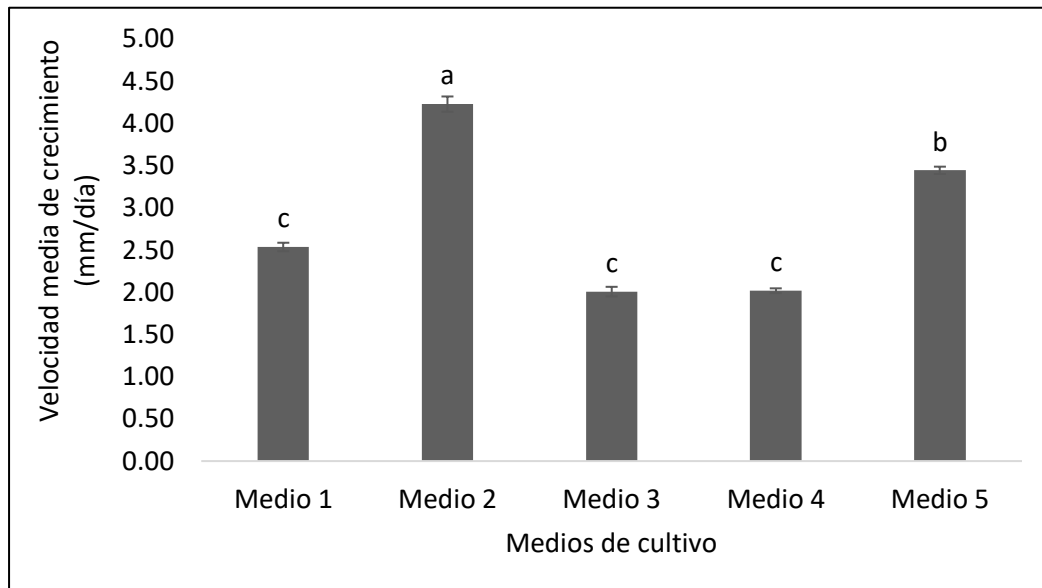
En los medios 2 y 4 se obtuvieron las mayores velocidades de crecimiento (VMC) con respecto a los demás, en el medio 2 se obtuvo una VMC de 5.34 mm/día y en el medio 4 una VMC de 5.27 mm/día. En ambos medios, el micelio invadió por completo las cajas de Petri en 16 días. En los demás medios de cultivo se obtuvieron diferentes VMC; en el medio 1, 2.95 mm/día y medio 5, 1.24 mm/día. En esta fase, en el medio 3 no se presentó crecimiento de *Gymnopus* sp. El análisis pos hoc de Tukey realizado, indica que estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre las medias de la velocidad de crecimiento de los medios 2 y 4 con 1 y 5 ( $F_{3,8} = 244.439$ ,  $p < 0.0001$ ). (Figura 5).



**Figura 5.** Velocidad de crecimiento de *Gymnopus* sp., en cuatro medios de cultivo sin adición de sustrato enzimático. Cada barra representa la media de tres réplicas  $\pm$  EE. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

### 6.3.2. Sustrato enzimático adicionado con 2,6-dimetoxifenol (Lacasa)

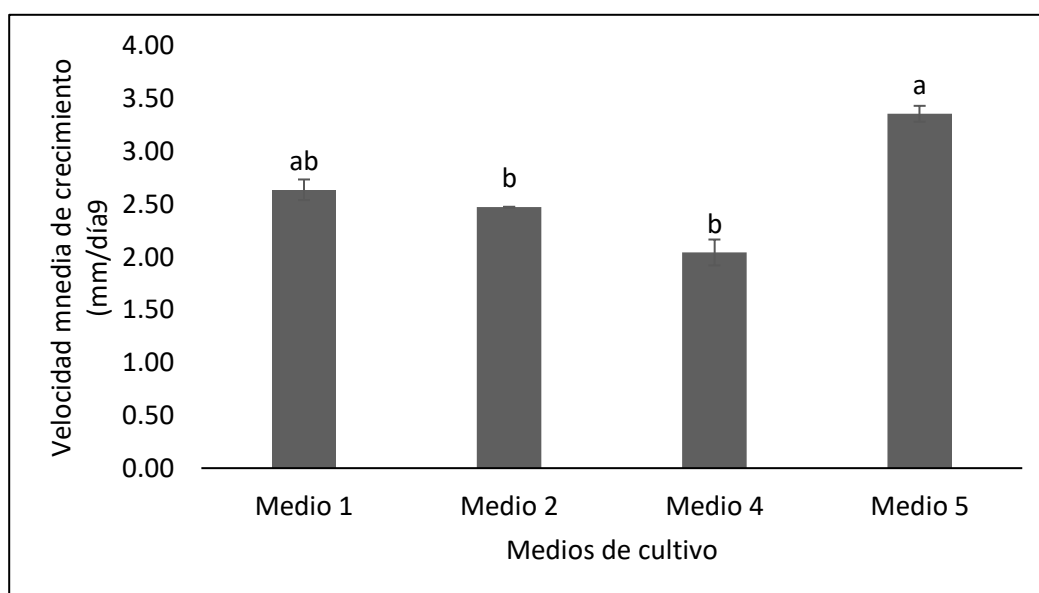
La adición del 2,6-Dimetoxifenol (DMP) a los medios de cultivo influyó positivamente en el crecimiento micelial en el medio 3, debido a que se observó su crecimiento en este medio, bajo esta condición, pero influyó negativamente en los demás medios. En el medio 2 se obtuvo una mayor velocidad media de crecimiento (VMC) en comparación con las demás, en este medio se encontró 4.23 mm/día y terminó de invadir la caja de Petri en el día 22. En los demás medios de cultivo se obtuvieron VMC diferentes, el medio 1 de 2.54 mm/día, el medio 3 de 2.01 mm/día, el medio 4 de 2.02 mm/día y el medio 4 de 3.44 mm/día. En el análisis pos hoc de Tukey realizado, estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los promedios de la velocidad de crecimiento de los medios 2, 5 y 4 ( $F_{4, 19} = 57.162, p < 0.0001$ ). (Figura 6).



**Figura 6.** Velocidades de crecimiento de *Gymnopus* sp., en cinco medios de cultivo adicionados con sustrato DMP. Cada barra representa la media de cinco réplicas  $\pm$  EE. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

### 6.3.3. Sustrato enzimático adicionado con 2,6-dimetoxifenol, sulfato de manganeso y peróxido de hidrógeno (manganeso peroxidasa)

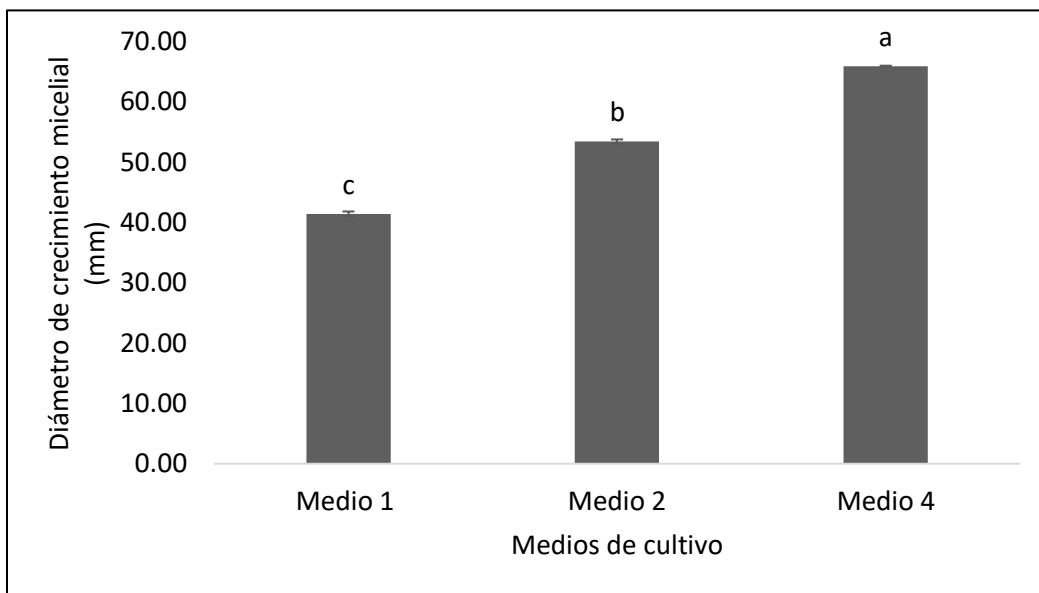
La adición de los sustratos 2,6-dimetoxifenol (DMP), sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) influyeron de forma negativa en el medio 3 impidiendo su crecimiento de *Gymnopus* sp. El medio de cultivo que obtuvo una mayor velocidad media de crecimiento (VMC) fue el medio 5, teniendo 3.36 mm/día e invadió totalmente el micelio a la caja de Petri al día 23. Los medios que le siguieron con respecto a la VMC fueron el medio 2 con 2.47 mm/día, luego le siguió el medio 1 con 2.64 mm/día y finalmente el medio 4 con 2.04 mm/día. El análisis pos hoc de Tukey realizado indica diferencias estadísticamente significativas entre las velocidades promedio de crecimiento con los sustratos DMP +  $\text{MnSO}_4$  entre los medios 1 y 5 con los medios 2 y 4 ( $F_{4, 19} = 7.384$ ,  $p < 0.003$ ). (Figura 7).



**Figura 7.** Velocidad media de crecimiento de *Gymnopus* sp., en cuatro medios de cultivo adicionados con los sustratos DMP +  $\text{MnSO}_4$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cada barra representa la media de cinco réplicas  $\pm$  EE. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

### 6.3.4. Sustrato enzimático adicionado con carboximetilcelulosa (celulasa)

Para determinar la actividad enzimática celulasa de *Gymnopus* sp., se eligió el día 15 para hacer la reacción y revelar el halo de hidrólisis en un único tiempo. De los cinco medios de cultivo, sólo se obtuvo crecimiento en tres medios. El mayor diámetro de crecimiento se encontró en el medio 4 con 65.89 mm, seguido del medio 2 con 53.47 y el medio 1 con 41.45. El análisis pos hoc de Tukey mostró diferencias estadísticamente significativas entre todos los diámetros de crecimiento en el día 15 en los tres medios de cultivo ( $F_{2, 11} = 394.559$ ,  $p < 0.0001$ ) (figura 8).



**Figura 8.** Diámetro de crecimiento micelial de *Gymnopus* sp. en el día 15 en tres medios adicionados con el sustrato carboximetilcelulosa. Cada barra representa la media de cinco réplicas  $\pm$  EE. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas.

## 6.4. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de *Gymnopus* sp.

### 6.4.1. Actividad enzimática cualitativa lacasa

El sustrato 2,6-Dimetoxifenol (DMP) reveló un halo de oxidación color anaranjado el cual era mayor respecto al crecimiento. En el medio 2 se obtuvo un halo mayor con respecto al obtenido en los demás, el promedio de la velocidad media del halo fue de 5.26 mm/día y el halo llegó al límite de la caja de Petri al día 13. En los demás medios de cultivo se obtuvieron velocidades del halo diferente, el medio 1 tuvo 5.00 mm/día, el medio 3 tuvo 4.23 mm/día, el

medio 4 tuvo 4.83 mm/día y el medio 5 tuvo 5.10 mm/día. De estos datos del halo y de la velocidad de crecimiento se tomó el día 10 de cada medio y se determinó el índice de potencia (IP). Los resultados indican que el mayor IP está en el medio 3 con 2.56, mostrando mayor actividad cualitativa lacasa con respecto al crecimiento micelial. Siguiendo el medio 1 con 1.85, el medio 5 con 1.75, el medio 4 con 1.61 y el medio 3 con 2.56 El análisis pos hoc de Tukey mostró que hay diferencias estadísticamente significativas en el IP del medio 3 con respecto a los demás medios ( $F_{4, 19} = 11.343$ ,  $p < 0.0001$ ). (Tabla 8).

**Tabla 8.** Determinación del índice de potencia de *Gymnopus* sp., en cinco medios de cultivo con sustrato DMP

Medios de cultivo	Halo de oxidación (mm)	Velocidad media de crecimiento (mm)	Índice de potencia
Medio 1	53.53	29.08	1.85 <sup>b</sup>
Medio 2	62.81	42.81	1.47 <sup>b</sup>
Medio 3	35.14	14.22	2.56 <sup>a</sup>
Medio 4	48.93	30.51	1.61 <sup>b</sup>
Medio 5	61.74	35.38	1.75 <sup>b</sup>

Cada dato representa la media de cinco réplicas. Los datos corresponden al día 10 de crecimiento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

#### 6.4.2. Actividad enzimática cualitativa manganeso peroxidasa

La adición de los sustratos 2,6-Dimetoxifenol (DMP), sulfato de manganeso ( $MnSO_4$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) reveló un halo de oxidación entre anaranjado y amarillo. En los medios en donde se presentó mayor diámetro del halo fueron el medio 2 y el medio 4, teniendo 4.13 mm/día y 4.18 mm/día respectivamente, en donde el diámetro del halo llegó al límite de la caja de Petri el día 18 en el medio 2 y día 17 en el medio 4. Después el medio que siguió en VMC fue el medio 5 con una VMC de 3.86 mm/día y el medio 1 con 3.81 mm/día. De estos datos del halo y de la velocidad de crecimiento se tomó el día 10 de cada medio y se determinó el índice de potencia (IP). Se obtuvo el mayor IP en el medio 1 con 1.51, indicando que la mayor actividad manganeso peroxidasa se encontró en este medio con respecto al crecimiento micelial, siguiendo el medio 5 con 1.41, el medio 2 con 1.22 y el medio 4 con 1.41. El análisis pos hoc de Tukey mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre el IP de los medios 1 y 5 con 2 y 4 ( $F_{3, 16} = 40.188$ ,  $p < 0.0001$ ). (Tabla 9).



**Tabla 9.** Determinación del índice de potencia de *Gymnopus* sp., en cuatro medios de cultivo con los sustratos DMP, MnSO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Medios de cultivo	Halo de oxidación	Velocidad media de crecimiento	Índice de potencia
Medio 1	48.03	31.92	1.51 <sup>a</sup>
Medio 2	49.19	40.38	1.22 <sup>b</sup>
Medio 4	42.98	36.95	1.17 <sup>b</sup>
Medio 5	59.14	41.93	1.41 <sup>a</sup>

Cada dato representa la media de cinco réplicas. Los datos corresponden al día 10 de crecimiento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

#### 6.4.3. Actividad enzimática cualitativa celulasa

La reacción de sustrato carboximetilcelulosa con el rojo Congo reveló un halo de hidrólisis blanco en un único tiempo (día 15) el cual era mayor que el crecimiento micelial. Se encontró una mayor actividad en el medio 4. El halo de hidrólisis se observaba en toda la superficie de la caja de Petri. El halo con el diámetro más grande se presentó en el medio 4 con 77.71 mm/día, indicando una alta actividad celulasa, luego en el medio 2 con 58.79 mm/día y finalmente en el medio 1 con 45.93 mm/día. De estos datos del halo y de la velocidad de crecimiento se eligió el día 15 de cada medio y se determinó el índice de potencia (IP). Se encontró el mayor IP en el medio 4 con 1.18. El medio 1 y 2 presentaron un IP de 1.11 y 1.10 respectivamente. No hubo actividad en los medios 3 y 5 porque no hubo crecimiento. El análisis pos hoc de Tukey mostró que hay diferencias estadísticamente significativas entre el IP del medio 4 con los medios 1 y 4 ( $F_{2, 11} = 5.459$ ,  $p < 0.023$ ). (Tabla 10).

**Tabla 10.** Determinación del índice de potencia de *Gymnopus* sp., en tres medios de cultivo con el sustrato carboximetilcelulosa

Medios de cultivo	Halo de hidrólisis (mm)	Diámetro de crecimiento (mm)	Índice de potencia
Medio 1	45.43	41.45	1.11 <sup>b</sup>
Medio 2	58.80	53.47	1.10 <sup>b</sup>
Medio 4	77.71	65.89	1.18 <sup>a</sup>

Cada dato representa la media de cinco réplicas. Los datos corresponden al día 15 de crecimiento. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

## 7. RESULTADOS SEGUNDA FASE

El medio elegido para esta fase, fue el medio 1 (ver discusión de la primera fase, página 58). Se obtuvo, en términos de producción, la caracterización de los cultivos de *Agrocybe* cf. *pediades* y *Pleurotus ostreatus*, este último usado como testigo positivo, en cultivo líquido durante 20 días (480 h). Con respecto a *Gymnopus* sp., no se obtuvo un crecimiento favorable en medio líquido, por lo que se tuvieron que hacer algunos experimentos distintos a los planeados, mismos que se describen a continuación.

