



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**EFFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y LA ZEOLITA EN LA
INDUCCIÓN DE LAS ENZIMAS LACASAS, COMO ESTRATEGIA
PARA INCREMENTAR LOS RENDIMIENTOS EN HONGOS
COMESTIBLES, FUNCIONALES Y MEDICINALES**

ALFREDO GUADALUPE MORALES JUÁREZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2017



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Alfredo Guadalupe Morales Juárez**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Porfirio Morales Almora**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Efecto del ácido acetilsalicílico y la zeolita en la inducción de las enzimas lacasas, como estrategia para incrementar los rendimientos en hongos comestibles funcionales y medicinales**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 13 de diciembre del 2017

Alfredo Guadalupe Morales Juárez

Vo. Bo. Profesor Consejero
Dr. Porfirio Morales Almora

La presente tesis, titulada: **EFFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y LA ZEOLITA EN LA INDUCCIÓN DE LAS ENZIMAS LACASAS, COMO ESTRATEGIA PARA INCREMENTAR LOS RENDIMIENTOS EN HONGOS COMESTIBLES, FUNCIONALES Y MEDICINALES**, realizada por el alumno: **Alfredo Guadalupe Morales Juárez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESORA:



DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. ANTONIO MACÍAS LÓPEZ

ASESOR:



DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

Puebla, Puebla, México a 13 de diciembre de 2017

EFFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y LA ZEOLITA EN LA INDUCCIÓN DE LAS ENZIMAS LACASAS, COMO ESTRATEGIA PARA INCREMENTAR LOS RENDIMIENTOS EN HONGOS COMESTIBLES, FUNCIONALES Y MEDICINALES

Alfredo Guadalupe Morales Juárez M. C.

Colegio de Postgraduados, 2017

Las diversas aplicaciones biotecnológicas que tienen las lacasas en la industria han despertado un interés por su producción y comercialización. Las lacasas son importantes en la industria de los alimentos, del papel, textil, y en aplicaciones médicas, ecológicas y en nanotecnología. Sin embargo, su producción es limitada ya que los hongos capaces de generar estas enzimas solo producen decenas de unidades por mililitro. Una propuesta ha sido el uso de inductores capaces de estimular la actividad enzimática y aumentar la producción, sin embargo, los costos resultan muy elevados y en algunos casos el incremento no es significativo. En el presente trabajo se evaluó el efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) y la zeolita como inductores de las enzimas lacasas en hongos comestibles cultivados. En la parte experimental se elaboraron medios de cultivo semisólidos con los inductores ácido acetilsalicílico (AAS) y zeolita, adicionando ABTS 0.5 mM como prueba cualitativa de la actividad enzimática mediante un halo oxidativo. Para la determinación cuantitativa de lacasas se usaron como sustratos enzimáticos el ABTS, guaiacol y la siringaldazina. Se observó que al usar ABTS se obtuvo una mayor cantidad de lacasas en comparación con el guaiacol y la siringaldazina. El AAS 100 μM con zeolita al 5% aumentó la producción de las enzimas del hongo medicinal *G. lucidum* de 3.95 ± 0.29 en el testigo, a $34.32 \pm 12.95 \text{ U mL}^{-1}$ en dicha condición, representando un incremento de un 868.86%. Mientras que, el hongo comestible *P. ostreatus* tuvo una producción de lacasas de $18.14 \pm 1.21 \text{ U mL}^{-1}$ en el testigo y de $237.86 \pm 11.34 \text{ U mL}^{-1}$ en zeolita al 5%, aumentando un 1311% la cantidad de lacasas. En los hongos *Grifola*, *Lentinula* y *Sparassis* se produjeron de 0.01 a 8.98 U mL^{-1} , actividades menores que *Ganoderma* y *Pleurotus*.

Palabras clave: ABTS, ácido acetilsalicílico, guaiacol, hongos comestibles, siringaldazina, zeolita.

EFFECT OF ACETYLSALICYLIC ACID AND ZEOLITE IN THE INDUCTION OF LACCASES ENZYMES, AS A STRATEGY TO INCREASE YIELDS IN EDIBLE, FUNCTIONAL AND MEDICINAL MUSHROOMS

Alfredo Guadalupe Morales Juárez M. C.

College of Postgraduates, 2017

The various biotechnological applications that laccases have in the industry have aroused an interest in their production and marketing. Laccases are important in the food, paper, textile, and medical, ecological, and nanotechnology industries. However, its production is limited since the mushrooms are capable of generating these enzymes only in small amounts. One proposal has been the use of inductors of enzymatic activity and increase its production, however, the costs are very high and in some cases the increase is not significant. In the present work, the effect of acetylsalicylic acid (ASA) and zeolite as inducers of laccase enzymes in cultured edible mushrooms was evaluated. In the experimental part, semisolid culture media (malt extract agar) were elaborated with the inducers of acetylsalicylic acid (ASA) and zeolite, adding 0.5 mM ABTS as a qualitative test of the enzymatic activity through an oxidative halo. For the quantitative determination of laccases three enzymatic substrates were used: ABTS, guaiacol and syringaldazine. It was observed that when ABTS was used a greater amount of laccases was obtained compared to guaiacol and syringaldazine. The condition of 100 μM ASA with 5% zeolite increased the production of the laccase enzyme of the medicinal mushroom *G. lucidum* from 3.95 ± 0.29 in the control to $34.32 \pm 12.95 \text{ U mL}^{-1}$, representing an increase of 868.86%. On the other hand, the edible mushroom *P. ostreatus* had a laccase production of $18.14 \pm 1.21 \text{ U mL}^{-1}$ in the control and $237.86 \pm 11.34 \text{ U mL}^{-1}$ in 5% zeolite, increasing the laccase production in 1311%. In the mushrooms *Grifola*, *Lentinula* and *Sparassis* the amount of laccase production ranged from 0.01 to 8.98 U mL^{-1} .

Key words: ABTS, acetylsalicylic acid, guaiacol, edible mushrooms, syringaldazine, zeolite.

Dedicatoria

A mis padres

Por su amor, entrega, confianza, paciencia, consejos y sacrificios

A mi hermano, mis abuelos y familia

A la Mtra. Rosalía Hernández Leyva

Por la motivación que me brindo durante estos años.

A mis maestros

Por contribuir en mi formación académica

A mis amigos

Cristóbal, Neguibi, Germán, Jessica, Abraham, Rebeca y Yolanda por la amistad y apoyo durante esta etapa.

A quienes están siempre conmigo, a pesar de la distancia.

Agradecimientos

Al pueblo de México a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haber financiado mis estudios de Maestría en el Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla durante el período 2016-2017.

Al Colegio de Postgraduados *Campus* Puebla que, a través de su planta académica y los integrantes de mi consejo particular: Dra. Mercedes Sobal Cruz, Dr. Porfirio Morales Almora, Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, Dr. Antonio Macías López y Dr. Francisco Hernández Rosas, quienes fueron el pilar en mi formación académica y profesional.

A mis compañeros y amigos del PROEDAR en especial a los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de Hongos: Víctor, Patricio, Myrna, Nora, Helios, Magali, Maricela, Luis Carlos, Mago, Apolo, Vladimir, Iván, Grace, Luz, Willis, Luis Joaquín y Hugo.

Especialmente a la Maestra Beatriz Inés Petlcalco Sánchez y al Maestro Joan Windhoek Olvera Noriega.

CONTENIDO		Página
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEORICO	3
2.1	Biotecnología y desarrollo en México.....	3
2.2	Importancia de los hongos comestibles, funcionales y medicinales en México.....	4
2.3	Producción rural de hongos comestibles, funcionales y medicinales.....	4
2.4	Importancia de algunos hongos comestibles.....	5
2.4.1	<i>Ganoderma lucidum</i>	5
2.4.2	<i>Grifola frondosa</i>	6
2.4.3	<i>Lentinula edodes</i>	6
2.4.4	<i>Pleurotus ostreatus</i>	7
2.4.5	<i>Sparassis crispa</i>	7
2.5	Los hongos como fuente de lacasas.....	8
2.6	Importancia de las lacasas en la industria.....	8
2.6.1	Inductores de lacasas.....	9
2.7	Biotecnología para incrementar la expresión de enzimas.....	10
2.8	Ácido acetilsalicílico.....	10
2.9	Zeolita.....	11
III.	MARCO DE REFERENCIA	12
3.1	Cultivo de hongos comestibles.....	12
3.2	Producción de hongos comestibles en México	12
3.2.1	<i>Ganoderma lucidum</i>	12
3.2.2	<i>Grifola frondosa</i>	13
3.2.3	<i>Lentinula edodes</i>	13
3.2.4	<i>Pleurotus ostreatus</i>	14
3.2.5	<i>Sparassis crispa</i>	14
3.3	Inductores en la producción de hongos comestibles.....	15
3.4	Mecanismos de inducción.....	16
3.5	El ácido acetilsalicílico.....	16
3.6	La zeolita.....	17
IV.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	18
V.	HIPÓTESIS	20
VI.	OBJETIVOS	20
6.1	Objetivo general.....	20
6.2	Objetivos específicos.....	20
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1	Diagrama general del proceso.....	21
7.2	Material biológico.....	22
7.3	Tolerancia máxima a la zeolita.....	23
7.3.1	Actividad volumétrica de lacasas (U mL ⁻¹).....	23
7.4	Preparación de medios semisólidos suplementados con AAS y zeolita.....	24
7.4.1	Adición de ABTS como prueba cualitativa de lacasas.....	25
7.5	Cinética de crecimiento de <i>G. lucidum</i> y <i>P. ostreatus</i>	26

7.5.1	pH.....	26
7.5.2	Velocidad de crecimiento lineal (cm día ⁻¹).....	26
7.5.3	Área de la colonia (cm ²).....	27
7.5.4	Halo oxidativo (cm ²).....	27
7.5.5	Determinación de proteínas por el método de Bradford (µg mL ⁻¹).....	27
7.5.6	Determinación de la actividad volumétrica de lacasas (U mL ⁻¹) con ABTS, guaiacol y siringaldazina.....	28
7.6	Análisis estadístico.....	30
VIII.	RESULTADOS.....	31
8.1	Caracterización de los recursos fúngicos estudiados (<i>Ganoderma</i> , <i>Grifola</i> , <i>Lentinula</i> , <i>Pleurotus</i> y <i>Sparassis</i>).....	31
8.1.1	Actividad enzimática de lacasas (U mL ⁻¹) de los recursos fúngicos estudiados (<i>Ganoderma</i> , <i>Grifola</i> , <i>Lentinula</i> , <i>Pleurotus</i> y <i>Sparassis</i>)...	34
8.2	Fisiología de la CP-145 de <i>G. lucidum</i> usando AAS, zeolita y ABTS....	38
8.2.1	pH inicial y final.....	42
8.2.2	Cuantificación de proteínas.....	43
8.2.3	Velocidad de colonización.....	44
8.2.4	Área de colonización y del halo de oxidación (cm ²).....	48
8.2.5	Actividad volumétrica de lacasas usando tres sustratos.....	52
8.2.5.1	ABTS.....	52
8.2.5.2	Guaiacol.....	53
8.2.5.3	Siringaldazina.....	54
8.3	Fisiología de la CP-753 de <i>P. ostreatus</i> usando AAS, zeolita y ABTS..	55
8.3.1	pH inicial y final.....	59
8.3.2	Cuantificación de proteínas.....	60
8.3.3	Velocidad de colonización.....	61
8.3.4	Área de colonización y halo de oxidación (cm ²).....	67
8.3.5	Actividad volumétrica de lacasas usando tres sustratos.....	73
8.3.5.1	ABTS.....	73
8.3.5.2	Guaiacol.....	74
8.3.5.3	Siringaldazina.....	75
IX.	DISCUSIÓN.....	77
X.	CONCLUSIONES.....	80
XI	CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	80
XII.	PROPUESTA DE ESTRATEGIA PARA EL APROVECHAMIENTO DE RECURSOS GENÉTICOS FÚNGICOS COMO CEPAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS LACASAS UTILIZANDO INDUCTORES DE FÁCIL ACCESO.....	81
12.1	Introducción.....	81
12.2	Actores de la estrategia.....	84
12.3	Objetivos estratégicos y específicos.....	85
XIII.	LITERATURA CITADA.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Metodología empleada en la investigación.....	21
Figura 2. Determinación de la actividad volumétrica de lacasas en microplaca usando el método de Bournonnais y Paice (1990).	24
Figura 3. Diagrama de la determinación de proteínas por método de Bradford.	28
Figura 4. Determinación de la actividad volumétrica de lacasas en microplaca usando el método de Bournonnais y Paice (1990), con diferentes sustratos enzimáticos.....	29
Figura 5. Actividad enzimática de <i>Ganoderma lucidum</i> en dosis de zeolita al 5% con AAS 100 μ M.	36
Figura 6 Actividad enzimática de lacasas del barrido de concentraciones de zeolita y AAS 100 μ M de la CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
Figura 7. Actividad volumétrica de lacasas de las cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> CP-50 y CP-753 usando 3 y 5% de zeolita a los 14 días de colonización con ABTS como sustrato.....	38
Figura 8. Crecimiento de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> en medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA) adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M y sustrato enzimático ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 0.5 mM a tiempo final de colonización.....	39
Figura 9. Cinética de crecimiento de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i>	40
Figura 10. pH inicial y final de <i>Ganoderma lucidum</i> en las diferentes condiciones.	43
Figura 11. Cuantificación de proteínas de <i>Ganoderma lucidum</i> en las diferentes condiciones.....	44
Figura 12. Velocidad de colonización de la cepa- CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> y halo oxidativo en las condiciones Tx1 y testigo a los 10 días de crecimiento..	45
Figura 13. Velocidad de colonización de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> y halo oxidativo en el tratamiento Tx3 y testigo y Tx2 a los 10 días de crecimiento.	46
Figura 14. Velocidad de colonización de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> y halo oxidativo del tratamiento Tx7 en comparación al testigo y Tx6 a diferentes días de crecimiento.	47
Figura 15. Velocidad de colonización de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> y halo oxidativo del tratamiento Tx11 en comparación al testigo, Tx2, Tx6 y Tx10 a los diferentes días de crecimiento.	48

Figura 16.	Área de colonización y halo oxidativo de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> en el tratamiento Tx1 en comparación con el Testigo a los 10 días de crecimiento.....	49
Figura 17.	Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> en el tratamiento Tx3 en comparación al Testigo y Tx2 a los 10 días de crecimiento.....	50
Figura 18.	Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> en el tratamiento Tx7 en comparación al Testigo y Tx6 a los diferentes días de crecimiento.....	51
Figura 19.	Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> en el tratamiento Tx11 en comparación al Testigo, Tx12, Tx6 y Tx10 a los diferentes días de crecimiento.	52
Figura 20.	Actividad volumétrica de lacasas de <i>Ganoderma lucidum</i> usando ABTS como sustrato enzimático.....	53
Figura 21.	Actividad volumétrica de lacasas de <i>Ganoderma lucidum</i> usando guaiacol como sustrato enzimático.....	54
Figura 22.	Actividad volumétrica de lacasas de <i>Ganoderma lucidum</i> usando siringaldazina como sustrato enzimático.....	55
Figura 23.	Crecimiento de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA) adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M y sustrato enzimático ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 0.5 mM.	56
Figura 24.	Cinética de crecimiento de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en diferentes condiciones.	57
Figura 25.	pH inicial y final de <i>Pleurotus ostreatus</i> en las diferentes condiciones.	60
Figura 26.	Cuantificación de proteínas de <i>Pleurotus ostreatus</i> en las diferentes condiciones.	61
Figura 27.	Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y halo oxidativo en el tratamiento Tx1 en comparación al testigo a los 7 días de crecimiento.....	62
Figura 28.	Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y halo oxidativo en el tratamiento Tx3 en comparación al testigo y Tx2 a los 7 días de crecimiento.....	63
Figura 29.	Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de <i>P. ostreatus</i> y halo oxidativo en el tratamiento Tx5 en comparación al testigo y Tx4 a los 7 días de crecimiento.....	64
Figura 30.	Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y halo oxidativo en el tratamiento Tx7 en comparación al testigo y Tx6 a los diferentes días de crecimiento.	65
Figura 31.	Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y halo oxidativo del tratamientoTx9 en comparación al testigo, Tx2, Tx4 y Tx8 a los diferentes días de crecimiento.	66

Figura 32.	Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> y halo oxidativo en el tratamiento Tx11 en comparación al testigo, Tx2, Tx6 y Tx11 a los diferentes días de crecimiento.	67
Figura 33.	Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el tratamiento Tx1 en comparación al testigo a los 9 días de colonización.....	68
Figura 34.	Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el tratamiento Tx3 en comparación al testigo y Tx2 a los 9 días de colonización.....	69
Figura 35.	Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el tratamiento Tx5 en comparación al testigo y Tx4 a los 9 días de colonización.....	70
Figura 36.	Área de colonización de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el tratamiento Tx7 en comparación al testigo y Tx6 a los diferentes días de crecimiento.	71
Figura 37.	Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el tratamiento Tx9 en comparación al testigo, Tx2, Tx4 y Tx8 a los diferentes días de crecimiento.	72
Figura 38.	Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de <i>Pleurotus ostreatus</i> en el tratamiento Tx11 contra testigo, Tx2, Tx6 y Tx10 a los diferentes días de crecimiento.....	73
Figura 39	Actividad volumétrica de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> usando ABTS como sustrato enzimático.....	74
Figura 40	Actividad volumétrica de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> usando guaiacol como sustrato enzimático.....	75
Figura 41	Actividad volumétrica de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> usando siringaldazina como sustrato enzimático.....	76

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1.	Material biológico de los recursos fúngicos depositados en el CREGENHC y empleados en esta investigación.....	22
Cuadro 2.	Blanco, testigos y tratamientos empleados en el experimento para la determinación de lacasas de las cepas CP-753 <i>Pleurotus ostreatus</i> y CP-145 <i>Ganoderma lucidum</i> en medios suplementados con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M y zeolita al 3 y 5%, adicionado con el substrato enzimático ABTS.....	25
Cuadro 3.	Crecimiento de tres especies de hongos comestibles en EMA a concentraciones de zeolita de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1%.....	31
Cuadro 4.	Crecimiento de dos especies de hongos comestibles en EMA a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10% de zeolita.....	32
Cuadro 5.	Tiempo de colonización (días) de las cepas en concentraciones de zeolita de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1%.....	33
Cuadro 6.	Tiempo de colonización (días) de las cepas en diferentes concentraciones de zeolita a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10% en EMA.....	34
Cuadro 7.	Actividad volumétrica de lacasas ($U\ mL^{-1}$) con las cepas de estudio a concentraciones de zeolita de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1% en EMA.....	35
Cuadro 8.	Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas de la estrategia propuesta.....	83
Cuadro 9.	Objetivos de la estrategia.....	85

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos que tienen células con núcleo (eucariontes) por lo que existen unicelulares como pluricelulares, son heterótrofos ya que no pueden producir su alimento, cuentan con una pared celular a base de quitina. La función de los hongos en la naturaleza es el reciclado de nutrientes en los hábitats terrestres y la degradación de material lignocelulósico. Los hongos más eficaces en la degradación de material lignocelulósico son los de pudrición blanca, café y blanda (Arora y Sharma, 2009). Los hongos utilizan enzimas para degradar la lignina y la celulosa de la madera para alimentarse. Entre las enzimas más estudiadas de los hongos de pudrición blanca, café y blanda se encuentran la manganeso peroxidasa, la lignina peroxidasa y la lacasa. La capacidad de las enzimas de estos hongos para degradar el material lignocelulósico ha despertado interés para su producción a nivel industrial, especialmente las lacasas que son capaces de oxidar compuestos fenólicos de diferente naturaleza (Manavalan, 2015).

Las aplicaciones de las lacasas en la industria incluyen la decoloración de efluentes industriales de alto contenido fenólico, pretratamiento de materiales lignolíticos, decoloración de colorantes textiles, obtención de alimento animal y tratamiento de hidrocarburos. Se han realizado investigaciones con diferentes especies de hongos que produzcan una mayor cantidad de enzimas, aunque no todos producen las mismas cantidades. Dos ejemplos de hongos de pudrición blanca capaces de producir grandes cantidades de lacasa de manera constitutiva pertenecen a las especies *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus*, las cuales han despertado su interés para la producción de estas enzimas. *G. lucidum* es de los hongos más eficientes degradadores de biopolímeros, debido a su capacidad para sintetizar importantes enzimas extracelulares hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) y oxidativas (ligninolíticas) (Castillo-Sebastian, 2016). *P. ostreatus* es capaz de biodegradar y mineralizar compuestos tales como hidrocarburos aromáticos, esto se lleva a cabo mediante un mecanismo de degradación que incluye la producción de diversas enzimas entre las que destacan las lacasas (Bolaños-García, 2015). Aunque estos hongos producen estas enzimas de manera constitutiva se han buscado estrategias para aumentar su producción mediante el uso de inductores.

La producción de enzimas se ve afectada por diversos factores como el pH del sustrato, la disponibilidad de nitrógeno, la presencia de algunos metales como el cobre y la temperatura. Estas condiciones son capaces de activar la expresión génica de lacasas, incluso es posible inducir la producción de más enzimas. Hasta la fecha se han descrito 43 secuencias de genes de lacasas lo cual demuestra el interés por la producción de estas enzimas (Ainhoa, 2003). Una buena estrategia para aumentar la productividad en el proceso de fermentación sería optimizar el sustrato y usar inductores para aumentar la actividad de dichas enzimas. Existen diferentes tipos de inductores para aumentar la expresión génica de lacasas, tal es el caso del cobre, tinturas textiles, ABTS, alcohol veratril y algunos residuos agroindustriales como las cascarras de algunas frutas. Sin embargo, estos procedimientos son costosos y el aumento en la producción de lacasas es mínimo (Osma, 2011).

Existen materiales que han tenido poco uso en la producción de hongos y han demostrado efectos positivos, tal es el caso de ácido acetilsalicílico (AAS) y la zeolita. Estos materiales son abundantes y de bajo costo han demostrado tener un efecto en otros organismos como plantas y animales, y en el caso de hongos se reporta un aumento de las propiedades funcionales y medicinales. Por lo que en el presente trabajo se propone el uso de estos como inductores en la producción de lacasas. Para esto se llevó a cabo un barrido de concentraciones donde se evaluaron diferentes dosis de zeolita y AAS a una concentración de 100 μM en diferentes cepas de hongos comestibles, esto con la finalidad de seleccionar las cepas de mayor producción enzimática y dosis óptimas. Una vez seleccionadas las cepas de estudio y dosis de los inductores se prepararon los medios de cultivo adicionados con AAS y zeolita con y sin presencia de ABTS como prueba cualitativa de la producción enzimática y parámetro para toma de muestra. Se realizó una cinética de crecimiento donde se evaluó la velocidad de crecimiento y el área de colonización del micelio, así como el halo oxidativo. Finalmente se determinó la actividad enzimática a tiempo final usando ABTS, guaiacol y siringaldazina como sustratos enzimáticos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Biotecnología y desarrollo en México

La biotecnología, en un sentido amplio se puede definir como la aplicación de organismos, componentes o sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios. La biotecnología en México en relación a la investigación, el desarrollo y la comercialización se encuentra en fase de expansión y diversificación. Actualmente, se están explorando nuevas aplicaciones en salud tanto humana como veterinaria, modernización agrícola, protección del medio ambiente, biocombustibles y otras áreas (PROMÉXICO, 2016). La industria de la biotecnología en México cuenta con un gran potencial de crecimiento debido a que el país reúne una serie de elementos que constituyen factores clave para el desarrollo de la misma, dentro de los que destacan una gran biodiversidad de ecosistemas y especies, capital humano altamente capacitado y costos de manufactura competitivos a nivel internacional.

Entre estas ventajas tenemos la biodiversidad ya que México cuenta con una gran biodiversidad de especies y ecosistemas debido a su privilegiada posición geográfica, a su variedad de climas y a su compleja topografía. Al albergar a cerca del 6.5% de la biodiversidad global de especies. El aprovechamiento del potencial de la biotecnología para el desarrollo agrícola y agroindustrial de la América Latina implica, en una primera etapa, la rápida incorporación a los procesos productivos de estos productos hacia el desarrollo de capacidades productivas locales en biotecnología, requisito indispensable para convertirla en una herramienta para la construcción de nuevos modelos de producción agrícola competitivos y ecológicamente sustentables. La necesidad de adaptación de los productos de la biotecnología a la especificidad geográfica de las situaciones productivas para capturar localmente el máximo del valor agregado es determinante (Jaffé, 1993).

2.2 Importancia de los hongos comestibles, funcionales y medicinales en México

México se considera un país megadiverso en cuanto a grupos de organismos. Su situación geográfica con variedad de altitudes y climas han contribuido a formar una gran variedad de condiciones ambientales y microambientales que promueven una gran variedad de hábitats y formas de vida, lo que le confiere a México una elevada diversidad biológica (Conabio, 1998). Se estima que se conocen 4 500 especies de macrohongos y 2 000 de microhongos. Se calcula que en México habría más de 200 000 especies de hongos, por lo que sólo se conoce el 3.2% de los que crecen en el país (Guzmán, 1998). Para la cultura mexicana los hongos no solo fueron considerados como alimento ya los antiguos pobladores incluían estos organismos en rituales sagrados (Mata *et al.*, 2007). El cultivo de hongos comestibles es considerado un sistema de producción-consumo. En los últimos años ha adquirido relevancia social, económica y ecológica a nivel mundial. Puesto que de estas actividades de producción se logran obtener diversos subproductos.

2.3 Producción rural de hongos comestibles, funcionales y medicinales

La producción de hongos comestibles inició como una auténtica biotecnología tradicional, basada en técnicas sencillas de propagación, hace aproximadamente 1000-1400 años en China, con el cultivo empírico de las “orejas de ratón” (*Auricularia* spp.) y del “shiitake” (*Lentinula edodes*). De la misma forma, aunque como proceso independiente, también comenzó en Francia hace más o menos 350 años con el cultivo del champiñón (*Agaricus* spp.). A través del tiempo, ha sido posible la incorporación y desarrollo de tecnologías que han mejorado substancialmente la producción comercial a gran escala no tan sólo de los hongos comestibles mencionados, sino también de otras especies potencialmente cultivables (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). La producción de hongos comestibles constituye una alternativa en la producción de alimentos en el medio rural porque no afecta los valores, ni las actividades centrales de la vida campesina y tampoco daña su entorno ecológico. Los hongos producidos mediante técnicas sencillas y de fácil establecimiento permiten la integración de la producción con el consumo,

evitando así la excesiva especulación o intermediación que tanto afecta a los productos básicos, además permite que la mujer participe activamente en el proceso productivo. Esta tecnología aprovecha el conocimiento tradicional que tienen los campesinos sobre los hongos y al mismo tiempo, lo fomenta al aumentar la disponibilidad de hongos comestibles todo el año. De igual manera, favorece el aprovechamiento óptimo de los recursos regionales mediante el uso de los subproductos agrícolas como el substrato para el cultivo y posteriormente como abono orgánico. El cultivo de hongos en México es parte del sector primario donde se agrupan actividades económicas agrícolas, pecuarias, pesqueras y silvícolas (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

2.4 Importancia de algunos hongos comestibles

2.4.1 *Ganoderma lucidum*

Las especies de *Ganoderma* pertenecen al reino Hongos, división Basidiomycota, clase Homobasidiomycetes, orden Aphylloporales, familia Ganodermataceae y género *Ganoderma* (Chang, 1995; Wasser y Weis, 1999). Crecen sobre madera en descomposición absorbiendo los nutrientes a través de sus hifas y desarrollan el cuerpo fructífero sobre troncos. Las especies de *Ganoderma* están entre los hongos que pueden crecer bajo condiciones elevadas de calor y humedad y, son usualmente encontrados en regiones tropicales y subtropicales (Moncalvo y Ryvarden, 1997). El género *Ganoderma* se conoce desde hace poco más de 100 años; fue descrito por el micólogo finlandés Peter Adolf Karsten (1881). Con el desarrollo de métodos para la clasificación natural y nuevos datos moleculares, se han evidenciado las relaciones filogenéticas de algunas especies de *Ganoderma* de diversas regiones geográficas. El número de especies conocidas de *Ganoderma* se puede estimar en alrededor de 60-80 especies lacadas y 10-30 especies no lacadas, es probable que los nuevos taxones están aún por descubrirse en las regiones tropicales no muy estudiadas (Moncalvo y Ryvarden, 2001).

2.4.2 *Grifola frondosa*

Grifola frondosa (Dicks.) Gray es un basidiomiceto perteneciente a la familia Meripilaceae del orden Polyporales. Macroscópicamente presenta basidiocarpos anuales, de grandes dimensiones (de 40-50 cm de ancho, incluso hasta 1 m de diámetro) que pueden alcanzar varios kilos de peso (hasta 18-20 kg) y que se desarrollan en la base y tocones de los árboles. Los basidiocarpos están ramificados y formados por un gran número de pequeños sombreros de unos 8 cm de diámetro, en forma de abanico, que se encuentran imbricados. Los pequeños sombreros son de color gris a pardo por la parte superior y en la inferior tienen pequeños poros de un color blanquecino (Berniccia, 2005). Es originario de Japón, Norte América y Europa, se le atribuyen una gran cantidad de propiedades medicinales entre las más destacadas se encuentra su capacidad antitumoral y anticancerígeno, sin embargo, algunas guías de setas no lo consideran un hongo comestible de calidad (Illana-Esteban, 2008), este hongo tiene potencial para ser incluido en la dieta de la población mexicana y es poco conocido en México.

2.4.3 *Lentinula edodes*

El shiitake (*Lentinula edodes*), conocido por sus atributos sensoriales, nutricionales y funcionales, es el segundo hongo comestible más cultivado del planeta, antecedido por el champiñón blanco (*Agaricus bisporus*). El píleo (sombrero) del hongo es muy apetecido mientras que su estípite (tallo) generalmente es separado y no es comercializado debido a que dentro de sus componentes hay alto contenido de fibra. Es un hongo degradador, que crece en sustratos muertos, o en desechos forestales. Su cultivo se puede realizar en bloques naturales (troncos de maderas duras) o sintéticos (preparación de combinación de sustratos) (Rivera *et al.*, 2017). El shiitake es usado en la cocina oriental, destacándose en la comida japonesa, china, coreana y taiwanesa desde hace cientos de años, esto debido a sus agradables características sensoriales, su alto valor nutricional y sus propiedades medicinales como anticancerígeno, antidiabético, controla la alta presión sanguínea, antiinflamatorio, hipocolesterolemico, inmunomodulador (Carbonero *et al.*, 2008; Wasser, 2005).

