



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

EL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO COMO INDUCTOR DE ENZIMAS LACASAS PARA DESARROLLAR LAS APLICACIONES DE GANODERMA EN MÉXICO

IVAN OMAR CASTILLO SEBASTIAN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2016



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

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

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN

CAMPUE-43-2-03

CAMPUS PUEBLA

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 académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Ivan Omar Castillo Sebastian**, 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 de la profesora consejera **Dra. Mercedes Sobal Cruz** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **El ácido acetilsalicílico como inductor de enzimas lacasas para desarrollar las aplicaciones de Ganoderma en México**, 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, la Consejera 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, 3 de agosto de 2016

Ivan Omar Castillo Sebastian

Dra. Mercedes Sobal Cruz
Vo. Bo. Profesora Consejera

Km. 125.5 carretera federal México-Puebla (actualmente Boulevard Forjadores de Puebla), C.P. 72760, Puebla, Puebla.
Teléfonos: (222) 285 14 42, 285 14 43, 285 14 45, 285 14 47, 285 07 38; exts. 2018, 2056, 2058.

Correos electrónicos: edar@colpos.mx ; admisionescampuspuebla@colpos.mx


La presente tesis, titulada: **El ácido acetilsalicílico como inductor de enzimas lacasas para desarrollar las aplicaciones de *Ganoderma* en México**, realizada por el alumno: **Ivan Omar Castillo Sebastian**, 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

CONSEJERA:




DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESORA:



DRA. MARÍA EUGENIA MENESES ÁLVAREZ

ASESOR:



DR. BENITO RAMÍREZ VALVERDE

Puebla, Puebla, México, 3 agosto de 2016

EL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO COMO INDUCTOR DE ENZIMAS LACASAS PARA DESARROLLAR LAS APLICACIONES DE *GANODERMA* EN MÉXICO

Ivan Omar Castillo Sebastian, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2016

México posee una megadiversidad de recursos genéticos, dentro de los que destacan los recursos fúngicos comestibles por su uso alimenticio y medicinal. *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. es un hongo que crece de manera silvestre en diversas regiones de nuestro país. El cultivo de este hongo en residuos agroindustriales es una alternativa para la obtención de compuestos bioactivos con propiedades medicinales y su aprovechamiento como productor de enzimas lignocelulósicas. Una estrategia para aumentar la producción de lacasas en el proceso de fermentación es la optimización del sustrato y el uso de inductores como el ácido acetilsalicílico (AAS). En este trabajo se estudió a nivel laboratorio, en medios de cultivo semisólido papa dextrosa agar (PDA) y medio líquido papa dextrosa (MLPD), la biomasa seca, pH, conductividad y la actividad volumétrica de lacasas de tres cepas nativas de *Ganoderma* spp. El ABTS se utilizó como indicador cualitativo de referencia de lacasas. La CP-145 de *G. lucidum* mostró la mayor área de crecimiento en todos los tratamientos estudiados en PDA en un rango de 54.64 – 55.49 cm² a los 8 días de crecimiento. También mostró mayor producción de biomasa seca (11.61 ± 1.61 mg/mL) a 40 días en MLPD adicionado con AAS 100 µM. Se encontró que la CP-834 de *Ganoderma* spp., en los diversos tratamientos produjo el valor más alto de actividad volumétrica de lacasas de 9.51 ± 0.43 U/mL a 8 días de incubación en medio PDA adicionado con ABTS 0.5 mM + AAS 100 µM, y 49.38 ± 3.4 U/mL a 40 días de incubación en medio de cultivo líquido adicionado con AAS 100 µM. La inducción del AAS 100 µM en la producción de lacasas fue de entre 190% y 250% en medio semisólido y de entre 160% y 400% en medio de cultivo líquido respecto al testigo. Se propone una estrategia que permita un aprovechamiento integral del cultivo de recursos genéticos de *G. lucidum* en México y el uso del AAS como inductor de la actividad volumétrica de lacasas.

Palabras clave: ABTS, biotecnología, fisiología, hongos comestibles, recursos genéticos.

ACETYLSALICYLIC ACID AS AN INDUCER OF LACCASE ENZYME FOR DEVELOPING TO *GANODERMA* APLICATIONS IN MEXICO

Ivan Omar Castillo Sebastian, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2016

Mexico has mega diversity, in particular those of fungal genetic resources because of their nutritional and medicinal use. *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. is a mushroom that grows wild in diverse regions in our country. The cultivation of this mushroom on agro-industrial waste is an alternative for obtaining bioactive compounds with medicinal properties and its use as a producer of lignocellulosic enzymes. A strategy to increase the production of laccases in the fermentation process is the optimization of the substrate and the use of inducers such as acetylsalicylic acid (ASA). In the present work, at laboratory level, the dry biomass, pH, conductivity and volumetric activity of laccases of three native strains of *Ganoderma* spp. on media semisolid culture (PDA) and liquid (PDB) was studied. The ABTS was used as an indicator laccase qualitative reference. The CP-145 *G. lucidum* showed the largest growth area in all treatments studied in PDA with a range of 54.64 - 55.49 cm² at 8 days of growth. It also showed the highest production of dry biomass (11.61 ± 1.61 mg / mL) at 40 days in PDB, supplemented with 100 µM ASA. It was found that CP-834 *Ganoderma* spp., in various treatments produced the highest volumetric activity of laccases with 9.51 ± 0.43 U / ml at 8 days of incubation on PDA medium supplemented with ABTS 0.5mM + ASA 100 uM and 49.38 ± 3.4 U / mL to 40 days of incubation in liquid culture medium supplemented with 100 uM ASA. Induction ASA 100 uM in the production of laccase was between 1.9 and 2.5 times in semisolid medium and between 1.6 and 4 times in liquid culture medium compared to the control. A strategy that allows full utilization of genetic resources cultivation of *G. lucidum* in Mexico and the use of ASA as an inducer of the volumetric activity of laccases is proposed.