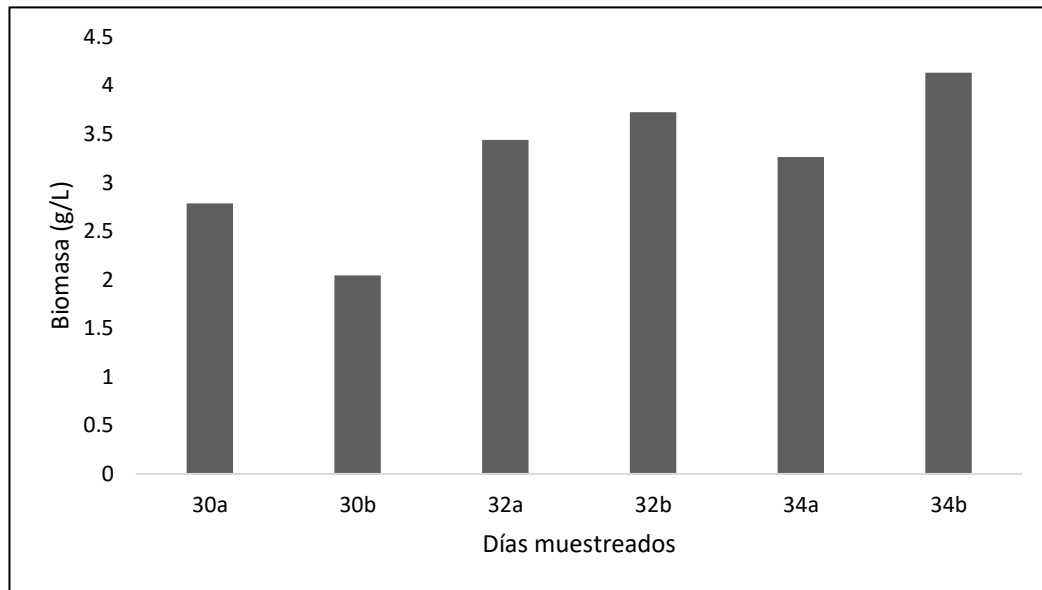
### 7.1. *Gymnopus* sp.

Este hongo no tuvo una respuesta favorable en el medio líquido debido a que no presentó crecimiento durante todo el tiempo del cultivo. Se realizaron varias pruebas para descartar si era el inóculo, la condición del medio líquido o algún otro factor. Los resultados indicaron que *Gymnopus* sp., creció sobre un soporte debido a que hubo crecimiento cuando se agregó el inóculo al matraz, el pellet de biomasa más agar (tabla 11). Se inocularon matraces que se muestrearon los días 30, 32 y 34 por duplicado (a y b). Se obtuvo biomasa, actividad enzimática lacasa y manganeso peroxidasa de estos días.

**Tabla 11.** Pruebas realizadas para el crecimiento de *Gymnopus* sp., en medio líquido

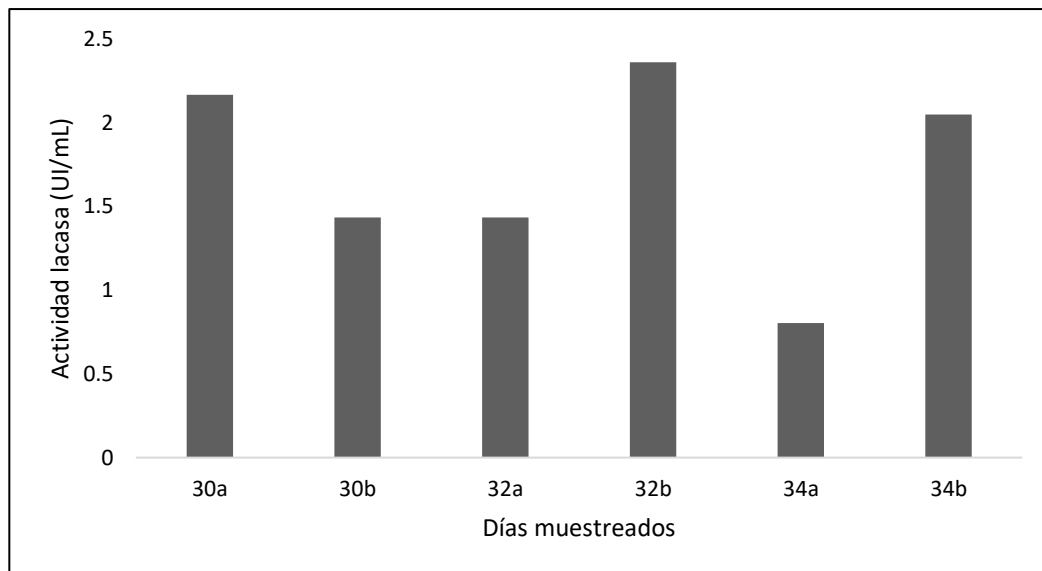
<b>Prueba 1</b>	<b>Prueba 2</b>	<b>Prueba 3</b>	<b>Prueba 4</b>
Inóculo en medio EMA	Inóculo en medio 1	Aumentar la cantidad de biomasa inicial	Pellets de biomasa con agar

Se determinó la biomasa obtenida en estos días a través de peso seco. La mayor cantidad de biomasa está en el día 34b con 4.12 g/l, luego le sigue el día 32b con 3.72 g/l. Los demás días obtuvieron 2.78 g/l, 2.04 g/l, 3.43 g/l y 3.26 g/l para los días 30a, 30b, 32a y 34a respectivamente (figura 9).



**Figura 9.** Biomasa obtenida en los días 30, 32 y 34 en *Gymnopus sp.*

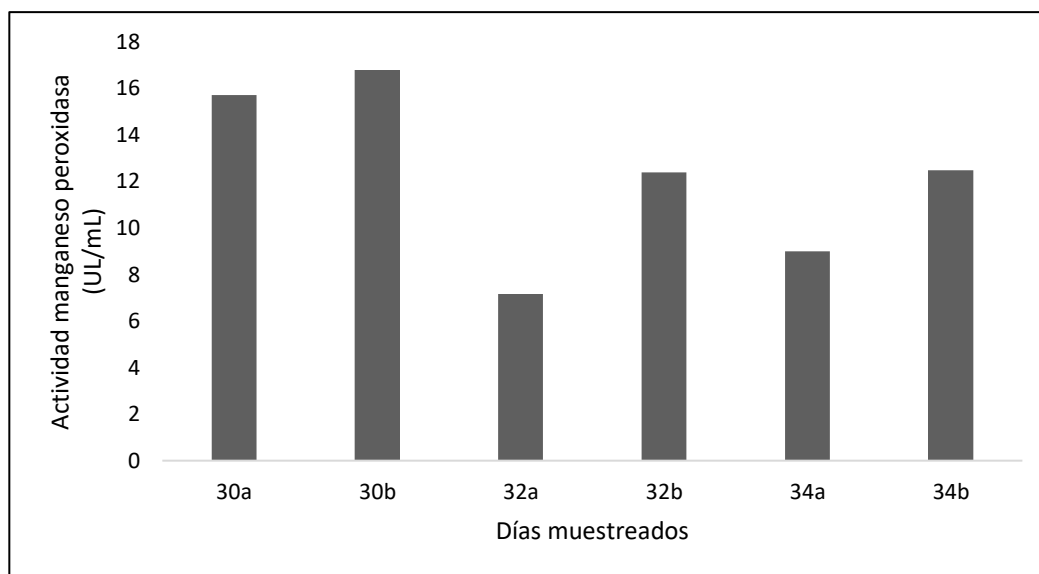
Se determinó la actividad lacasa volumétrica con el ECE, encontrando la mayor actividad en el día 32b con 2.35 UI/mL. Los días 30a, 30b, 32a, 34a y 34b obtuvieron una actividad de 2.16 UI/mL, 1.43 UI/mL, 1.43 UI/mL, 0.80 UI/mL y 2.04 UI/mL, respectivamente (figura 10).



**Figura 10.** Actividad volumétrica lacasa obtenida en los días 30, 32 y 34 en *Gymnopus sp.*

También se evaluó la actividad volumétrica manganoso peroxidasa. Se encontró la mayor actividad en el día 30b con 16.78 UI/mL. Los demás días 30a, 32a, 32b, 34a y 34b, obtuvieron 15.70 UI/mL, 7.16 UI/mL, 12.36 UI/mL, 8.98 UI/mL y 12.47 UI/mL respectivamente.

Los datos de la actividad enzimática manganoso peroxidasa fueron multiplicados por el factor de dilución (5) proveniente del tratamiento del ECE (figura 11).



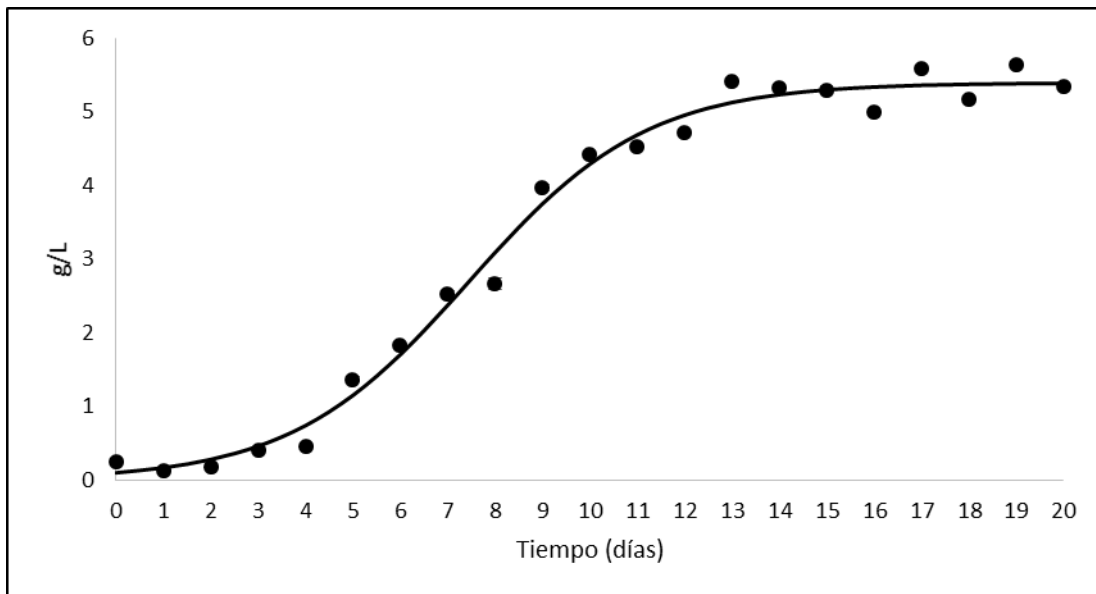
**Figura 11.** Actividad volumétrica manganoso peroxidasa obtenida en los días 30, 32 y 34 en *Gymnopus* sp

## 7.2. Caracterización en cultivo líquido de *Agrocybe* cf. *pediades*

### 7.2.1. Biomasa

Se utilizó el modelo de Malthus para obtener la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la biomasa máxima alcanzada durante el crecimiento exponencial ( $X_{\max}$ ). Cada punto representa la media de cinco réplicas.

En el perfil de generación de biomasa de *Agrocybe* cf. *pediades* a través del tiempo se observa que la fase de adaptación termina a las 72 horas y comienza la fase exponencial que concluye a las 264 horas permitiendo al hongo entrar en la fase estacionaria hasta cumplir las 480 horas de cultivo. Se obtuvo una  $X_{\max}$  de 5.39 g/L y una  $\mu$  de 0.022 h<sup>-1</sup>. Estos datos representan la evaluación de cinco réplicas (figura 12).



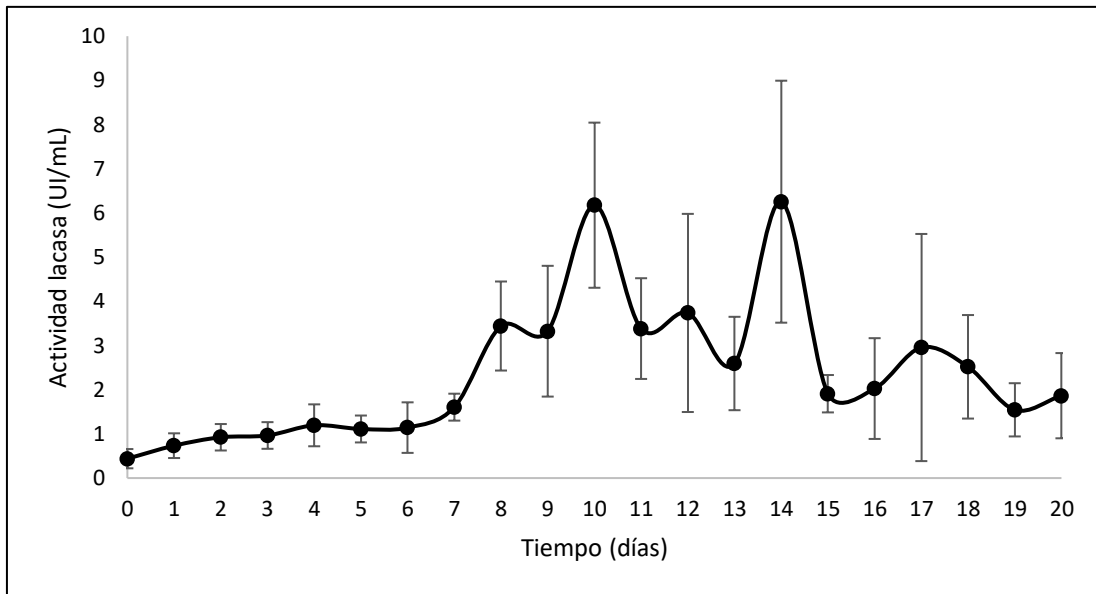
**Figura 12.** Curva de crecimiento específico de *Agrocybe cf. pediades*

### 7.2.2. Actividad enzimática

La cuantificación de actividad se basa en una derivación de la Ley de Lambert-Beer y muestra que la reacción es de orden 0. Los datos representan la media de cinco réplicas.

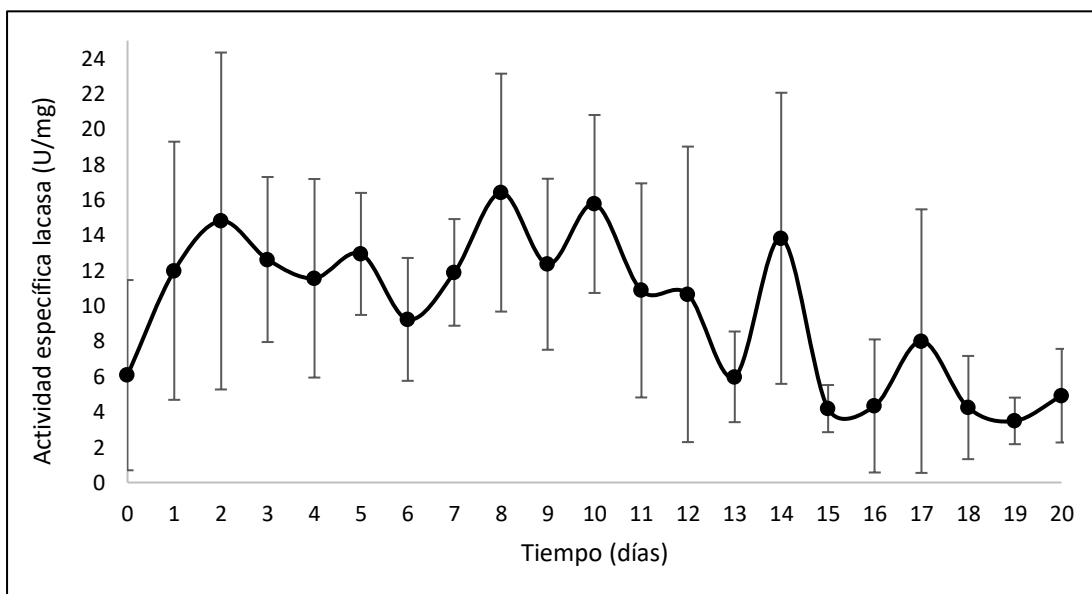
#### 7.2.2.1. Lacasa

La actividad volumétrica lacasa de *Agrocybe cf. pediades*, expresó la mayor actividad, en promedio, el día 14 con 6.25 UI/mL, comenzando a descender hasta el término del cultivo. El segundo día con mayor actividad lacasa fue el día 10 con 6.17 UI/mL (figura 13).