2.4.4 *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es un hongo que pertenece a la clase Basidiomiceto, orden Agaricales y familia Pleurotaceae. Su nombre deriva de su forma “de ostra”, llamado también vulgarmente “Pleuroto en forma de concha”, “seta de chopo”, “seta de ostra”, “orellana” o “pleuroto ostreado” (Zanón *et al.*, 2005). Es un hongo saprófito y algunas veces parásito que crece principalmente sobre sustratos lignocelulósicos vivos o muertos, pobres en nutrientes y con bajos niveles de minerales y vitaminas. Se distribuye principalmente en zonas templadas y se le encuentra creciendo sobre árboles de los géneros *Aesculus*, *Betula*, *Fagus*, *Juglans*, *Populus*, *Salix*, etc. Este hongo fructifica durante el otoño e invierno a temperaturas de 15°C, aunque existen cepas comerciales que son menos afectadas por las temperaturas bajas y altas (Cisterna, 2003). Presenta las siguientes partes cuando fructifica. El sombrero es carnoso, grande 8-15 cm, convexo al principio. normalmente de color gris azulado a pizarra, virando a pardusco al marchitarse, láminas decurrentes blancas o marfil, pie normalmente lateral, corto o ausente, aterciopelado y de color blanco con esporas cilíndricas (Milla, 2007).

2.4.5 *Sparassis crispa*

El género *Sparassis* conocido comúnmente como “seta coliflor” o “barba de cabra” es un hongo perteneciente a la familia de Sparassidaceae, tiene forma de coliflor con un diámetro de hasta 30 cm. Las múltiples ramificaciones se inician en un tronco central, común, blanco y terminan en expansiones laminosas onduladas de color crema pálido, con un pie corto rudimentario de hasta 6 cm de longitud. Carne blanca con tonos amarillentos, de olor afrutado y sabor a nuez. Aparece en otoño desarrollándose en suelos de pinares junto a los troncos de pino (Calonge, 2009).

Tiene un costo aproximado de \$120.00 por kilogramo en México, sin embargo, no es comercializada en los tianguis del centro del país; es muy apreciada por la población de Amanalco, a pesar de que es vendido esporádicamente en el tianguis sus recolectoras mencionan que su disponibilidad es escasa en el bosque (Burrola-Aguilar *et. al*, 2012).

2.5 Los hongos como fuente de lacasas

La función de las lacasas en la naturaleza es la degradación del material lignocelulósico que permite su reciclado en los ecosistemas (Blanchette, 1995). Varios microorganismos, incluyendo bacterias y hongos, han evolucionado para degradar biomasa lignocelulósica mediante la producción de enzimas ligninolíticas sinérgicas, entre las que se encuentran las lacasas. Sin embargo, sólo pocos grupos de hongos, tales como los hongos de pudrición blanca, café y blanda, pueden degradar la biomasa lignocelulósica con eficacia (Arora y Sharma, 2009; Manavalan *et al.*, 2015). Hay dos grupos principales de hongos xilófagos los cuales son conocidos como basidiomicetos y ascomicetos. Los basidiomicetos son de manera abrumadora la causa más común de la pudrición de la madera en los bosques. No todos los hongos degradan la madera de la misma forma. Existen tres formas en las que el hongo realiza la pudrición estas son conocidas como pudrición blanca, café y pudrición blanda. Estos tipos de pudrición realmente constituyen formas de ataque enzimático en la madera (Luley, 2006).

Los hongos de pudrición blanca se consideran el grupo más prometedor de los microorganismos que degradan la lignina ya que éstos producen polifenol oxidasas extracelulares, particularmente peroxidasas de lignina, manganeso peroxidasa y lacasas que son muy eficaces en la degradación de la lignina. Recientemente, los hongos de pudrición blanca están ganando mucha importancia a causa de su capacidad de degradar un amplio espectro de productos químicos orgánicos debido a la baja especificidad y fuertes capacidades oxidativas de su sistema de degradación de la lignina por hongos (Revankar y Lele, 2006).

2.6 Importancia de las lacasas en la industria

Las lacasas son enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción de la cual surgen todas sus aplicaciones (Mayer y Staples, 2002). Son catalogadas como enzimas de alto interés en la biotecnología industrial y ambiental dada su especificidad sobre diversos sustratos (Osma *et al.*, 2011). En la industria textil se utiliza ampliamente para la remoción de colorantes; debido a que algunos de ellos

son compuestos polifenólicos (Reyes *et al.*, 1999). Algunas aplicaciones de la lacasa en la industria alimentaria son las siguientes. En la industria vinícola, la función principal de la lacasa, es la oxidación de los polifenoles (Conrad *et al.*, 2000). También, la lacasa actúa en el mejoramiento de los parámetros sensoriales para el control de olores, el mejoramiento del sabor y la reducción de compuestos indeseables como compuestos fenólicos o ácidos grasos oxidados. Las lacasas están involucradas en la biodegradación verde debido a sus propiedades catalíticas. El compuesto xenobiótico es una fuente importante de contaminación en el suelo y la lacasa lo degrada. Además, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que surgen de los depósitos de petróleo natural y la utilización de combustibles fósiles, también se degradan por las lacasas. Las peroxidasas de lignina (LiP) presentan un mecanismo de biocatalizador no específico. MnP mostró que puede realizar la mineralización de muchos contaminantes ambientales, por lo que estas enzimas son muy utilizadas para el proceso de biorremediación (Maciel *et al.*, 2010).

2.6.1 Inductores de lacasas

Existen varios inductores capaces de estimular la expresión de genes. La mayoría de hongos de pudrición blanca, blanda y café producen enzimas lacasas de manera constitutiva. El aumento o la disminución de esta depende de las condiciones del cultivo o de la adición de inductores como la 2,5 xilidina, el ácido ferúlico o el alcohol veratrílico. Se han reportado investigaciones de inductores como el cobre, tinturas textiles, residuos ligninocelulósicos, como el aserrín, salvado de trigo y metales pesados que presentan un efecto inductor sobre la producción de enzimas lacasas (Baldrian, 2003; Lorenzo *et al.*, 2006). Asimismo, se ha estudiado el efecto de estos inductores en la activación de genes para así aumentar la producción de lacasas al agregar estos inductores y cambiar las condiciones del medio es posible inducir la producción de otras 6 enzimas con características diferentes en el caso de algunos hongos como *Pleurotus ostreatus* (Tinoco *et al.*, 2001).

2.7 Biotecnología para incrementar la expresión de enzimas

Diferentes estudios han demostrado que la actividad y número de isoenzimas de las diferentes fenoloxidasas en hongos, dependen de diferentes factores ambientales entre ellos la temperatura, pH, inductores, condiciones de cultivo y la composición del medio (Durán, 2002; Téllez, 2008; Pezzella, 2012), asimismo se sabe que estas enzimas pueden ser producidas de forma constitutiva o ser inducidas (Téllez, 2005). La regulación de la expresión de genes de la lacasa difiere de un organismo a otro, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de estas enzimas en los hongos. La expresión de genes de lacasa en algunos hongos puede ser estimulada por inductores, mientras que, en otros, la expresión es sensible a las condiciones del medio de cultivo y es afectada por las concentraciones de nitrógeno, fuentes de carbono o presencia de oligoelementos (Wolfaardt *et al.*, 2004; Baldrian, 2005). Gracias a los avances en biotecnología aplicada se ha podido secuenciar los genes responsables de la expresión génica de lacasas: aunque estos organismos sean difíciles de manejar desde el punto de vista de la ingeniería genética ya se han realizado investigaciones para aumentar la expresión génica.

2.8 Ácido acetilsalicílico

El ácido salicílico (AS) es muy conocido gracias al extenso uso clínico de la aspirina o ácido acetil salicílico (Raskin, 1992). El AAS es un metabolito secundario de síntesis orgánica, derivado del grupo de los fenilpropanoides o también llamados compuestos fenólicos, descendientes del fenol, dichos compuestos están ligados a las actividades de defensa de las plantas, así como al endurecimiento de la pared celular (ligninas), actividad antimicrobiana (furanocumarinas, isoflavonoides y estirpenos), repelentes (taninos) y en procesos de señalización. Actualmente, se ha considerado al AAS como un biorregulador del crecimiento de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Se ha propuesto un modo de acción para el AAS basándose en el hallazgo de que se une e inhibe a la enzima catalasa. La inhibición de la catalasa podría conducir a un incremento en la concentración del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) o de otras especies reactivas de esta molécula. El H_2O_2 podría tener una

actividad antibiótica en contra de patógenos. Otro mecanismo de acción del ácido acetilsalicílico podría estar en la capacidad que posee para formar por sí mismo radicales libres de AAS por medio de la inhibición de enzimas que contienen grupos hemo, como la peroxidasa y catalasa. Tales radicales fenólicos libres podrían activar reacciones de defensa (Rangel, 2010).

2.9 Zeolita

Las zeolitas pertenecen a la familia de los tectosilicatos y son aluminosilicatos cristalinos, con elementos de los grupos I y II como cationes. Consisten en un armazón de tetraedros de $[\text{SiO}_4]^{4-}$ y $[\text{AlO}_4]^{5-}$ conectados el uno al otro en las esquinas por medio de átomos de oxígeno (Rodríguez-Fuentes, 1987). Las zeolitas por definición, son aluminosilicatos de cationes alcalinos y alcalinos térreos. Las zeolitas naturales tienen un tamaño de porosidad y todas son hidrofílicas (Ostroumov *et al.*, 2003). El armazón contiene canales interconectados donde se encuentran los cationes de sodio, calcio, potasio, magnesio, etc., los cuales neutralizan las cargas negativas y moléculas de agua. Estos cationes son móviles y pueden intercambiarse en diferentes grados por otros cationes.

El intercambio iónico es una de las propiedades más importantes de las zeolitas, se pueden llevar a cabo modificaciones de las zeolitas, para cambiar sus propiedades superficiales (afinidad por compuestos orgánicos) y por otro lado, esta propiedad de intercambio iónico es útil en más de un proceso industrial (García-Medineta *et al.*, 2009; Olguin, 2006), como en la agricultura, en la acuicultura y en usos ambientales debido a que pueden retener nutrientes (N, P, K), compuestos orgánicos de interés (micotoxinas) así como en el tratamiento de aguas gracias a la retención de metales pesados (Giannetto *et al.*, 1990; Meshko *et al.*, 2001). Como ejemplo de una estructura zeolítica se encuentra la clinoptilolita que es un aluminosilicato de sodio, potasio y calcio hidratado que tiene la fórmula molecular $(\text{Na}, \text{K}, \text{Ca}_{0.5}, \text{Sr}_{0.5}, \text{Ba}_{0.5}, \text{Mg}_{0.5})_6[\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Cultivo de hongos comestibles

En la actualidad el cultivo de hongos se ha convertido en una verdadera alternativa para la obtención de alimentos para el consumo humano, por la posibilidad de obtener grandes cantidades en pequeñas áreas mediante técnicas sencillas, a bajo costo, en cortos periodos de tiempo y empleando residuos agroindustriales como sustrato para su cultivo, la producción de hongos comestibles, es un claro ejemplo de cómo la biotecnología es una alternativa real para la obtención de alimentos. En nuestro país el cultivo de hongos comestibles se encuentra muy poco desarrollado a pesar de la potencialidad que existe para cultivar hongos que se desarrollan en forma silvestre y de la tradición por su consumo. La producción de hongo seta comprende 2 etapas: La producción de semillas y la producción de hongo. El cultivo de hongos comestibles constituye un verdadero sistema de producción-consumo, el cual ha adquirido gran relevancia social, económica y ecológica a nivel mundial. Se trata de procesos biotecnológicos aplicados que pueden desarrollarse a pequeña y gran escala para producir: 1) Alimento humano de buena calidad nutricional y con propiedades medicinales (anticancerígenas, antibióticas, que reducen el nivel de colesterol y la hipertensión, antitrombóticas, antidiabéticas); 2) Suplementos alimenticios; y 3) Enzimas y productos metabólicos con amplio potencial de utilización en la industria (Mora y Martínez-Carrera, 2007).

3.2 Producción de hongos comestibles en México

3.2.1 *Ganoderma lucidum*

En la naturaleza las especies de *Ganoderma* producen pocas cantidades de lacasas por lo que se han realizado diferentes estudios para la producción de enzimas en el hongo medicinal *G. lucidum*. Se han utilizado diferentes inductores que incrementan la actividad enzimática, como el glicerol, sulfato de cobre, ácido ferúlico, etanol, ácido gálico, alcohol veratril, xilidina y residuos de la agroindustria como lo son cascaras de mandarina y tamarindo (Manalavan *et al.*, 2013; Songulashvili *et al.*,

2006). La producción de enzimas ligninolíticas por *G. lucidum* ha sido estudiada en las últimas décadas, con especial énfasis en la actividad de las lacasas, debido a su eficacia como degradador de lignina y su baja producción de Mn peroxidasa y lignina peroxidasa (Kuhar y Papinutti, 2014). Extensos estudios realizados sobre las lacasas fúngicas han demostrado su potencialidad para el blanqueo de pasta de papel, decoloración de tintes sintéticos, biorremediación, biosensores e inmunoensayos, deslignificación de compuestos lignocelulósicos, biopulping o bioblanqueo, transformación de colorantes en la industria textil, el tratamiento de aguas residuales y la degradación de explosivos y pesticidas (Manavalan *et al.*, 2013).

3.2.2 *Grifola frondosa*

En cultivos comerciales del hongo *G. frondosa* se requiere controlar diferentes parámetros ambientales como: Temperatura, humedad de sustrato, humedad relativa y oxígeno, entre otros. Se han desarrollado métodos de cultivo sobre sustratos artificiales a base de aserrín de madera o viruta de madera de residuos de aserríos (preferiblemente de maderas duras no aromáticas), suplementados con cascarillas, salvados o cereales, entre los que se destacan el maíz, trigo y arroz. El hongo *G. frondosa* podría ser utilizado en la degradación de residuos sólidos orgánicos ricos en materiales lignocelulósicos, debido a que posee un sistema enzimático capaz de degradar en tiempos cortos cantidades importantes de polímeros naturales de difícil degradación. Se han realizado pocos estudios de la actividad enzimática de *G. frondosa*. Donde se determinaron las actividades enzimáticas de las enzimas celulolíticas: endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa; ligninolíticas: lacasa, lignina peroxidasa (LiP) y manganeso-peroxidasa (MnP) y xilanolíticas: endoxilanasas del hongo en dos formulaciones diferentes basadas en aserrín de roble y borra de café (Montoya *et al.*, 2011).

3.2.3 *Lentinula edodes*

El hongo comestible *Lentinula edodes*, es el segundo hongo comestible con mayor producción a nivel mundial. Se han estudiado las propiedades funcionales y

medicinales de este hongo, así como la producción de enzimas. Entre los hongos de pudrición blanca esta especie se encuentra como una de los más potentes agentes productores de enzimas lignocelulolíticas, en la actualidad es reconocida por su gran capacidad de degradación de celulosa y lignina. Asimismo, este hongo ha sido utilizado en diferentes procesos con fines de biodegradación de diferentes polímeros: carbohidratos, aromáticos, hidrocarburos, colorantes sintéticos, etc. Se han reportado hasta 9,489 UE $\mu\text{mol/g s.s min}$ en fermentación sólida (Montoya *et al.*, 2014). Diversos inductores se usan tales como manganeso y nitrógeno para aumentar la producción de lacasas y manganeso peroxidasas (Buswell *et al.*, 1995)

3.2.4 *Pleurotus ostreatus*

El género *Pleurotus* spp. presenta un complejo multienzimático ligninolítico, dentro del cual se encuentran las lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxígeno:óxido-reductasa). Estas forman parte del grupo enzimático llamadas oxidasas azules, que, a diferencia de la mayoría, reducen el oxígeno y producen agua en lugar de peróxido (García-Oduardo *et al.*, 2016). Se han utilizado diferentes inductores para el aumento de la actividad enzimática de este hongo. Sin embargo, con ayuda de las recientes herramientas moleculares se conocen varios genes responsables de la síntesis de lacasa en algunos hongos, como es el caso de *Pleurotus ostreatus*. Su gen *pox1* que consiste de 2592 pb, interrumpido por 19 intrones, codifica una proteína de 529 aa con cinco posibles sitios de glicosilación. Otro gen productor de lacasa en *P. ostreatus* es *poxa1b* el cual consiste de 1599 pb, es interrumpido por 15 intrones y codifica una isoforma de 62 kDa con cinco sitios de glicosilación. En una cepa nativa se ha reportado el gen *lccK* que consiste de 2929 pb, con 19 intrones y marco de lectura de 1599 pb que codifican una proteína de 533 aa (Gutiérrez-Soto, 2009).

3.2.5 *Sparassis crispa*

El hongo *Sparassis* no ha sido utilizado en investigaciones para la producción de lacasas. En México este hongo solo ha sido recolectado y comercializado en comunidades por lo que este hongo aún no ha sido cultivado a gran escala. Una de

las limitantes por las cuales este hongo no ha sido profundamente estudiado y producido es por el tiempo que le toma colonizar. Farooq y colaboradores (2014), evaluaron las diferentes condiciones en medio de cultivo a un pH de 5 -7 con una temperatura de 25°C y diversas fuentes de carbono, glucosa y fructosa, colonizando el medio en 28 días. Otra estrategia de producción ha sido usar semilla líquida obtenida en fermentación líquida para reducir los tiempos de colonización (Ma, *et al.*, 2016). Sin embargo, la producción en fermentación sólida puede tomar más tiempo para colonizar. En el periodo de incubación de algunas especies pueden tardar de 61 a 94 días y el periodo de cosecha de 21 a 63 días (Sung-Ryul *et al.*, 2009).

3.3 Inductores en la producción de hongos comestibles

Se han realizado investigaciones para aislar cepas capaces de producir grandes cantidades de lacasas y que además sean de crecimiento rápido. Siendo México un país mega diverso cuenta con un gran número de recursos genéticos de hongos comestibles con potencial para la producción de lacasas a nivel industrial. Sin embargo, se desconoce el potencial de muchas de estas especies de hongos, además de que no se producen las mismas cantidades de enzimas. Una propuesta ha sido el uso de inductores que sean capaces de estimular la actividad enzimática y aumentar la producción, sin embargo, los costos resultan muy elevados y en algunos casos el incremento no es muy significativo (Osma, 2011). Para la producción de hongos comestibles en sustrato sólido se han estudiado diversos aditivos que puedan aumentar la eficiencia biológica, reducir el tiempo de colonización, entre los más importantes se tienen, CuSO₄, tinturas textiles, fermentaciones en sustratos obtenidos de los residuos de la agroindustria. Kuhar y Pappinuti (2014), evaluaron la capacidad enzimática de dos cepas de *G. lucidum* usando como inductores diferentes compuestos fenólicos e iones metálicos, siendo estos el ácido ferúlico y el cobre siendo estos inductores (fenólicos y metálicos) quienes producen distintos patrones electroforéticos de actividad lacasa. También comprobaron que a pH más alto la enzima es más termoestable.

3.4 Mecanismos de inducción

Los mecanismos enzimáticos utilizados para la degradación de la lignina son oxidativos y producen radicales libres, los cuales, al ser muy reactivos, reaccionan entre sí volviéndose a polimerizar, iniciándose reacciones que pueden seguir cualquier camino sin control, a lo cual se le denomina “combustión enzimática” (Kirk y Farrell, 1987). Dentro de las enzimas de los hongos ligninolíticos se encuentran las peroxidasas, que contienen un grupo hemo lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), estas enzimas reducen al oxígeno para la producción de peróxido de hidrógeno. Otra enzima que forma parte del mecanismo de degradación es la lacasa, la cual reduce el oxígeno disuelto en agua y oxida sustratos fenólicos formando radicales catiónicos, quinonas o radicales fenóxilo (Archibald *et al.*, 1997; Osma *et al.*, 2010).

3.5 El ácido acetilsalicílico

Se han realizado pocas investigaciones donde se ha utilizado el ácido acetilsalicílico en la producción de hongos comestibles en estas se ha reportado un cambio considerable en las propiedades funcionales de hongos. You *et al.*, (2013), utilizaron el ácido acetilsalicílico a una concentración de 0.5-8 mM en medio de cultivo líquido papa y dextrosa durante 4 días para inducir la apoptosis de *G. lucidum* y obtener ácidos ganodéricos. Se han realizado estudios en sustrato sólido con hongos comestibles como *Fistulina guzmanii*, *Volvariella bombycina* y *Hericium erinaceus* donde se observó un cambio en las propiedades funcionales y medicinales como el contenido de proteínas y antioxidantes usando AAS 100 μ M (Rendón-Hernández, 2015). También se ha evaluado el efecto de las propiedades funcionales de los extractos hidroalcohólicos obtenidos de *G. lucidum* cultivado en sustratos adicionados con ácido acetilsalicílico en una concentración de 10 mM, Meneses *et al.*, (2016). Ellos encontraron que las propiedades hipocolesterolemiantes (reducción de nivel de colesterol en suero) y efectos prebióticos de extractos estandarizados en modelo animal (ratones, cepa C57BL/6) después de 43 días de dieta experimental. También se ha evaluado el efecto del AAS como inductor de la actividad enzimática. Martínez-Carrera *et al.*, (2016), emplearon AAS 100 μ M en el

cultivo de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en condiciones de laboratorio *in vitro* reportando la inducción de la expresión de enzimas lacasas a 40 días de cultivo. Castillo-Sebastian (2016) evaluó el efecto del AAS como inductor de lacasas en medio de cultivo semisólido (PDA) y medio de cultivo líquido de papa y dextrosa donde reporta un incremento de la cantidad de lacasas en tres diferentes cepas de *G. lucidum*.

3.6 La zeolita

La zeolita ha sido aplicada principalmente en plantas para aumentar rendimiento y aprovechar los nutrientes de importancia agronómica. También tiene aplicaciones en hidroponía, ganadería, en el tratamiento de aguas y suelos contaminados (Latifah *et al.*, 2017; Chica-Toro *et al.*, 2006; Soca *et al.*, 2016; Urbina-Sánchez *et al.*, 2011). Debido a sus propiedades de intercambio iónico ha sido utilizada principalmente en la industria agronómica, sin embargo, pocos son los estudios relacionados a la aplicación de este material en la producción de hongos comestibles. Klaus reportó en 2005 el potencial de una zeolita modificada como acelerador de crecimiento en micelio de los hongos comestibles *Agaricus blazei*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*, donde reportó que el uso de este mineral logró estimular el crecimiento de las cepas en medio de cultivo PDA. El uso de este mineral también ha sido reportado en sustrato sólido utilizando el hongo medicinal *Grifola frondosa* donde el uso de la Kaolinita y una zeolita modificada lograron aumentar la eficiencia biológica, la actividad antioxidante, así como el contenido de beta glucanos, también menciona que se redujo el tiempo de colonización debido a que la zeolita estimula la actividad enzimática (Vunduk *et al.*, 2016). También se realizó un estudio del efecto de la zeolita clinoptilolita en el cultivo de *Pleurotus sajor-caju* donde lograron aumentar la eficiencia biológica al adicionar 30g de zeolita (Shinde *et al.*, 2010). López y colaboradores en 2010 evaluó los cambios en la estructura de la zeolita al mezclarla con fertilizantes en el cultivo de *P. ostreatus* donde demostró que el hongo no puede alterar la estructura de la zeolita y se lleva a cabo el intercambio iónico con el hongo.

IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Las lacasas (p-difenol: oxígeno óxido reductasas E.C. 1.10.3.2) son cuproproteínas capaces de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos mediante la reducción de oxígeno a agua, generando compuestos insolubles de fácil recuperación. La función de las lacasas en la naturaleza es la degradación del material lignocelulósico que permite su reciclado en los ecosistemas (Blanchette, 1995). Varios microorganismos, incluyendo bacterias y hongos, han evolucionado para degradar biomasa lignocelulósica mediante la producción de enzimas ligninolíticas sinérgicas, entre las que se encuentran las lacasas. Sin embargo, sólo pocos grupos de hongos, tales como los hongos de pudrición blanca, café, y blanda, pueden degradar la biomasa lignocelulósica con eficacia (Manavalan *et al.*, 2015). En las últimas décadas se han buscado estrategias para la producción de estas enzimas que forman parte de diversos procesos biotecnológicos (Maciel *et al.*, 2010).

Sin embargo, la aplicación de lacasas a nivel comercial ha sido limitada debido a que estas enzimas son constitutivas y se produce en pequeñas cantidades (decenas de unidades por mililitro), lo que da como resultado un alto costo en el mercado. La regulación de la expresión de genes de las lacasas difiere de un organismo a otro, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de estas enzimas en los hongos. La expresión de genes en algunos hongos puede ser estimulada por inductores, mientras que, en otros, la expresión es sensible a las condiciones del medio de cultivo y es afectada por las concentraciones de nitrógeno, fuentes de carbono o presencia de oligoelementos (Wolfaardt *et al.*, 2004; Baldrian., 2005). México al ser un país mega diverso, sobre todo en hongos comestibles, cuenta con suficientes recursos genéticos con potencial para ser utilizados en la producción de lacasas, por lo que se plantea utilizar cepas nativas que puedan producir altas cantidades de enzimas usando dos inductores innovadores. El inductor ácido acetilsalicílico (AAS) ha sido utilizado en diferentes hongos comestibles donde se han aumentado las propiedades funcionales y medicinales (Meneses *et al.*, 2016; Martínez-Carrera, 2016). Mientras que la zeolita, que es un mineral aluminosilicato con propiedades de intercambio iónico (Soca y Daza-Torres, 2016), se ha usado en

la producción de hongos comestibles y ha demostrado un aumento en la eficiencia biológica sin alterar su estructura (Shinde *et al.*, 2010, López *et al.*; 2010; Vunduk *et al.*, 2016).

Las diversas aplicaciones de estas enzimas despiertan el interés por su producción, siendo los hongos de pudrición blanca los más utilizados. Sin embargo, a pesar de contar con una gran diversidad de recursos genéticos de hongos comestibles cultivados en la región central de México, aún se desconoce la capacidad de producción de enzimas lacasas de estas especies. Por lo que es necesario caracterizar cepas de hongos de pudrición blanca capaces de producir una mayor cantidad de enzimas lacasas. Asimismo, evaluar a nivel laboratorio las concentraciones de inductores de fácil acceso que estimulen la producción de lacasas. Además, establecer una estrategia para aplicar cepas de hongos comestibles e inductores en fermentación sólida con aplicaciones en la producción de hongos comestibles o en la biorremediación de suelos contaminados por la industria textil en la región central de México.

V. HIPÓTESIS

La adición de ácido acetilsalicílico y zeolita en medio de cultivo semisólido durante el cultivo de especies de hongos comestibles inducirán la producción de enzimas lacasas.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar a nivel laboratorio el efecto del ácido acetilsalicílico y zeolita como inductores en la producción de lacasas y proteínas de diferentes cepas de hongos comestibles cultivados en México.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Evaluar diferentes cepas de hongos comestibles con potencial para producción de lacasas en medios semisólidos adicionados con AAS, zeolita, y ABTS como prueba cualitativa confirmativa.

6.2.2 Cuantificar la actividad volumétrica de lacasas en medio de cultivo de las cepas de hongos comestibles seleccionadas.

6.2.3 Proponer una estrategia para la producción de lacasas de hongos comestibles usando estos inductores de fácil adquisición, para incrementar las aplicaciones biotecnológicas de las enzimas lacasas en la zona centro de México.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diagrama general de proceso

En la Figura 1 se muestra el diagrama general de la metodología empleada para determinar el efecto del ácido acetilsalicílico y la zeolita en el cultivo de hongos comestibles.

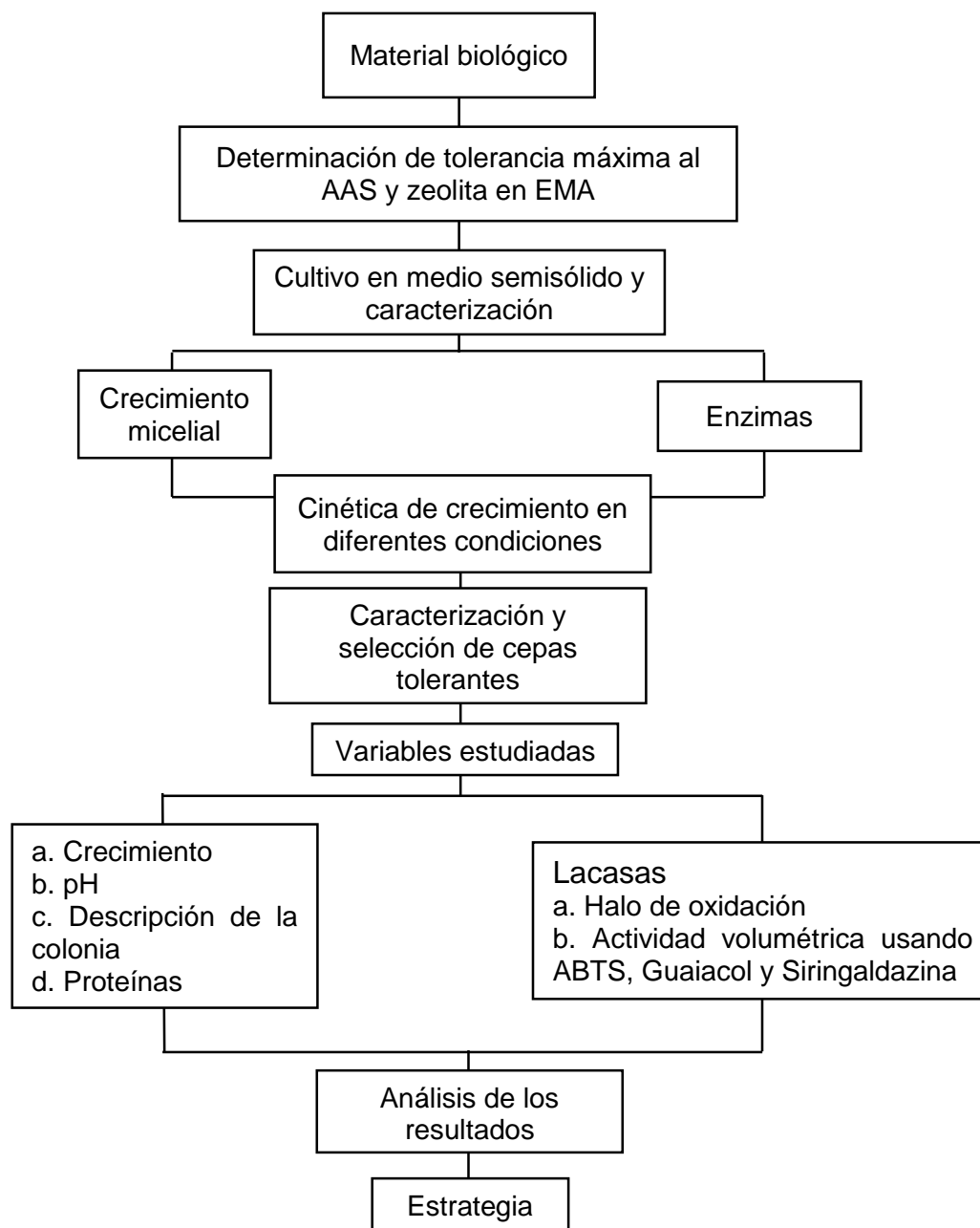


Figura 1. Metodología empleada en la investigación. EMA= Agar Extracto de Malta. AAS= Ácido acetilsalicílico. ABTS= 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Fuente: Elaboración propia

7.2 Material biológico

El material biológico utilizado durante la investigación se encuentra depositado en la Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. En el cuadro 1 se observan las cepas de estudio seleccionadas para este estudio.

Cuadro 1. Material biológico de los recursos fúngicos depositados en el CREGENHC y empleados en esta investigación.

Registro	Especie	Procedencia
CP-145	<i>Ganoderma lucidum</i>	Cuernavaca, Morelos
CP-459	<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray	Comercial
CP-825	<i>Grifola frondosa</i>	San Pedro Ixtlahuaca, Estado de México
CP-850	<i>Grifola frondosa</i>	Comercial
CP-580	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	Senguio, Michoacán
CP-50	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm	Alemania
CP-753	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ixtlahuaca, Estado de México
CP-845	<i>Sparassis</i> sp.	Senguío, Michoacán
CP-873	<i>Sparassis</i> sp.	Senguío, Michoacán

Fuente: Elaboración propia

Las cepas *G. lucidum*, *G. frondosa*, *L. edodes*, *P. ostreatus* y *Sparassis* sp. fueron reactivadas en medio de cultivo semisólido EMA el cual se preparó según las instrucciones del fabricante (Dibico) 33.6 g en 1000 mL de agua destilada se disolvieron a 100 °C y se esterilizo a 121 °C durante 25 minutos. Posteriormente, el medio fue vertido en cajas Petri 60 x 15 mm (SYM Laboratorios, México) colocando 15 mL de medio de cultivo en cada una de las cajas, esta etapa se realizó dentro de una campana de flujo laminar para evitar la contaminación del medio. Finalmente, se tomaron fragmentos de micelio de 0.5 cm de diámetro previamente colonizado y se inocularon en medio de cultivo semisólido EMA sellando las cajas con parafilm e incubándolas a temperatura ambiente.

7.3 Tolerancia máxima a la zeolita

Las cepas seleccionadas para la investigación fueron inoculadas en medios de cultivo extracto de malta agar (EMA) adicionado con zeolita en diferentes concentraciones para determinar el porcentaje máximo que toleran las cepas para seleccionar aquellas donde se observó crecimiento de micelio y un aumento en la actividad volumétrica de lacasas (U mL^{-1}). La zeolita utilizada en este trabajo fue obtenida de un yacimiento natural ubicado en Tehuacán, Puebla. Para que los poros de la zeolita estuvieran disponibles, se retiró la humedad de estos colocando la zeolita dentro de un horno de secado a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, posteriormente se almaceno en un recipiente libre de humedad hasta su uso. Para el mantenimiento del material biológico, la obtención del inóculo y la actividad enzimática en el medio de cultivo semisólido, se empleó el medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA, DIBICO), el cual se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante disolviendo 33.6 g/L . Las dosis utilizadas para la determinación de tolerancia fueron 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% y 10% de zeolita. Para mantener las mismas condiciones en todo el experimento el porcentaje de zeolita se pesó en tubos de ensaye donde, con ayuda de una probeta se colocaron 30 mL de medio de cultivo, una vez obtenidos los medios se esterilizaron en olla de presión a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 25 min, posteriormente se vaciaron en cajas de Petri desechables de 60 x 15 mm (SYM Laboratorios, México) usando un Vortex para homogenizar la zeolita en el medio y una vez gelificado el medio se almacenó hasta su uso.

7.3.1 Actividad volumétrica de lacasas (U mL^{-1})

Para la determinación de actividad volumétrica de lacasas se utilizó el método de Bournonnais y Paice (1990), donde se utiliza como substrato enzimático e indicador el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), a una absorbancia de luz de 420 nm. Se preparó una solución buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 5 y ABTS 1 mM. En la microplaca y con la ayuda de una pipeta automática multicanal (Gilson) se colocaron $160\text{ }\mu\text{L}$ del buffer de acetato de sodio pH 5 en cada pozo de la columna y posteriormente se agregaron $20\text{ }\mu\text{L}$ de muestra o de agua (blanco) y $20\text{ }\mu\text{L}$ de ABTS, se homogenizó cada pozo y se procedió a leer a 420 nm en el

espectrofotómetro de microplacas Epoch-Biotek (E.U.A.) durante 8 minutos por columna. Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel y se analizaron. Una unidad de actividad volumétrica se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, usando un coeficiente de extinción de $29,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para guaiacol $26,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y para siringaldazina $65,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bourbonnais *et al.*, 1998) (Figura 2).

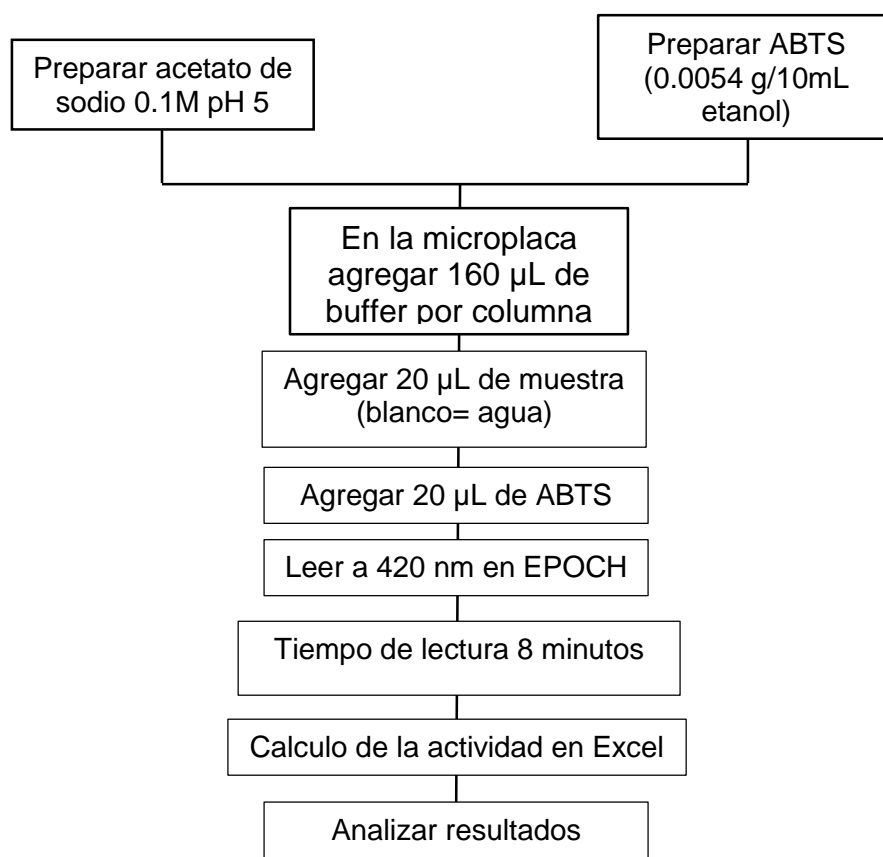


Figura 2. Determinación de la actividad volumétrica de lacasas en microplaca usando el método de Bournonnais y Paice (1990).

7.4 Preparación de medios semisólidos suplementados con AAS y zeolita

Para la cinética de crecimiento y la actividad enzimática en el medio de cultivo semisólido, se empleó el medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA, DIBICO), el cual se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los medios adicionados con inductores se empleó una solución de AAS (ácido acetilsalicílico)

100 μ M (Sigma), otro medio de cultivo adicionado con 3 y 5% de zeolita y una mezcla de AAS (ácido acetilsalicílico) 100 μ M con 3 y 5% de zeolita, todas estas condiciones con y sin presencia de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 0.5 mM (ABTS, Sigma), se disolvieron en agua destilada estéril. Para mantener las mismas condiciones en todo el experimento el porcentaje de zeolita se pesó en tubos de ensaye donde con ayuda de una probeta se colocaron 30 mL de medio de cultivo. Una vez obtenidos los medios se esterilizaron a 121 °C durante 25 min, posteriormente se vaciaron en cajas de Petri desechables de 100 x 15 mm (SYM Laboratorios, México) usando un Vortex para homogenizar la zeolita en el medio. A todas las condiciones se les asignó una clave para su identificación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Blanco, testigos y tratamientos empleados en el experimento para la determinación de lacasas de las cepas CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y CP-145 de *Ganoderma lucidum* en medios suplementados con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M y zeolita al 3 y 5%, adicionado con el substrato enzimático ABTS.

Clave	Descripción	<i>G. lucidum</i>	<i>P. ostreatus</i>
Testigo	Agar extracto de malta (EMA)	√	√
T _x 1	ABTS 0.5 mM	√	√
T _x 2	Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M	√	√
T _x 3	AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM	√	√
T _x 4	Zeolita 3%	ND	√
T _x 5	Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM	ND	√
T _x 6	Zeolita 5%	√	√
T _x 7	Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM	√	√
T _x 8	AAS 100 μ M + zeolita 3%	ND	√
T _x 9	Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM	ND	√
T _x 10	AAS 100 μ M + zeolita 5%	√	√
T _x 11	AAS +zeolita 5% + ABTS 0.5 mM	√	√

ND= No determinado. Tx= Tratamiento. ABTS= ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Fuente: Elaboración propia

7.4.1 Adición de ABTS como prueba cualitativa de lacasas

En el caso de los tratamientos donde se utilizó ABTS como prueba cualitativa se preparó una solución de ABTS 0.5 mM la cual se esterilizó a través de un filtro de membrana de celulosa (Advantec) de 0.20 μ m para mantener las condiciones de esterilidad en el medio. La finalidad del uso de ABTS fue medir el halo oxidativo que

generan las lacasas al oxidar el ABTS y generan una coloración morada. La prueba cualitativa nos permite saber si el hongo produce enzimas y gracias al halo observar que cepas producen una mayor actividad de enzimas.

7.5 Cinética de crecimiento de *G. lucidum* y *P. ostreatus*

Las cajas con medio EMA y las adicionadas con AAS 100 μM , con ABTS 0.5 mM, y zeolita, se inocularon en condiciones de esterilidad empleando un círculo de 0.5 cm de diámetro de inóculo previamente crecido en medio EMA, el cual se colocó en el centro de la caja con ayuda de una aguja de disección estéril. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente. Se estableció la cinética de crecimiento con las variables área de la colonia (cm^2) para todas las condiciones y halo de oxidación (cm^2) para los tratamientos donde se usó el ABTS. La cinética de crecimiento finalizó cuando el halo de oxidación alcanzó la periferia de la caja de Petri, evitando llegar al extremo de la misma, esta variable fue independiente del área de la colonia. Se consideraron 3 repeticiones por condición y por cepa.

7.5.1 pH

Una vez colonizada la caja se retiró el medio de cultivo colonizado de esta para homogenizar las muestras con una mezcladora comercial manual (Hamilton Beach) a máxima velocidad durante 1 minuto. Posteriormente se realizó la medición de pH y temperatura con ayuda de un potenciómetro (Conductronic PH120) el cual fue previamente calibrado a pH 7 y pH 4 para muestras sin zeolita y pH 7 y pH 10 para muestras con zeolita con soluciones buffer estandarizadas marca Meltter Toledo.

7.5.2 Velocidad de crecimiento lineal (cm día^{-1})

Para medir la velocidad de crecimiento lineal del micelio se partió del contorno inicial del inóculo de 0.5 mm al contorno que presento al realizar la toma de muestra, todo esto con ayuda de una regla, el mismo proceso se realizó para el halo oxidativo de los tratamientos donde se utilizó ABTS, las mediciones se realizaron cada dos días, los resultados fueron guardados en una hoja de Excel versión 2016 donde fueron procesados los datos, expresándolos en cm día^{-1} .

7.5.3 Área de la colonia (cm²)

Para la determinación del área de la colonia (cm²) se tomaron imágenes digitales de las cajas Petri con ayuda de una cámara Sony Power Shot A3300IS al final de la cinética. Cada imagen se analizó empleando el programa Image Processing and Analysis in Java (Image J 1.50i) del National Institutes of Health, USA, de acuerdo a lo descrito por Camacho-Martínez (2013).

7.5.4 Halo oxidativo (cm²)

Se consideró la aparición del halo de oxidación (cm²) en los medios semisólidos sin que éste llegara al extremo de las cajas (tiempo final de la cinética). El cambio de color de los medios empleados manifestó la actividad de las enzimas lacasas. Se realizó la toma de imagen y análisis de área de acuerdo a lo descrito en el apartado 7.5.3.

7.5.5 Determinación de proteínas por método de Bradford (µg mL⁻¹)

Para calcular el contenido de proteínas se utilizó el método de Bradford que consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible del colorante Coomassie Blue G-250 cuando este se une a las proteínas a una longitud de onda de 595 nm. Se preparó una solución de albumina bovina 1 mg mL⁻¹ a partir de la cual se realizó una curva de calibración a concentraciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg mL⁻¹. En una microplaca de 96 pozos (Kima, Vacutest) se colocaron 80 µL de muestra en cada pozo con ayuda de una pipeta automática multicanal de 8 puntas (Gilson) y posteriormente se agregaron 20 µL de colorante Biorad Protein Stains, se homogenizó cada pozo y se dejó incubar en oscuridad durante 30 minutos, posteriormente se realizó la lectura de la microplaca en un espectrofotómetro (EPOCH-Biotek) a una absorbancia de 595 nm (Fig. 3).

Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo en el programa Excel, donde se usaron las absorbancias de la curva de calibración para obtener la ecuación de la recta $Y=mx+b$ y determinar el contenido de proteínas de cada muestra analizada.

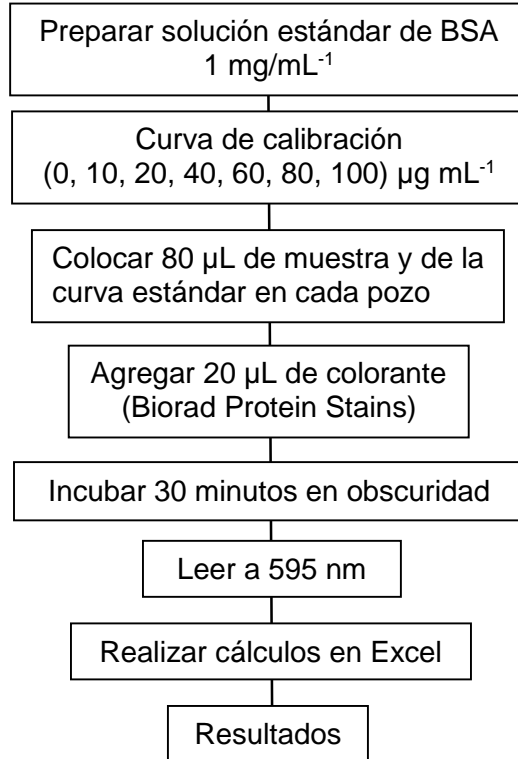


Figura 3. Diagrama de la determinación de proteínas por método de Bradford.

7.5.6 Determinación de la actividad volumétrica de lacasas (U mL⁻¹) con ABTS, guaiacol y siringaldazina

Una vez que el halo de oxidación abarcó el área total de la caja Petri se retiraron las muestras de incubación y se vació el contenido de esta en un vaso de acero inoxidable de 250 mL, al cual se le agregaron 5 mL de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M pH 5 para cada una de las repeticiones del blanco, testigos y tratamientos. Posteriormente la muestra fue homogenizada con un homogeneizador (Pro 250-Pro Scientific) con un rotor de 20 mm x 150 mm a 10 000 rpm, todo este proceso se realizó en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad. La muestra homogenizada se retiró del vaso con ayuda de una espátula de acero inoxidable estéril y colocada en un tubo para centrifuga de 50 mL (Oak Teflon FEP, Thermo Scientific Nalgene) el cual se centrifugó a 10 000 rpm a 4° C durante 10 (Sigma 4K15, Laboratory centrifuges). El sobrenadante obtenido se

recuperó con ayuda de una pipeta de 1000 mL y se depositó en tubos eppendorf de 2 mL estéril. Finalmente, las muestras se almacenaron en un congelador a -2 °C hasta su análisis. Para la determinación de dicha actividad se utilizó el método de Bourbonnais y Paice. (1990), que consiste en utilizar como substrato indicador el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Se preparó una solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M pH 5 y ABTS 1 mM. En la microplaca y con la ayuda de una pipeta automática multicanal (Gilson) se colocaron 160 μ L de la solución reguladora de acetato de sodio pH 5 en cada pozo y se agregaron 20 μ L de muestra o de agua (blanco) y 20 μ L de ABTS, guaiacol y siringaldazina se homogenizó cada pozo y se procedió a leer a 420 nm para ABTS, 470 nm para el guaiacol y 520 nm para la siringaldazina en el espectrofotómetro de microplacas (Epoch-Biotek, E.U.A.) durante 8 minutos. Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel y se analizaron. (Figura 4) Una unidad de actividad volumétrica se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto, usando un coeficiente de extinción de 29 300 M⁻¹ cm⁻¹ (Bourbonnais *et al.*, 1998).

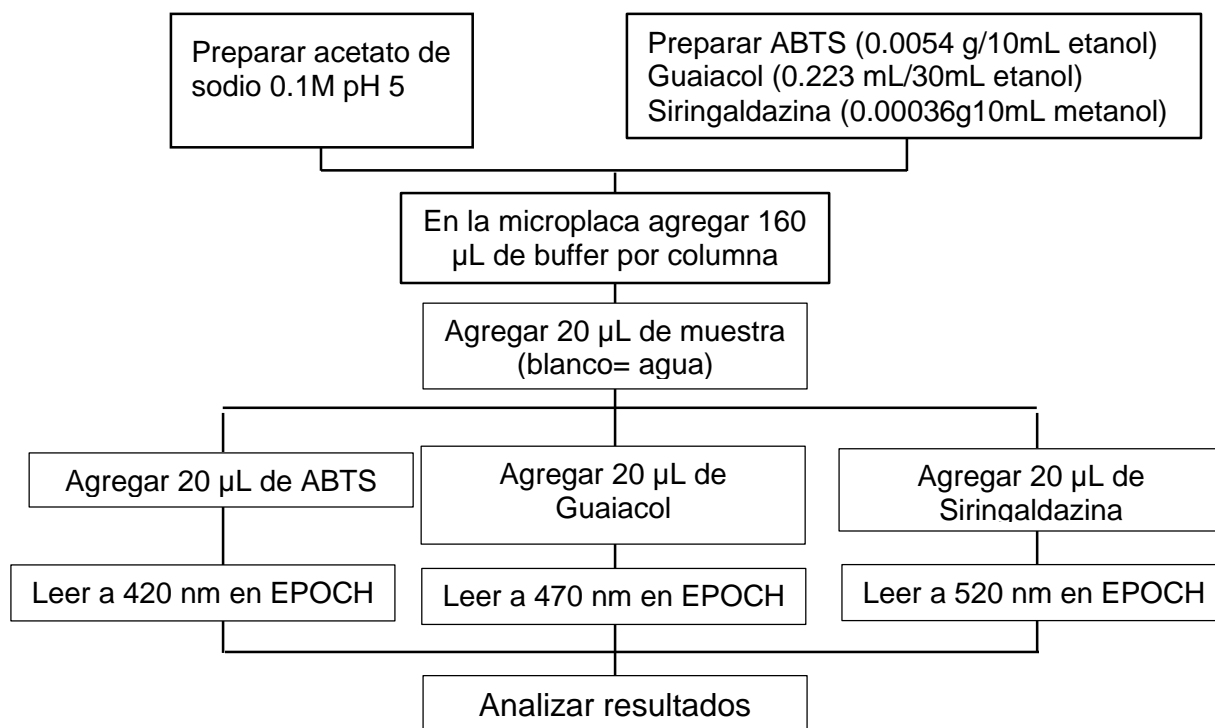


Figura 4. Determinación de la actividad volumétrica de lacasas en microplaca usando el método de Bourbonnais y Paice (1990), con diferentes substratos enzimáticos.

7.6 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($\alpha= 0.05$) empleando un diseño completamente al azar. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SAS 9.0.

VIII. RESULTADOS

8.1 Caracterización de los recursos fúngicos estudiados (*Ganoderma*, *Grifola*, *Lentinula*, *Pleurotus* y *Sparassis*)

Se realizó un barrido de concentraciones de zeolita con AAS 100 µM para todas las cepas seleccionadas en el estudio. Las cepas que toleraron concentraciones menores a 1% (Cuadro 3) fueron *G. frondosa*, *L. edodes* y *Sparassis* sp., las que mostraron una inhibición en su crecimiento al aumentar la dosis. Las cepas que toleraron dosis superiores a 1% (Cuadro 4) fueron *G. lucidum* y *P. ostreatus* las cuales lograron colonizar en dosis de hasta 10% de zeolita. Como en el caso de las cepas menos tolerantes se presentó una inhibición de crecimiento al aumentar las dosis de zeolita.

En el cuadro 3 se muestra el crecimiento de las cepas menos tolerantes, donde en el caso de *G. frondosa* y *L. edodes* todas las cepas lograron colonizar en todas las condiciones. Se observó que en los tratamientos donde se utilizó zeolita, el micelio fue más abundante y vigoroso en comparación al testigo (Agar extracto de malta). En el caso de *Sparassis* sp. la CP-873 logró colonizar en todas las condiciones, mientras que la CP-854 solo colonizó hasta 0.6%, en los tratamientos con dosis superiores no se presentó ningún crecimiento.

Cuadro 3. Crecimiento de tres especies de hongos comestibles en EMA a concentraciones de zeolita de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1%.

Especie	Registro	T	0.2	0.4	0.6	0.8	1
<i>Grifola frondosa</i>	CP-459	C	C	C	C	C	C
	CP-825	C	C	C	C	C	C
	CP-850	C	C	C	C	C	C
<i>Lentinula edodes</i>	CP-580	C	C	C	C	C	C
	CP-845	C	C	C	C	SC	SC
<i>Sparassis</i> sp.	CP-873	C	C	C	C	C	C

C= Colonización de la cepa. SC= Sin Colonización de la cepa. T= Testigo. Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 4 se muestra el crecimiento de las cepas tolerantes mayores a 1% donde *G. lucidum* logró colonizar en medio de cultivo con 10% de zeolita,

presentando un crecimiento irregular. *P. ostreatus* también colonizó en todas las condiciones y presentó un crecimiento irregular.

Cuadro 4. Crecimiento de dos especies de hongos comestibles en EMA a concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10% de zeolita.

Especie	Clave	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Ganoderma lucidum</i>	CP-145	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CP-50	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	CP-753	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

C= Colonización de la cepa. S/C= Sin Colonización de la cepa. T= Testigo. Fuente: Elaboración propia.

Las cepas que colonizaron en menor tiempo la totalidad de la caja Petri fueron *G. lucidum* que logró crecer de 5 a 7 días en todas las condiciones. Las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus* donde colonizaron en todas las condiciones a los 4 días, siendo estas las cepas que colonizaron en menor tiempo. En el caso de las cepas de *G. frondosa* y *L. edodes* el crecimiento en medio de cultivo semisólido fue más lento. En las tres cepas de *G. frondosa* el tiempo de crecimiento en el testigo (Agar Extracto de Malta) fue de 19 días, así como el medio suplementado con 0.2% de zeolita, en el caso de la cepa CP-825 las condiciones 0.4, 0.6 y 0.8% colonizaron a los 21 días. La cepa CP-850 tardó 20 días en crecer en el medio de cultivo al 0.4% de zeolita y colonizó los medios con 0.6, 0.8 y 1% en 26 días.

La cepa CP-459 tardó 26 días para colonizar el medio con dosis de 0.4, 0.6 y 0.8% mientras que para 1% fueron 29 días. En el caso de la cepa CP-580 de *Lentinula edodes* el crecimiento en el testigo, 0.2 y 0.4% fue de 15 días, mientras que en 0.6 y 0.8 fue de 19 días, finalmente en 1% tardó en colonizar 21 días. Las cepas que tardaron más tiempo en colonizar fueron las correspondientes a *Sparassis* sp. donde ambas cepas colonizaron en sus testigos a los 34 días, al aumentar la dosis el tiempo de crecimiento fue aumentando, al utilizar 0.2% tardó 41 días en colonizar, y con 0.4% 54 días. En la CP-845 el crecimiento en las condiciones 0.8 y 1% no presentó ningún crecimiento. Las cajas se tuvieron en observación hasta 70 días, no lográndose observar ningún crecimiento. En la CP-873 se presentó crecimiento

sin embargo no logró colonizar en su totalidad la caja Petri por lo que se cosecharon las muestras a los 70 días después de la siembra para evitar que el medio se deshidratara, sin embargo, al aumentar la dosis de zeolita se observó que el micelio de las cepas era más vigoroso y abundante en comparación al testigo que presentaba un micelio delgado (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tiempo de colonización (días) de las cepas en concentraciones de zeolita de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1%.

Especie	Registro	T	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1%
<i>Ganoderma lucidum</i>	CP-145	5	5	5	5	7	7
	CP-459	19	19	26	26	26	29
<i>Grifola frondosa</i>	CP-825	19	19	21	21	21	25
	CP-850	19	19	20	26	26	26
<i>Lentinula edodes</i>	CP-580	15	15	15	19	19	21
<i>Sparassis</i>	CP-845	34	41	54	54	SC	SC
sp.	CP-873	34	41	54	70	70	70
<i>Pleurotus</i>	CP-50	4	4	4	4	4	4
<i>ostreatus</i>	CP-753	4	4	4	4	4	4

SC= Sin crecimiento. T= Testigo. Fuente: Elaboración Propia.

Para las cepas que toleraron dosis mayores a 1% se realizó un barrido de 1 a 10% de concentración de zeolita. *G. lucidum* colonizó a los 5 días en el testigo a los 7 días en 1% de zeolita, a los 11 días en 2% y a los 12 días en 3, 4, 5%, mientras que en dosis de 6 a 10% tardó de 22 a 28 días en colonizar. En el caso de *L. edodes* la cepa tardó 15 días en colonizar el testigo, mientras que en dosis de 1 a 4% tardó de 21 a 23 días, en dosis de 5 a 7% de 23 a 27 días y finalmente de 8 a 10% tardó de 33 a 35 días en colonizar. En estas últimas dosis el micelio no logró colonizar la totalidad de la caja por lo que se colectó la muestra antes de que esta perdiera humedad.

En el caso de las cepas CP-50 y CP-753 de *P. ostreatus* colonizaron el testigo y los tratamientos con 1, 2 y 3% de zeolita a los 4 días. Asimismo, le tomo de 5 a 6 días en colonizar medios con 4, 5, 6, 7 y 8% de zeolita y finalmente en 9 y 10% tardó 7 días en colonizar, siendo *P. ostreatus* una de las cepas más rápidas en colonizar los medios de cultivo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tiempo de colonización (días) de las cepas en diferentes concentraciones de zeolita a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10% en EMA.

Especie	Registro	T	1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
<i>Ganoderma</i>	CP-145	5	7	11	12	12	12	22	25	28	28	28
<i>Lentinula</i>	CP-580	15	21	23	23	23	26	27	29	33	35	35
<i>Pleurotus</i>	CP-50	4	4	4	4	5	5	5	6	6	7	7
	CP-753	4	4	4	4	5	5	5	6	6	7	7

T= Testigo. Fuente: Elaboración propia.

8.1.1 Actividad enzimática de lacasas (U mL⁻¹) de los recursos fúngicos estudiados (*Ganoderma*, *Grifola*, *Lentinula*, *Pleurotus* y *Sparassis*)

Se determinó la actividad volumétrica de lacasas de las cepas de hongos que toleraron dosis menores a 1 % de zeolita (Cuadro 7). Las cepas de *G. frondosa* mostraron en general que al aumentar la concentración de zeolita cambian la actividad enzimática de lacasas. En la CP-459 la actividad enzimática en el testigo fue de 2.047 U mL⁻¹, mientras que en 0.2% la actividad aumentó a 5.532 U mL⁻¹ y en los tratamientos con 0.4, 0.6, 0.8 y 1% la actividad enzimática comenzó a disminuir con 0.641, 0.403, 0.471 y 0.317 U mL⁻¹ respectivamente. En la CP-825 se obtuvieron 4.973 U mL⁻¹ en el testigo, en el caso de las dosis con 0.2 y 0.6% se observó un incremento a 7.213 y 8.175 U mL⁻¹, mientras que en los tratamientos con 0.4, 0.8 y 1% la actividad disminuyó a 2.555, 3.680 y 1.551 U mL⁻¹ respectivamente.

La cepa CP-850 produjo 8.98 U mL⁻¹ en el testigo mientras que en las dosis 0.6 y 0.8, 1% aumentó a 15.34, 14.39 y 0.07 U mL⁻¹ respectivamente, mientras que en las dosis 0.2 y 0.4% la actividad enzimática disminuye a 6.92 y 3.66 U mL⁻¹. Para la cepa CP-580 de *L. edodes* la actividad enzimática en el testigo fue de 2.71 U mL⁻¹ mientras que en 0.2, 0.4 y 0.6 aumentó a 5.16, 3.84 y 4.17 U mL⁻¹, siendo los tratamientos que mostraron un mayor aumento 0.8 y 1% de zeolita con 8.03 y 8.69 U mL⁻¹ respectivamente. *Sparassis* sp. presentó cambios en la actividad volumétrica de lacasas al adicionar zeolita. La CP-845 tuvo 0.081 U mL⁻¹ en el testigo, mientras que a concentraciones de 0.2% la actividad aumenta a 0.171 U mL⁻¹ en el caso de

las condiciones con 0.4 y 0.6% la actividad disminuye. En el caso de la CP-873 se obtuvieron 0.179 U mL⁻¹ en el testigo, mientras que en la condición de 0.6% la actividad aumento a 2.231 U mL⁻¹, seguidos de 1%, 0.4% y 0.8% donde se muestra un ligero cambio en la actividad enzimática (Cuadro 7).