**Figura 13.** Actividad enzimática volumétrica lacasa de *Agrocybe cf. pediades*

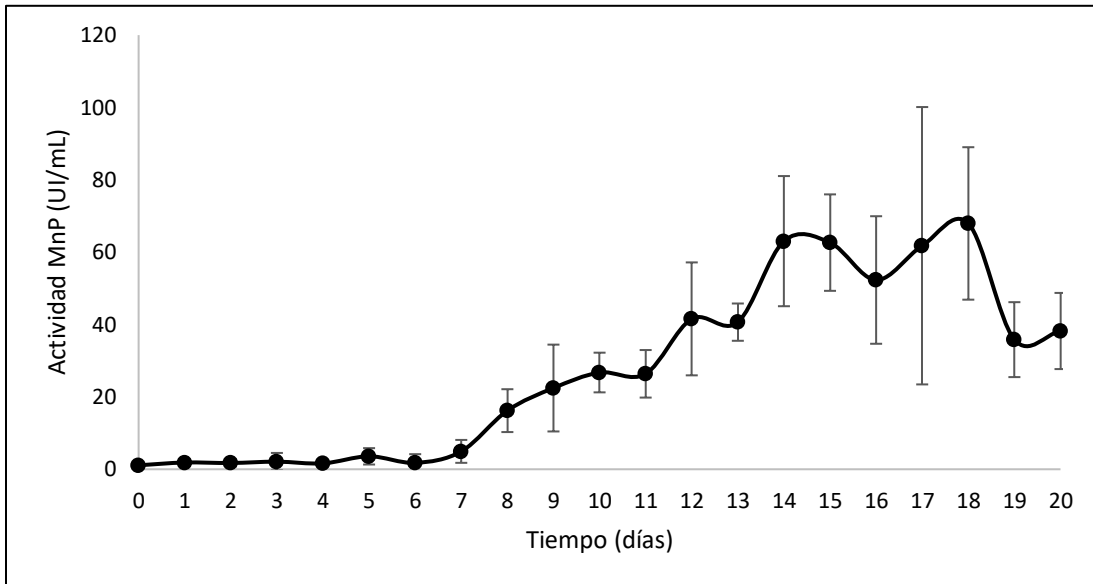
El punto de mayor expresión en la actividad específica lacasa por cada miligramo de proteína se encontró en el día 8 con 16.40 UI/mg. El día que le sigue con respecto a una alta actividad es el día 10 con 15.76 UI/mg (figura 14).



**Figura 14.** Actividad específica lacasa de *Agrocybe cf. pediades*

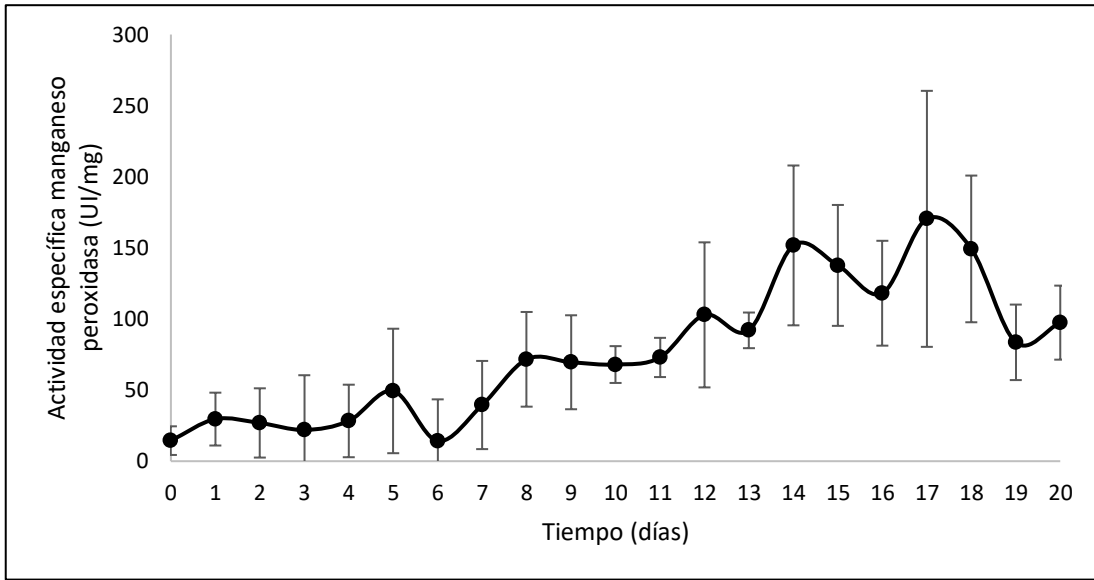
### 7.2.2.2. Manganeso peroxidasa

Los datos de la actividad manganeso peroxidasa fueron multiplicados por el factor de dilución (5). La expresión de la actividad manganeso peroxidasa va en aumento durante todo el tiempo del cultivo. El día con mayor actividad fue el 18 con 67.95 UI/mL y en los últimos días comienza a descender. El segundo día con actividad alta fue el 14 con 63.05 UI/mL (figura 15).



**Figura 15.** Actividad volumétrica manganeso peroxidasa de *Agrocybe cf. pediades*

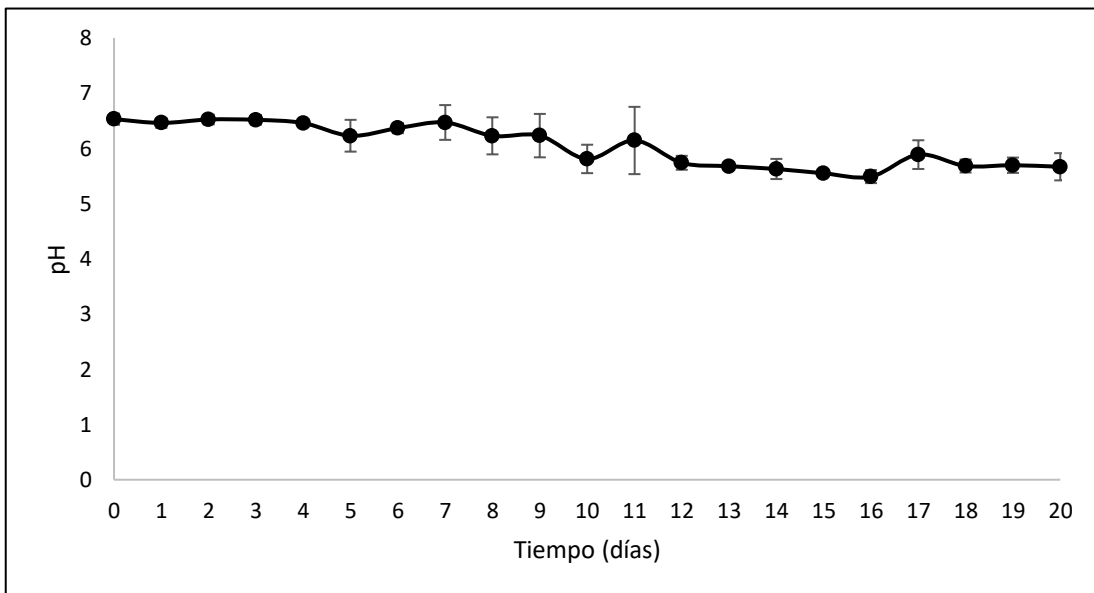
La mayor expresión de actividad específica manganeso peroxidasa se obtuvo en el día 17 con 170.40 UI/mg. El segundo punto con alta actividad es el día 18 con 149.25 UI/mg (figura 16).



**Figura 16.** Actividad específica manganeso peroxidasa de *Agrocybe cf. pediades*

### 7.2.3. pH

Este medio esta amortiguado con fosfatos. El pH del medio sin inocular fue de 6.5, el pH del día 0 fue de 6.5. En promedio, el pH fue de 6.04 que se mantuvo durante todo el cultivo (figura 17). Cada punto representa la media de 5 réplicas.



**Figura 17.** Perfil de pH de *Agrocybe cf. pediades*



### 7.3. Caracterización en cultivo líquido de *Pleurotus ostreatus* (PoB)

#### 7.3.1. Biomasa

Basado en el modelo de Malthus para obtener la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la biomasa máxima alcanzada durante el crecimiento exponencial ( $X_{\max}$ ). Los datos mostrados representan la media de cinco réplicas.

*Pleurotus ostreatus* llegó fase de adaptación a las 48 horas para comenzar con la fase exponencial hasta las 480 horas, este hongo no llega a la fase estacionaria. Se obtuvo una  $X_{\max}$  de 6.18 g/L y una  $\mu$  de  $0.014 \text{ h}^{-1}$  (figura 18).

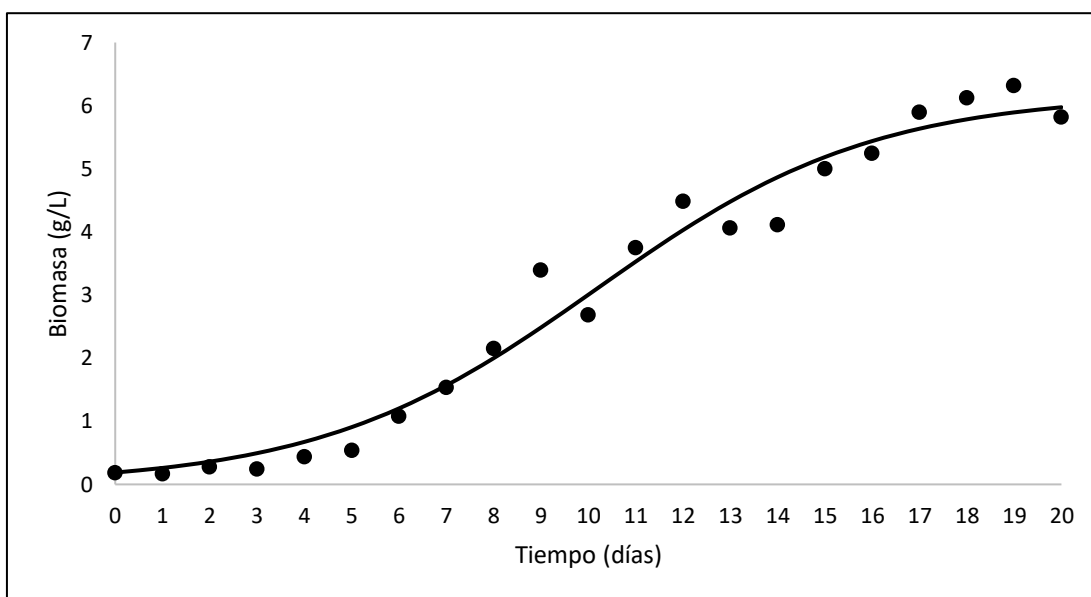


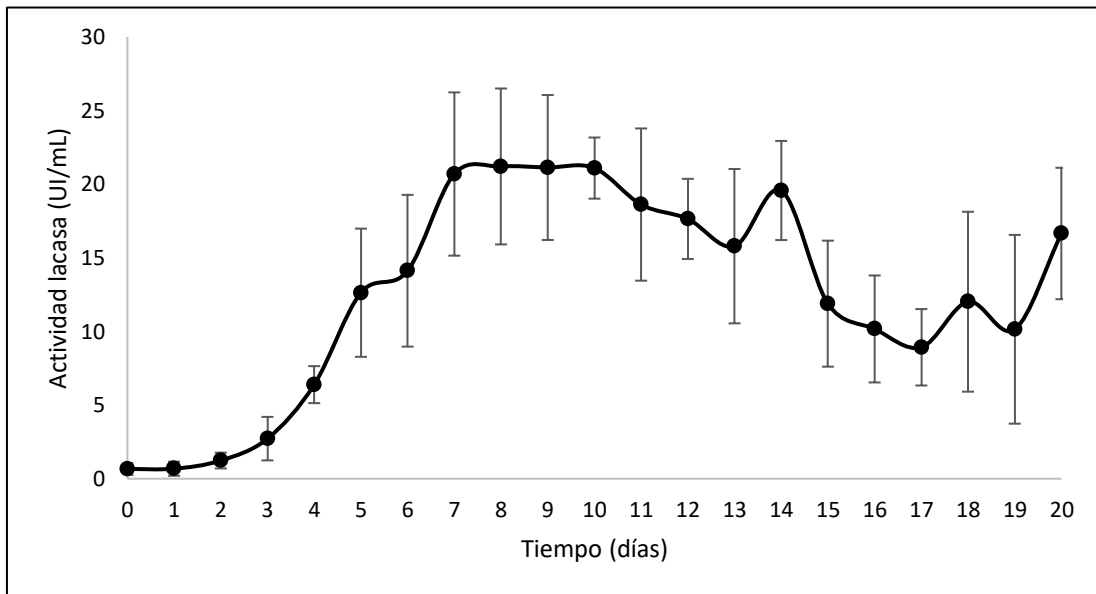
Figura 18. Curva de crecimiento específico de *Pleurotus ostreatus*

#### 7.3.2. Actividad enzimática

La cuantificación de actividad se basa en una derivación de la Ley de Lambert-Beer, donde indica que la reacción es de orden 0. Los datos representan la media de cinco réplicas.

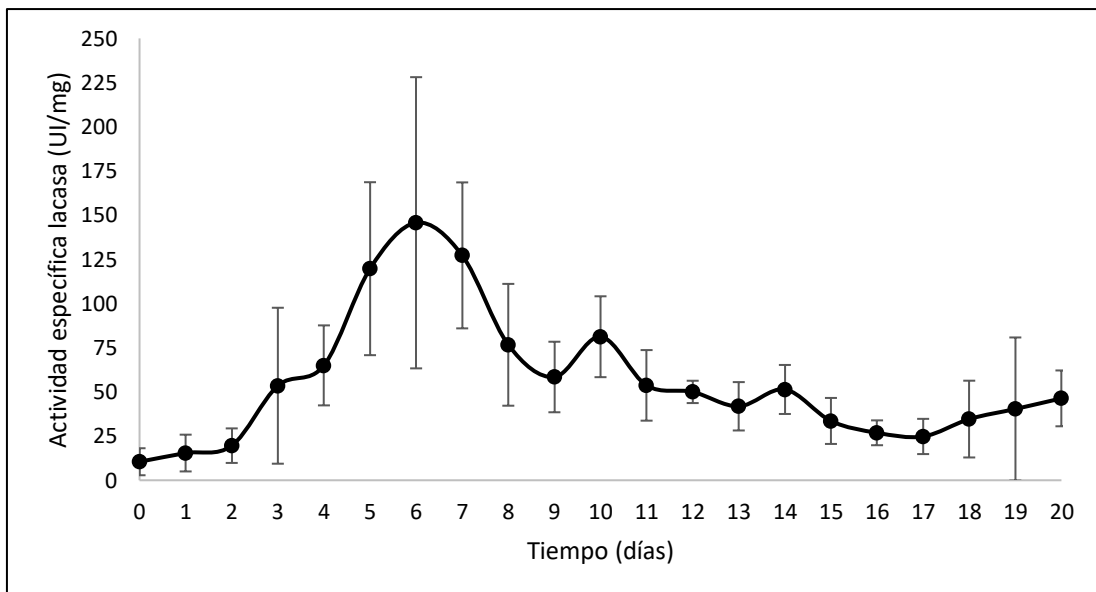
##### 7.3.2.1. Lacasa

La actividad lacasa de *Pleurotus ostreatus* llegó a la mayor actividad en el día 8 con 21.20 UI/mL. La mayor actividad lacasa se mantuvo constante durante los días 7, 8, 9 y 10 con 20.68 UI/mL, 21.20 UI/mL, 21.13 UI/mL y 21.09 UI/mL respectivamente (figura 19).



**Figura 19.** Actividad volumétrica lacasa de *Pleurotus ostreatus*

La mayor actividad específica lacasa se obtuvo el día 6 con 145.69 UI/mg. Los siguientes puntos de mayor actividad específica son el día 7 y 5 con 127.23 UI/mg y 119.70 UI/mg respectivamente (figura 20).