Cuadro 7. Actividad volumétrica de lacasas (U mL⁻¹) con las cepas de estudio a concentraciones de zeolita de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1% en EMA.

Especie	Registro	T	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1%
<i>Grifola frondosa</i>	CP-459	2.047	5.532	0.641	0.403	0.471	0.317
	CP-825	4.973	7.213	2.555	8.175	3.680	1.551
	CP-850	8.98	6.92	3.66	15.34	14.39	7.07
<i>Lentinula</i>	CP-580	2.71	5.16	3.84	4.17	8.03	8.69
<i>Sparassis</i>	CP-845	0.081	0.171	0.015	0.055	SC	SC
	CP-873	0.179	0.050	0.229	2.231	0.194	0.235

T= Testigo. SC= Sin colonizar. Fuente: Elaboración propia.

Para la cepa CP-145 de *G. lucidum* se realizó una prueba utilizando dos dosis de zeolita 5 y 10% adicionado con AAS 100 µM. En la Figura 5 se muestra la actividad volumétrica de lacasas en medios semisólidos a los 7 días después de colonización de la CP-145 de *G. lucidum*, usando AAS y zeolita. Se observa que la producción de lacasas aumentó al mezclar AAS 100 µM con zeolita al 5 y 10%, siendo los tratamientos donde se obtuvo una mayor actividad enzimática con 23.48 U mL⁻¹ en comparación con 0.08 U mL⁻¹ del testigo. Los tratamientos donde no se utilizó AAS 100 µM no presentaron un aumento considerable en comparación a los tratamientos donde sí se utilizó. Aunque el tratamiento donde se utilizó AAS 100 µM con 10% de zeolita mostró un aumento en la cantidad de lacasas el tiempo de colonización se extendió varios días, además de que el micelio no logro colonizar completamente la caja Petri, por lo que solo se consideró utilizar la dosis de 5% de zeolita con y sin de AAS 100 µM.

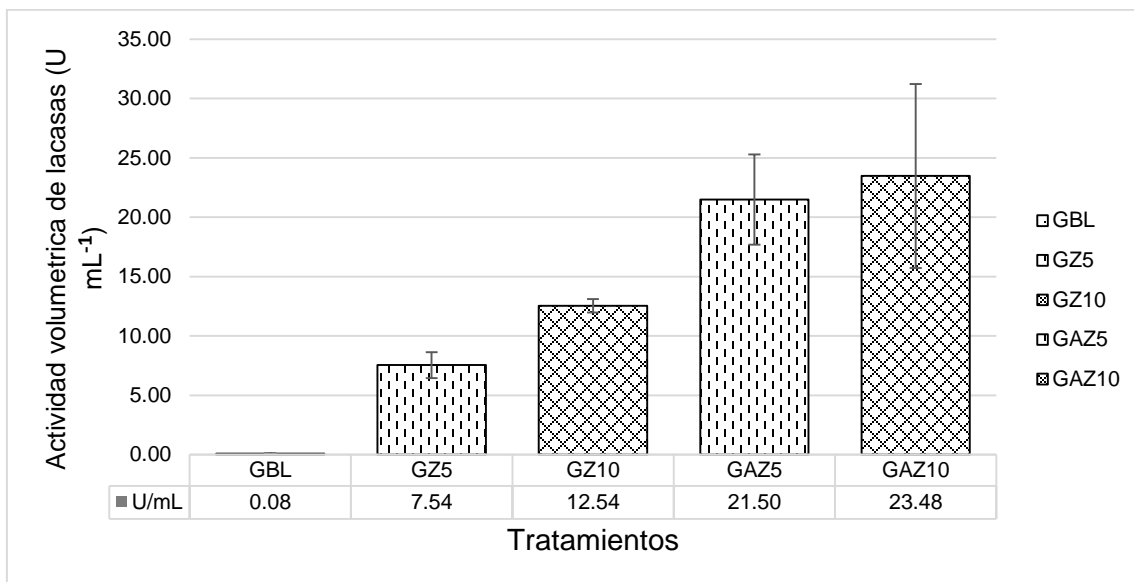


Figura 5. Actividad enzimática de *Ganoderma lucidum* en dosis de zeolita al 5% con AAS 100 μ M. GBL= Testigo. GZ5= Zeolita al 5%. GZ10= Zeolita al 10%. GAZ5= AAS 100 μ M con zeolita al 5%. GAZ10= AAS 100 μ M con zeolita al 10%.

En la figura 6 se muestra la actividad volumétrica de lacasas en medios semisólidos a los 7 días después de la colonización de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* con diferentes tratamientos usando AAS 100 μ M y zeolita. Se observa que en la producción de lacasas aumentó hasta el tratamiento PZ3 (EMA adicionado con zeolita al 3%) con 116.2 U mL⁻¹. Después de esta dosis la producción de lacasas comenzó a disminuir siendo este el tratamiento que mostró mayor diferencia significativa en comparación a las demás condiciones donde no se utilizó el AAS. En el caso de las condiciones donde se realizó la mezcla de AAS 100 μ M con zeolita el tratamiento PAZ5 (AAS adicionado con zeolita al 5%) se obtuvieron 106.1 U mL⁻¹, posteriormente al aumentar la dosis, la producción de lacasas disminuye.

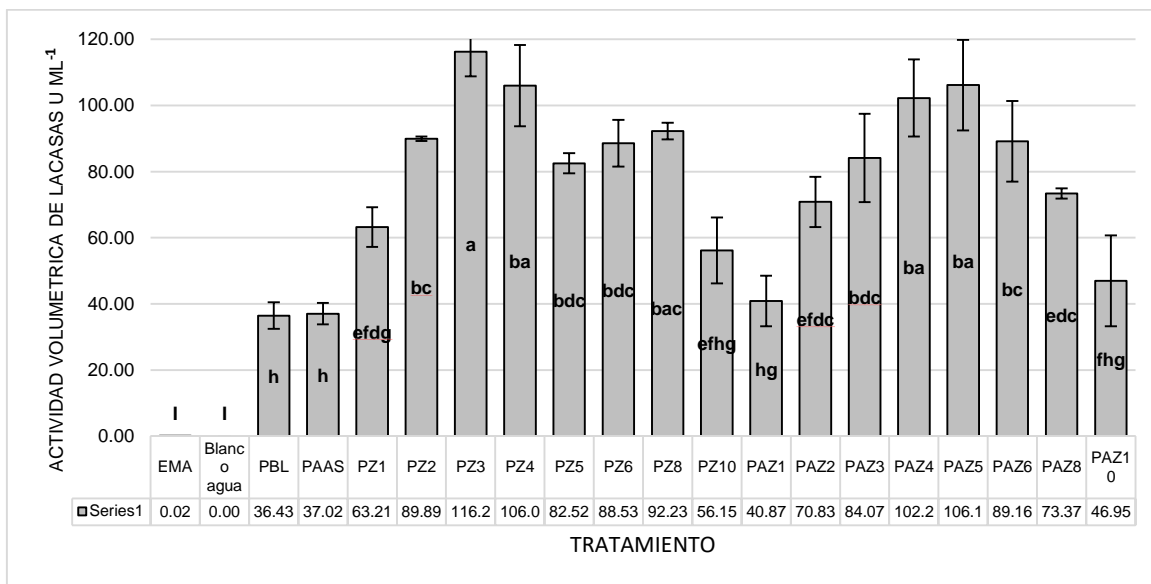


Figura 6. Actividad enzimática de lacasas del barrido de concentraciones de zeolita y AAS 100 μ M de la CP-753 de *Pleurotus ostreatus*. PBL= Testigo. PAAS= Ácido acetilsalicílico. PZ= Zeolita. PAZ= AAS 100 μ M con zeolita. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 7 se observa que la producción de lacasas con la cepa CP-50 de *P. ostreatus* en EMA adicionado con zeolita al 3% (P50Z3) fue de 87.76 U mL⁻¹. En el tratamiento EMA adicionado con AAS 100 μ M con zeolita al 5% (P50AZ5) fue de 98.49 U mL⁻¹ mientras que en el testigo se obtuvieron 15.62 U mL⁻¹. En el caso de la cepa CP-753 se observa que la producción de lacasas con el tratamiento EMA adicionado con zeolita al 3% (P753Z3) fue de 204.29 U mL⁻¹. En el tratamiento AAS 100 μ M con zeolita al 5% (P753 AZ5) se obtuvieron 175.25 U mL⁻¹, mientras que en el blanco se obtuvieron 20.6 U mL⁻¹. En el caso de la cepa CP-753 se obtuvo una mayor cantidad de lacasas en todas las condiciones en comparación con la CP-50 donde la actividad enzimática fue menor. Por estos motivos se seleccionó la CP-753 para la segunda etapa del experimento utilizando dosis de 3 y 5% de zeolita.

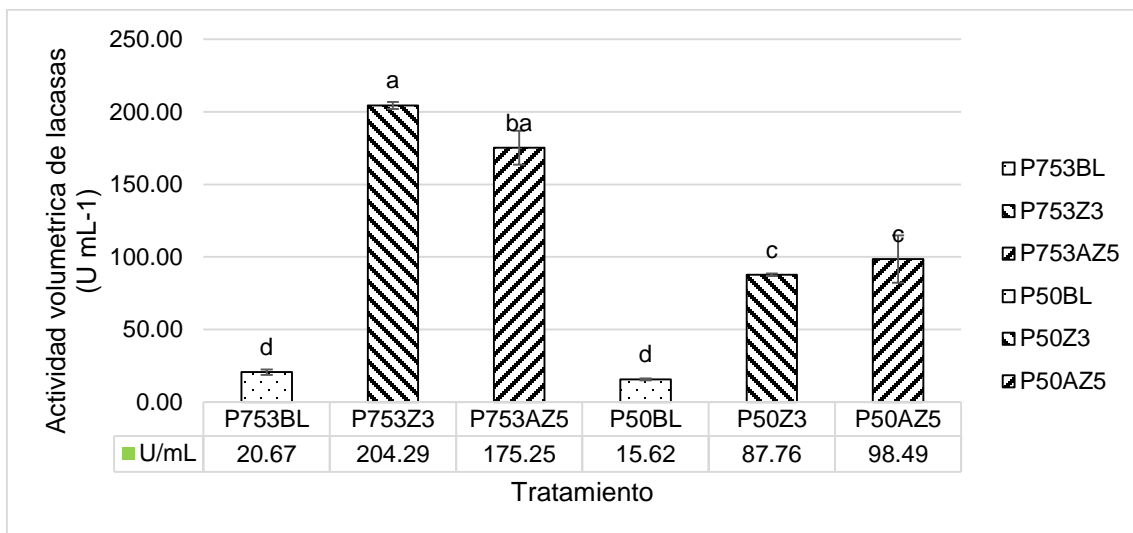


Figura 7. Actividad volumétrica de lacasas de las cepas de *Pleurotus ostreatus* CP-50 y CP-753 usando 3 y 5% de zeolita a los 14 días de colonización con ABTS como sustrato. P50= Cepa CP-50 de *P. ostreatus*. P753= Cepa CP-753 de *P. ostreatus*. BL= Testigo. Z3= Zeolita al 3%. AZ5= AAS 100 μ M con zeolita al 5%. Fuente: Elaboración propia.

8.2 Fisiología de la CP-145 de *G. lucidum* usando AAS, zeolita y ABTS

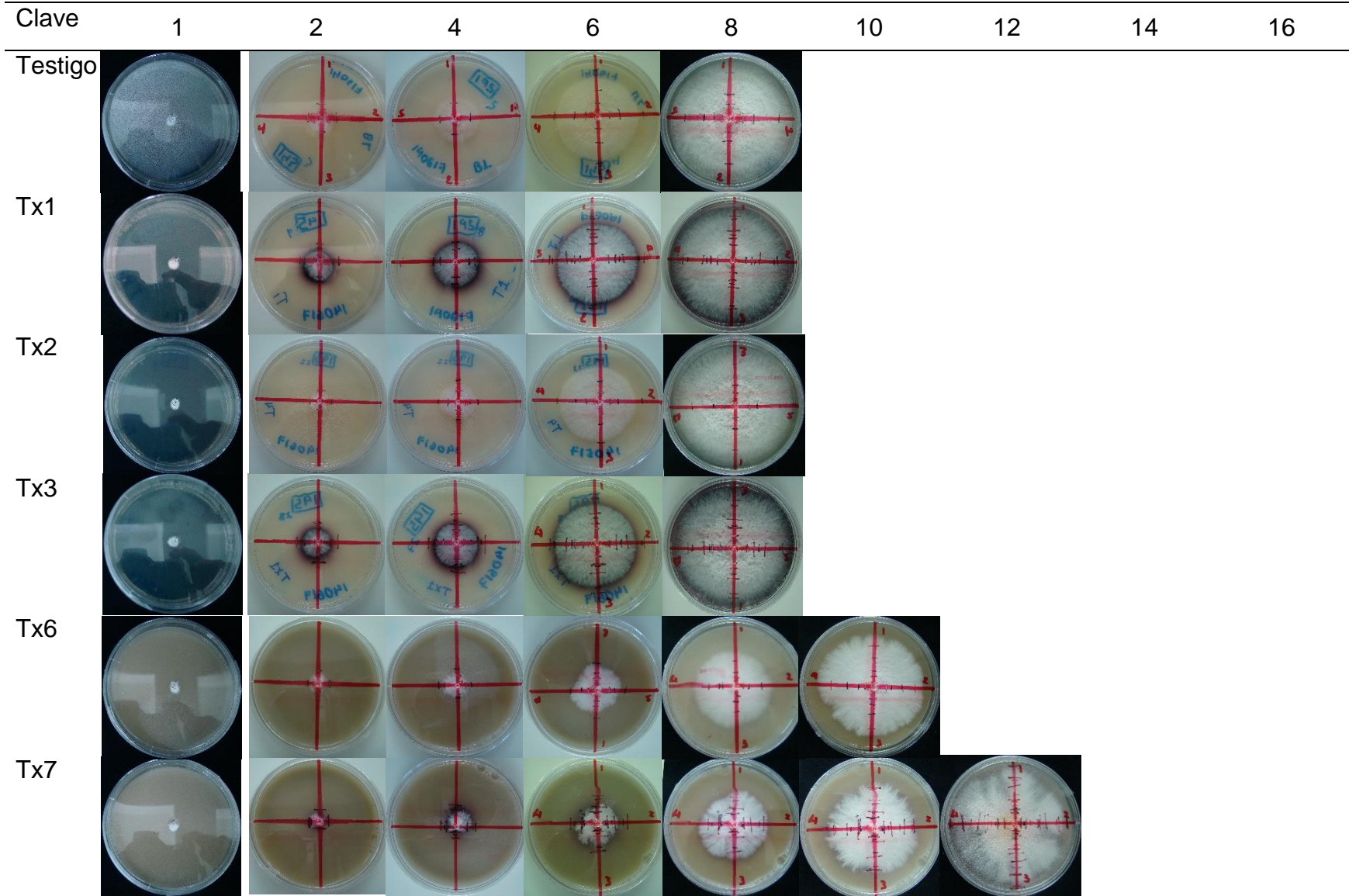
En la figura 8 se observa el crecimiento de la cepa CP-145 a tiempo final de colonización en medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA) adicionado con los inductores AAS 100 μ M y zeolita al 5%. La morfología del micelio varió dependiendo del tratamiento. *Ganoderma lucidum* en las condiciones Testigo, Tx1, Tx2 y Tx3 presentó crecimiento regular, además de que el micelio presentaba forma algodonosa.

Cepa	Tratamiento			
CP-145	EMA	EMA + Z5%	EMA + AAS 100µM	EMA + AAS 100µM + Z5%
CP-145	EMA + ABTS 0.5 mM	EMA + Z5% + ABTS 0.5 mM	EMA + AAS 100µM + ABTS 0.5 mM	EMA + AAS 100µM + Z5% + ABTS 0.5 mM

Figura 8. Crecimiento de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA) adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 µM y substrato enzimático ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 0.5 mM a tiempo final de colonización. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 9 se observa la cinética de crecimiento de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en EMA en los diferentes tratamientos. Los tratamientos Tx6, Tx7, Tx10 y Tx11 presentaron crecimiento irregular del micelio. *G. lucidum* colonizó en 7 días en el Testigo, Tx1, Tx2 y Tx3 las condiciones en las que el micelio se desarrolló más rápido. Los tratamientos donde el micelio colonizó a los 12 días fueron Tx6, Tx7 y Tx10, finalmente el tratamiento que colonizó a los 14 días fue Tx11.

Tiempo (días)



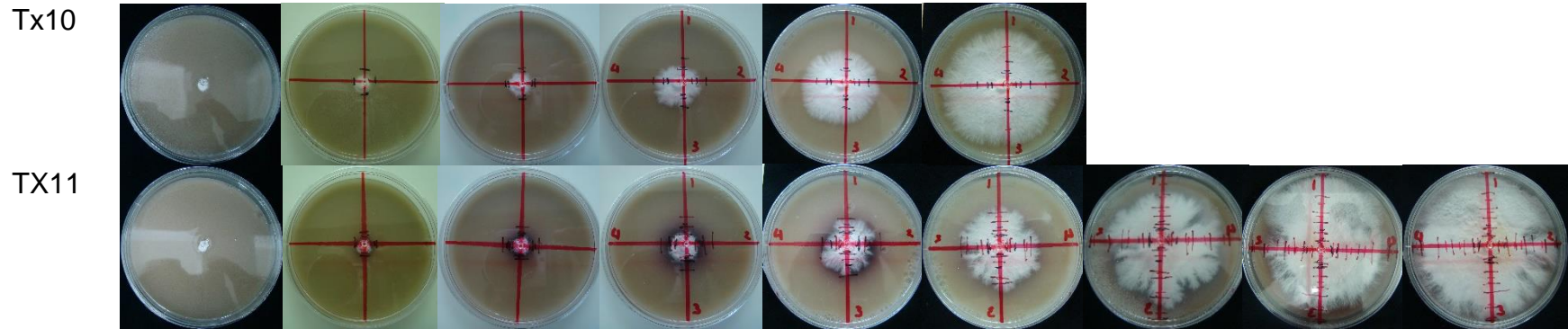


Figura 9. Cinética de crecimiento de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum*. Testigo= Agar extracto de malta. Tx1= ABTS 0.5 mM. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. Tx6= Zeolita 5%. Tx7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. Tx10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. Tx11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.2.1 pH inicial y final

La figura 10 muestra el pH inicial y final del medio de cultivo EMA después del crecimiento de la cepa CP-145 de *G. lucidum*. Puede observarse que el pH en todos los tratamientos disminuyó a tiempo final de colonización. También se observa que la adición de ABTS no altera el pH de los medios de cultivo. El testigo (EMA) tuvo un pH de 5.41 ± 0.02 que cambió a 4.03 ± 0.06 , en el caso de Tx1 (EMA con ABTS) el pH inicial fue de 5.52 ± 0.05 y el final de 3.99 ± 0.04 . El tratamiento AAS $100 \mu\text{M}$ con y sin ABTS el pH inicial fue de 5.52 ± 0.02 y 5.10 ± 0.05 respectivamente y el pH final disminuyó a 4.15 ± 0.03 y 4.08 ± 0.07 , en este tratamiento el hongo logró bajar el pH en más de una unidad.

En los tratamientos donde está presente la zeolita el pH inicial aumentó en comparación al testigo siendo 7.74 ± 0.13 para Tx6 y 7.71 ± 0.4 para Tx7. El pH de estas condiciones disminuyó a 7.02 ± 0.05 en Tx6 y 6.75 ± 0.07 en Tx7. Finalmente, en la combinación de AAS $100 \mu\text{M}$ con zeolita al 5% el pH inicial de Tx10 y Tx11 fue de 7.79 ± 0.02 y 7.87 ± 0.04 respectivamente el cual después de la colonización bajó a 7.18 ± 0.53 y 7.05 ± 0.06 .

El uso de zeolita en medios de cultivo semisólidos aumentó el pH de ligeramente ácido, correspondiente al testigo a ligeramente alcalino en los tratamientos Tx6, Tx7, Tx10 y Tx11, después del crecimiento del hongo.

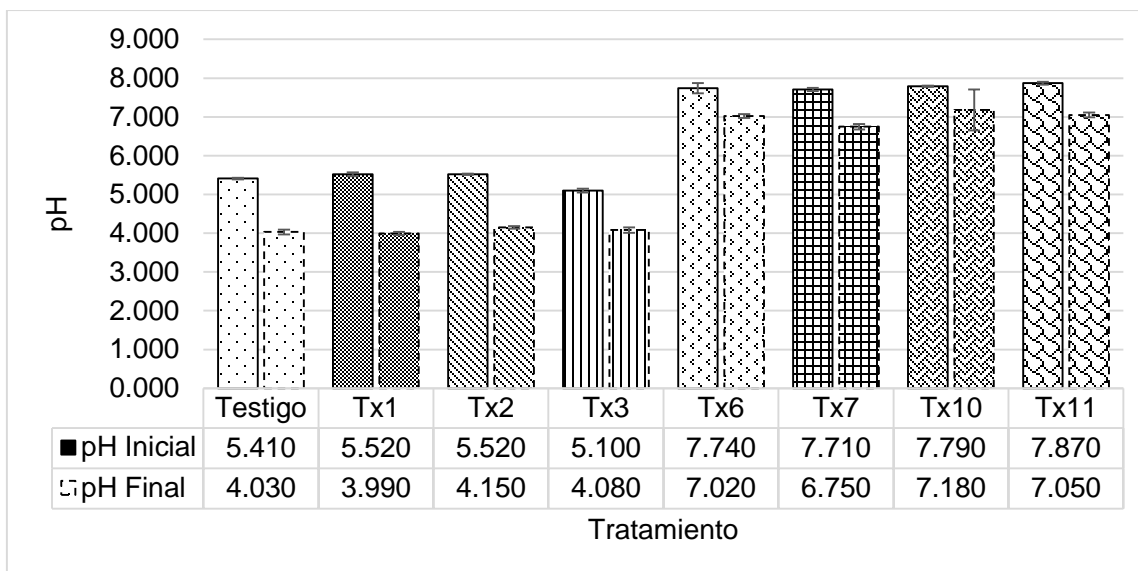


Figura 10. pH inicial y final de *Ganoderma lucidum* en las diferentes condiciones. Testigo= Agar extracto de malta, TX1= ABTS 0.5 mM. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. TX3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. TX6= Zeolita 5%. TX7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. TX10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. TX11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.2.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se consideraron los tratamientos donde no se utilizó el ABTS debido a que la muestra final interfería en la lectura del espectrofotómetro. Los tratamientos seleccionados fueron Testigo, Tx2, Tx6 y Tx10. En la CP-145 la cantidad de proteínas aumentó en 228% con $67.85 \pm 7.19 \mu\text{g mL}^{-1}$ usando el tratamiento Tx2 (AAS 100 μ M) en comparación con el testigo donde se obtuvieron $29.73 \pm 7.19 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que en los tratamientos Tx6 se logró aumentar en 138% la cantidad de proteínas con $41.19 \pm 12.76 \mu\text{g mL}^{-1}$ y en Tx10 la cantidad de proteínas disminuyó en 48% con $15.35 \pm 0.36 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 11).

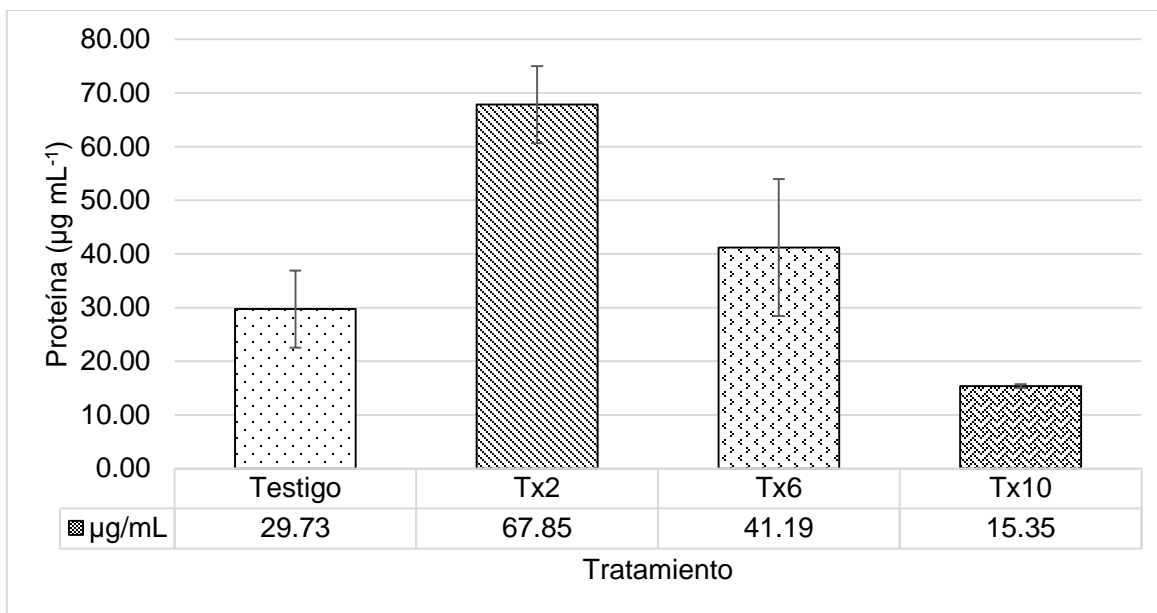


Figura 11. Cuantificación de proteínas de *Ganoderma lucidum* en las diferentes condiciones. Testigo= Agar extracto de malta. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 µM. TX6= Zeolita 5%. TX10= AAS 100 µM + zeolita 5%. Fuente: Elaboración propia.

8.2.3 Velocidad de colonización

Se evaluó la velocidad de crecimiento de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en medios semisólidos suplementados con AAS y zeolita utilizando como indicador cualitativo ABTS 0.5 mM, donde se evaluó la velocidad de crecimiento del micelio y del halo de oxidación para observar de manera cualitativa la presencia de lacasas.

En la figura 12 se observa la velocidad de colonización de la cepa CP-145 de *G. lucidum* en el testigo y el tratamiento Tx1 (EMA con ABTS). Se muestra la velocidad del halo oxidativo, ambos colonizando en 10 días y creciendo 0.4 cm/día en promedio. En ambas condiciones no hubo diferencia ya que crecieron al mismo tiempo.

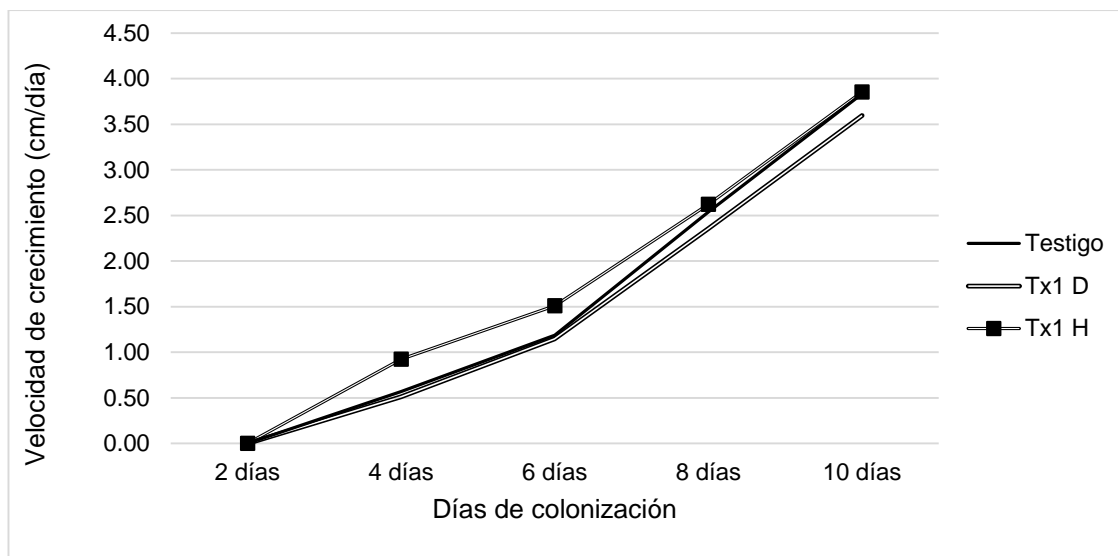


Figura 12. Velocidad de colonización de la cepa- CP-145 de *Ganoderma lucidum* y halo oxidativo en las condiciones Tx1 y al testigo a los 10 días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. TX1= Agar extracto de malta con ABTS 0.5 mM. D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

Se comparó la velocidad de los tratamientos Tx2 (AAS 100 μ M) y Tx3 (AAS 100 μ M con ABTS) con el testigo. El tratamiento Tx2 colonizó a los 10 días a una velocidad de 0.32 cm/día. En el tratamiento Tx3 (AAS 100 μ M con ABTS) el halo oxidativo llegó a la periferia de la caja en 10 días al igual que Tx2, con una velocidad de 0.39 cm/día, en el caso del crecimiento micelial de este tratamiento la velocidad de crecimiento fue de 0.34 cm/día. Estas condiciones no tuvieron diferencia en comparación al testigo debido a que colonizaron en el mismo tiempo (Fig. 13)

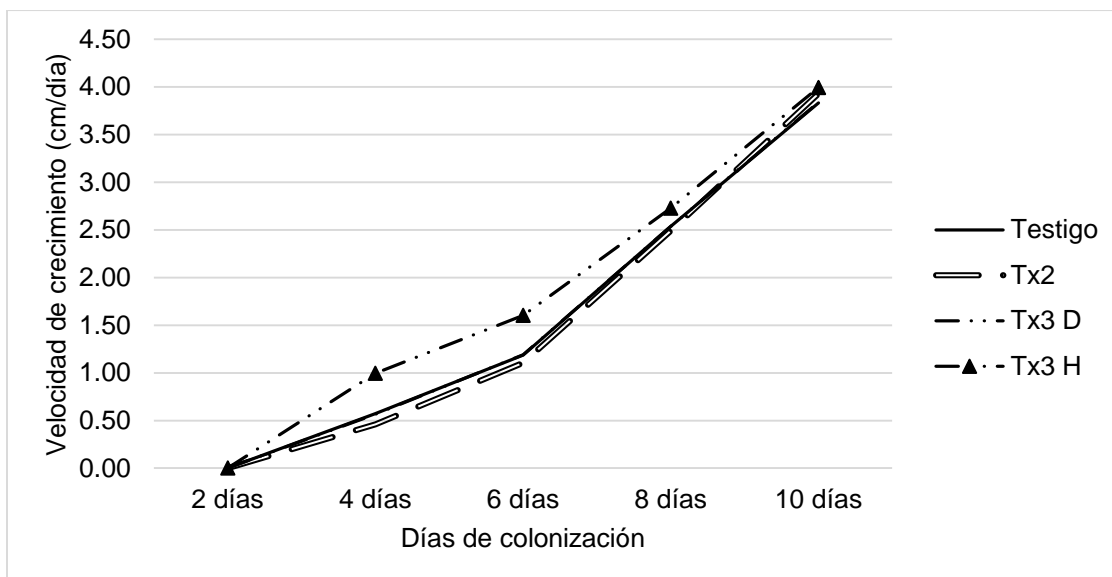


Figura 13. Velocidad de colonización de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* y halo oxidativo en el tratamiento y testigo y Tx2 a los 10 días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. TX3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

La comparación de la velocidad de crecimiento del testigo (EMA), los tratamientos Tx6 (zeolita 5%) y Tx7 (zeolita con ABTS) se pueden observar en la figura 14. El testigo colonizó en 10 días mientras que Tx6 y Tx7 colonizaron a los 14 días con una diferencia de cuatro días. Tx6 colonizó a una velocidad de 0.27 cm/día siendo más lenta que el testigo. En halo oxidativo de Tx7 creció a una velocidad de 0.29 cm/día mientras que el micelio fue de 0.27 cm/día, sin mostrar diferencia en comparación a Tx6.