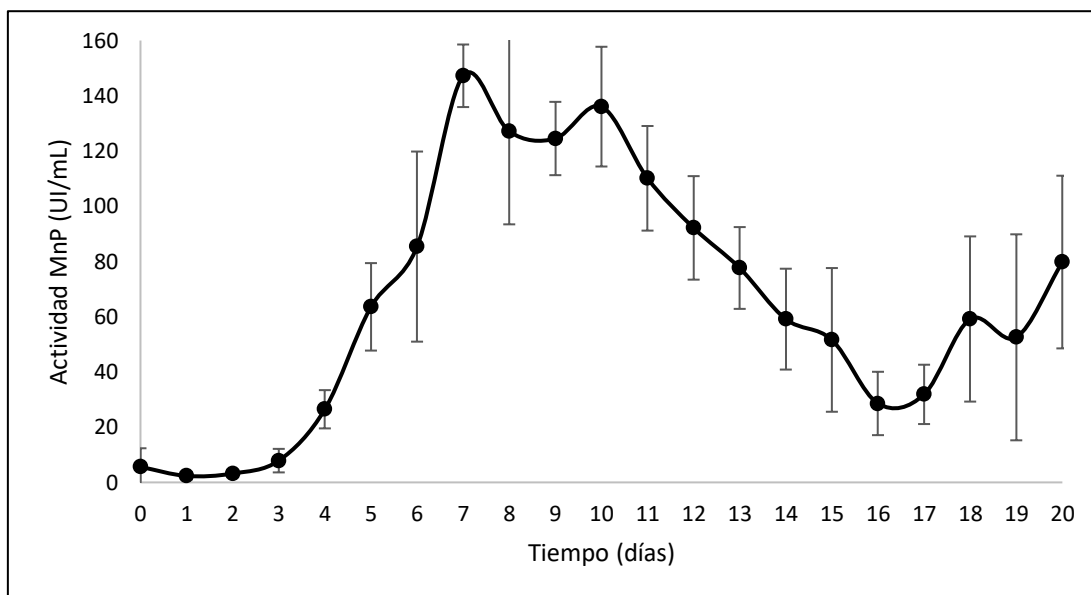


**Figura 20.** Actividad específica lacasa de *Pleurotus ostreatus*

### 7.3.2.2. Manganeso peroxidasa

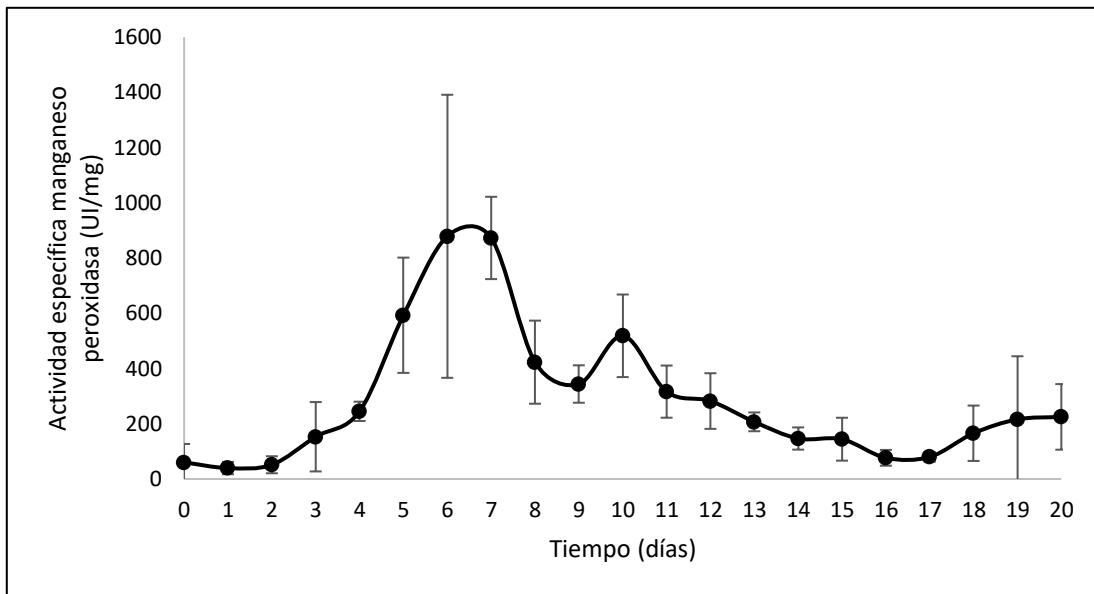
Los datos están multiplicados por el factor de dilución (5) utilizado para el ECE. Cada punto representa la media de cinco réplicas.

La mayor magnitud de actividad enzimática se obtuvo en el día 7 con 147.23 UI/mL. El segundo punto seguido en magnitud de actividad es el día 10 con 136.05 UL/mL (figura 21).



**Figura 21.** Actividad volumétrica manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus*

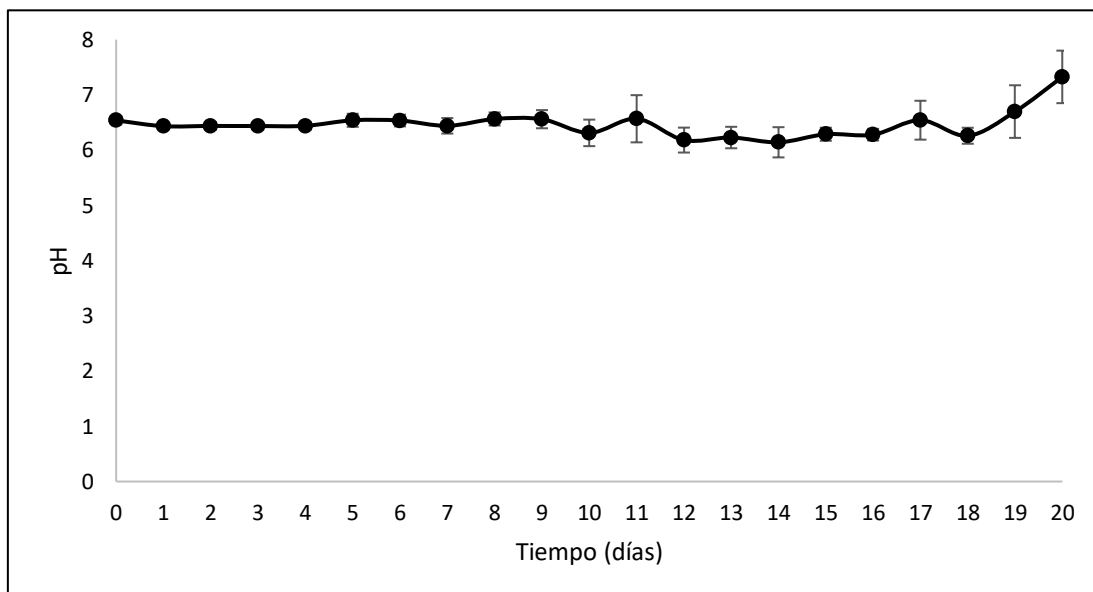
El mayor valor de actividad enzimática específica de manganeso peroxidasa se obtuvo el día 6 con 878.85 UI/mg. El segundo valor más alto se encontró al siguiente día, el 7 con 872.81 UI/mg (figura 22).



**Figura 22.** Actividad específica manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus*

### 7.3.3. pH

El perfil del pH del medio de cultivo durante el cultivo de *Pleurotus ostreatus* se mantuvo constante. El medio utilizado, está amortiguado. El pH del medio sin inocular fue de 6.61, el pH del día 0 fue de 6.5 y se mantuvo en promedio con 6.46 durante todo el cultivo (figura 23).



**Figura 23.** Perfil de pH de *Pleurotus ostreatus*

#### 7.4. Análisis de resultados

Se realizó una t de student para datos pareados entre los resultados de *Agrocybe cf. pediades* y *Pleurotus ostreatus* de los parámetros de biomasa, actividad lacasa y manganeso peroxidasa. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tres parámetros indicando que estos dos hongos son diferentes entre sí (tabla 12).

**Tabla 12.** Análisis estadístico t de student para datos pareados entre *Agrocybe cf. pediades* y *Pleurotus ostreatus*

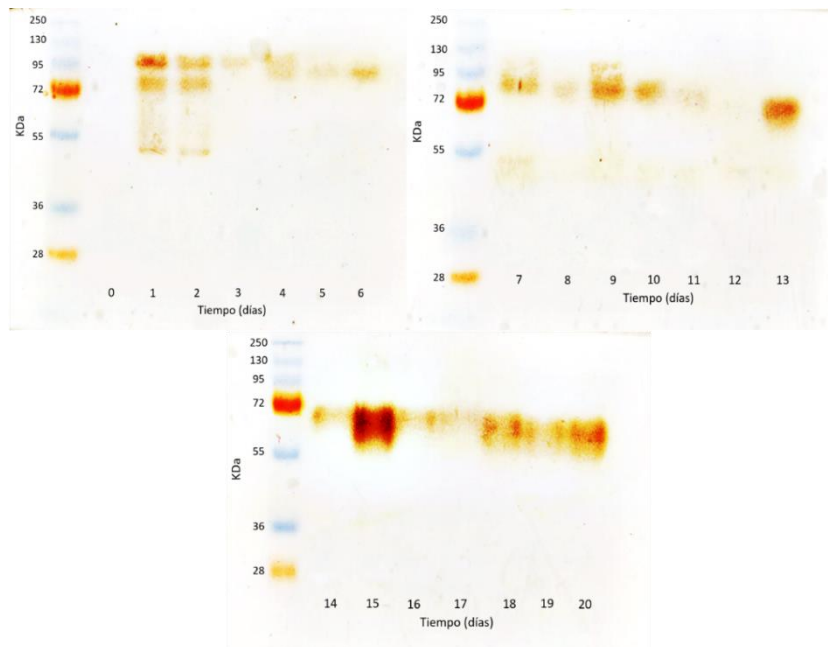
	Biomasa	Actividad lacasa		Actividad MnP	
		Volumétrica	Específica	Volumétrica	Específica
<b>t observada</b>	$t_{4, 0.05 (2)} = 4.605$	$t_{4, 0.05 (2)} = 19.365$	$t_{4, 0.05 (2)} = 4.130$	$t_{4, 0.05 (2)} = 3.975$	$t_{4, 0.05 (2)} = 5.505$
<b>t crítica</b>	$t_{4, 0.05 (2)} = 2.776$	$t_{4, 0.05 (2)} = 2.776$	$t_{4, 0.05 (2)} = 2.776$	$t_{4, 0.05 (2)} = 2.776$	$t_{4, 0.05 (2)} = 2.776$
<b>p (dos colas)</b>	0.010	0.0001	0.014	0.016	0.005

## 8. RESULTADOS DE LA TERCERA FASE

### 8.1. Determinación de isoenzimas lacasa por zimografía de *Agrocybe cf. pediades*

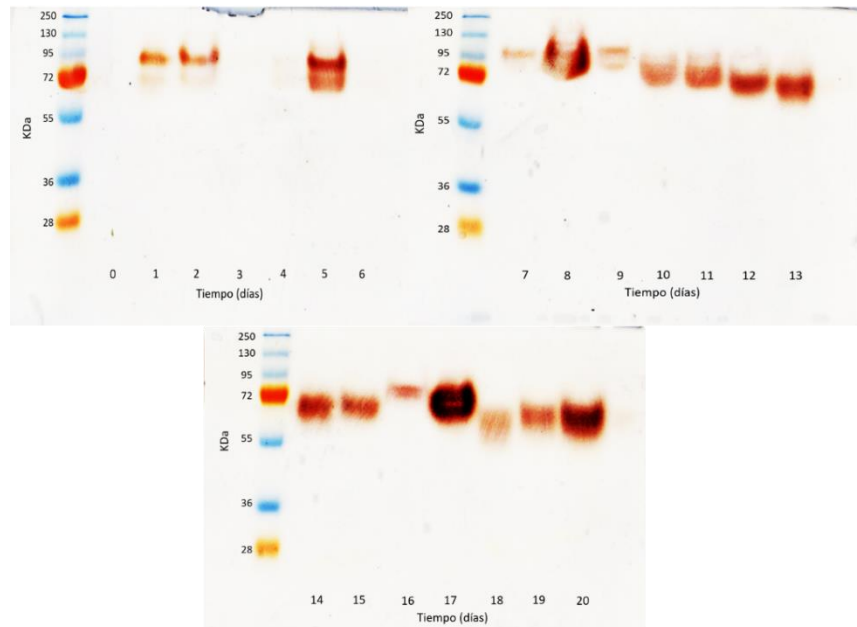
De las cinco réplicas obtenidas en la segunda fase, se determinó la presencia de isoenzimas de lacasa de cuatro réplicas.

Se encontró la presencia de tres isoenzimas de lacasa durante la réplica 1. La banda es más intensa el día 15, posicionada a la altura del marcador de peso molecular de 72 kDa. Se observan otras isoenzimas que se posicionan a la altura del marcador de 95 kDa, para los días 1, 2, 3, 4 y 6; 72 kDa para los días 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, manteniéndose constante los demás días y 55 kDa para los días 1 y 2 (figura 26).



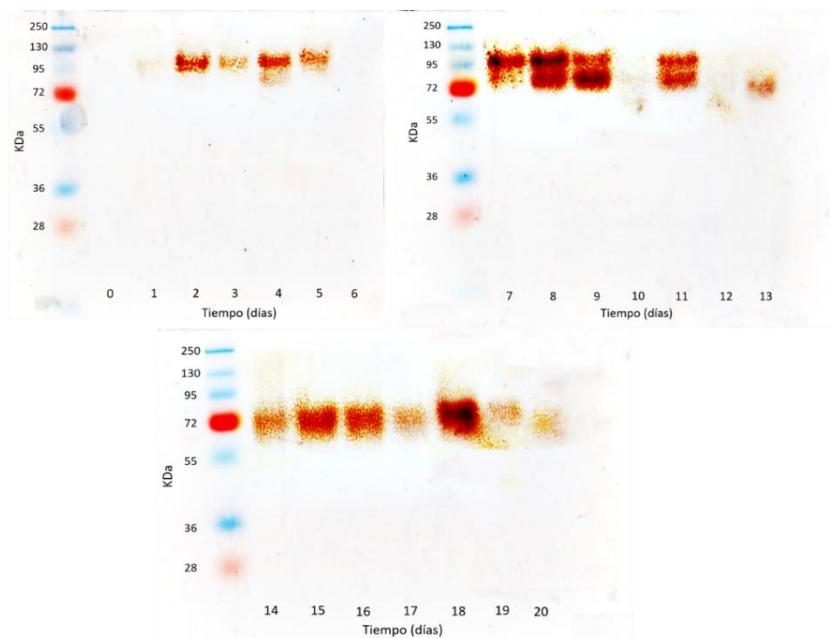
**Figura 26.** Perfil de isoenzimas de lacasa de *Agrocybe cf. pediades* (Réplica 1)

En la réplica 2, se posicionan a la altura del marcador de peso molecular dos isoenzimas lacasa de 95 kDa y 72 kDa. La isoenzima de 95 kDa se presenta los días 1, 2, 5, 8 y 9. La isoenzima de 72 kDa se expresa los demás días del cultivo, mostrando una banda más intensa el día 17 (figura 27).



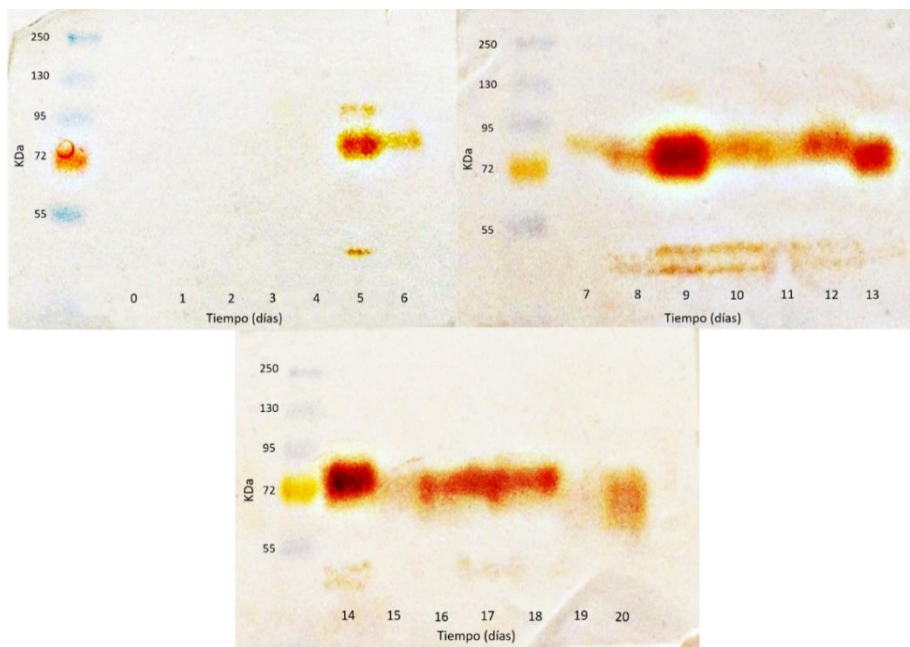
**Figura 27.** Perfil de isoenzimas de lacasa de *Agrocybe cf. pediades* (Réplica 2)

Se expresaron dos isoenzimas lacasa en la réplica 3, la primera, posicionada a la altura del marcador de 95 kDa del día 2 al día 11 (el día 10 no hubo presencia de isoenzima) y la segunda, posicionada la altura del marcador de 72 kDa del día 7 al día 20 manteniéndose constante durante todo el cultivo (figura 28).



**Figura 28.** Perfil de isoenzimas de lacasa de *Agrocybe cf. pediades* (Réplica 3)

En la réplica 4, se expresó una isoenzima de 72 kDa posicionada a la altura del marcador de 72 kDa desde el día 5 hasta finalizar el cultivo. Otra isoenzima de tamaño aparente de 95 kDa se presentó en el día 5. La banda más intensa se expresa el día 14 (figura 29).

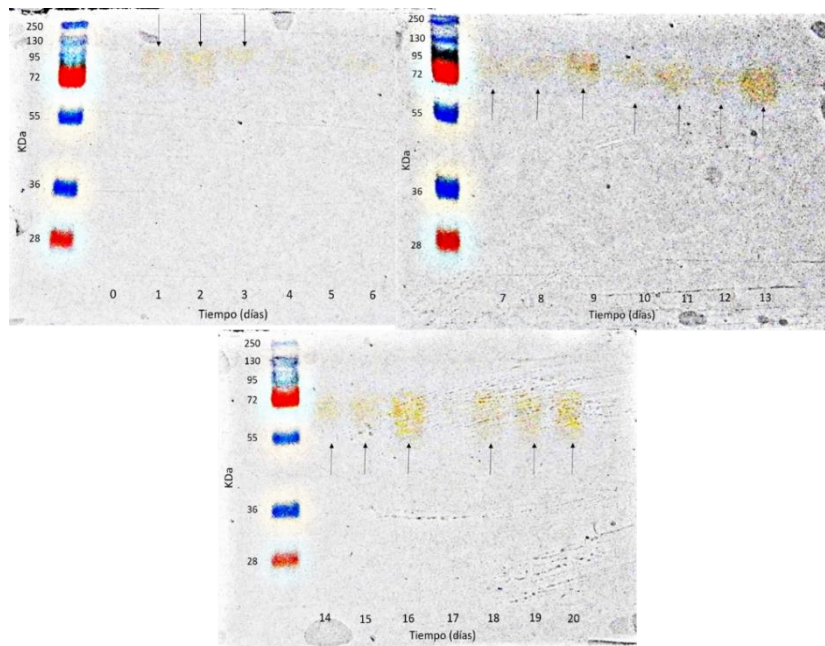


**Figura 24.** Perfil de isoenzimas de lacasa de *Agrocybe cf. pediades* (Réplica 4)

## 8.2. Determinación de isoenzimas manganeso peroxidasa por zimografía de *Agrocybe cf. pediades*

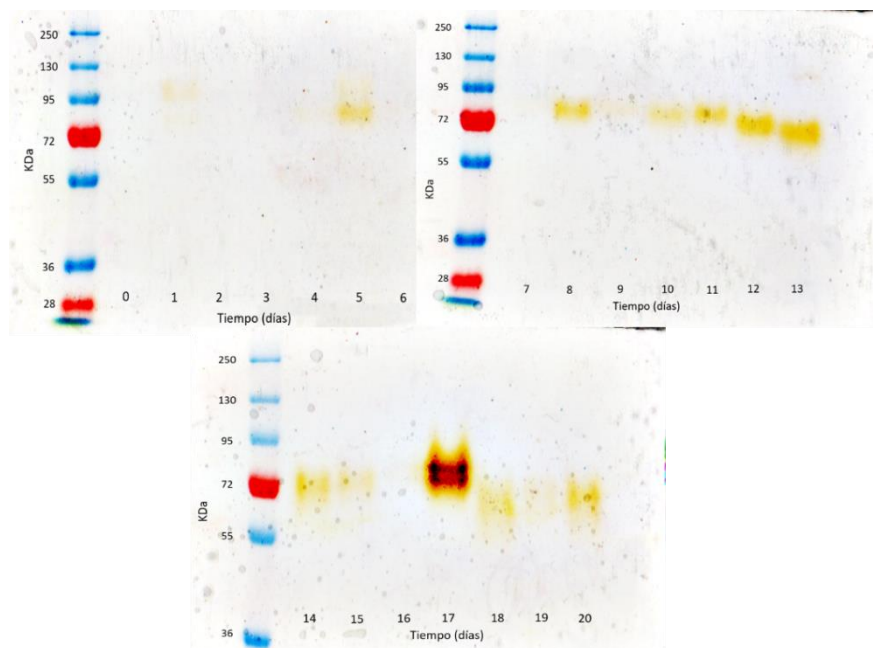
En la réplica 1, se encontró una isoenzima manganeso peroxidasa posicionada la altura del marcador de 72 kDa que se expresa durante todo el cultivo con excepción de los días 0, 4, 5, 6 y 17 (figura 30).





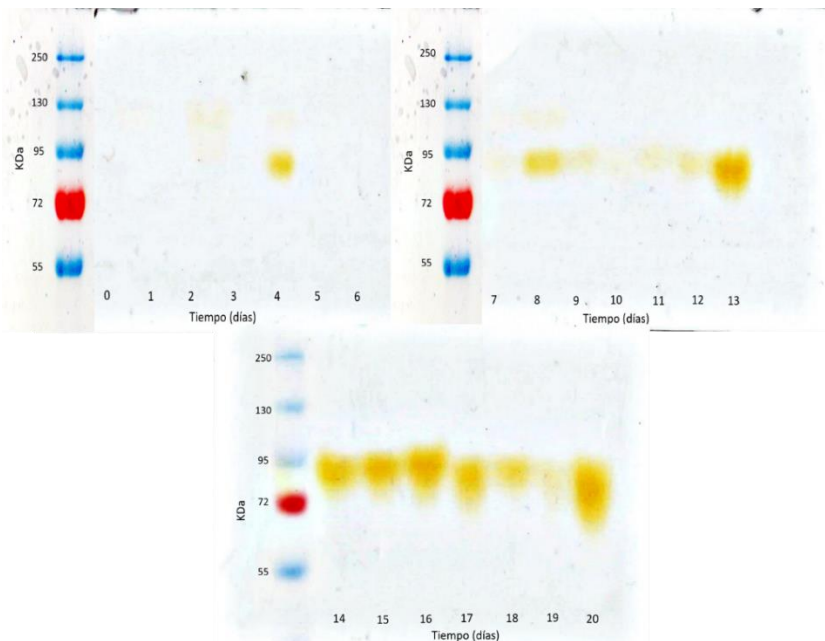
**Figura 30.** Perfil de isoenzimas manganeso peroxidasa de *Agrocybe cf. pediades* (Réplica 1)

En la réplica 2, se expresa una isoenzima manganeso peroxidasa posicionada la altura del marcador de 72 kDa desde el día 5 hasta terminar el cultivo. El día con la banda más intensa se observa el día 17 (figura 31).



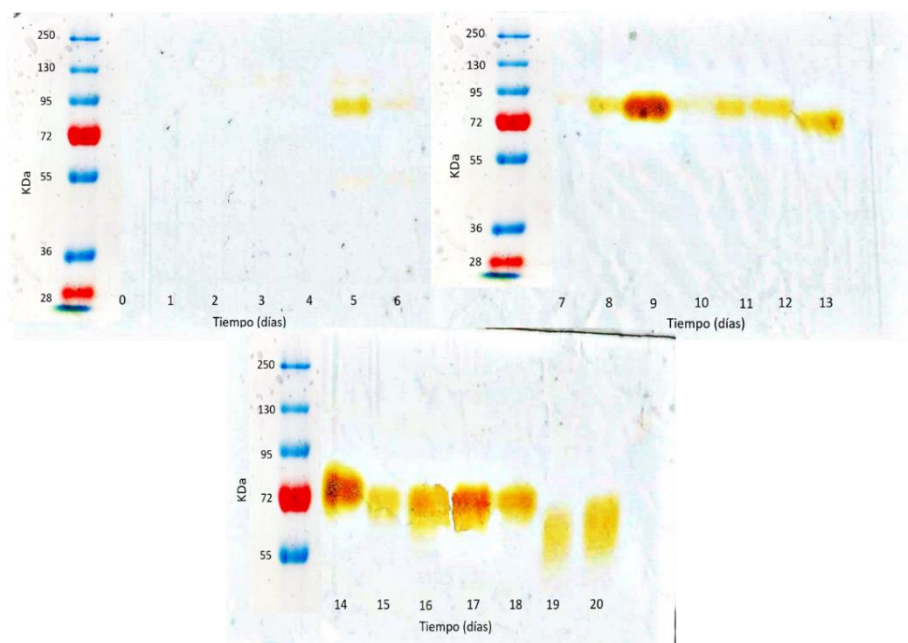
**Figura 31.** Perfil de isoenzimas manganeso peroxidasa de *Agrocybe cf. pediades* (Réplica 2)

En la réplica 3, se presencié una isoenzima a la altura del marcador de peso molecular de 72 kDa, expresándose desde el día 5, hasta el día 20. Estuvo presente durante casi todo el cultivo (figura 32).



**Figura 32.** Perfil de isoenzimas manganeso peroxidasa de *Agrocybe cf. pediades* (Réplica 3)

Se observa una isoenzima de manganeso peroxidasa posicionada a la altura del marcador de 72 kDa que se expresa durante todo el cultivo a partir del día 5 hasta su finalización (figura 33).

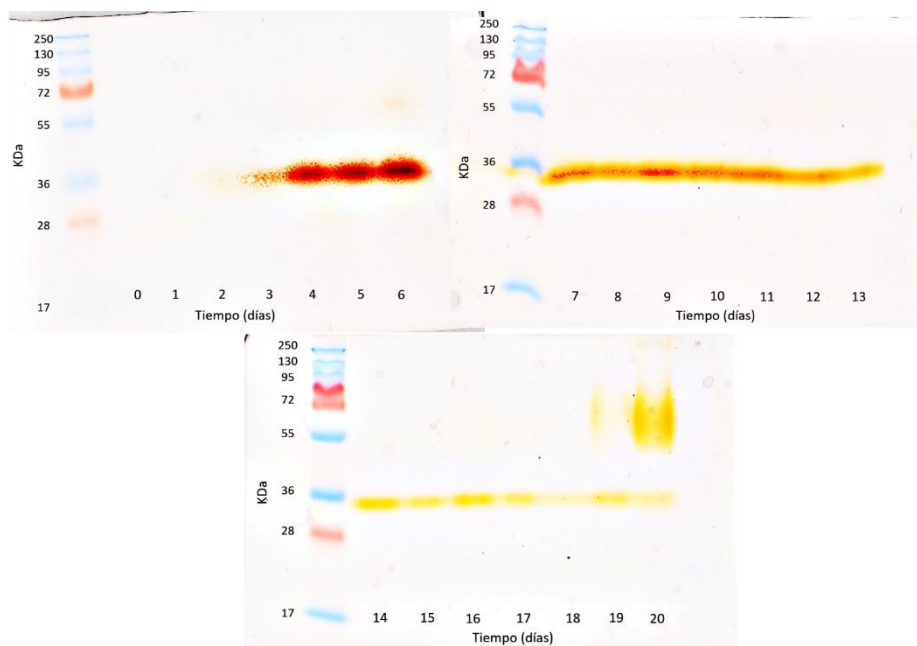


**Figura 33.** Perfil de isoenzimas manganeso peroxidasa de *Agrocybe cf. pediades* (Réplica 4)

### 8.3. Determinación de isoenzimas lacasa por zimografía de *Pleurotus ostreatus*

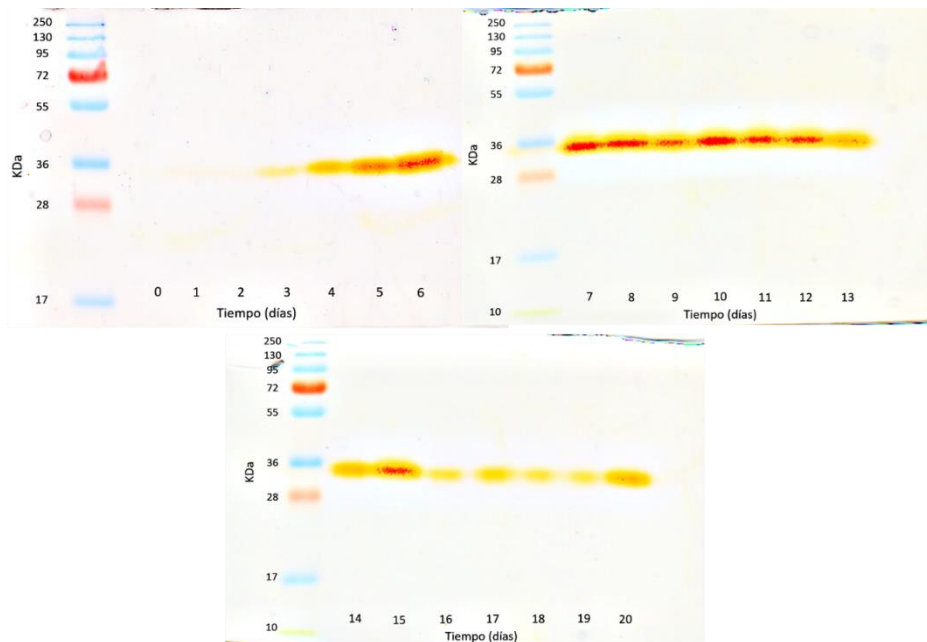
De las cinco réplicas obtenidas en la segunda fase, se determinó la presencia de isoenzimas de lacasa de cuatro réplicas.

Se expresó en la réplica 1 una isoenzima de lacasa posicionada la altura del marcador de 36 kDa, permanece constante durante todo el cultivo desde el día 3. La banda se observa más intensa en los primeros días y en el día 9. También se observa otra banda en el día 20 posicionada a la altura del marcador de 55 kDa (figura 34).



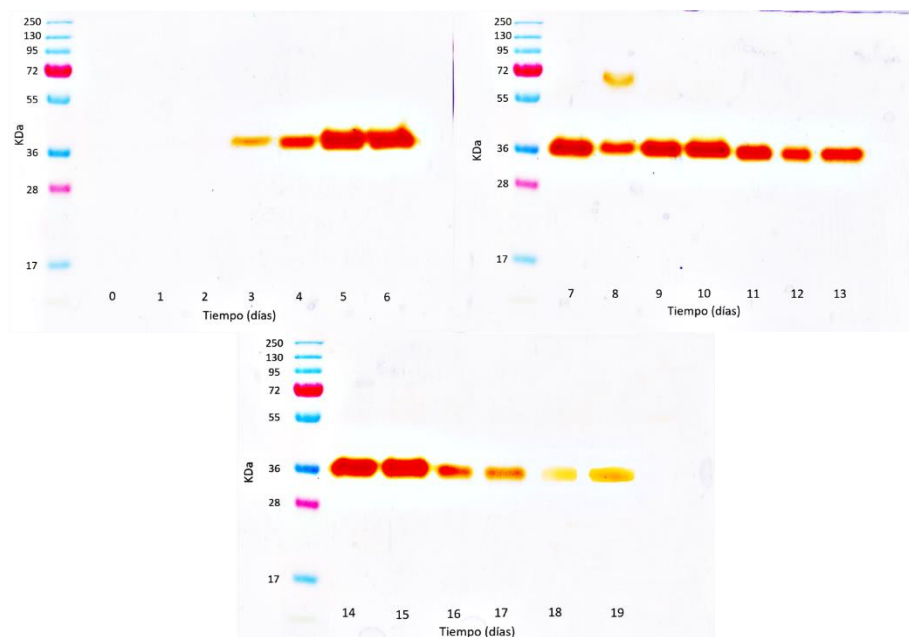
**Figura 34.** Perfil de isoenzimas lacasa de *Pleurotus ostreatus* (Réplica 1)

En la réplica 2, a la altura del marcador, se posiciona una isoenzima lacasa de 36 kDa expresada durante todo el cultivo desde el día 3. Las bandas más intensas se ven entre los días 7 y 12 (figura 35).



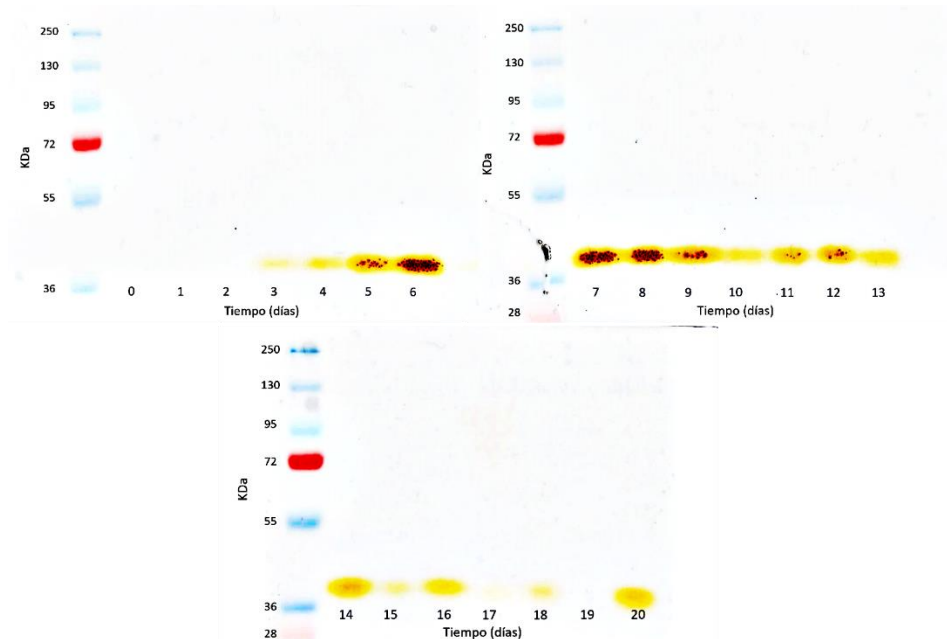
**Figura 35.** Perfil de isoenzimas lacasa de *Pleurotus ostreatus* (Réplica 2)

En la réplica 3, se expresaron dos isoenzimas lacasa posicionadas a la altura del marcador de 36 y 55 kDa. La primera isoenzima se mantiene constante en todo el cultivo desde el día 3, las bandas más intensas se observan desde el día 5 hasta el día 15. La segunda solo se expresa en el día 8 (figura 36).