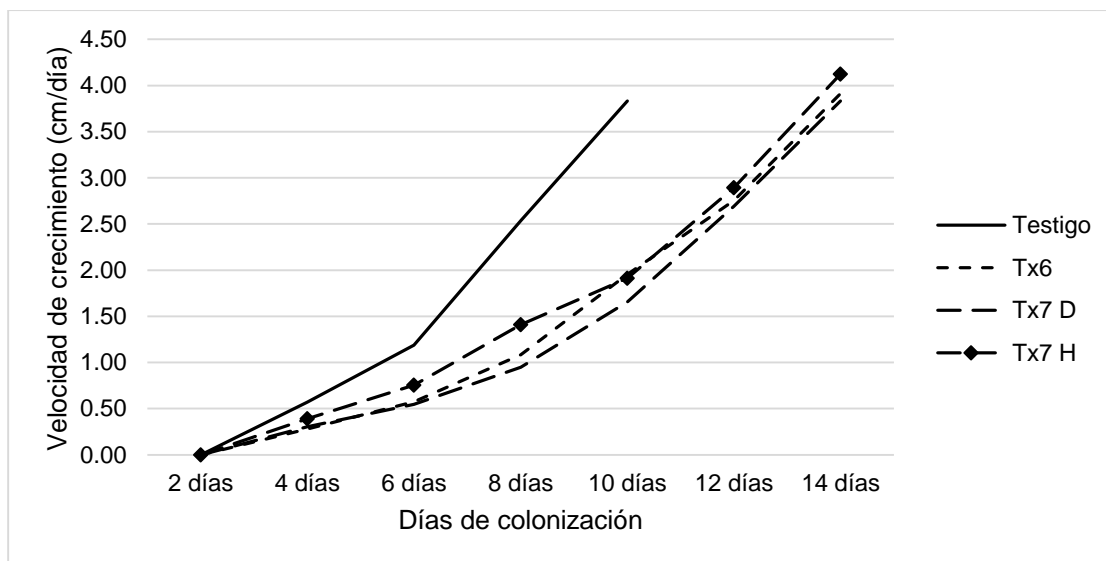


Figura 14. Velocidad de colonización de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* y halo oxidativo del tratamiento Tx7 en comparación al testigo y Tx6 a diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. ABTS 0.5 mM. TX6= Zeolita 5%. TX7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

Los tratamientos Tx10 (AAS 100 μ M con zeolita al 5%) y Tx11 (AAS 100 μ M con zeolita al 5% y ABTS) fueron comparados contra el testigo, Tx2 y Tx6. En la figura 15 se observa que el testigo y el tratamiento Tx2 colonizaron en menor tiempo en comparación con las demás condiciones. Tx6 y Tx10 colonizaron el medio de cultivo a los 14 días con una velocidad de crecimiento de 0.27 cm/día y 0.29 cm/día respectivamente. El tratamiento que tuvo una velocidad de crecimiento menor a los tratamientos anteriores y el testigo fue Tx11 donde el halo de oxidación colonizó a los 16 días, 6 días de diferencia entre este tratamiento y el testigo, con una velocidad de 0.24 cm/día. Mientras que el micelio colonizó a una velocidad de 0.21 cm/día, siendo este tratamiento el que inhibió el crecimiento de la CP-145.

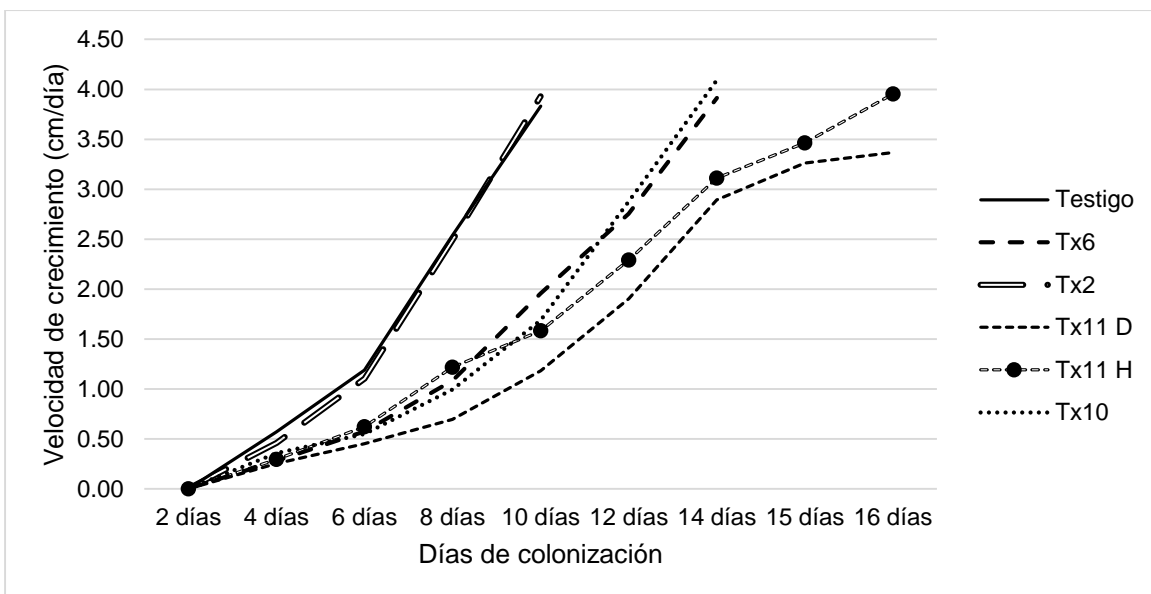


Figura 15. Velocidad de colonización de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* y halo oxidativo del tratamiento Tx11 en comparación al testigo, Tx2, Tx6 y Tx10 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. TX6= Zeolita 5%. TX10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. TX11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM% D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo.

8.2.4 Área de colonización y del halo de oxidación (cm^2)

En la figura 16 se observa que el micelio de la CP-145 de *G. lucidum* colonizó a los 10 días en el testigo y el tratamiento TX1, siendo el halo oxidativo el que abarcó mayor área durante el crecimiento de la cepa. El área del testigo y Tx1 colonizaron de la misma manera, por lo que no hubo diferencia entre su crecimiento, ambas crecieron a una velocidad de $3.13 \text{ cm}^2/\text{día}$. Mientras que el halo oxidativo tuvo un crecimiento de área de $4.19 \text{ cm}^2/\text{día}$

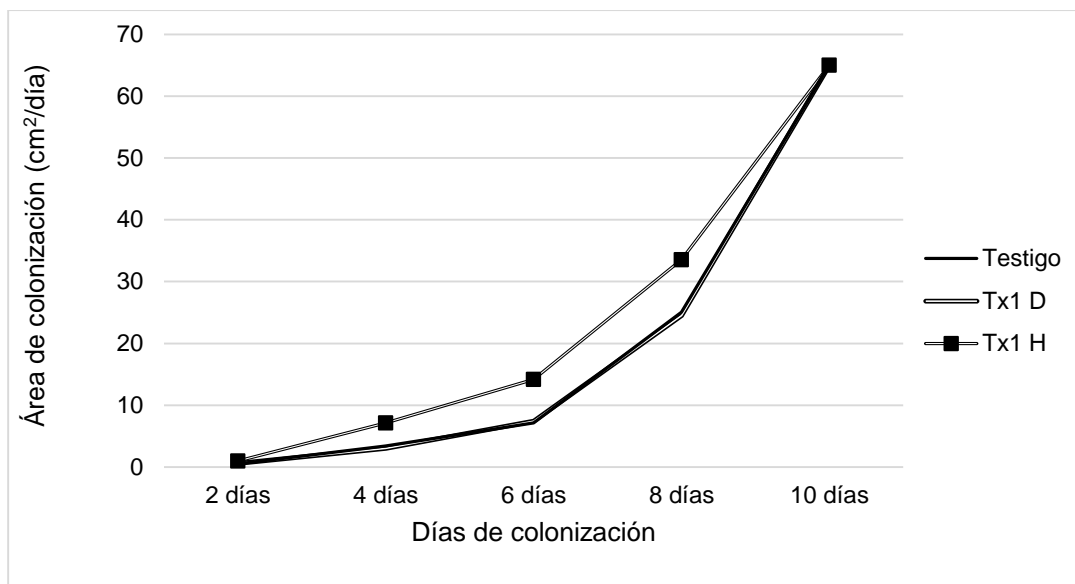


Figura 16. Área de colonización y halo oxidativo de la CP-145 de *Ganoderma lucidum* en el tratamiento Tx1 en comparación con el Testigo a los 10 días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. TX1= ABTS 0.5 mM. D= Área del micelio. H= Área del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 17 se observa el crecimiento de área de la CP-145 en los tratamientos Tx2 (AAS), Tx3 (AAS con ABTS) y el testigo. El halo oxidativo del tratamiento Tx3 abarcó el área de la caja antes que el micelio creciendo a 4.25 cm²/día mientras que el área del micelio de creció a 3.29 cm²/día. Tx2 y el testigo tuvieron la misma área durante todo el crecimiento creciendo a de 3.13 cm²/día.

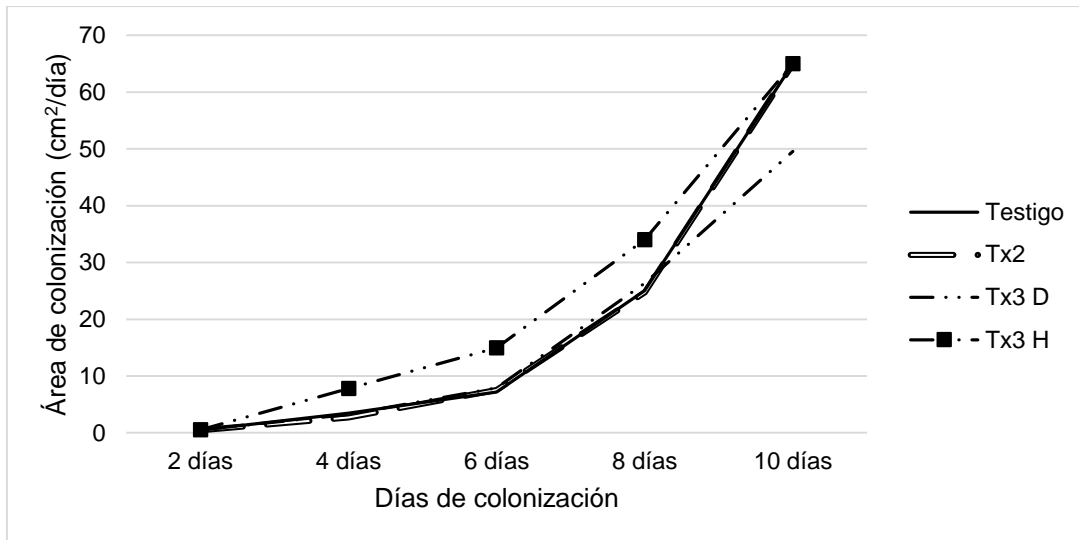


Figura 17. Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en el tratamiento Tx3 en comparación al Testigo y Tx2 a los 10 días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. TX1= ABTS 0.5 mM. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. TX3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. D=Área de colonización del micelio. H= Área de colonización del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 18 se reporta el crecimiento de área de Tx7 donde el halo de oxidación abarcó el área de la caja Petri a los 14 días creciendo 2.65 $\text{cm}^2/\text{día}$, mientras que el micelio de este tratamiento tuvo un área de 2.06 $\text{cm}^2/\text{día}$. El tratamiento Tx6 tuvo un crecimiento de área de 2.59 $\text{cm}^2/\text{día}$. Estos tratamientos inhibieron su crecimiento en comparación con el testigo, teniendo 4 días de diferencia entre estas condiciones.

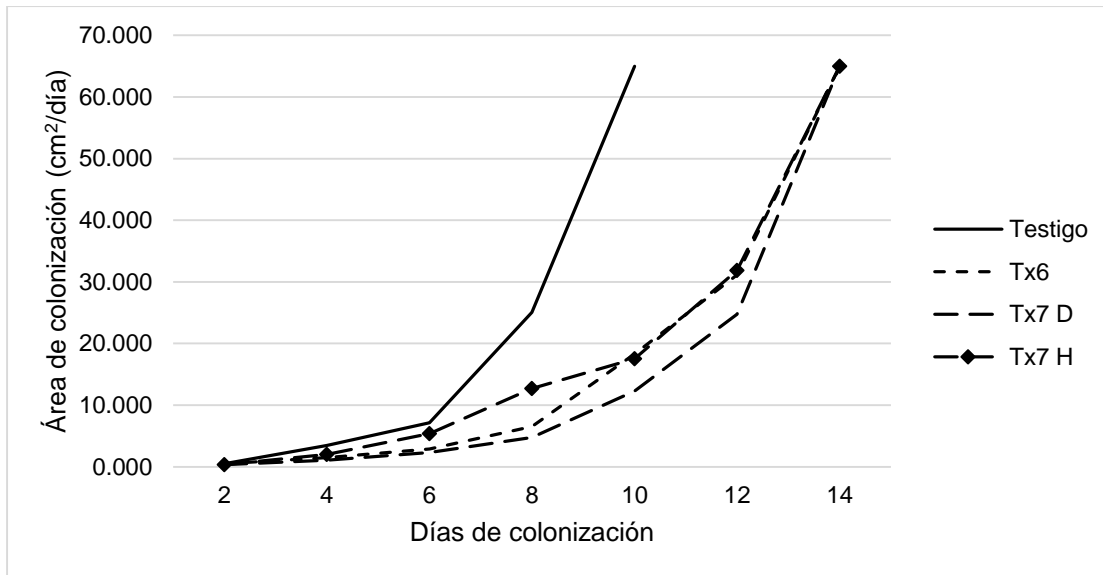


Figura 18. Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en el tratamiento Tx7 en comparación al Testigo y Tx6 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. TX6= Zeolita 5%. TX7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

Al comparar el área de crecimiento de la CP-145 con los tratamientos Tx10 y Tx11 que corresponden a AAS 100 μ M con zeolita y AAS 100 μ M con zeolita adicionado con ABTS. La comparación se hace contra el testigo y los tratamientos Tx2 (AAS) y Tx6 (zeolita 5%) (Fig. 19). El halo oxidativo de tratamiento Tx11 abarcó el área en 16 días a con 3.67 $\text{cm}^2/\text{día}$, mientras que el micelio de este tratamiento colonizó a 3.14 $\text{cm}^2/\text{día}$. El tratamiento Tx10 colonizó en menor tiempo que Tx11, con una diferencia de 4 días a pesar de contener la misma dosis de zeolita creciendo a 4.64 $\text{cm}^2/\text{día}$. Estas condiciones inhibieron el crecimiento de micelio en comparación con el testigo y los tratamientos Tx2 y Tx6.

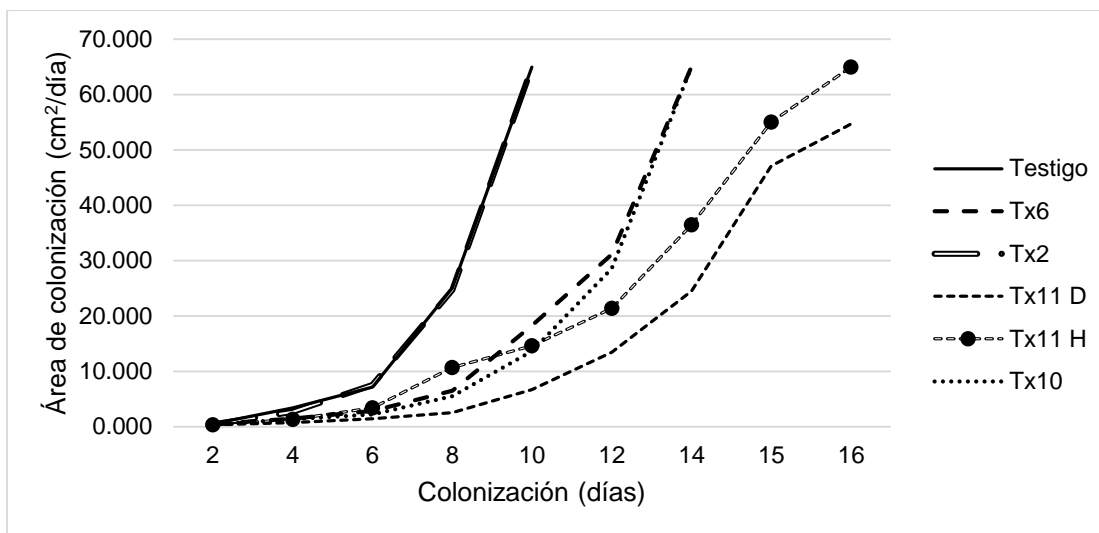


Figura 19. Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* en el tratamiento Tx11 en comparación al Testigo, Tx12, Tx6 y Tx10 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. TX6= Zeolita 5%. TX10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. TX11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

8.2.5 Actividad volumétrica de lacasas usando tres sustratos

El ABTS fue el sustrato donde se obtuvieron los valores significativamente más altos en la determinación de lacasas en comparación con el guaiacol y la siringaldazina en donde se obtuvieron valores menores a 20 U mL⁻¹. Para la cepa CP-145 de *G. lucidum* usando estos tres sustratos, el tratamiento que tuvo los valores significativamente más altos de producción de lacasas fue Tx10 (AAS 100 μ M + zeolita 5%) en comparación con el testigo.

8.2.5.1 ABTS

El uso de AAS 100 μ M adicionado con zeolita al 5% (Tx10) en el hongo *G. lucidum* aumentó la cantidad de lacasas de 3.95 ± 0.29 en el testigo a 34.32 ± 12.95 U mL⁻¹ en el tratamiento Tx10 (Fig. 20). Este aumento represento el 868.86%, seguido del tratamiento Tx11 con un aumento de la actividad enzimática de 27.56 ± 3.78 (Tukey, $\alpha = 0.05$). Seguidos de los tratamientos Tx7, Tx3 y Tx5. Los tratamientos que no mostraron diferencia fueron el testigo y Tx1. Se observa que el AAS si estimulo la

actividad enzimática, sin embargo, los tratamientos con zeolita mostraron mayor diferencia significativa.

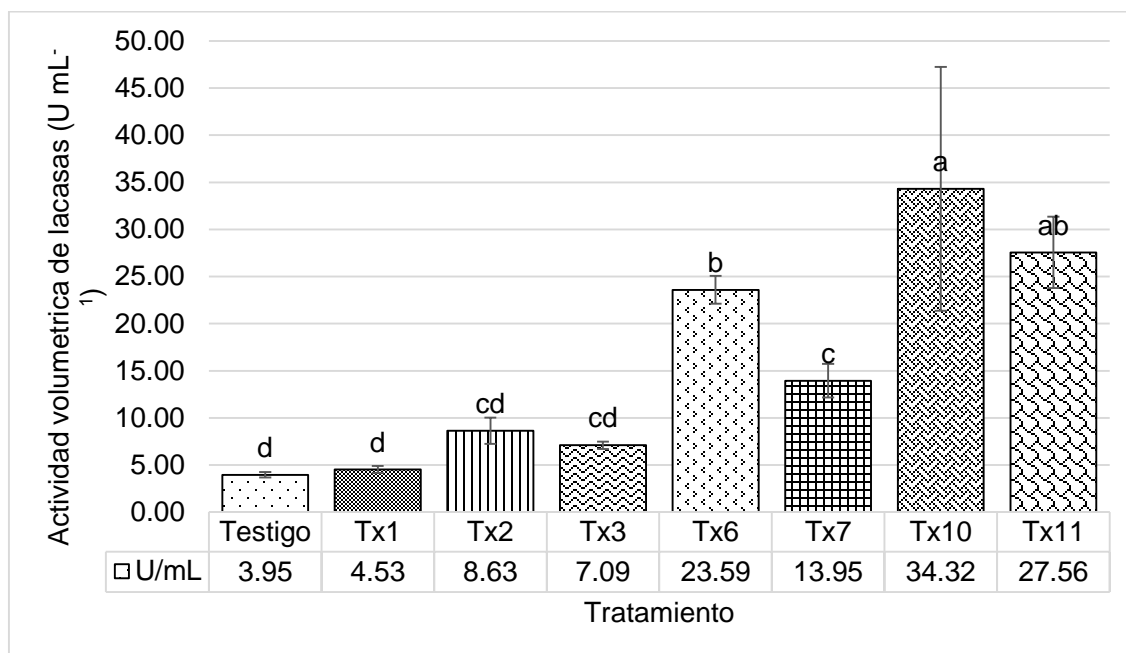


Figura 20. Actividad volumétrica de lacasas de *Ganoderma lucidum* usando ABTS como sustrato enzimático. Testigo= Agar extracto de malta, TX1= ABTS 0.5 mM. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. TX3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. TX6= Zeolita 5%. TX7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. TX10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. TX11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.2.5.2 Guaiacol

En la actividad enzimática de *G. lucidum* usando guaiacol donde se observa que el tratamiento que mostró mayor diferencia significativa (Tukey, $\alpha= 0.05$) fue Tx10 con 4.74 U mL⁻¹ colonizando a los 12 días después de la siembra en comparación con el testigo (7 días) donde se obtuvieron 0.26 U mL⁻¹ significo un 1823% más en la producción de lacasas, el segundo tratamiento con mayor diferencia significativa fue Tx6 con 4.36 U mL⁻¹ aumentando en 1676% la actividad enzimática (Fig. 21). Se observa que en el caso de *Ganoderma* la adición de AAS con zeolita aumenta la actividad enzimática. Las condiciones testigo, Tx1, Tx3, Tx7, Tx10 no mostraron diferencia significativa.

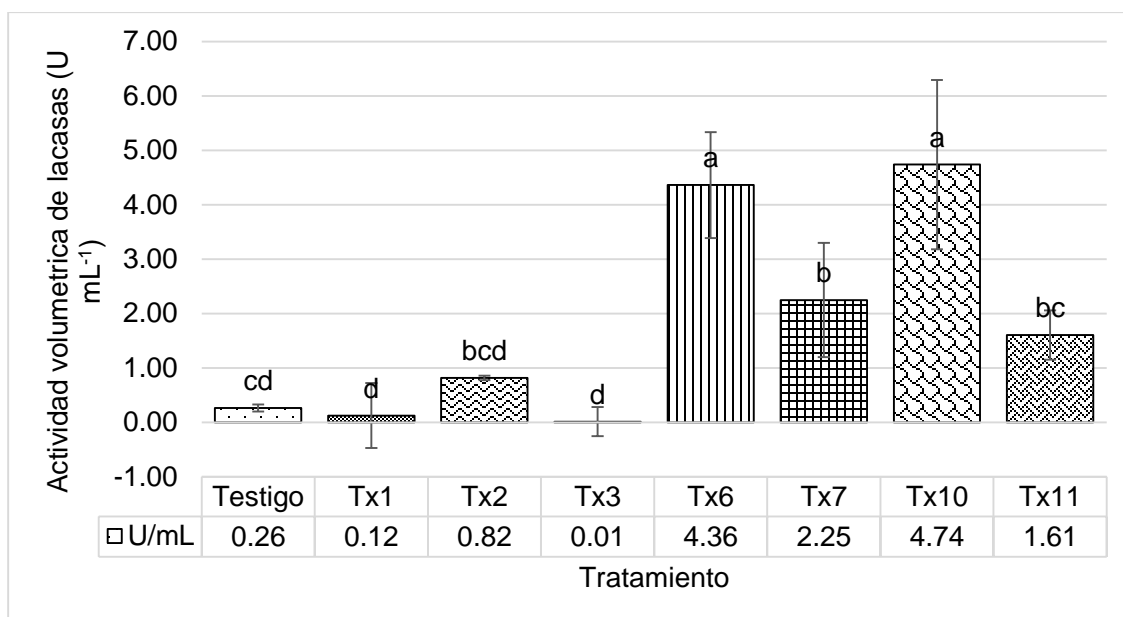


Figura 21. Actividad volumétrica de lacasas de *Ganoderma lucidum* usando guaiacol como sustrato enzimático. Testigo= Agar extracto de malta. TX1= ABTS 0.5 mM. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. TX3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. TX6= Zeolita 5%. TX7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. TX10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. TX11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.2.5.3 Siringaldazina

En el hongo medicinal *G. lucidum* se observa que el tratamiento que mostró los valores significativamente más altos en la producción de lacasas (Tukey, $\alpha= 0.05$) fue el Tx10 con 9.78 U mL⁻¹ colonizando a los 12 días después de la siembra mientras que en el testigo (7 días) se obtuvieron 1.38 U mL⁻¹ lo que representa un aumento del 708%. El segundo tratamiento con los valores significativamente más altos fue el Tx6 con 7.73 U mL⁻¹ lo que significó un aumento del 560% la actividad enzimática. Se observa que en el caso de *G. lucidum* la adición de AAS aumenta la actividad enzimática. El siguiente grupo que mostró diferencia en comparación al testigo fue Tx2 y Tx7 (Figura 22).

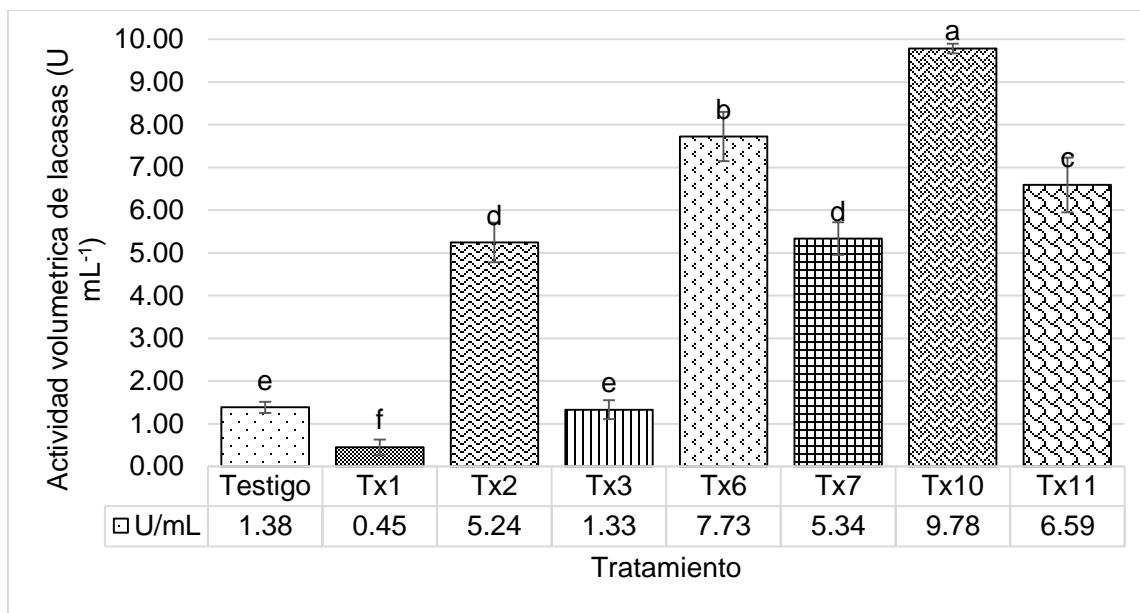


Figura 22. Actividad volumétrica de lacasas de *Ganoderma lucidum* usando siringaldazina como sustrato enzimático. Testigo= Agar extracto de malta. TX1= ABTS 0.5 mM. TX2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. TX3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM, TX6= Zeolita 5%. TX7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. TX10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. TX11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.3 Fisiología de la CP-753 de *P. ostreatus* usando AAS, zeolita y ABTS

El crecimiento de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* a tiempo final de colonización en medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA) adicionado con los inductores AAS 100 μ M y con zeolita al 3 y 5% (Fig. 23). La morfología del micelio varió dependiendo del tratamiento. *P. ostreatus* presentó crecimiento regular en el testigo y los tratamientos Tx2, Tx6, y Tx10, mientras que en los tratamientos Tx1, Tx3, Tx7 y Tx11 se presentó un crecimiento irregular, en los tratamientos con zeolita se observó que el micelio era más abundante y algodonoso.