**Figura 36.** Perfil de isoenzimas lacasa de *Pleurotus ostreatus* (Réplica 3)

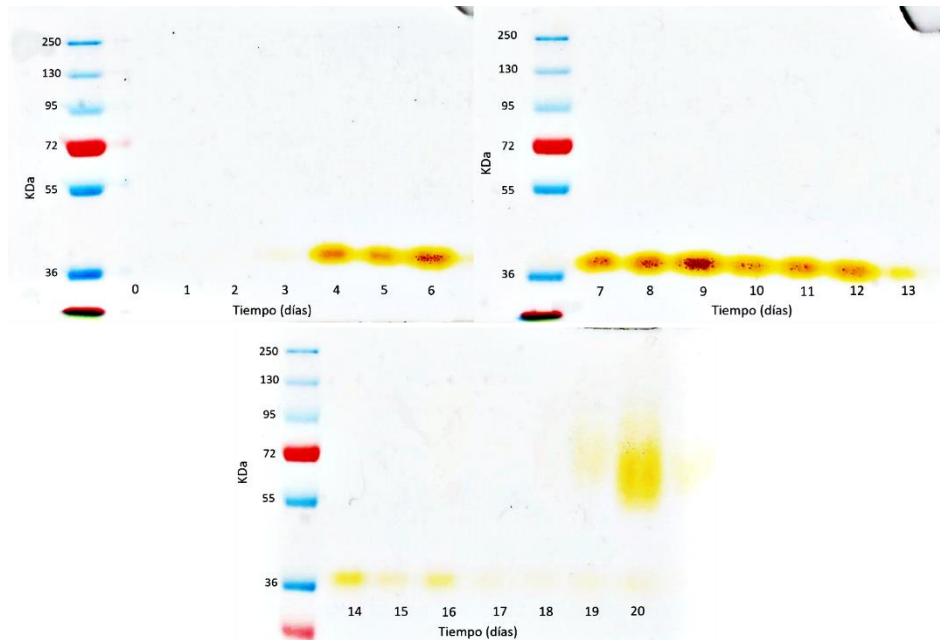
En la réplica 4, se observó una isoenzima lacasa posicionada a la altura del marcador de 36 kDa aproximadamente. Esta isoenzima se mantiene constante desde el día 3 hasta finalizar el cultivo. Las bandas más intensas se observan en los días 6, 7 y 8 (figura 37).



**Figura 37.** Perfil de isoenzimas lacasa de *Pleurotus ostreatus* (Réplica 3)

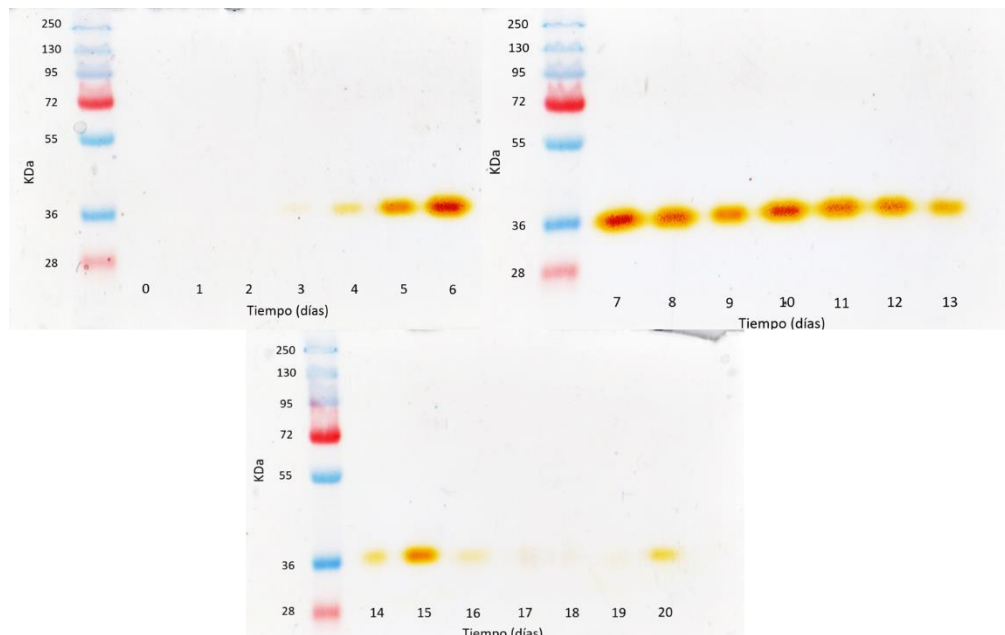
#### 8.4. Determinación de isoenzimas manganeso peroxidasa por zimografía de *Pleurotus ostreatus*

En la réplica 1 se expresan dos isoenzimas de manganeso peroxidasa posicionadas a la altura del marcador de 36 y 55 kDa aproximadamente. La isoenzima de 36 kDa se mantiene constante durante todo el cultivo, desde el día 4 hasta el día 20. Mientras la isoenzima de 55 kDa se expresa en los días 19 y 20 (figura 38).



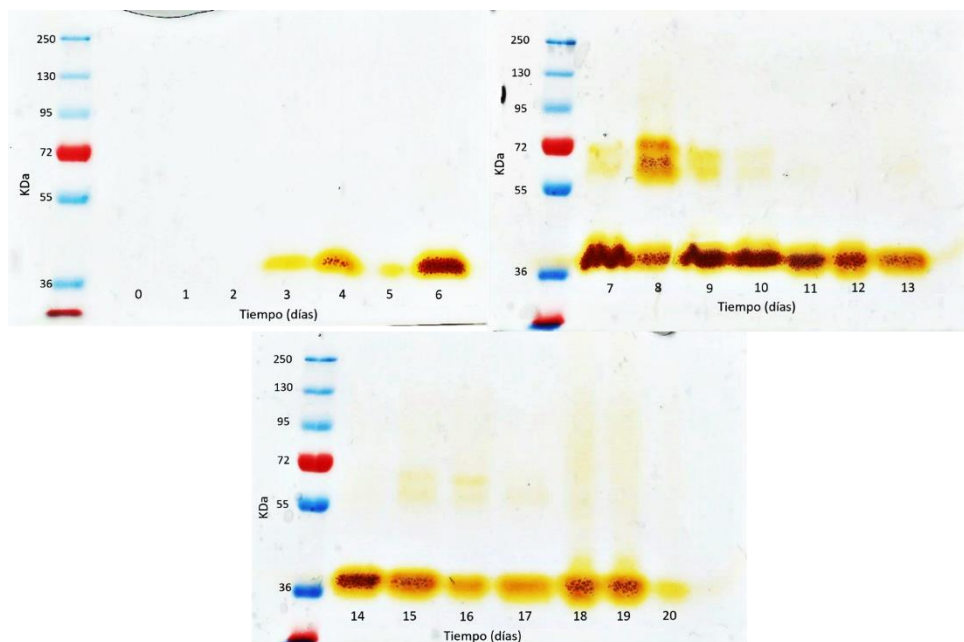
**Figura 38.** Perfil de isoenzimas manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* (Réplica 1)

En la réplica 2 se observa una isoenzima de manganeso peroxidasa posicionada a la altura del marcador de 36 kDa que se expresa de forma constante desde el día 4 hasta el día 15 y se vuelve a expresar hasta el día 20 (figura 39).



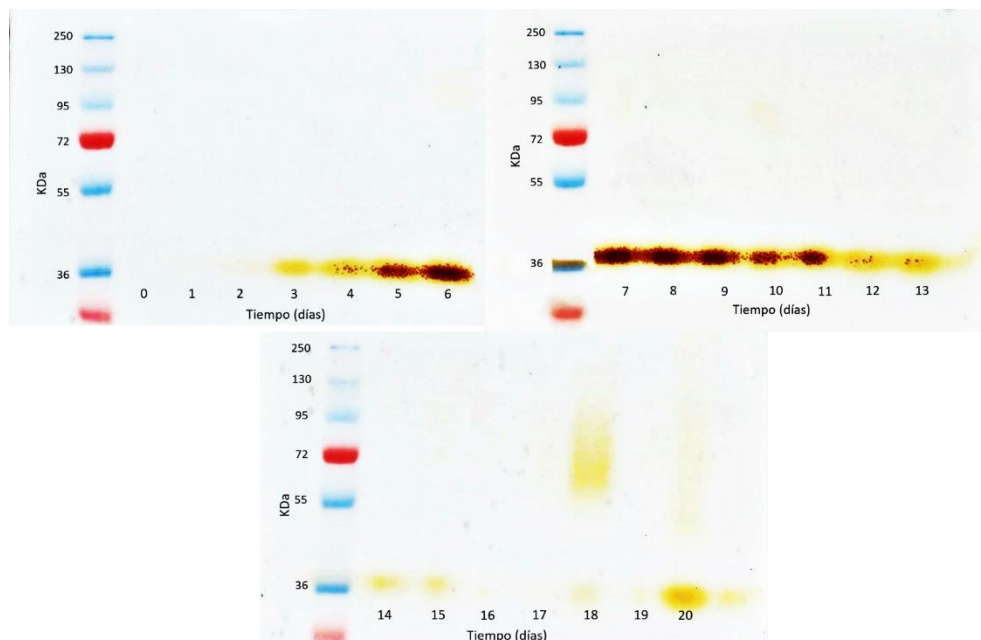
**Figura 39.** Perfil de isoenzimas manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* (Réplica 2)

En la réplica 3 se observaron tres isoenzimas de manganeso peroxidasa posicionadas a la altura del marcador de 36, 55 y 72 kDa. La primer isoenzima se mantiene constante en el cultivo desde el día 3 hasta el día 20. La isoenzima de 55 kDa se expresó los días 7, 8, 9, 15 y 16. Finalmente la isoenzima de 72 kDa se expresó en los días 7, 8, y 9 (figura 40).



**Figura 40.** Perfil de isoenzimas manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* (Réplica 3)

En la réplica 4 se expresaron dos isoenzimas de manganeso peroxidasa posicionadas a la altura del marcador de 36 y 55 kDa. La isoenzima de 55 kDa sólo se expresó en el día 18 y la isoenzima de 35 kDa se mantuvo constante en todo el cultivo desde el día 3 hasta el día 20 (figura 41).



**Figura 25.** Perfil de isoenzimas manganeso peroxidasa de *Pleurotus ostreatus* (Réplica 3)

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE

### 9.1. *Agrocybe cf. pediades*

Con respecto a la elección de un medio de cultivo para utilizarlo en la segunda fase, se observó que el medio 5, en *Agrocybe cf. pediades*, tuvo una mayor velocidad media de crecimiento (VMC) cuando en la composición del medio estaba la presencia del 2,6-dimetoxifenol (DMP), aunque no contenga una fuente de carbono. Aparentemente, el DMP podría estar proporcionado una fuente de carbono, debido a que, la estructura del DMP es similar a la lignina, por lo cual es utilizado para determinar la actividad de enzimas lignícolas (Wan y cols. 2008). Cuando se compara las VMC del medio 5 con la composición nutrimental sin DMP y con adición de DMP hay diferencias visuales, porque la biomasa se ve densa y homogénea cuando tiene el DMP en el medio que cuando no lo tiene. En este último caso, cuando no hay DMP en el medio, se observa a las hifas del micelio muy laxas y ciertas ramificaciones de hifas, que aparentemente tienen la función de buscar y reconocer nuevas fuentes de carbono para su crecimiento (Gow y cols. 1999). Sin embargo, al no contener una fuente de carbono, este medio quedó descartado para seleccionarlo en la segunda fase debido a que sería complicado manejarlo en medio líquido.



Por otro lado, al observar los resultados de forma general, en *Agrocybe cf. pediades* vemos que el medio 3 presentó un índice de potencia (IP) alto para las tres enzimas. El índice de potencia es una herramienta económica que facilita conocer las enzimas que pueden expresar hongos con potencial biotecnológico y proveer de un parámetro para considerarse en términos de producción. Sin embargo, el IP sobreestima la magnitud de la actividad enzimática porque no proporciona un valor preciso (Chan-Cupul y cols. 2016). Para estos fines, tanto para *Agrocybe cf. pediades*, como para *Gymnopus sp.*, el IP es útil porque estos hongos fueron recién aislados *in vitro* por lo que es necesario confirmar la presencia de enzimas de interés y tener una referencia de la actividad enzimática que presentan, además de ver como diferentes componentes nutricionales de medios de cultivo influyen en la expresión de las enzimas de interés. Este índice ha sido utilizado en varios estudios (Márquez Ortega 2004, Ramírez y cols. 2010, Antonio Revuelta, 2013). Aún con todo, el medio 3 tuvo una VMC lenta, indistinto si tenía, o no, en su composición la presencia de algún sustrato enzimático, lo cual indica que posiblemente la composición del medio influyó en el crecimiento y en la actividad enzimática.

La cantidad y fuente de carbono fue diferente en cada medio, el medio 3 contenía una alta cantidad de fuente de carbono (39 g/L de glucosa), lo cual triplicaba la cantidad de fuente de carbono de los otros medios de cultivo y contenía una alta cantidad de nitrógeno (extracto de levadura,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , peptona), lo cual probablemente influyó en la actividad enzimática, ya que Elisashvili y cols. (2011) reportan que el contenido de carbono y el tipo de fuente influyen en la respuesta de los basidiomicetos en la producción de enzimas ligninolíticas y que la cantidad de nitrógeno, particularmente la presencia de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y la peptona, aumentan la actividad enzimática lacasa y manganeso peroxidasa. Por el contrario, altas cantidades de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (también es un compuesto nutrimental del medio 3), incrementan el potencial osmótico, lo cual, en consecuencia, puede reducir el crecimiento del micelio (Beever y Laracy 1986, Chan-Cupul y cols. 2016). La composición del medio 3 pudo haber influido en el alto IP encontrado y en el crecimiento lento de *Agrocybe cf. pediades*.

Por el contrario, al analizar la composición de nutrientes y la cantidad utilizada del medio 3 con fines de producción, la alta cantidad de carbono y de nitrógeno, elevan el costo de producción, además de que los resultados nos indican que el crecimiento del hongo es lento. Económicamente sale más caro elaborar este medio al hablar de producción masiva. En

biotecnología, se busca producir algún metabolito de forma eficiente y de forma rápida pero con el menor costo económico posible, por lo tanto, aparentemente, este medio no cumple con estos requerimientos.

Para elegir un medio de cultivo, se realizaron los análisis estadísticos que permitan ver con que otro medio de cultivo, el medio 3 no tiene diferencias significativas para poder utilizarlo. Al evaluar los resultados de los demás medios, el medio 1, no presenta diferencias significativas en la VMC (sin sustrato y con sustrato DMP + MnSO<sub>4</sub>) del medio 3 pero si con el medio 3 con el sustrato DMP. El IP de lacasa y manganeso peroxidasa del medio 3 presenta diferencias significativas con el IP del medio 1 pero no con el IP de celulasa. Por el contrario, el IP del medio 3 prácticamente presenta diferencias significativas con los demás medios por ser un valor alto. Observando los datos del IP de las tres enzimas, el dato mayor que sigue del medio 3, es el dato del medio 1, por tanto se propone el medio 1 (anexo 2).

## **9.2. *Gymnopus* sp.**

Con respecto a *Gymnopus* sp., no hubo crecimiento en el medio 3 en casi todas las condiciones. Solo hubo crecimiento cuando a la composición del medio se añadió el sustrato 2,6-Dimetoxifenol (DMP), donde el crecimiento fue lento pero se encontró el mayor índice de potencia (IP) de lacasa. Probablemente, la adición de DMP promueve de cierta forma el crecimiento como con *Agrocybe* cf. *pediades* (Márquez Ortega 2004). De igual manera, se descartó el medio 5 para la fase en líquido.

Por el contrario, el medio 1 presentó los valores más altos de IP para lacasa y manganeso peroxidasa y el segundo valor más alto para celulasa. Aparentemente la composición del medio también influyó en la actividad enzimática. Concentraciones bajas de MgSO<sub>4</sub> (componente del medio 1) contribuyen a mantener la estabilidad de la actividad lacasa en periodos prolongados de incubación (Stoilova y cols. 2010). En este caso, a diferencia de *Agrocybe* cf. *pediades*, la baja cantidad de nitrógeno, fuente de carbono y la relación C/N favorecieron la expresión de las enzimas estudiadas (Kaal y cols. 1995). Las cepas trabajadas en este estudio fueron recién aisladas por lo cual, es posible que esto influyera en la variación de la respuesta de estos hongos.