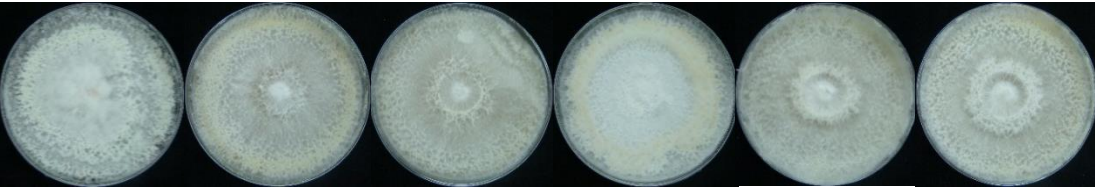
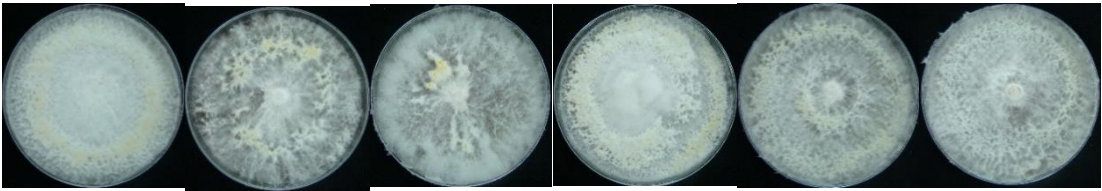
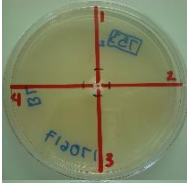

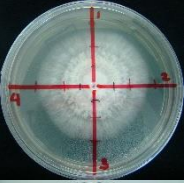
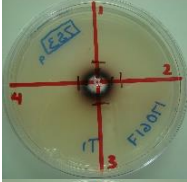
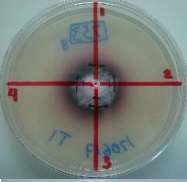
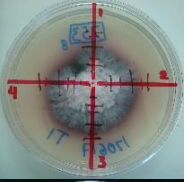
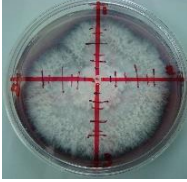



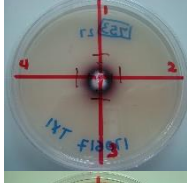
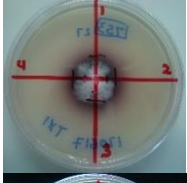
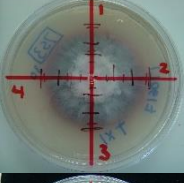
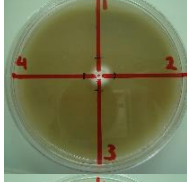
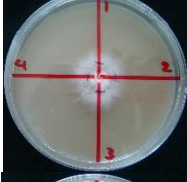

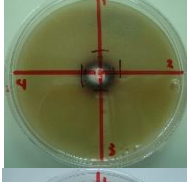
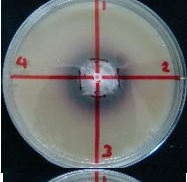
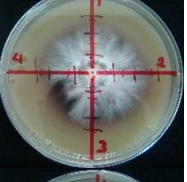

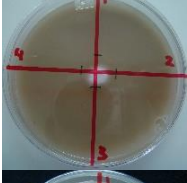

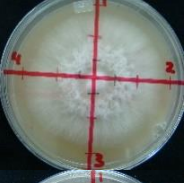
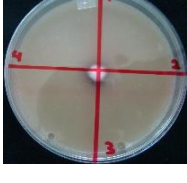
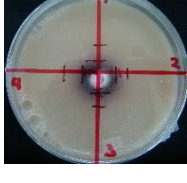
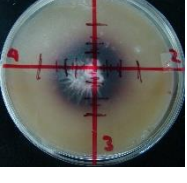
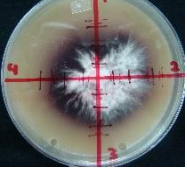
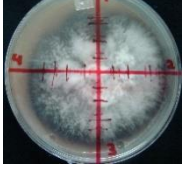
Cepa	Tratamiento						
CP-753	EMA	EMA + Z3%	EMA + Z5%	EMA + AAS 100µM	EMA + AAS 100µM + Z3%	EMA + AAS 100µM + Z5%	
							
CP-753	EMA ABTS mM	+ 0.5 mM	EMA + Z3% + ABTS 0.5 mM	EMA + Z5% + ABTS 0.5 mM	EMA + AAS 100µM + ABTS 0.5 mM	EMA + AAS 100µM + Z3% + ABTS 0.5 mM	EMA + AAS 100µM + Z5% + ABTS 0.5 mM
							

Figura 23. Crecimiento de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA) adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 µM y substrato enzimático ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 0.5 mM. Fuente: Elaboración propia.

En la cepa CP-753 de *P. ostreatus* los tratamientos que colonizaron en 7 días fueron Testigo, Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5, Tx6, Tx8 y Tx10. Los tratamientos donde el micelio coloniza a los 11 días fueron Tx7, Tx9 y Tx11 (Fig. 24).

		Tiempo (días)				
Clave		3	5	7	9	11
Testigo						
Tx1						
Tx2						
Tx3						
Tx4						
Tx5						
Tx6						
Tx7						

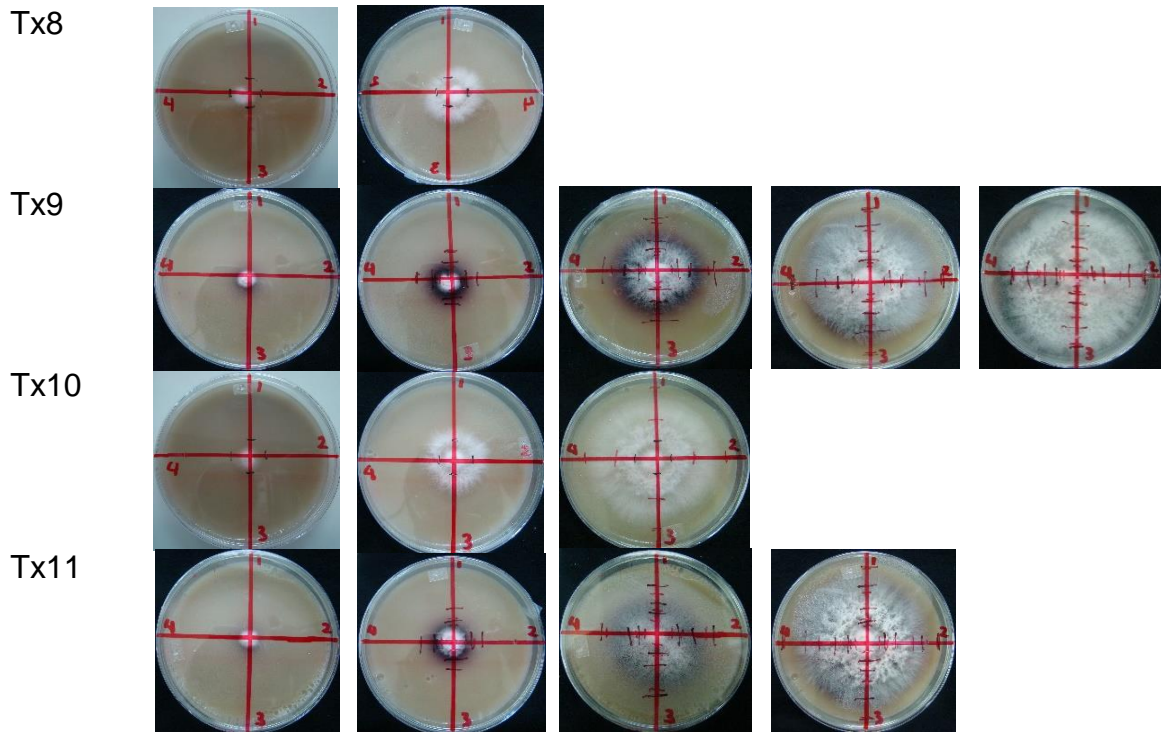


Figura 24. Cinética de crecimiento de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en diferentes condiciones. Testigo= Agar extracto de malta. Tx1= ABTS 0.5 mM. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. Tx4= Zeolita 3%. Tx5= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM. Tx6= Zeolita 5%. Tx7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. Tx8= AAS 100 μ M + zeolita 3%. Tx9= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM. Tx10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. Tx11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.3.1 pH inicial y final

La figura 25 muestra el pH inicial y final que hubo entre todas las condiciones. En todos los tratamientos el pH disminuyó al final de la colonización debido a que el hongo acidificó el medio de cultivo. También se observa que la adición de ABTS no altera el pH de los medios de cultivo. El testigo (EMA) tuvo un pH de 5.41 ± 0.02 que cambió a 5.41 ± 0.07 . En el caso de Tx1 (EMA con ABTS) el pH inicial fue de 5.52 ± 0.05 y el final de 5.06 ± 0.02 . En el tratamiento AAS 100 μM con y sin ABTS el pH inicial fue de 5.52 ± 0.05 y 5.10 ± 0.05 respectivamente donde el pH final disminuyó a 5.66 ± 0.21 y 5.15 ± 0.03 .

El pH inicial de 3% de zeolita con y sin ABTS fue de 7.18 ± 0.04 y 7.19 ± 0.06 respectivamente, estos valores de pH disminuyeron a 6.69 ± 0.05 y 6.87 ± 0.24 . Los tratamientos con 5% de zeolita con y sin ABTS (Tx6 y Tx7) el pH inicial fue de 7.74 ± 0.13 para Tx6 y un pH inicial de 7.71 ± 0.4 para Tx7, el pH de estas condiciones disminuyó a 6.99 ± 0.099 en Tx6 y 7.03 ± 0.04 en Tx7.

Finalmente, en la combinación de AAS 100 μM con zeolita al 3% el pH inicial en Tx8 y Tx9 fue de 7.30 ± 0.04 y 7.16 ± 0.02 , disminuyendo a tiempo final 6.89 ± 0.09 y 6.90 ± 0.10 . En el tratamiento AAS 100 μM con zeolita al 5% con y sin ABTS el pH inicial de Tx10 y Tx11 fue de 7.79 ± 0.02 y 7.87 ± 0.04 , respectivamente el cual después de la colonización bajó a 7.09 ± 0.20 y 7.07 ± 0.09 .

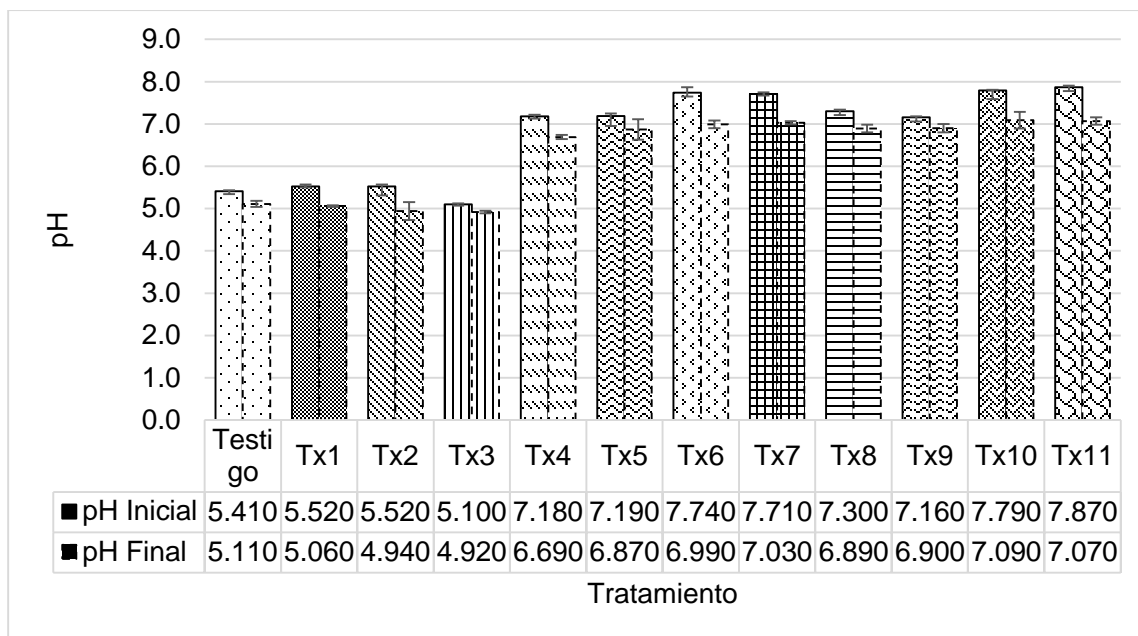


Figura 25. pH inicial y final de *Pleurotus ostreatus* en las diferentes condiciones. Testigo= Agar extracto de malta. Tx1= ABTS 0.5 mM. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. Tx4= Zeolita 3%. Tx5= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM. Tx6= Zeolita 5%. Tx7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. Tx8= AAS 100 μ M + zeolita 3%. Tx9= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM. Tx10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. Tx11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.3.2 Cuantificación de proteínas

En la figura 26 se muestra la cantidad de proteínas de la CP-753 de *P. ostreatus* en EMA y suplementados donde el testigo produjo $26.81 \pm 17.89 \mu\text{g mL}^{-1}$. Mientras que en Tx2 (AAS 100 μ M) disminuyó la cantidad de proteína en 40% con $16.02 \pm 4.76 \mu\text{g mL}^{-1}$. En el tratamiento Tx4 (zeolita 3%) se obtuvieron $4.65 \mu\text{g mL}^{-1}$ disminuyendo la cantidad de proteínas en 82% en comparación con el testigo. El tratamiento Tx6 (zeolita 5%) produjo la cantidad de proteínas de $30.77 \pm 1.44 \mu\text{g mL}^{-1}$ lo que represento un aumento del 14% en comparación con el testigo. Finalmente, los tratamientos donde se usaron los indicadores AAS 100 μ M y zeolita al 3 y 5% (Tx8 y Tx10) se obtuvieron 27.85 ± 2.89 y $20.15 \pm 6.91 \mu\text{g mL}^{-1}$. Siendo Tx8 donde aumentó en 4% la cantidad de proteínas en comparación con el testigo y Tx10 disminuyó en 24% la cantidad de proteínas.

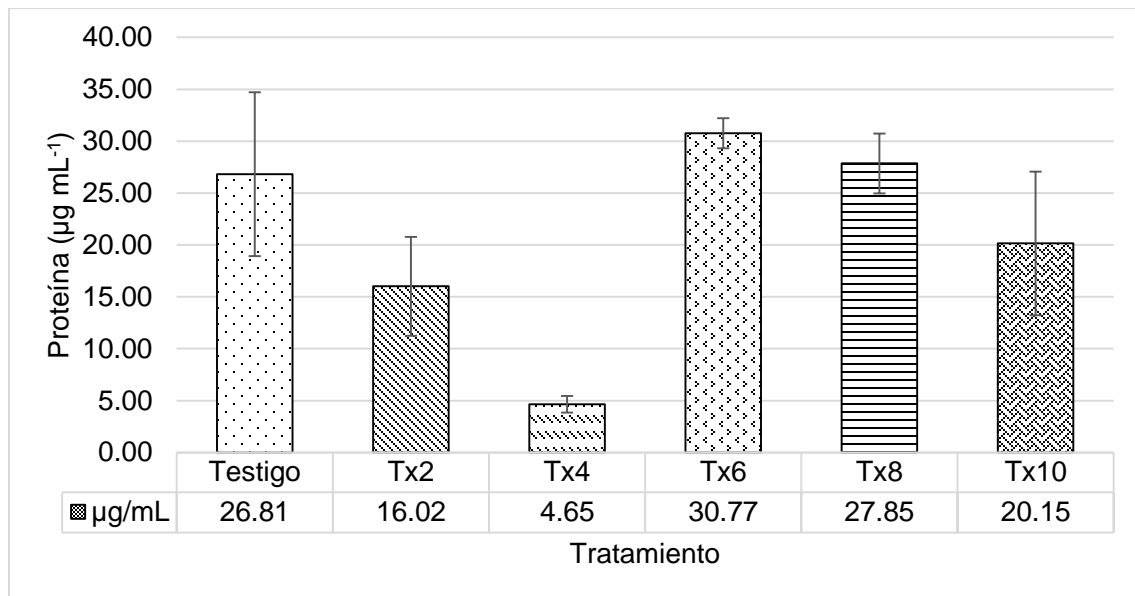


Figura 26. Cuantificación de proteínas de *Pleurotus ostreatus* en las diferentes condiciones. Testigo= Agar extracto de malta. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 µM. Tx4= Zeolita 3%. Tx6= Zeolita 5%. Tx8= AAS 100 µM + zeolita 3%. Tx10= AAS 100 µM + zeolita 5%. Fuente: Elaboración propia.

8.3.3 Velocidad de colonización

Se evaluó la velocidad de crecimiento de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en medios semisólidos suplementados con AAS y zeolita y utilizando como indicador el ABTS 0.5 mM para observar de manera cualitativa la presencia de lacasas. Donde se evaluó la velocidad de crecimiento del micelio y del halo de oxidación.

En la figura 27 se hace una comparación de la velocidad de crecimiento de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en medio EMA (testigo) en comparación con el tratamiento Tx1 (EMA con ABTS) donde la velocidad de halo oxidativo fue mayor al crecimiento de la cepa creciendo en el testigo, ambas condiciones colonizaron a los 7 días a una velocidad de 0.57 cm/día en promedio.

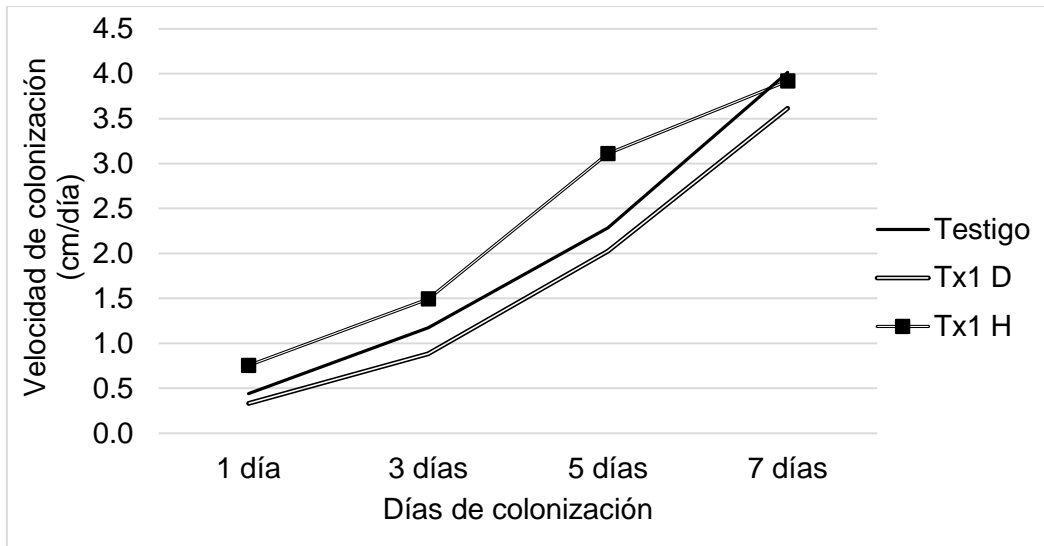


Figura 27. Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y halo oxidativo en el tratamiento Tx1 en comparación al testigo a los 7 días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx1= ABTS 0.5 mM. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 28 se reporta la velocidad de crecimiento de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* y el halo oxidativo creciendo en el tratamiento Tx3 (AAS con ABTS) en comparación con el testigo (EMA) y Tx2 (AAS) donde se observa que no hubo diferencia en cuanto a la velocidad de crecimiento del micelio de la cepa en el testigo, Tx2 y Tx3 y el halo oxidativo de Tx3 colonizando todas las condiciones en 7 días a una velocidad de 0.57 cm/día.

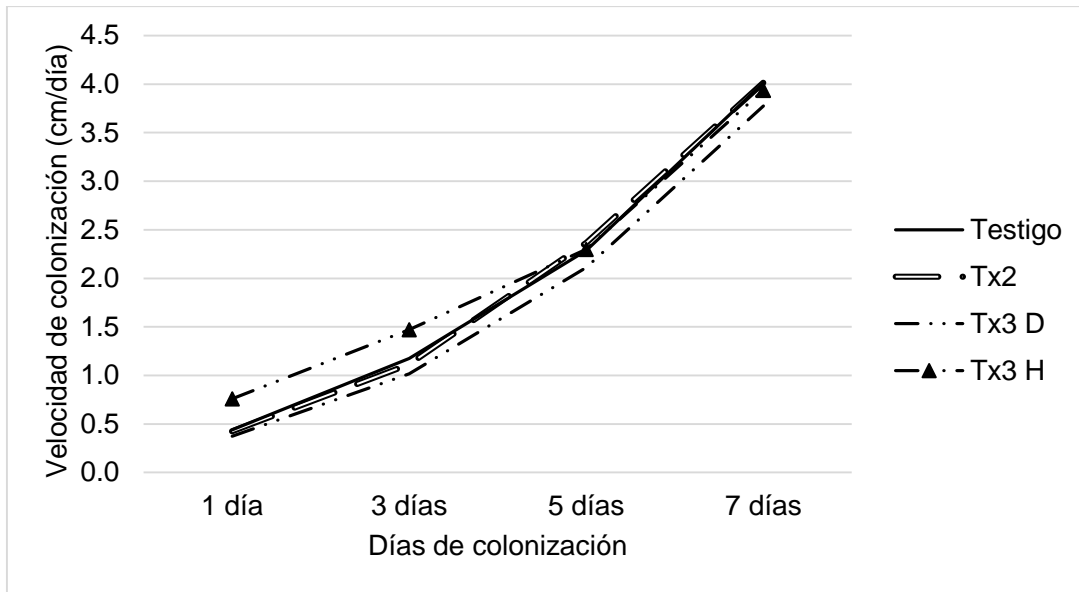


Figura 28. Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y halo oxidativo en el tratamiento Tx3 en comparación al testigo y Tx2 a los 7 días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

Se realizó una comparación de la velocidad de colonización del micelio de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en el tratamiento Tx5 (zeolita 3% con ABTS) en comparación al testigo (EMA) y Tx4 (zeolita 3 %). Donde todas las condiciones colonizaron al mismo tiempo (7 días) a una velocidad promedio de 0.57 cm/día. En la figura 29 se observa que Tx4 colonizó de manera más rápida en comparación al halo de oxidación de Tx5, así como el micelio de este tratamiento y el testigo. Sin embargo, no hubo diferencia en cuanto al tiempo que colonizo la cepa.

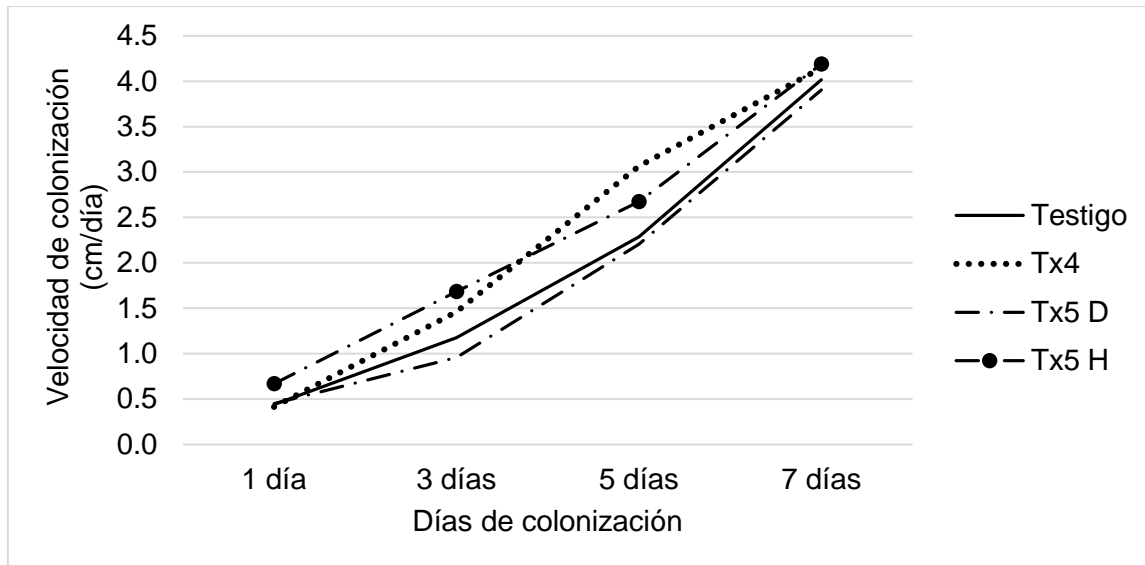


Figura 29. Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* y halo oxidativo en el tratamiento Tx5 en comparación al testigo y Tx4 a los 7 días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx4= Zeolita 3%. Tx5= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM. D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

Se realizó la comparación de la velocidad de crecimiento de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en el tratamiento Tx6 (Zeolita 5% con ABTS) en comparación al testigo y el tratamiento Tx7 donde se utilizó zeolita al 5%. Se observó una diferencia entre el tiempo de colonización de estos tratamientos. El testigo y el tratamiento Tx6 colonizaron a los 7 días a una velocidad promedio de 0.57 cm/día, se observa en la figura 30 que el Tx6 logró aumentar la velocidad de crecimiento en comparación al testigo y a Tx7. El tratamiento Tx7 tuvo una velocidad promedio de 0.36 cm/día colonizando a los 11 días en comparación a Tx6 y el testigo, donde se muestra un menor crecimiento en comparación a estas dos condiciones.

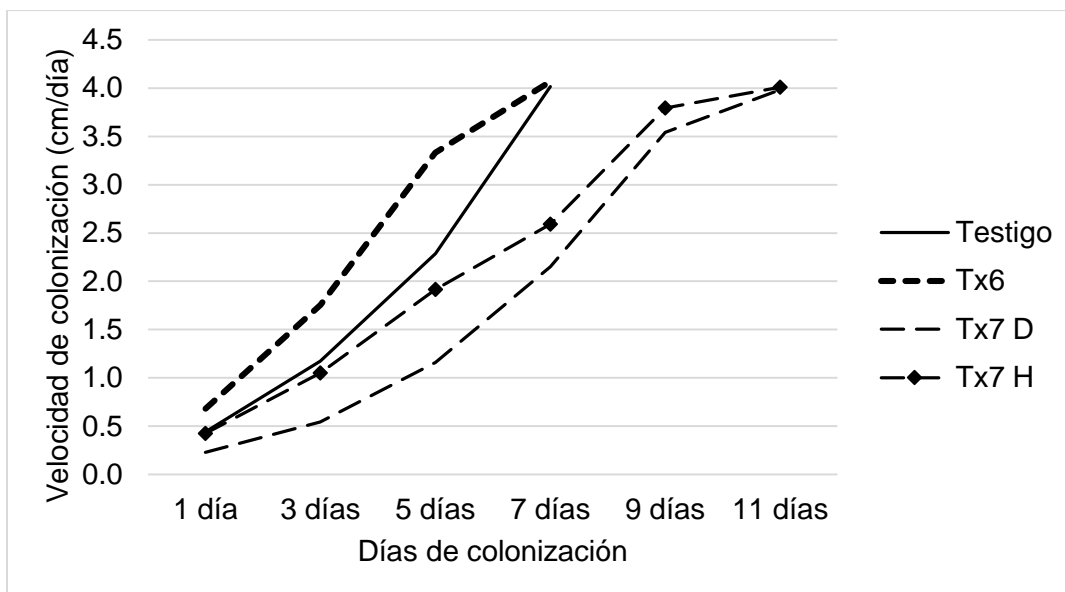


Figura 30. Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y halo oxidativo en el tratamiento Tx7 en comparación al testigo y Tx6 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx6= Zeolita 5%. Tx7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 31 se hace una comparación de la velocidad de crecimiento de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* y el halo oxidativo del tratamiento Tx9 donde se utilizó AAS 100 μ M con zeolita al 3% con ABTS en comparación con el testigo y los tratamientos Tx2 (AAS 100 μ M), Tx4 (zeolita 3%) y Tx8 (AAS 100 μ M con zeolita al 3%). El halo de oxidación del tratamiento Tx9 colonizó a los 11 días en el medio de cultivo a una velocidad de 0.36 cm/día. El testigo, Tx2, Tx4 y Tx8 colonizaron en menor tiempo a una velocidad promedio de 0.57 cm/día. Entre estos tratamientos se observa que los tratamientos Tx4 y Tx8 tuvieron una mayor velocidad de crecimiento en comparación a Tx2 y el testigo. Estas diferencias se observan a pesar de que estos tratamientos colonizaron el mismo día.

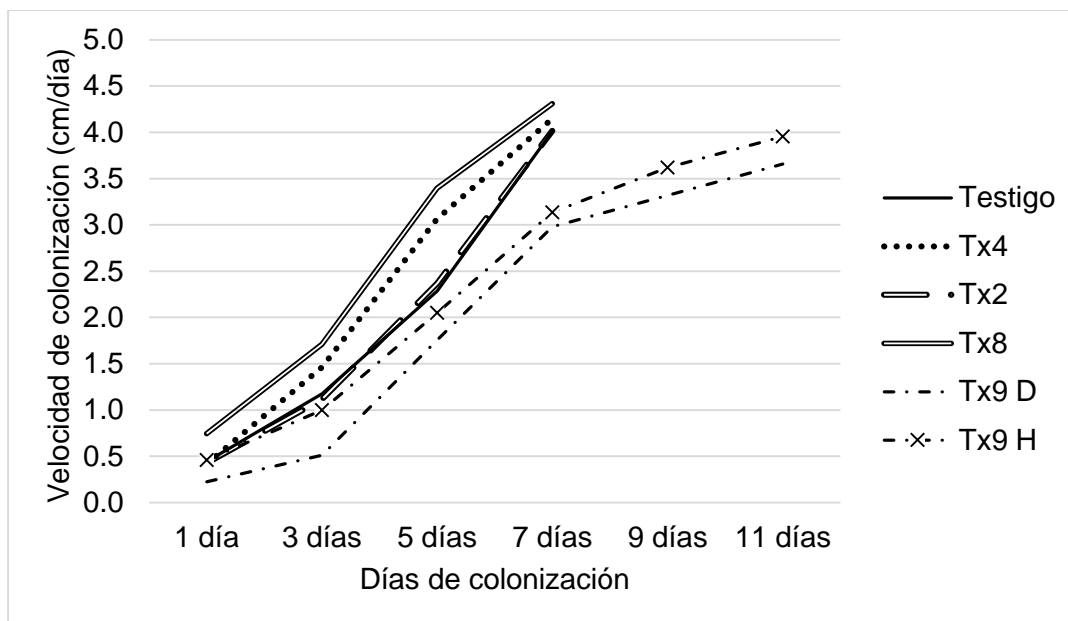


Figura 31. Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y halo oxidativo del tratamiento Tx9 en comparación al testigo, Tx2, Tx4 y Tx8 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx4= Zeolita 3%. Tx8= AAS 100 μ M + zeolita 3%. Tx9= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM. D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 32 se hace una comparación de la velocidad de crecimiento de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* y del halo de colonización en el tratamiento Tx11 (AAS 100 μ M adicionada con zeolita al 5% y ABTS) en comparación al testigo (EMA) y los tratamientos Tx2 (AAS 100 μ M), Tx6 (zeolita al 5%) y Tx10 (AAS 100 μ M adicionada con zeolita al 5%). El tratamiento Tx11 tardó 11 días en colonizar el medio, en esta condición se observa que el halo de oxidación fue mayor que el crecimiento de micelio. Sin embargo, la velocidad de colonización del tratamiento Tx10 fue en menor tiempo (7 días) junto al testigo y los tratamientos Tx2 y Tx6. Los tratamientos Tx6 y Tx10 presentaron una mayor velocidad de crecimiento en comparación a el testigo y Tx2.

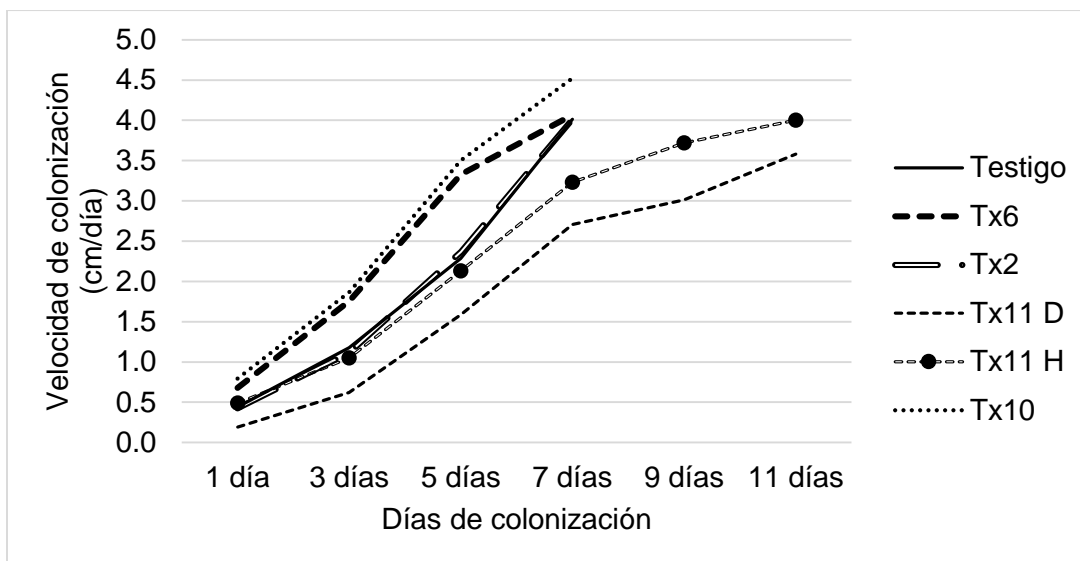


Figura 32. Velocidad de colonización de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* y halo oxidativo en el tratamiento Tx11 en comparación al testigo, Tx2, Tx6 y Tx11 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. Tx11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. D= Diámetro del micelio. H= Diámetro del halo oxidativo.

8.3.4 Área de colonización y halo de oxidación (cm^2)

En la figura 33 se observa la comparación del área de colonización de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* y el área del halo oxidativo en el tratamiento Tx1 (EMA con ABTS) en comparación al testigo. Ambas condiciones colonizaron en 9 días, siendo el halo oxidativo el que abarcó mayor área durante el crecimiento. El área del micelio de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en el testigo y Tx1 colonizaron de la misma manera, por lo que no hubo diferencia entre su crecimiento, ambas crecieron a una velocidad de $3.13 \text{ cm}^2/\text{día}$. Mientras que el halo oxidativo tuvo un crecimiento de área de $4.19 \text{ cm}^2/\text{día}$.

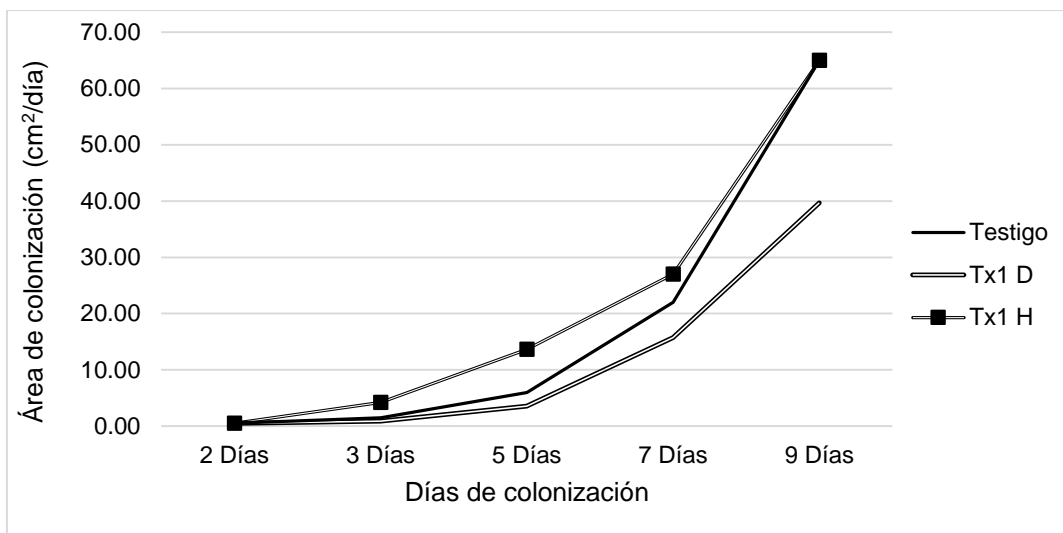


Figura 33. Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento Tx1 en comparación al testigo a los 9 días de colonización. Testigo= Agar extracto de malta. Tx1= ABTS 0.5 mM. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 34 se hace una comparación del área de colonización y área del halo oxidativo del tratamiento Tx3 (AAS 100 μ M con ABTS) en comparación al testigo (EMA) y el tratamiento Tx2 (AAS 100 μ M). Se observa que todas las condiciones colonizaron el medio de cultivo en 9 días a una velocidad de 7.2 $\text{cm}^2/\text{día}$. Donde el halo de oxidación de Tx3 abarcó mayor área en comparación al área del micelio de la cepa con una diferencia de 23 cm^2 . En la figura también se observa que no hubo diferencia entre la velocidad del testigo y Tx2 y el halo oxidativo de Tx3.

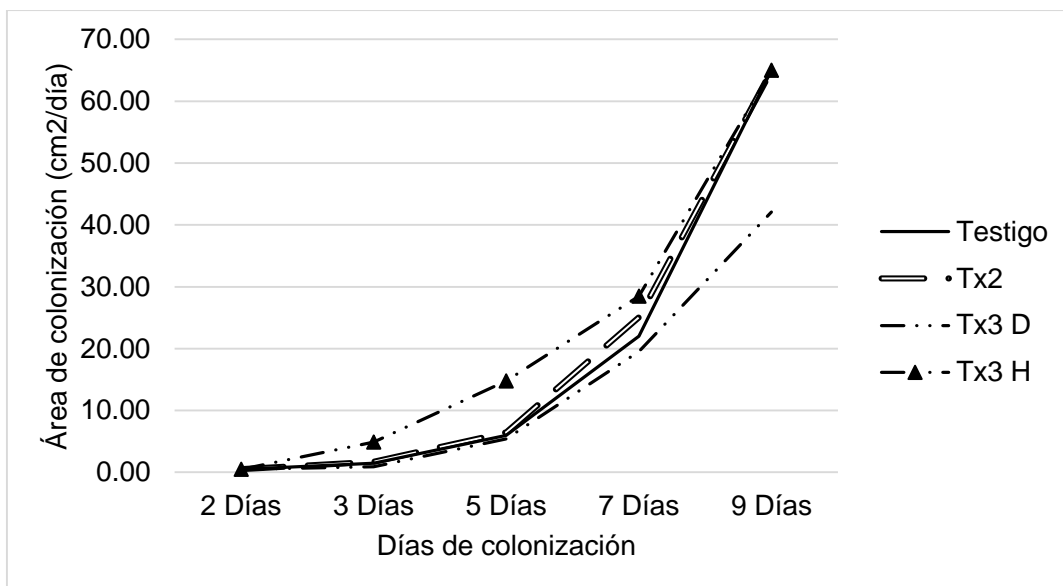


Figura 34. Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento Tx3 en comparación al testigo y Tx2 a los 9 días de colonización. Testigo= Agar extracto de malta. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En el caso del área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en el tratamiento Tx5 (zeolita 3% con ABTS) en comparación al testigo (EMA) y Tx4 (zeolita 3%) se puede observar en la figura 35 que no hubo diferencia entre los días que tardó en colonizar el micelio y el halo oxidativo. Todas las condiciones colonizaron a los 9 días a 7.2 cm²/día en promedio. El tratamiento donde se observa un área mayor de crecimiento durante la cinética de crecimiento fue Tx4 en comparación al testigo. En el caso del área de colonización de Tx5 se muestra que fue menor en comparación del testigo.

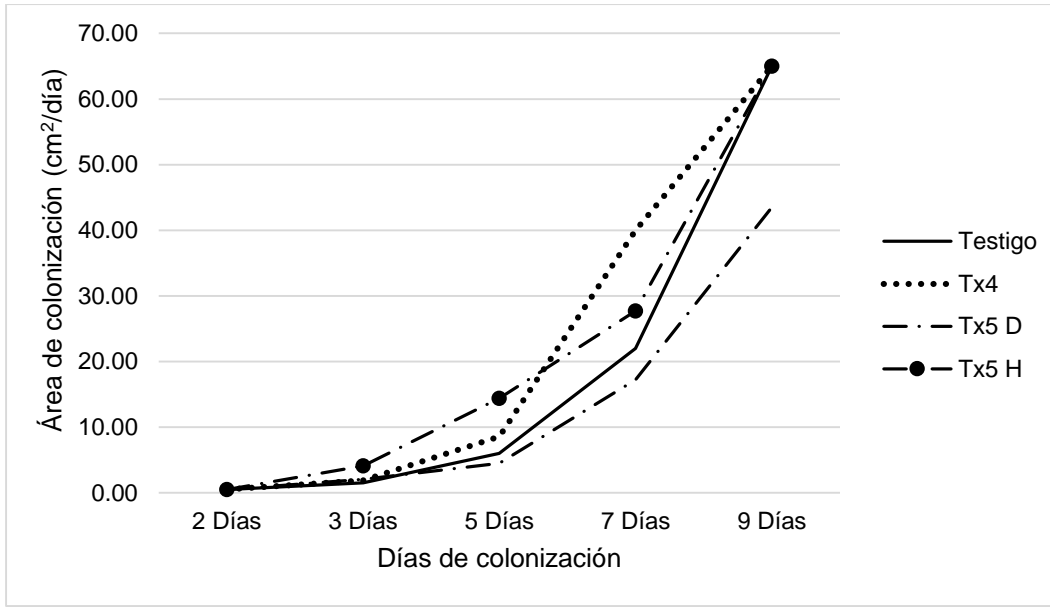


Figura 35. Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento Tx5 en comparación al testigo y Tx4 a los 9 días de colonización. Testigo= Agar extracto de malta. Tx4= Zeolita 3%. Tx5= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 36 se muestra la comparación del área de colonización de halo oxidativo y micelio de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en el tratamiento Tx7 (Zeolita 5% con ABTS) en comparación al testigo (EMA) y Tx6 (Zeolita 5%). El halo oxidativo de Tx7 colonizó el área total del medio de cultivo a los 11 días creciendo 5.9 cm²/día mientras que el micelio solo llegó a colonizar 29.48 cm² al momento de obtener la muestra. Para las demás condiciones el crecimiento en el testigo y Tx6 fue de 7.22 cm²/día. Se observa que el crecimiento de la cepa en el tratamiento Tx6 tuvo un área de crecimiento mayor en comparación al testigo. También se muestra que el uso de zeolita 5% con ABTS inhibió el crecimiento del hongo.

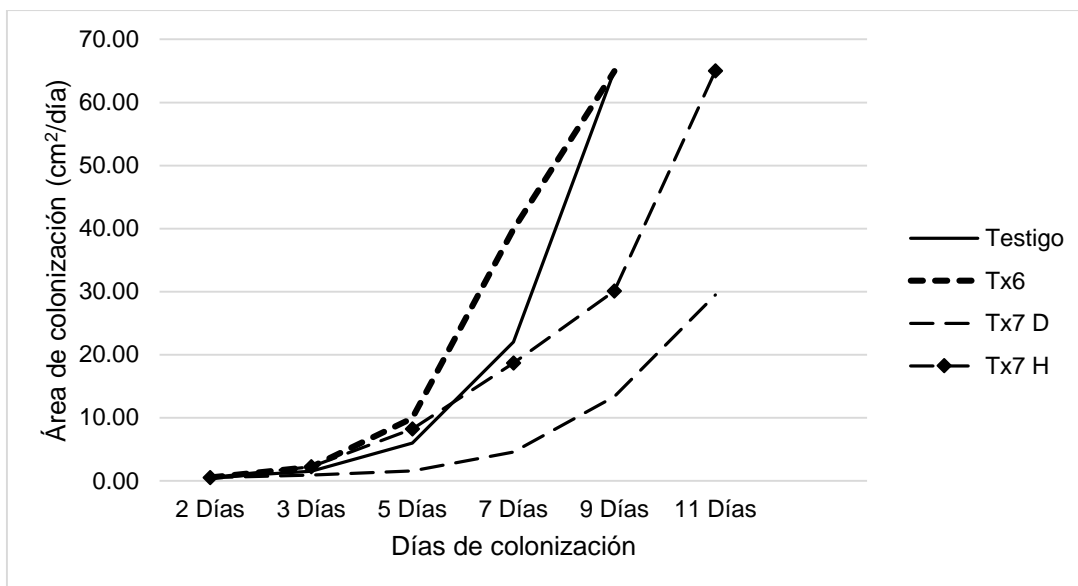


Figura 36. Área de colonización de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento Tx7 en comparación al testigo y Tx6 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx6= Zeolita 5%. Tx7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 37 se muestra la comparación de área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en el tratamiento Tx9 (AAS 100 μ M y zeolita 3% con ABTS) en comparación al testigo (EMA), Tx2 (AAS 100 μ M), Tx4 (zeolita 3%) y Tx8 (AAS 100 μ M y zeolita 3%). El testigo y los tratamientos Tx2, Tx4 y Tx8 colonizaron a los 9 días. Mientras que el halo oxidativo del tratamiento Tx9 le tomó 4 días más en colonizar en comparación al testigo junto al micelio de la CP-753. Se muestra que el tratamiento Tx2 y Tx4 lograron aumentar el área de crecimiento en comparación al testigo y Tx8 que colonizaron al mismo tiempo. Mientras que el área de colonización del micelio en el tratamiento Tx9 fue menor que en el resto de las condiciones.

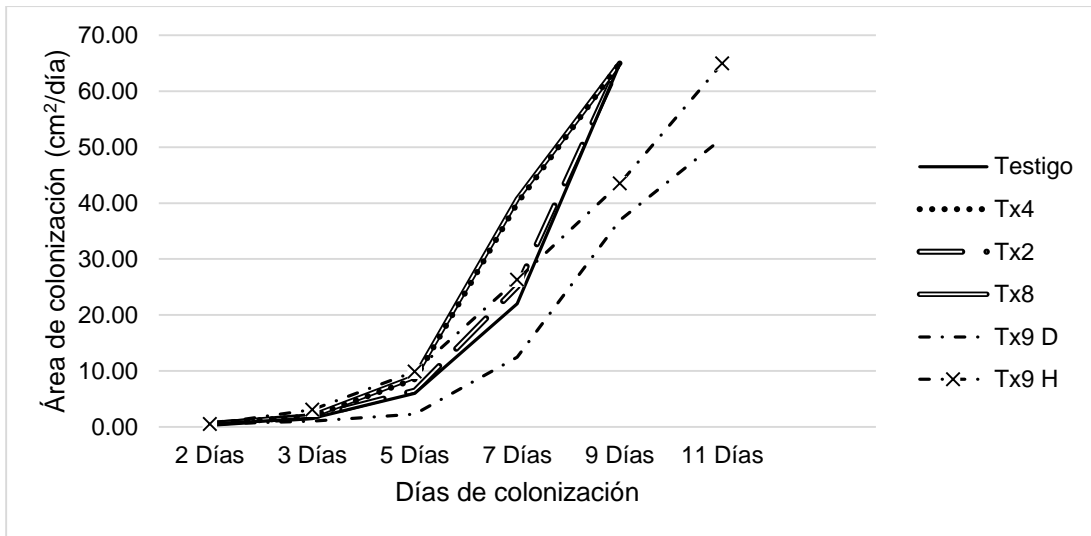


Figura 37. Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento Tx9 en comparación al testigo, Tx2, Tx4 y Tx8 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx4= Zeolita 3%. Tx8= AAS 100 μ M + zeolita 3%. Tx9= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 38 se observa el área de colonización del halo oxidativo y crecimiento de colonia de la cepa CP-753 de *P. ostreatus* en el tratamiento Tx11 (AAS 100 μ M con zeolita 5% y ABTS) en comparación con el testigo (EMA), Tx2 (AAS 100 μ M), Tx6 (zeolita 5%) y Tx10 (AAS 100 μ M con zeolita 5%). El halo oxidativo del tratamiento Tx11 tardó 11 días en colonizar en comparación al resto de los tratamientos, los cuales colonizaron en 7 días. Se observa que los tratamientos Tx16 y Tx10 tuvieron un aumento en el área de colonización durante la cinética de crecimiento en comparación al testigo y Tx2 lo cuales mostraron un crecimiento de área similar.

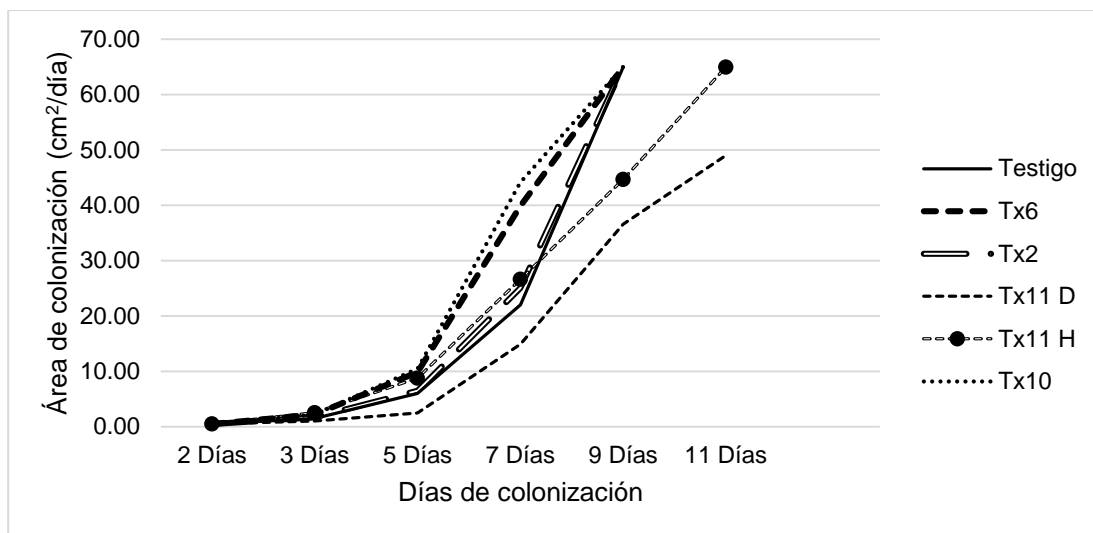


Figura 38. Área de colonización y halo oxidativo de la cepa CP-753 de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento Tx11 contra testigo, Tx2, Tx6 y Tx10 a los diferentes días de crecimiento. Testigo= Agar extracto de malta. Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M. Tx6= Zeolita 5%. Tx10= AAS 100 μ M + zeolita 5%. Tx11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. D= Área de micelio. H= Área de halo oxidativo. Fuente: Elaboración propia.

8.3.5 Actividad volumétrica de lacasas usando tres sustratos

8.3.5.1 ABTS

El tratamiento que tuvo los valores significativamente más altos (Tukey, $\alpha = 0.05$) en *P. ostreatus* fue Tx6 con 237.86 U mL⁻¹ colonizando a los 7 días después de la siembra en comparación con el Testigo (7 días) donde se obtuvieron 18.14 U mL⁻¹ aumentando en 1311% la producción de lacasas, el segundo grupo con valores significativamente mayores fue Tx10 y Tx11 con 159.52 y 158.56 U mL⁻¹ aumentando en 876% la actividad enzimática (Figura 39). En el caso de *Pleurotus* la adición de AAS disminuye la actividad enzimática.

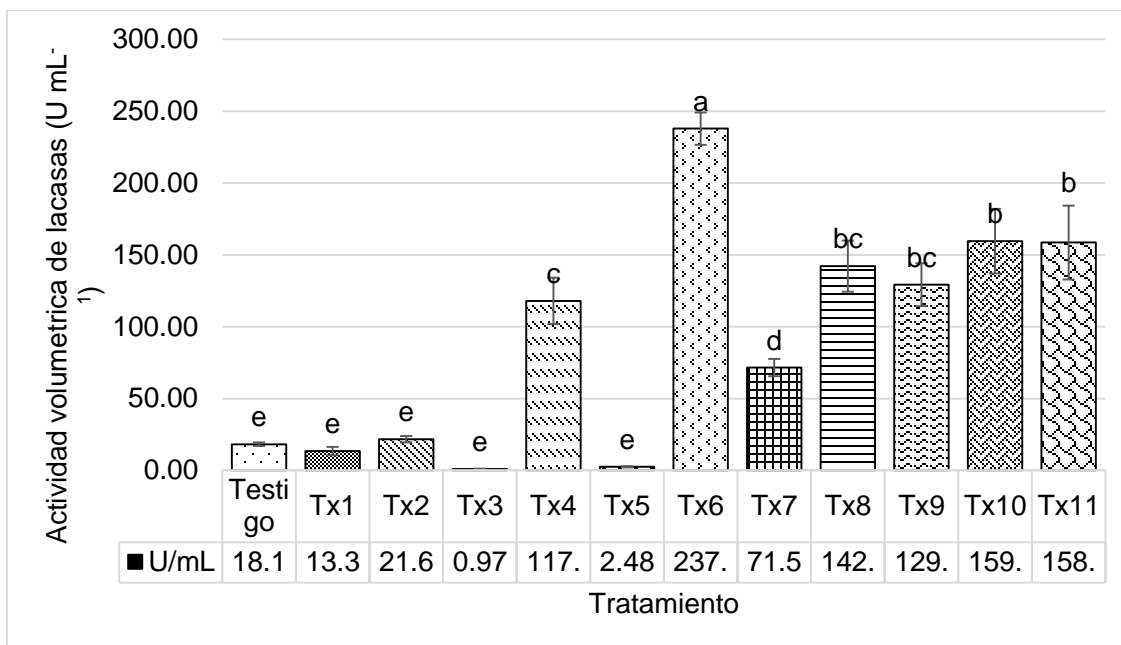


Figura 39. Actividad volumétrica de lacasas de *Pleurotus ostreatus* usando ABTS como sustrato enzimático. Testigo= Agar extracto de malta, Tx1= ABTS 0.5 mM, Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M, Tx3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM, Tx4= Zeolita 3%, Tx5= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM, Tx6= Zeolita 5%, Tx7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM, Tx8= AAS 100 μ M + zeolita 3%, Tx9= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM, Tx10= AAS 100 μ M + zeolita 5%, Tx11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.3.5.2 Guaiacol

En el caso de *P. ostreatus* la actividad volumétrica de lacasas en medios semisólidos adicionados con inductores, usando como sustrato enzimático guaiacol se observa que el tratamiento que mostró mayor diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$) fue Tx10 con 18.24 U mL⁻¹ colonizando a los 7 días después de la siembra en comparación con el testigo (7 días) donde se obtuvieron 0.97 U mL⁻¹ aumentando en 1884% la producción de lacasas, el segundo tratamiento con mayor diferencia significativa fue Tx6 y Tx11 con 16.49 y 16.62 U mL⁻¹ aumentando en 1700% la actividad enzimática (figura 40).

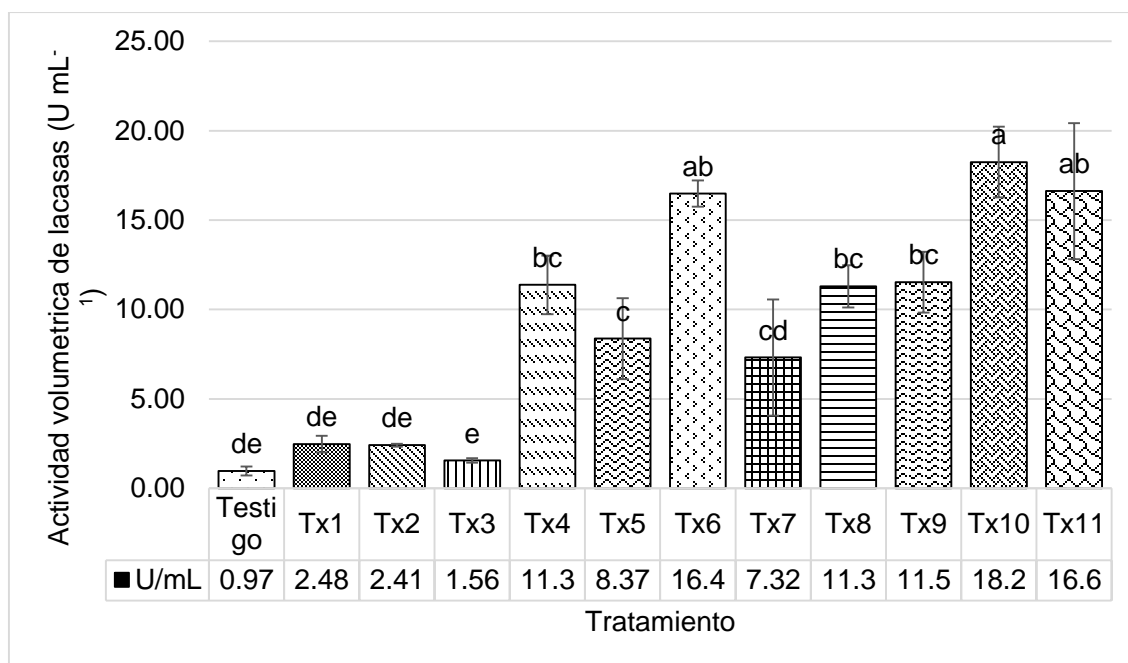


Figura 40. Actividad volumétrica de lacasas de *Pleurotus ostreatus* usando guaiacol como sustrato enzimático. Testigo= Agar extracto de malta, Tx1= ABTS 0.5 mM, Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M, Tx3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM, Tx4= Zeolita 3%, Tx5= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM, Tx6= Zeolita 5%, Tx7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM, Tx8 = AAS 100 μ M + zeolita 3%, Tx9= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM, Tx10= AAS 100 μ M + zeolita 5%, Tx11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

8.3.5.3 Siringaldazina

En el caso de *P. ostreatus* se observa que el tratamiento que mostró los valores significativamente más altos (Tukey, $\alpha=0.05$) fue Tx4 con 10.14 U mL^{-1} colonizando a los 7 días después de la siembra en comparación con el testigo (7 días) donde se obtuvieron 5.05 U mL^{-1} aumentando en 200% la producción de lacasas, el segundo tratamiento con los valores significativamente más altos fue Tx5 y Tx8 con 9.54 y 9.58 U mL^{-1} aumentando en 189% la actividad enzimática (Figura 41).

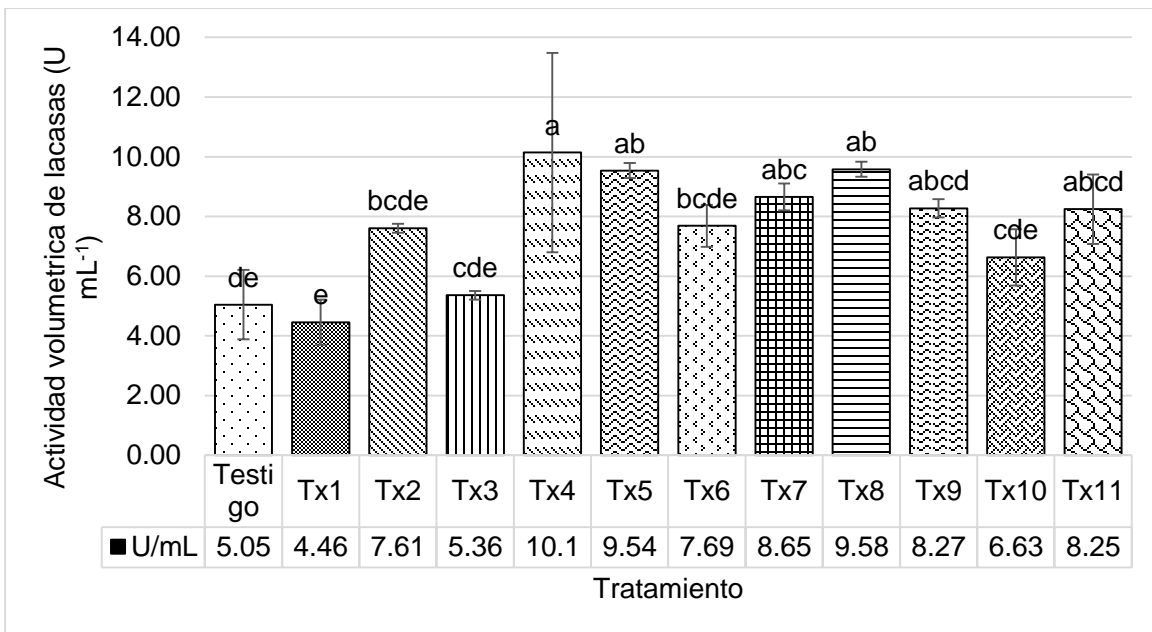


Figura 41. Actividad volumétrica de lacasas de *Pleurotus ostreatus* usando siringaldazina como sustrato enzimático. Testigo= Agar extracto de malta, Tx1= ABTS 0.5 mM, Tx2= Ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M, Tx3= AAS 100 μ M+ ABTS 0.5 mM, Tx4= Zeolita 3%, Tx5= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM, Tx6= Zeolita 5%, Tx7= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM, Tx8= AAS 100 μ M + zeolita 3%, Tx9= Zeolita 3% + ABTS 0.5 mM, Tx10= AAS 100 μ M + zeolita 5%, Tx11= Zeolita 5% + ABTS 0.5 mM%. Fuente: Elaboración propia.

IX. DISCUSIÓN

En los últimos años ha despertado un interés por el estudio, caracterización y producción de enzimas lignocelulósicas de diferentes recursos genéticos de hongos de pudrición blanca como *G. lucidum* y *P. ostreatus* con potenciales aplicaciones industriales. Los resultados generados de esta investigación se enfocaron al incremento de la actividad enzimática de lacasas con el uso de inductores de bajo costo y fácil adquisición como lo es el ácido acetilsalicílico y la zeolita. Se han reportado investigaciones de inductores como el cobre, tinturas textiles, residuos lignocelulósicos, como el aserrín, salvado de trigo y metales pesados que presentan un efecto inductor sobre la producción de enzimas lacasas (Baldrian, 2003; Lorenzo *et al.*, 2006; Tinoco *et al.*, 2001).