Con respecto a la velocidad media de crecimiento (VMC), el dato de mayor valor, de forma general (con o sin sustrato enzimático, se presentó en el medio 2). Para poder determinar que

medio utilizar en la segunda fase (medio 1 ó 2) se hicieron análisis estadísticos. De acuerdo con esto, se encontró que el medio 1 y el medio 2 no presentaron diferencias significativas en el IP y con respecto a la VMC, los medios con adición de sustrato, no obtuvieron diferencias significativas, pero sí cuando no se añadió el sustrato a los medios de cultivo. De acuerdo con la elección del medio de cultivo para *Agrocybe* cf. *pediades* y observando que, de forma general, no existen diferencias significativas con el medio 2; el medio que se propone para *Gymnopus* sp., es el 1 (anexo 2).

## **10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA SEGUNDA FASE**

### **10.1 *Gymnopus* sp.**

Este hongo tuvo un comportamiento diferente al esperado en condiciones de medio líquido en movimiento. Bajo las condiciones que trabajamos en el laboratorio en cultivo líquido *Gymnopus* sp., no creció. Después de varias pruebas, el hongo creció cuando los matraces fueron inoculados con siete pellets del agar de 6 mm y el micelio en conjunto. A pesar de esto, el micelio de hongo no fue tan denso como el de *Agrocybe* cf. *pediades* y se observó una cantidad moderada de biomasa hasta el día 30. En los pocos estudios relacionados con este hongo, se ha reportado las condiciones en que lograron crecer a *Gymnopus* sp. Valášková y cols. (2007) crecieron a este hongo en hojarasca estéril, inoculando con dos pellets de 7 mm, logrando un crecimiento lento hasta la cuarta semana. En cambio, obtuvo un alto porcentaje de degradación de la hojarasca, lo cual indica que aparentemente está secretando las enzimas necesarias para poder participar en este proceso. En otro trabajo, Větrovský y cols. (2013) trabajaron a *Gymnopus* sp. en cultivo líquido en forma estática. Utilizaron un medio mineral y de igual manera inocularon con dos pellets de 7 mm. Por esto es posible que este hongo necesite una alta cantidad inicial de nutrientes, proporcionada por el pellet de agar, que permita comenzar la fase de adaptación al medio donde se desarrolle. Además, aparentemente este hongo necesita un soporte, dado por el pellet, el cual probablemente le brindó reservas estáticas de nutrientes y abatió las condiciones de oxigenación para poder adaptarse y crecer cultivo líquido en movimiento.

Respecto a la actividad enzimática, *Gymnopus* sp. presentó una baja actividad lacasa en comparación de la actividad manganeso peroxidasa después del día 30. Větrovský y cols.

(2013) encontraron en su estudio que *Gymnopus* sp. mostró la mayor degradación de la hojarasca relacionada con la alta actividad manganeso peroxidasa, esta enzima se expresó después de la cuarta semana de crecimiento con una baja producción de enzima lacasa. En cuanto a la participación de la enzima manganeso peroxidasa, se sabe que tiene una función clave en la descomposición de la lignina, lo cual está relacionado con lo que encontraron. Sin embargo, el medio de cultivo que utilizamos en el laboratorio tiene una fuente de carbono simple y los nutrientes son de fácil asimilación para el hongo. A pesar de eso, el hecho de que este hongo fuera recién aislado de un ambiente perturbado puede que tenga esta relación y por ello hubo mayor producción de enzima manganeso peroxidasa. Aún con todo esto es complicado comprobarlo porque los matraces muestreados se hicieron en los días 30, 32 y 34 y por consiguiente no conocemos el perfil de expresión de la enzima en un intervalo de tiempo. Además de que la actividad enzimática fluctúa a través de tiempo y puede expresarse mayor o menor magnitud de la enzima manganeso peroxidasa. Por todo esto, *Gymnopus* sp. tiene potencial y sería conveniente continuar con su investigación para poder saber, en primera instancia, el papel del soporte en el cultivo líquido y si esto, favorece o no, la producción de enzimas de interés.

## **10.2 *Agrocybe* cf. *pediades* y *Pleurotus ostreatus***

En este trabajo, *Pleurotus ostreatus* fue un referente con respecto a *Agrocybe pediades* y las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa. De acuerdo con los resultados, las condiciones utilizadas fueron adecuadas para *Agrocybe* cf. *pediades* porque obtuvo una producción eficiente de biomasa y expresó las enzimas esperadas. Por el contrario, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre ambos hongos. En las condiciones trabajadas en este estudio, *Pleurotus ostreatus* tuvo una mayor magnitud de actividad de las dos enzimas estudiadas y mayor producción de biomasa.

*Pleurotus ostreatus* se utilizó como control para verificar que las condiciones y las técnicas de medición fueran adecuadas para el hongo recién aislado, *Agrocybe* cf. *pediades*. Respecto a ello, en el laboratorio las condiciones establecidas y el medio de cultivo (medio 1), se ha utilizado para estudiar a *Pleurotus ostreatus*, particularmente la cepa PoB, obteniendo una alta producción de la enzima lacasa.

En lo concerniente a *Pleurotus ostreatus*, es un hongo modelo muy estudiado desde hace varios años con respecto a estas enzimas (Karas y cols. 2011, Farizah 2016). Asimismo, varios estudios probaron una diversidad de condiciones en las cuales concluyeron que el medio en el que se encuentran, los factores ambientales e internos propios del hongo, influyen en la expresión de enzimas. Aunado que una variedad de cepas han sido estudiadas pero pocas han sido investigadas a nivel molecular (Janusz y cols. 2013). En posteriores trabajos, se realizaron expresiones heterólogas de la enzima lacasa de *Pleurotus ostreatus*, aún con todo esto, el rendimiento de producción es bajo y son enzimas difíciles de purificar (Piscitelli y cols. 2010). Esto pudo deberse a la formación de agregados de las enzimas recombinantes o a los factores externos e internos que no han permitido una producción masiva de la enzima lacasa (Suzuki y cols. 2003).

No obstante, *Agrocybe cf. pediades* es un hongo recién aislado, no cuenta con la cantidad de información que tiene *Pleurotus ostreatus* y son escasos los antecedentes. A pesar de lo dicho, expresó las dos enzimas de interés aunque en menor magnitud y con un comportamiento diferente durante todo el cultivo. Las expresando isoenzimas expresadas fueron de aparentemente mayor peso molecular en comparación a *Pleurotus ostreatus*. Manganeseo peroxidasa fue la enzima con mayor actividad en contraste con la enzima lacasa, aunque las isoenzimas de lacasa son de mayor peso con respecto a las isoenzimas de manganeseo peroxidasa. Debido a esto, es probable que estas enzimas tengan diferentes características que podrían dar pauta para estudiar con otras condiciones e incluso con otras enzimas a *Agrocybe cf. pediades*.

## **11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA TERCERA FASE**

### **11.1. Isoenzimas lacasa de *Agrocybe cf. pediades* y *Pleurotus ostreatus***

Las isoenzimas de lacasa de *Agrocybe cf. pediades* en comparación con las de *Pleurotus ostreatus* son de aparente mayor peso molecular a pesar de que la magnitud de actividad enzimática fue menor. Además, se observan dos isoenzimas en *Agrocybe cf. pediades* y una isoenzima en *Pleurotus ostreatus*. A pesar de eso, la magnitud de la actividad enzimática lacasa es mucho mayor en *Pleurotus ostreatus*, la isoenzima se observa con mayor intensidad y es constante durante todo el cultivo. Esto podría deberse a que las isoenzimas de *Agrocybe*

cf. *pediades*, probablemente muestran modificaciones estructurales en procesos postraduccionales, al presentar un mayor porcentaje de glicosilación para aparentemente tener una mayor protección de la enzima y poder realizar su función al provenir de un ambiente perturbado.

En cuanto a esto, se ha reportado que las lacasas en otros organismos (plantas) son altamente glicosiladas, debido a que aparentemente le brinda una mayor protección, estabilidad o plegamiento de la proteína pero es poca la información sobre los procesos de glicosilación en basidiomicetos (Eggert y cols. 1996). Las lacasas de hongos filamentosos y en los basidiomicetos del género *Pycnoporus*, regularmente son *N*-glicosiladas con alto contenido de manosa, encontrando que hasta un 40 % del peso molecular de las lacasas corresponde a los glucanos (Vite-Vallejo y cols. 2009). Por consiguiente, Maestre-Reyna y cols. (2015) reportan indicios sobre la estructura de la glicosilación y la función de la enzima lacasa en el basidiomiceto *Lentinus* sp., encontrando que el primer azúcar *N*-GlcNAc en los tres sitios de glicosilados que presenta este hongo juega un papel importante en la estabilización de la enzima lacasa fúngica, aun así, no se ha investigado por completo acerca de la estructura-función de la glicosilación en las lacasas fúngicas.

Dentro de los estudios que han realizado para expresar heterológamente a estas enzimas en *Escherichia coli*, se ha reportado que la falta de una alta magnitud de actividad enzimática o la disminución de afinidad hacia el sustrato pueden deberse a los altos niveles de glicosilación de la proteína nativa por lo cual es necesario hacer estudios acerca de la relación de la función con los glucanos de la enzima lacasa (Iimura y cols. 2017).

Es por todo esto que las isoenzimas de *Agrocybe* cf. *pediades*, al tener un mayor tamaño y una expresión diferente durante todo el cultivo, podría indicar que son proteínas más grandes o tienen un mayor nivel de glicosilación para protección realizar su función, posiblemente a consecuencia a las condiciones de perturbación que tienen el ambiente de donde proviene este hongo. Esto puede indicar otras funciones fisiológicas de la enzima lacasa distintas a las reportadas en *Pleurotus ostreatus*, lo cual genera nuevas preguntas de investigación sobre ¿Qué papel podría estar desempeñando la enzima lacasa en *Agrocybe* cf. *pediades*? Al provenir de un ambiente perturbado, ¿la función de esta enzima es distinta? ¿Cuántos tipos de esta enzima tiene este hongo y bajo qué condiciones son secretadas? ¿Cuántos genes codifican

para esta enzima? ¿Qué otras funciones fisiológicas podría estar realizando esta enzima en *Agrocybe cf. pediades*? ¿En qué etapas del ciclo de vida son secretadas estas enzimas? Entre otras preguntas, por lo cual es necesario realizar futuras investigaciones para responder estas incógnitas.

## 12. CONCLUSIONES

- *Agrocybe cf. pediades* y *Gymnopus sp.*, expresaron las enzimas lacasa, manganeso peroxidasa y celulasa cualitativamente en medio sólido.
- *Gymnopus sp.* creció en las condiciones de medio líquido utilizando como inóculo un soporte (pellet de agar más micelio) pero expresó las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa en estas condiciones.
- *Agrocybe cf. pediades* secretó en medio líquido las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa. Se expresaron dos isoenzimas lacasa y una isoenzima manganeso peroxidasa, con pesos moleculares mayores que las producidas por *Pleurotus ostreatus*. Esto abre nuevas preguntas de investigación dirigidas hacia la función o requerimientos que *Agrocybe cf. pediades* necesita para la función de esta enzima lo que permitirá considerar a esta especie como un modelo para el estudio de diversos procesos en futuras investigaciones.

## 13. PERSPECTIVAS

Con respecto a *Gymnopus sp.*, se sugiere buscar y establecer otras condiciones en medio líquido con el soporte para determinar los números de isoenzimas de lacasa y manganeso peroxidasa. También se sugiere determinar el posible papel del soporte al momento de colocarlo en medio líquido en agitación.

Para *Agrocybe cf. pediades* sería importante caracterizar a las isoenzimas lacasa y manganeso peroxidasa, determinar la constante de saturación de estas enzimas sobre el sustrato transformado en cierto tiempo. Purificar las isoenzimas para determinar el peso molecular exacto y obtener su secuencia de aminoácidos para poder generar primers y hacer la búsqueda de genes o transcritos. De esta forma, se podrían silenciar genes de lacasa para indagar acerca del posible papel fisiológico que estas puedan tener en el hongo de estudio.

Aunado a esto, se sugiere determinar el porcentaje y estructura de la glicosilación de las isoenzimas lacasa para comenzar a indagar sobre la función de la glicosilación en la enzima lacasa.

Buscar la expresión de la enzima lacasa en el ciclo de vida de *Agrocybe* cf. *pediades* para saber en que etapas se está produciendo y poder estudiar su posible papel fisiológico

Por otro lado, sería interesante buscar otros metabolitos de interés que sean secretados por *Agrocybe* cf. *pediades* y *Gymnopus* sp., para investigar la relación de la expresión de estos metabolitos y el ambiente perturbado de donde provienen estas cepas.

#### 14. REFERENCIAS

Adrio JL y Demain AL. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology* 6 (3): 191-199.

Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J y Valenzuela R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista mexicana de biodiversidad* 85: S76-S81.

Introduction to Mycology. Redactado por el Dr. Orlando Popoff, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina. <http://fai.unne.edu.ar/biologia/fungi/fungi.htm> (fecha de acceso el 12 febrero de 2016).

Antonio Revuelta B. (2013). Evaluación del potencial enzimático de macromicetos lignícolas del centro del estado de Veracruz. Tesis de licenciatura en biología. Universidad Veracruzana.

Baldrian P y Gabriel J. (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 206(1): 69-74.

Baldrian P. (2006). Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30(2): 215-242.

Baldrian P. (2008). Enzymes of saprotrophic basidiomycetes. In *British Mycological Society Symposia Series* (Vol. 28, pp. 19-41). Academic Press.

Beever RE y Laracy EP. (1986). Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 168(3): 1358-1365.



Brizuela MA, García L, Pérez y Mansur M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 15: 69-74.

Boddy L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS. Microbiology Ecology* 31: 185-194.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Chacon O, Waliszewski. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia* 21 (42): 111-120.

Brijwani K, Rigdon A y Vadlani, PV. (2010). Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*. 2010: 1-10.

Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ y Martínez ÁT. (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry* 274(15): 10324-10330.

Chan Cupul W, Heredia Abarca GP y Rodríguez Vázquez R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista internacional de Contaminación Ambiental* 32(3): 339-351.

Chi Y, Hatakka A y Maijala P. (2007). Can co-culturing of two white rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? *International Biodeterioration and Biodegradation* 59: 32–39.

Cortés-Sánchez AJ y Mosqueda-Olivares T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva* 12(2): 64-90.

Crowther TW, Boddy L. y Jones TH. (2012). Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus–grazer interactions. *The ISME journal* 6(11): 1992-2001.

Dashtban M, Maki M, Leung KT, Mao C y Qin W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology* 30(4): 302-309.

Deacon JW. (2013). *Fungal biology*. John Wiley & Sons.

Demian A y Fang A. (2000). The natural functions of secondary metabolites in History of modern biotechnology 1. Fiechter A (eds). Editorial Board Springer. Berlin. pp1.

Donnelly DP. y Boddy L. (2001). Mycelial dynamics during interactions between *Stropharia caerulea* and other cord-forming, saprotrophic basidiomycetes. *New Phytologist* 151: 691-704.

Eggert C, Temp U y Eriksson KE. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62(4): 1151-1158.

Elisashvilia V, Torokb T, Kachlishvilia E, Khardziania T, Metrevelia E, Kobakhidzea A y Berikashvilia I. (2011). Evaluation and regulation of the lignocellulolytic activity of novel white-rot basidiomycetes. *Global Journal of Biochemistry* 2(2).

Fang QH, y Zhong JJ. (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10(1): 61-65.

Faraco V, Ercole C, Festa G, Giardina P, Piscitelli y A, Sannia G (2008). Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77:1329–1335

Farizah A. (2016). Screening, Production and Optimization of Extracellular Laccase Enzyme from *Pleurotus Ostreatus*. *International Journal of Waste Resources* 6: 1 – 6.

Flores Herrera O, Rendón Huerta E y Velázquez López I. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico* 30: 29-55.

Frankland JC. (1998). Fungal succession unravelling the unpredictable. *Mycological Research* 102(1): 1-15.

Gow NAR, Robson GD y Gadd GM (Eds.). (1999). *The fungal colony* (Vol. 21). Cambridge University Press.

Guzmán G, Mata G, y Salmones D. (1993). *El cultivo de los hongos comestibles*. 1a edición. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

Guzmán G. (1998). Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). En *La diversidad biológica de*

Iberoamérica II, G. Halffter (ed.). Acta Zoológica Mexicana, nueva serie vol. Especial, CYTED e Instituto de Ecología, Xalapa. p. 111-175.

Hatakka A. (2001). Biodegradation of lignin. In: Lignin, Humic Substances and Coal (M. Hofrichter and A. Steinbüchel, eds.). Wiley-VCH, Weinheim 1:129-179.

Herrera T y Ulloa M. (1998). El reino de los hongos: micología básica y aplicada. 2a edición. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Hiscox J, Baldrian P, Rogers HJ y Boddy L. (2010). Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Fungal Genetics and Biology 47: 562–571.