En este estudio se demostró que el uso del ácido acetilsalicílico y la zeolita a dos concentraciones produce un incremento significativo en la actividad enzimática. Sin embargo, se demostró que la concentración de zeolita y la mezcla con el AAS es específico en cada microorganismo, ya que *G. lucidum* incremento su producción usando AAS 100 μ M con 5% de zeolita. Mientras que en *P. ostreatus* la adición de zeolita al 5% mostró un incremento en la actividad de lacasas en comparación a otros tratamientos donde en algunos casos la actividad enzimática disminuyó.

Otros factores como el pH afectan la producción de enzimas. Se reporta que el pH influye en la producción de lacasas donde se ha reportado un mayor incremento a un pH de 5 (Jönsson *et al.*, 1997; Soden y Dobson, 2001; Arboleda y Mejía, 2010). En el presente estudio las cepas se desarrollaron en un pH de 7 a 7.8 correspondientes a los tratamientos con zeolita donde se logró una mayor actividad enzimática. Sin embargo, las lacasas conservan su actividad en un rango de pH de 3 a 10, generalmente las lacasas son más estables en pH alcalinos que en pH ácidos (Ramírez *et al.*, 2003).

El cultivo de las cepas CP-145 y CP-753 de *G. lucidum* y *P. ostreatus* en medios semisólidos EMA adicionados con ABTS 0.5 mM mostraron la aparición de un halo oxidación de color morado oscuro derivado de la actividad de las lacasas producidas

por los hongos. En cuanto a la velocidad de crecimiento y el área de colonización en los medios adicionados con AAS 100 μM y zeolita al 3 y 5% mostraron diferencia, entre tratamientos. Los tratamientos EMA, EMA con ABTS, AAS 100 μM , AAS 100 μM con ABTS en la CP-145 de *G. lucidum* colonizaron al mismo tiempo y no mostraron diferencia en el área de crecimiento. Los tratamientos zeolita 5% y AAS 100 μM con zeolita al 5% inhibieron su crecimiento hasta los 10 días mostrando un crecimiento regular mientras que los tratamientos donde los medios fueron suplementados con AAS 100 μM , zeolita y ABTS mostraron una inhibición en la velocidad de crecimiento, donde la colonización fue hasta los 12-16 días después de la siembra. Los resultados de la actividad volumétrica de lacasas de la fase acuosa de cultivos semisólidos mostraron valores altos y significativamente diferentes (Tukey $\alpha=0.5$) en los medios adicionados con AAS 100 μM y zeolita. La producción de lacasas se vio incrementada en más del 868% con el uso de AAS 100 μM con zeolita al 5% en los medios semisólidos con la cepa CP-145 de *G. lucidum* donde en el testigo se obtuvieron $3.95 \pm 0.29 \text{ U mL}^{-1}$ mientras que en AAS 100 μM con zeolita 5% se obtuvieron $34.32 \pm 12.95 \text{ U mL}^{-1}$, representando un incremento de un 868.86%.

En el caso de *G. lucidum* el tratamiento que mostró una mayor diferencia significativa fue AAS 100 μM con 5% de zeolita con $34.32 \pm 12.95 \text{ U mL}^{-1}$ en otras investigaciones con otros inductores en esta especie Songulashvili y colaboradores (2007) realizaron una fermentación donde adicionaron cascara de mandarina, salvado de trigo y residuo de grano en la producción de alcohol. Entre los resultados obtenidos se reporta que el uso de cascara de mandarina logró producir $35,980 \text{ U L}^{-1}$, con el residuo de grano se logró una actividad enzimática de $57,740 \text{ U L}^{-1}$ y finalmente con el salvado de trigo se lograron producir $97,340 \text{ U/L}^{-1}$. Manavalan y colaboradores (2013) reportan un aumento en la actividad enzimática adicionando etanol, CuSO_4 , ácido gálico, alcohol veratril y cáscara de tamarindo usando ABTS y guaiacol como sustrato enzimático. Entre los resultados obtenidos se tiene que el etanol estimuló la producción de enzimas hasta 2.53 U mL^{-1} . Con el uso del ácido gálico se obtuvieron 1.5 U mL^{-1} y finalmente en la mezcla con cascara de tamarindo se obtuvieron 74.84 U mL^{-1} . En el caso de *P. ostreatus* la actividad de lacasas fue

de 237.86 ± 11.34 U mL⁻¹ en zeolita al 5%, se comprobó que el uso de este material aumentó la actividad enzimática en comparación a Guillén-Navarro *et al.*, (1998), donde obtuvieron 0.0307 U mL⁻¹ de enzimas lacasas en medio de cultivo líquido de *P. ostreatus*. Ramírez *et al.*, (2003), reportó valores de 20 U mL⁻¹ de actividad de lacasas utilizando *P. ostreatus* en un sustrato de vinaza y salvado de trigo. También Manjarrés *et al.*, (2010) reportó que *P. ostreatus* produce mayor cantidad de lacasas (19.4 U mL⁻¹) en el día 24 de cultivo utilizando como sustrato cáscara de plátano maduro y suplementado con bagazo de caña. Hublik y Schinner (2000) obtuvieron valores de 2.5 U mL⁻¹ de lacasas de *P. ostreatus* usando siringaldazina. Se comprueba que estos inductores tienen un efecto positivo en la inducción de la actividad enzimática de *G. lucidum* y *P. ostreatus*. Ambos inductores tienen el potencial para ser utilizados con otros hongos de pudrición blanca, blanda y café, sin embargo, deben estudiarse las concentraciones de tolerancia máxima a estos inductores para ser aprovechados en especies endémicas mexicanas con potencial para su utilización en procesos biotecnológicos.

X. CONCLUSIONES

1. El uso de ABTS 0.5 mM en medios semisólidos demostró de forma cualitativa la producción de lacasas, evidenciado por la aparición de un halo morado oscuro. La medición del halo mostró que el área del mismo fue mayor en el caso de *P. ostreatus*. Mientras que en el halo de la CP-145 se mantuvo muy cercano al crecimiento del área de colonia.
2. La producción de lacasas se vio incrementada en más del 868% con el uso de AAS 100 μ M con zeolita al 5% en los medios semisólidos con la cepa 145 de *G. lucidum*. En el caso de la CP-753 de *P. ostreatus* el uso de zeolita al 5% incremento en 1311% la producción de lacasas
3. El área de colonización no se vio afectada por el uso del AAS en la CP-145 y CP-753, mientras que con el uso de zeolita se mostró una inhibición en el crecimiento micelial.
4. El uso de zeolita en medios de cultivo incremento el pH a ligeramente alcalino. Aun en estas condiciones los hongos lograron colonizar.
5. La actividad volumétrica de lacasas de las cepas de las especies *G. frondosa*, *L. edodes* y *Sparassis* sp. logró aumentar con el uso de zeolita en dosis menores a 1%.

XI. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

En base a los resultados obtenidos y contrastando la hipótesis planteada en este trabajo se demostró que el ácido acetil salicílico (AAS) y la zeolita adicionados a los medios de cultivo de *G. lucidum* y *P. ostreatus* lograron tener un efecto en la actividad enzimática de lacasas de las cepas estudio, aumentando dicha actividad en comparación al testigo, por lo que se acepta la hipótesis.

XII. PROPUESTA DE ESTRATEGIA PARA EL APROVECHAMIENTO DE RECURSOS GENÉTICOS FÚNGICOS COMO CEPAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS LACASAS UTILIZANDO INDUCTORES DE FÁCIL ACCESO.

12.1 Introducción

Las diversas aplicaciones biotecnológicas que tienen las lacasas en la industria han despertado un interés por su producción y comercialización. Sin embargo, su producción es limitada ya que los organismos capaces de generar estas enzimas solo producen decenas de unidades por mililitro de manera constitutiva, además que los procesos para la obtención de lacasas resultan ser muy costosos lo cual repercute en la elevación del precio de estas enzimas en el mercado. Aunque gran parte de los hongos pueden producir estas enzimas, los hongos de pudrición blanca, café y blanda son el grupo de interés para su producción, ya que son capaces de degradar material lignocelulósico. A pesar de que este grupo de hongos ha despertado interés para su uso en la industria, no todos estos logran producir grandes cantidades de enzimas. Se han realizado investigaciones para aislar cepas capaces de producir grandes cantidades de lacasas y que además sean de crecimiento rápido. Siendo México un país mega diverso cuenta con un gran número de recursos genéticos de hongos comestibles con potencial para la producción de lacasas a nivel industrial. Sin embargo, se desconoce el potencial de muchas de estas especies de hongos, además de que no se producen las mismas cantidades de enzimas. Una propuesta ha sido el uso de inductores que sean capaces de estimular la actividad enzimática y aumentar la producción, sin embargo, los costos resultan muy elevados y en algunos casos el incremento no es muy significativo.

En la presente estrategia se plantea el uso de dos inductores de lacasas de fácil acceso y disponibilidad capaces de inducir una elevada cantidad de lacasas. Siendo los inductores propuestos el ácido acetilsalicílico y la zeolita. Así mismo se propone el uso de cinco géneros de hongos comestibles cultivados en México que son *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Sparassis* sp. Resaltando el potencial de estos hongos comestibles y medicinales en la transformación de residuos lignocelulósicos agroforestales para así obtener

una alta producción de lacasas, así como la obtención de basidiocarpos con propiedades funcionales y medicinales, como un producto con valor agregado.

La estrategia se divide en dos etapas:

La primera etapa consiste en la selección de cepas de hongos comestibles capaces de producir grandes cantidades de enzimas. Asimismo, caracterizar las enzimas producidas mediante el uso de herramientas moleculares. También en esta etapa se seleccionarán las concentraciones de los inductores ácido acetilsalicílico y zeolita donde las cepas aumenten la producción de enzimas lacasas.

La segunda etapa es la utilización de estos inductores en fermentación sólida, existen dos posibles aplicaciones de estos inductores en las cepas propuestas. La primera aplicación sería el uso de cepas capaces de producir altas cantidades de lacasas con inductores para la biorremediación de suelos contaminados por la industria textil en la zona central de México. La segunda aplicación sería el uso de estos inductores para la producción comercial de hongos comestibles para la obtención de basidiocarpos con un aumento en sus propiedades funcionales y medicinales, así como aumentar la eficiencia biológica con una reducción en el tiempo de colonización y fructificación.

En una estrategia es necesario conocer cuál es el potencial de recursos con el que se cuenta y que está subutilizado y, por otro lado, cuáles son las necesidades que se requiere satisfacer. En este sentido se plantea una matriz de las potencialidades, limitaciones y problemas a resolver (Cuadro 8).

Cuadro 8. Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas de la estrategia propuesta.

Área temática	Potencialidades	Limitaciones	Problemas
Recursos naturales y ambientales	Abundancia de recursos genéticos nativos. Abundancia de los inductores y fácil acceso a ellos. El uso de los inductores no tiene efecto negativo en el medio ambiente.	No se han estudiado la capacidad de producción de enzimas de los recursos genéticos de hongos comestibles disponibles en el CREGENHC	No se ha realizado un aprovechamiento de los recursos genéticos con potencial para comercialización, así como los recursos con potencial para biorremediación.
Sistema físico-natural	México en su variedad de climas, posee las condiciones para el aprovechamiento de los hongos propuestos.	Suelos y agua contaminados por la industria textil en la región central de México	Falta de interés por parte de la industria textil para reducir la contaminación.
Área económica	El precio en el mercado de productos derivados del cultivo de los hongos comestibles propuestos es elevado.	Falta de inversión en planes de desarrollo e innovación de la producción de hongos comestibles en el sector público y privado	Disponer de financiamientos acorde a la tecnología necesaria a implementar. Baja producción y consumo de hongos en México.
Demografía y mercado de trabajo	Ofrece una oportunidad de generación de nuevos empleos en la región central de México.	Se requiere personal capacitado y calificado para realizar la transferencia de tecnología a los actores afectados.	Los actuales productores se encuentran dispersos en el país. Efectos en la salud por personar cercanas a zonas contaminadas.
Infraestructura	La infraestructura requerida para la producción es de fácil acceso. Existe capacitación para el establecimiento de la estructura.	Riesgos de contaminación en el cultivo por una infraestructura deficiente	El escalamiento de nivel laboratorio- planta piloto requiere investigación y desarrollo
Aspectos institucionales	Se cuenta con la capacidad tecnológica para desarrollar conocimiento y aplicación del mismo en la producción de estos hongos.	Existe un número limitado de recursos humanos altamente capacitados. Conocimiento limitado de las regularizaciones y normas	No se cuenta con una estrategia de transferencia de tecnología para el correcto uso de los inductores en la producción de lacasas en la producción de hongos o en la biorremediación de suelos contaminados.

9.2 Actores de la estrategia

Los principales actores de la presente estrategia corresponden a los afectados por la baja producción de hongos o la contaminación generada por la industria textil. Otros actores corresponden a la academia como generadores de conocimiento, así como los encargados de transmitir el conocimiento generado al grupo afectado y el gobierno encargado del financiamiento para la ejecución de la estrategia.

1. El primer actor de la estrategia sería el campesino propietario de espacios contaminados a causa de la industria textil, este actor podría utilizar cepas de hongos con alta producción de enzimas utilizando los inductores AAS y zeolita para la biorremediación del espacio contaminado.

2. El segundo actor de la estrategia sería las personas productoras de hongos comestibles. Éstos productores de hongos pueden utilizar los inductores con cepas novedosas de hongos comestibles y reducir el tiempo de colonización del sustrato, así como obtener basidiocarpos con un aumento en sus propiedades funcionales y medicinales, así como aumentar la eficiencia biológica.

3. En conjunto con el primer y segundo actor las instituciones como el Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla tendrían un gran impacto en la estrategia propuesta; ya que estas instituciones cuentan con la tecnología científica para el asesoramiento en la producción de especies de hongos comestibles con capacidad en producir enzimas esenciales para la biorremediación de espacios contaminados, así como el cultivo de especies novedosas de hongos comestibles.

4. El cuarto actor primordial son las instituciones de gobierno como la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), así como otras instituciones capaces de brindar apoyo técnico, económico y administrativos a los agricultores y campesinos involucrados.

9.3 Objetivos estratégicos y específicos

En el cuadro 9 se establecen los objetivos generales y específicos para la implementación de la estrategia, así como los resultados esperados y las actividades para el cumplimiento de los objetivos.

Cuadro 9. Objetivos de la estrategia propuesta.

Objetivo general	Realizar transferencia de tecnología sobre el uso de lacasas así como la aplicación de inductores para el aprovechamiento de cepas de hongos comestibles cultivados.
Objetivo específico	Aprovechar recursos genéticos nativos de hongos comestibles en la producción de enzimas lacasas.
Resultados	<ol style="list-style-type: none">1. Manejo integral de los residuos lignocelulósicos de las actividades agroforestales.2. Aprovechamiento de recursos genéticos nativos de <i>G. lucidum</i>, <i>G. frondosa</i>, <i>L. edodes</i>, <i>P. ostreatus</i> y <i>Sparassis</i> sp.3. Aprovechamiento de sustratos residuales del cultivo de las cepas de hongos comestibles cultivados.4. Dar un valor agregado al cultivo de <i>G. lucidum</i>, <i>G. frondosa</i>, <i>L. edodes</i>, <i>P. ostreatus</i> y <i>Sparassis</i> sp. a través de la obtención de enzimas lacasas a partir de sustratos con el uso de los inductores AAS y zeolita.
Actividades	<ol style="list-style-type: none">1. Aislamiento y conservación de los recursos genéticos nativos de hongos comestibles2. Implementación de un modelo de producción de <i>G. lucidum</i> y <i>P. ostreatus</i> en sustratos sólidos.3. Determinación de la producción máxima de enzimas lacasas de cepas novedosas y potenciales de hongos en diferentes concentraciones de zeolita.4. Caracterización de las enzimas lacasas a nivel bioquímico, e iniciar la caracterización a nivel molecular.5. Comercialización de productos de lacasas de <i>G. lucidum</i> y <i>P. ostreatus</i> derivadas de su cultivo en sustratos lignocelulósicos.6. Comercialización de las cepas de hongos con potencial de producción en México.

XII. LITERATURA CITADA

- Ainhoa, A., Téllez, A., González, T. y González, A. 2001. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: Aplicaciones industriales de lacasas. *BioTecnología*, 7: 40-55.
- Arboleda, C. y Mejía A.I. 2010. Inducción de la actividad de lacasa en *Ganoderma* sp. y actividad antioxidante de su biomasa. *Revista Cubana de Farmacia*, 44, 519-532.
- Archibald F.S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M.G. and Reid I.D. 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 53: 215-336.
- Arora, D. S. and Sharma, R. K. 2009. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 1760–1788.
- Baldrian, P. 2003. Interaction of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 78-91.
- Baldrian, P. 2005. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 215–242.
- Blanchette, R. A. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany*, 73: S999-S1010.
- Bourbonnais, R. and Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267: 9-102.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Leech, D. and Freiermuth B. 1998. Reactivity and mechanism of laccase mediators for pulp delignification. *TAPPI Biological Science Symposium*, 23: 335-338.
- Burrola-Aguilar, C., Montiel, O., Garibay-Orijel, R. y Zizumbo-Villarreal L. 2012. Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología*, 35: 1-16.
- Buswell, J. A., Cai, Y. and Chang, S. T. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128: 81-87.
- Calonge, F. D. 2009. Guía de bolsillo para el buscador de setas. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 158 p.
- Camacho-Martínez, F. J. 2013. Biorremediación de zonas contaminadas por hidrocarburos empleando hongos comestibles: efecto del antraceno sobre el crecimiento in vitro de *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Puebla. Pp. 88.
- Carbonero E., Gracher, A., Komura, D., Marcon, R., Freitas, C., Baggio C. and Santos, A. 2008. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Food Chemistry*, 111, 531–537.
- Castillo-Sebastian, I.O. 2016. El ácido acetilsalicílico como inductor de enzimas lacasas para desarrollar las aplicaciones de *Ganoderma* en México. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Puebla. Pp. 78.

- Chang, S.T. 1995. *Ganoderma*-The leader in production and technology of mushroom nutraceuticals; Pp 43-52. In: Proceedings 6th International Symposium Recent Advances in *Ganoderma lucidum*. Eds. B. K. Kim, I. H. Kim y Y. S. Kim. The Pharmaceutical Society of Korea, Seoul, Korea.
- Chica-Toro, F., Londoño-Benítez, L., y Álvarez-Herrera, M. 2006. La zeolita en la mitigación ambiental. *Revista Lasallista de Investigación*, 3 (1): 30-34.
- Cisterna, C. 2003. Cultivo del champiñón ostra en Chile. 1ª Edición. Editorial Mycotec, Ltda. Chile, 118 p.
- Conabio. 1998. La diversidad biológica de México: estudio de país, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 341 p.
- Conrad, L. S., Sponholz, W. R. and Berker, O. 2000. Treatment of cork with a phenol oxidizing enzyme. US patent 6152966.
- Durán, N. R. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 907-931.
- Farooq, M.U., Chioza, A. and Ohga, S. 2014. Vegetative development of *Sparassis crispa* in various growth conditions and effect of electric pulse simulation on its fruit body production. *Advances in Microbiology*, 4: 267-274.
- García-Medineta, A., Solache-Ríos M. and Olguín, M.T. 2009. Evaluation of the sorption properties of a Mexican clinoptilolite-rich tuff for iron, manganese and iron-manganese systems, *Microporous Mesoporous Mater*, 118: 489-495.
- García-Oduardo, N., Bermúdez-Savón, R., Castillo-Rojas, I., Perraud-Gaime, I., y Serrano-Alberni M. 2016. Evaluación de la producción de lacasa de *Pleurotus* spp. *Tecnología Química*, XXXVI: 100-105.
- Giannetto P.G., Montes R.A., y Rodríguez, I.G. 1990. Zeolitas: Características, Propiedades y Aplicaciones Industriales. 2ª ed. Caracas, Venezuela: Editorial Innovación Tecnológica, 22-25 p.
- Guillén-Navarro, G. K., Márquez-Rocha, F. J. y Sánchez-Vázquez, J. E. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: 302-306.
- Gutiérrez-Soto, J.G. 2009. Purificación y caracterización parcial de las lacasas de *Trametes maxima* CU1 y su aplicación en la degradación de colorantes textiles. Tesis de Doctorado con especialidad en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León, Pp. 135.
- 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, Pp. 111-175.
- Hublik, G. and Schinner, F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 330-336.
- Illana-Esteban, C. 2008. El hongo maitake (*Grifola frondosa*) y su potencial terapéutico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: 141-144.
- Jaffé, W. R. 1993. La agrobiotecnología comercial en América Latina y el Caribe. Organización de Los Estados Americanos. Instituto Interamericano de Cooperación Para la Agricultura. U. S. A. 130 p.

- Jönsson, L.J., Saloheimo, M. and Penttilä, M. 1997. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics*, 32: 425-430.
- Kirk, T. K. and Farrell, R. L. 1987. Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41: 465–505.
- Klaus, M., Grubešić, A. and Nikšić, M. 2011. Influence of some zeolites on the growth of mycelia of industrial fungi *Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Memoria de congreso 1st South East European Congress of Chemical Engineering*, Pp120
- Kuhar, F. and Papinutti, L. 2014. Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. *Revista argentina de microbiología*, 46: 144-149.
- Ma, L., Lina, Y. Q., Yanga, C., Yinga, Z. H. and Jianga, X. L. 2016. Production of liquid spawn of an edible mushroom, *Sparassis latifolia* by submerged fermentation and mycelial growth on pine wood sawdust, *Scientia Horticulturae*, 209: 22-30.
- Latifaha, O., Haruna-Ahmeda, O. and Abdul-Majidc, N. 2017. Enhancing nitrogen availability from urea using clinoptilolite zeolite. *Geoderma*, 306: 152-159.
- López, M., Hernández, M.A., Barahona, C.R., Martínez, M.A., Portillo, R. y Rojas, F. 2010. Propiedades fisicoquímicas de la clinoptilolita tratada con fertilizantes a usar como aditivo en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Terra Latinoamericana*, 28: 247-254.
- Lorenzo, M., Moldes, D. and Sanromán, M.A. 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere*, 63: 912-917.
- Luley, J. 2006. Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos. *Arborist News*. Pp. 14.
- Maciel, M J., Silva, A.C. and Riberio, H.C.T. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13: 1-14.
- Manavalan, T., Manavalan, A. and Heese, K. 2015. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current Microbiology*, 70 : 485-498.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K.P. and Heese, K. 2013. Characterization of optimized production, purification and application of lacasse from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*, 70: 106-114.
- Manjarrés, K., Castro, A. y Rodríguez E. 2010. Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*, 2: 9-15.
- Martínez-Carrera, D., Larqué-Saavedra, A., Tovar, A., Torres, N., Meneses, M. E., Sobal, M., Morales, P., Bonilla, M., Escudero, H., Tello-Salgado, I., Bernabé-González, T., Martínez, W. y Mayett Y. 2016. Contribución de los hongos comestibles, funcionales y medicinales a la construcción de un paradigma sobre la producción, la dieta, la salud y la cultura en el sistema agroalimentario de México. En: *Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México Hacia un enfoque integral de la producción, la dieta,*

- la salud y la cultura en beneficio de la sociedad. Eds. Daniel Martínez-Carrera y Javier Ramírez Juárez. Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP. México, 581-640 p.
- Martínez-Carrera, D., Sobal, M., Morales, P., Martínez, W., Martínez, M. y Mayett, Y. 2004. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana. COLPOS-BUAP-UPAEP-IMINAP, Puebla
- Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M. y Martínez, W. 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles; Capítulo 1. Pp. 7-26. En: El Cultivo de Setas *Pleurotus* spp. en México. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal. ECOSUR-CONACYT, México D.F.
- Mata, G., Gaitán-Hernández, R. y Salmones, D. 2007. Hongos comestibles en México, una industria en crecimiento. Pp. 39-48. En: El Maravilloso mundo de los hongos. Eds. R. Zuleta Rodríguez, D. Trejo Aguilar y A.R. Trigos Landa. Universidad Veracruzana. Xalapa Ver., México.
- Mathiasen, T. E. 1995. Laccase and beer storage .PCT international application, WO 9521240 A2.
- Mayer, A. M. and Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60: 551–565.
- Meneses, M.E., Martínez-Carrera, D., Torres, N., Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Morales, P., Sobal, M., Bernabé, T., Escudero, H., Granados-Portillo, O. y Tovar, A.R. 2016. Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE*, 11: 1-20.
- Meshko V., Markovska, L., Mincheva, M. and Rodríguez, A. E. 2001. Adsorption of basic dyes on granular activated carbon and natural zeolite. *Water Research*, 35: 3357-3366.
- Milla, A. 2007. Introducción al cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Ed. Publicaciones INEA. Valladolid. España. 120 p.
- Moncalvo, J. M. and Ryvarden, L. 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. *Synopsis Fungorum*, 11: 1–114
- Moncalvo, J. M. and Ryvarden, L. 2001. Systematics of *Ganoderma*; Pp. 23-45. En: *Ganoderma* Diseases of Perennial Crops. Ed. J. Flood, P. D. Bridge y M. Holdemess. CABI Bioscience, Egham, UK.
- Montoya B.S., Orrego, C.A. and Levin, L. 2011. Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4): 1533-41.
- Montoya, S., Sánchez, O. J. y Levin, L. 2014. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12: 115-124.
- Mora, V. M. y Martínez-Carrera, D. 2007. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México, Capítulo 1.1. Pp. 7-26. In: El Cultivo de Setas *Pleurotus* spp. en México. Eds. J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal. ECOSUR, México, D.F.
- Olgún, M.T. 2006. Zeolitas características y propiedades. 21 p.

- Osma, J. F., Toca-Herrera, J.L. and Rodríguez-Couto, S. 2010. Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Research*, 2010: 1-8.
- Osma, J.F., Toca-Herrera, J.L. and Rodríguez-Couto, S. 2011. Cost analysis in laccase production. *Journal of Environmental Management*, 92: 2907-2912.
- Ostroumov, F.M., Ortiz, L.E. y Corona, C.P. 2003. Zeolitas de México diversidad mineralógica y aplicaciones. *Sociedad Mexicana de Mineralogía*. 1-9 p.
- Pezzella, C. L. 2012. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2): 705-717.
- PROMÉXICO. 2016. Biotecnología. Unidad de inteligencia de negocios. 40 p.
- Ramírez, N. E., Vargas, M. C., Ariza, J. C. y Martínez, C. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2: 64-72.
- Rangel, A. M. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia de patógenos en plantas. *Instituto de Investigaciones Químico Biológicas*, 12: 90-95.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 439-463.
- Rendón-Hernández, G. A. 2015. Caracterización y cultivo de recursos genéticos de hongos y su importancia en el desarrollo regional de la zona central de México. Tesis de Maestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Puebla. Pp 158.
- Revankar, M. S. and Lele, S. S. 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochemistry*, 41: 581–588.
- Reyes, R., Pickard, M. and Vazquez-Duhalt, R. 1999. Hydroxybenzotriazole increase the range of textile dyes decolourized by immobilized laccase. *Biotechnology Letters*, 21: 875–880.
- Rivera, O., Albarracín, W. y Lares, M. 2017. Componentes Bioactivos del Shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler) y su impacto en la salud. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 36 (3): 67-71.
- Rodríguez-Fuentes, G. 1987. "Propiedades Físico-Químicas y Aplicaciones Industriales de la Clinoptilolita Natural". Tesis de doctorado en Ciencias Físicas. CENIC, Cuba.
- Shinde, S.A., Telang, S.M., Patil, S.S. and Baig M.M.V. 2010. Effect of clinoptilolite zeolite on mushroom growth. *Asian Journal of Soil Science*, 5: 68-69.
- Soca, M y Daza-Torres, M. 2016. Evaluación de fracciones granulométricas y dosis de zeolita para la agricultura. *Agrociencia*, 50 (8): 965-976.
- Soden, D. y Dobson, A.D.W. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, 147: 55-63.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E., y Hadar, Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 57-61.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E. and Hadar Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 57-61.

- SungRyul, R., Kang-Hyeon, K., Park, H., Won-Chull, B. and Bong-Hun L. 2009. Cultivation characteristics of *Sparassis crispa* strains using sawdust medium of *larix kaempferi*. The Korean Journal of Micology, 41: 465-501.
- Taiz, L. y Zeiger E. 2006. Secondary metabolites and plant defense; Cap. 13. En: Plant Physiology. Eds. L. Taiz y E. Zeiger Sinauer Associates Sanderland. Inc. Massachusetts. Pp. 369-396.
- Téllez, A. A. 2005. Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. Enzyme and Microbiology Technology, 38: 665-669.
- Téllez, T. M. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged. Applied Microbiology and Biotechnology, 81: 675-679.
- Tinoco, R., Acevedo, A., Gallindo, E. and Serrano-Carreón, L. 2011. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 38: 531-540.
- Tinoco, R., Pickard, M.A. and Vazquez-Duhalt, R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. Letters Applied Microbiology, 32: 331-335.
- Urbina-Sánchez, E., Baca-Castillo, G., Núñez-Escobar, R., Colinas-León, M., Tijerina-Chávez, L. y Tirado-Torres, J. 2011 Zeolita como sustrato en el cultivo hidropónico de gerbera. Terra Latinoamericana, 29 (4): 387-394.
- Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Dordevic, R., Miladinovic, Z., Jovanovic, L., Niksic. M. and Van, L. 2016. Addition of zeolites to improve the functionale characteristics of the hen of the wood or maitake medicinal mushroom, *Grifola frondosa* (Agaricomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, 18(9): 781-792.
- Wasser S. 2005. Shiitake (*Lentinus edodes*). Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, 2: 653-664.
- Wasser, S. P. and Weis, A. L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 31-62.
- Wolfaardt, F., Taljaard, J.F, Jacobs, A., Male, J.R. and Rabie, C.J. 2004. Assessment of wood-inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips. Bioresource Technology, 95: 25-30
- You, B. J., Lee, M. H., Tien, N., Lee, M. S., Hsieh, H. C., Tseng, L. H., Chung, Y. L and Lee, H. Z. 2013. A novel approach to enhancing ganoderic acid production by *Ganoderma lucidum* using apoptosis induction. PLoS ONE 8: e53616. doi:10.1371/journal.pone. 0053616.
- Zanon, J., Armengol J. y Vilaseca, C. 2005. Estudio del síndrome de decaimiento en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 31; 431-441.