Hofrichter M. (2002). Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology 30: 454-466.

Iakovlev A, Olson Å, Elfstrand M y Stenlid J. (2004). Differential gene expression during interactions between *Heterobasidion annosum* and *Physisporinus sanguinolentus*. FEMS Microbiology Letters - Wiley Online Library 241: 79–85.

Jaszek M, Zuchowski J, Dajczak E, Cimek A, Graz M, and Grzywnowicz K. (2006). Ligninolytic enzymes can participate in a multiple response system to oxidative stress in white-rot basidiomycetes: *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens*. International Biodeterioration & Biodegradation. 58, pp: 168–175.

Jaszek M, Kos K, Matuszewska A, Grąz M, Stefaniuk D, Osińska-Jaroszuk M, Predecka M, Jóźwik E y Grzywnowicz K. (2014). Effective Stimulation of the Biotechnological Potential of the Medicinal White Rot Fungus: *Phellinus pini* by Menadione-Mediated Oxidative Stress. Applied Biochemistry Biotechnology 174: 644–656.

Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M y Paszczynski AJ. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. Enzyme and Microbial Technology 52(1): 1-12.

Kaal EE, Field JA, y Joyce TW. (1995). Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. Bioresource Technology 53(2): 133-139.

Karas PA, Perruchon C, Exarhou K, Ehaliotis C y Karpouzas DG. (2011). Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation* 22: 215–228

Kim HO, Lim JM, Joo JH, Kim SW, Hwang HJ, Choi JW y Yun JW. (2005). Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology* 96(10): 1175-1182.

Lassen SF, Breinholt J, Østergaard PR, Brugger R, Bischoff A, Wyss M y Fuglsang CC. (2001). Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia sp.*, and *Trametes pubescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10): 4701-4707.

Imura Y, Sonoki T y Habe H. (2017). Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification* 141: 39-43.

Lindahl B y Boberg J. (2008). Distribution and function of litter basidiomycetes in coniferous forests. In *British Mycological Society Symposia Series* 28:183-196

Llaza HF. (2012). Evaluación de la actividad celulolítica del complejo enzimático celulasa en cepas fúngicas de los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín, Huánuco. Tesis de licenciatura de biólogo-microbiólogo-parasitólogo. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.

Maestre-Reyna M, Liu WC, Jeng WY, Lee CC, Hsu CA, Wen TN y Shyur LF. (2015). Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus sp.* *PLOS ONE* 10(4): e0120601.

Martínez Maximino. (1963). Los *Juniperus* Mexicanos. In Martínez M. 1963. Las Pinaceas mexicanas. Tercera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal. pp. 289-400.

Márquez-Ortega AE. (2004). Determinación de patrones de inducción de lacasas en hongo *Trametes sp.* EUM1. Tesis de Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

Marquina D. (1991) Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de biología. Madrid – España.

Maziero R, Cavazzoni V y Bononi VLR. (1999). Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia* 30(1): 77-84.

Miller G. (1956). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Mosier AC, Justice NB, Bowen BP, Baran R, Thomas BC, Northen TR y Banfield JF. (2013). Metabolites associated with adaptation of microorganisms to an acidophilic, Metal-rich environment identified by stable-isotope-enabled metabolomics. *Mbio* 4: 1-12.

Morris SJ, Friese CF y Allen MF. (2007). Disturbance in natural ecosystems: scaling from fungal diversity to ecosystem functioning en: *The Mycota IV environmental and microbial relationships*. Kubicek CP, y Druzhinina IS (eds). Editorial springer. Heidelberg, Germany.

Ortiz-Moreno ML. (2010). Macromicetos en Zona Rural de Villavicencio. *Orinoquia* 14(2): 125-132.

Owens EM, Reddy CA y Grethlein HE, (1994). Outcome of interspecific interactions among brown-rot and white-rot wood decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 14: 19–2.

Pecyna MJ, Ullrich, R, Bittner B, Clemens A, Scheibner K, Schubert R y Hofrichter M. (2009). Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(5): 885-897.

Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V y Sannia G. (2010). Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs* 1(4): 254-264.

Radha KV, Regupathi I, Arunagiri A y Murugesan, T. (2005). Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochemistry* 40(10): 3337-3345.

Ramírez JM. (2000). Detección de hongos saprótrofos del bosque de *Juniperus* del municipio de Ixtacuixtla Tlaxcala, inhibidores de crecimiento de hongos fitopatógenos. Tesis de licenciatura en biología. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Ramírez MC, Rivera-Ríos JM, Téllez-Jurado A, Gálvez AM, Mercado-Flores Y y Arana-Cuenca A. (2010). Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase,

and protease activity isolated in Mexico. *Journal of Environmental Management* 95: S256-S259.

Reyes C, Bran M y Morales O. (2014). Evaluación del crecimiento micelial de cepas nativas de *Agrocybe cylindracea* (DC.: FR) Maire, en diferentes medios de cultivo y pH. *Revista Científica* 23: 1-10.

Reyes Herminio Fabián (2003). Estado del conocimiento de *Juniperus deppeana* Steud. Tesis profesional en la modalidad de investigación bibliográfica. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Chapingo, Texcoco, Edo. De México.

Riva S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24(5): 219-226.

Rojas VG. (2010). Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en nuevo león. Tesis de doctorado en biotecnología. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Rzedowski J. (1981). Vegetación de México 1ra. Edición. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Schlesinger WH y Andrews JA. (2000). Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* 48(1): 7-20.

Sharma M, Chaurasia PK, Yadav A, Yadav RSS, Yadava S y Yadav KDS. (2016). Purification and characterization of a thermally stable yellow laccase from *Daedalea flavida* MTCC-145 with higher catalytic performance towards selective synthesis of substituted benzaldehydes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 42(1): 59-68.

Solomon Pearl E, Berg LR, Martin DW. y Villee C. (2000). Biología de Ville. Edición. Mc. Graw Hill. 1305pp.

Steffen KT, Hofrichter M y Hatakka A. (2002). Purification and characterization of manganese peroxidases from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 550-555.

Stoilova I, Krastanov A y Stanchev V. (2010). Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1(3): 208-215.

Sławińska A y Kalbarczyk J. (2011). Evaluation of enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* regarding stages of mycelium development. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 10(2): 195-202.

Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K y Inamori Y. (2003). A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67(10): 2167-2175.

Téllez-Téllez M, Fernández JF, Montiel-González AM, Sánchez C y Díaz-Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 675-679.

Thurston CF. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140(1): 19-26.

Valášková V, Šnajdr J, Bittner B, Cajthaml T, Merhautová V, Hofrichter M y Baldrian P. (2007). Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. *Soil Biology and Biochemistry* 39(10): 2651-2660.

Větrovský T, Baldrian P y Gabriel J. (2013). Extracellular enzymes of the white-rot fungus *Fomes fomentarius* and purification of 1, 4- $\beta$ -glucosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169(1): 100-109.

Vite-Vallejo O, Palomares LA, Dantán-González E, Ayala-Castro HG, Martínez-Anaya C, Valderrama B y Folch-Mallol J. (2009). The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 45(3): 233-239.

Wan Y, Du Y y Miyakoshi T. (2008). Enzymatic catalysis of 2, 6-dimethoxyphenol by laccases and products characterization in organic solutions. *Science in China Series B: Chemistry* 51(7), 669-676.

Zumárraga Uribealago M. (2007). Evolución molecular dirigida de lacasas fúngicas en *Saccharomyces cerevisiae*: tolerancia a disolventes orgánicos y estudios semi-rationales. Doctoral dissertation. Universidad Autónoma de Madrid.

## 15. ANEXOS

### Anexo 1. Operaciones para determinar la relación C/N

#### Medio 1

Glucosa 10 g – 6 C

$$10 \text{ g} * 72 \text{ C} = 720$$
$$1 \text{ L} * 180 \text{ g} = 180 \quad = 4 \text{ C/L}$$

Extracto de levadura 0.6 g – 8.6 N = 10.7 %

$$0.6 \text{ g} * 8.6 \text{ N} = 5.16 \quad = 0.0516 \text{ N/L}$$
$$1 \text{ L} * 100 \text{ g} = 100$$

$$4 / 0.0516 = 77.5 \text{ C/N}$$

#### Medio 2

Glucosa 10 g – 6 C

$$10 \text{ g} * 72 \text{ C} = 720$$
$$1 \text{ L} * 180 \text{ g} = 180 \quad = 4 \text{ C/L}$$

Extracto de levadura 1 g – 8.6 N = 10.7 %

$$1 \text{ g} * 8.6 \text{ N} = 8.6 \quad = 0.086 \text{ N/L}$$
$$1 \text{ L} * 100 \text{ g} = 100$$

$$4 / 0.086 = 46.51 \text{ C/N}$$

#### Medio 3

Glucosa 39 g – 6 C

$$39 \text{ g} * 72 \text{ C} = 2808$$
$$1 \text{ L} * 180 \text{ g} = 180 \quad = 15.6 \text{ C/L}$$

Extracto de levadura 2 g – 8.6 N

$$2 \text{ g} * 8.6 \text{ N} = 17.2 \quad = 0.172 \text{ N/L}$$
$$1 \text{ L} * 100 \text{ g} = 100$$



Sulfato de amonio 5 g – 2 N

$$5 \text{ g} * 28 \text{ N} = 140 \quad = 1.06 \text{ N/L}$$

$$1 \text{ L} * 132 \text{ g} = 132$$

Peptona 1g – 4.01 N – 5%

$$1 \text{ g} * 4.01 \text{ N} = 4.01 \quad = 0.040 \text{ N/L}$$

$$1 \text{ L} * 100 \text{ g} = 100$$

$$15.6 / 1.272 = 12.26 \text{ C/N}$$

#### **Medio 4**

Sacarosa 35 g – 144 C

$$35 \text{ g} * 144 \text{ C} = 5040 \quad = 14.73 \text{ C/L}$$

$$1 \text{ L} * 342 \text{ g} = 342$$

Extracto de malta 2.5 g – 144 C

$$2.5 \text{ g} * 144 \text{ C} = 360 \quad = 2.18 \text{ C/L}$$

$$1 \text{ L} * 165 \text{ g} = 165$$

Peptona 5g – 4.01 N – 5%

$$5 \text{ g} * 4.01 \text{ N} = 20.05 \quad = 0.200 \text{ N/L}$$

$$1 \text{ L} * 100 \text{ g} = 100$$

$$16.91 / 0.200 = 84.55 \text{ C/N}$$

#### **Medio 5**

No tiene fuente de carbono

Sulfato de amonio 5 g – 2 N

$$5 \text{ g} * 28 \text{ N} = 140 \quad = 1.06 \text{ N/L}$$

$$1 \text{ L} * 132 \text{ g} = 132$$

**Anexo 2.** Datos de mayor valor que se obtuvieron en cada parámetro evaluado en la primera fase de cada medio de cultivo.

*Agroclybe cf. pediades*

	Velocidad media de crecimiento sin sustrato	Velocidad media de crecimiento con DMP (Lacasa)	Índice de potencia (Lacasa)	Velocidad media de crecimiento con DMP + MnSO <sub>4</sub> (MnP)	Índice de potencia (MnP)	Crecimiento con carboximetilcelulosa en el día 8 (celulasa)	Halo de hidrólisis en el día 8 (Celulasa)	Índice de potencia (Celulasa)
Medio 1	2.29 mm/día	4.01 mm/día	1.52	2.72 mm/día	1.53	27.02 mm	43.39 mm	1.61
Medio 2	3.98 mm/día	5.93 mm/día	1.20	4.56 mm/día	1.26	43.61 mm	45.90 mm	1.05
Medio 3	2.03 mm/día	2.91 mm/día	1.76	2.56 mm/día	1.16	24.52 mm	39.73 mm	1.62
Medio 4	3.18 mm/día	4.84 mm/día	1.28	2.61 mm/día	1.40	28.23 mm	32.15 mm	1.14
Medio 5	2.91 mm/día	7.58 mm/día	1.14	8.43 mm/día	1.00	58.18 mm	84 mm	1.45

*Gymnopus sp.*

	Velocidad media de crecimiento sin sustrato	Velocidad media de crecimiento con DMP (Lacasa)	Índice de potencia (Lacasa)	Velocidad media de crecimiento con DMP + MnSO <sub>4</sub> (MnP)	Índice de potencia (MnP)	Crecimiento con carboximetilcelulosa en el día 15 (celulasa)	Halo de hidrólisis en el día 8 (Celulasa)	Índice de potencia (Celulasa)
Medio 1	2.95 mm/día	2.54 mm/día	1.82	2.64 mm/día	1.51	41.45 mm	45.93 mm	1.10
Medio 2	5.34 mm/día	4.23 mm/día	1.47	2.47 mm/día	1.22	53.47 mm	58.79 mm	1.11
Medio 3	-	2.01 mm/día	2.56	-	-	-	-	-
Medio 4	5.27 mm/día	2.02 mm/día	1.61	2.04 mm/día	1.17	65.89 mm	77.71 mm	1.18
Medio 5	1.24 mm/día	3.44 mm/día	1.75	3.36 mm/día	1.41	-	-	-



## 16. PUBLICACIONES

### **Expresión de enzimas ligninocelulolíticas de dos especies de hongos saprótrofos aislados de un bosque de *Juniperus* en Tlaxcala, México**

Diana Torres-González<sup>1,5</sup>, Arturo Estrada-Torres<sup>2,6</sup>, Araceli Tomasini-Campocoso<sup>3,7</sup>, Alba M. Montiel-González<sup>4,8</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km. 1.5 carretera Tlaxcala-Puebla C.P. 90070, Tlaxcala, Tlax. México.

<sup>2</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km. 1.5 carretera Tlaxcala-Puebla C.P. 90070, Tlaxcala, Tlax. México.

<sup>3</sup>Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina C.P.09340, Iztapalapa, CDMX. México.

<sup>4</sup>Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km. 10.5 autopista San Martín Texmelucan-Tlaxcala, San Felipe Ixtacuixtla, C.P. 90120. Tlaxcala, México.

Correos electrónicos: <sup>5</sup>londres\_333@hotmail.com; <sup>6</sup>arturomixo@hotmail.com; <sup>7</sup>atc@xanum.uam.mx

<sup>8</sup>amonicamg@yahoo.com

Palabras clave: Cultivo, lacasa, manganeso peroxidasa, perturbado.

Las enzimas ligninocelulolíticas de hongos saprótrofos constituyen un mecanismo de degradación sobre compuestos naturales y xenobióticos, de ahí su interés en Biotecnología. La expresión enzimática depende de los ambientes y condiciones en que se desarrollan los hongos. Los ambientes perturbados imponen un reto de sobrevivencia para ellos, por lo que se puede esperar que los metabolitos producidos por estos organismos sean distintos y representen nuevas opciones de interés potencial para el humano, lo que hace importante su estudio. Dichos ambientes y la relación con la producción de enzimas han sido poco estudiados. En este estudio, se probaron dos cepas de hongos saprótrofos asociados con el bosque de *Juniperus* en Tlaxcala, México. *Agrocybe pediades* y *Gymnopus* sp. fueron cultivadas en medio sólido con 5 diferentes composiciones de nutrientes y sustratos para evidenciar la presencia de enzimas lacasa, manganeso peroxidasa y celulasa, evaluando la velocidad de crecimiento e índice de potencia. Los resultados determinaron el medio a usarse en cultivo líquido, el cual fue medio mineral con glucosa. En este, se evaluó biomasa, pH, actividad enzimática lacasa, manganeso peroxidasa y perfil de isoenzimas, usando a *Pleurotus ostreatus* como referente. En el cultivo sólido se

Lima - Perú

22 - 25 agosto 2017

[www.almc-peru2017.pe](http://www.almc-peru2017.pe)

[almcperu@gmail.com](mailto:almcperu@gmail.com)



## IX CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICOLOGÍA

confirmó la presencia de las tres enzimas en ambas cepas, *A. pediades* mostró el mayor índice de potencia y la mayor velocidad de crecimiento. En el cultivo líquido, la mayor actividad lacasa fue de 6.25 UI/mL y de manganeso peroxidasa de 67.95 UI/mL en *A. pediades*, con dos isoenzimas de lacasa localizadas cerca del marcador de 72 y 95 kDa. En *Gymnopus* sp., la mayor actividad lacasa fue de 3.06 UI/mL y no se observó actividad manganeso peroxidasa. *P. ostreatus* mostró actividad lacasa de 21.20 UI/mL, manganeso peroxidasa de 147.23 UI/mL y dos isoenzimas de lacasa cerca del marcador de 36 y 55 kDa. Las medias de los parámetros evaluados de las cepas de estudio y *P. ostreatus* muestran diferencias significativas. Las isoenzimas producidas por *A. pediades* aparentemente son de mayor tamaño, podría estar indicado que son proteínas más grandes o cuentan con mayor nivel de glicosilación. *A. pediades* puede ser propuesto como un nuevo modelo de estudio.