Keywords: ABTS, biotechnology, edible fungi, genetic resources, physiology.

Dedicatoria

A mi familia por su apoyo incondicional.

A Lu por su amor y motivación.

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 periodo 2014-2016.

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, Dra. María Eugenia Meneses Álvarez y Dr. Benito Ramírez Valverde, 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: Myrna, Willi, Helios, Mago y Hugo.

CONTENIDO		Página
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
2.1	Biotecnología y desarrollo.....	3
2.1.1	Biotecnología de hongos comestibles.....	4
2.1.2	Aprovechamiento de los hongos comestibles.....	6
2.2	Recursos genéticos de <i>Ganoderma lucidum</i> en México.....	7
2.3	Actividad enzimática de <i>G. lucidum</i>	8
2.4	Uso de inductores para la producción de enzimas.....	9
2.5	Propiedades del ácido acetilsalicílico (AAS) como inductor de actividad enzimática.....	10
2.6	Lacasas: origen, análisis y aplicaciones.....	11
III.	MARCO DE REFERENCIA	15
3.1	Ciclo de vida de <i>G. lucidum</i>	15
3.2	Fisiología de <i>G. lucidum</i>	16
3.3	Cultivo de <i>G. lucidum</i> en sustratos sólidos.....	17
3.4	Estado del arte de las enzimas en <i>G. lucidum</i>	18
3.5	Avances en México de las investigaciones de <i>G. lucidum</i>	19
3.6	Producción de enzimas lacasas de <i>G. lucidum</i>	20
IV.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	22
V.	HIPÓTESIS	23
VI.	OBJETIVOS	23
6.1	Objetivo general.....	23
6.2	Objetivos específicos.....	23
VII.	MATERIALES Y METODOS	24
7.1	Material biológico.....	24
7.2	Elaboración de medios de cultivo.....	26
7.2.1	Medios de cultivo semisólidos.....	26
7.2.2	Medios de cultivo líquidos.....	26
7.3	Cinética de cultivo.....	27
7.3.1	En medio de cultivo semisólidos.....	27
7.3.2	En medio de cultivo líquidos.....	27
7.4	Variables estudiadas.....	27
7.4.1	Área de la colonia.....	28
7.4.2	Halo oxidativo.....	28
7.4.3	Obtención de la biomasa.....	28
7.4.4	Obtención de la fase acuosa de los medios semisólidos y líquidos.....	28
7.4.4.1	Determinación de pH y conductividad de la fase acuosa de los medios semisólidos y líquidos.....	29
7.4.5	Determinación de la actividad volumétrica de lacasas (U/mL).....	30
7.5	Análisis estadístico.....	31

VIII.	RESULTADOS	32
8.1	Fisiología de las cepas en medio de cultivo semisólido.....	32
8.1.1	CP-145 de <i>G. lucidum</i>	33
8.1.2	CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp.	36
8.1.3	CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp.	38
8.2	Fisiología de las cepas en medio de cultivo líquido.....	41
8.2.1	CP-145 de <i>G. lucidum</i>	41
8.2.2	CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp.....	44
8.2.3	CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp.	46
8.3	Cinética enzimática de lacasas.....	48
8.3.1	CP-145 de <i>G. lucidum</i>	48
8.3.1.1	Medio de cultivo semisólido.....	48
8.3.1.2	Medio de cultivo líquido.....	48
8.3.2	CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp.	49
8.3.2.1	Medio de cultivo semisólido.....	49
8.3.2.2	Medio de cultivo líquido.....	50
8.3.3	CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp.	51
8.3.3.1	Medio de cultivo semisólido.....	51
8.3.3.2	Medio de cultivo líquido.....	52
8.4	Análisis estadístico.....	53
8.4.1	Medios de cultivo semisólido.....	53
8.4.2	Medios de cultivo líquido.....	56
IX.	DISCUSIÓN	59
X.	CONCLUSIONES	62
XI.	ESTRATEGIA PARA EL APROVECHAMIENTO DE RECURSOS GENÉTICOS NATIVOS DE <i>Ganoderma</i> spp. COMO CEPAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS LACASAS	64
XII.	LITERATURA CITADA	68
XIII.	ANEXO	77

LISTA DE FIGURAS		Página
Figura 1.	Gradiente de biotecnologías (Nangju, 2001).....	3
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Ganoderma lucidum</i> (Modificado de: Mukhin y Votintseva, 2002; Campbell y Reece, 2007).....	16
Figura 3.	Metodología general empleada en este trabajo. PDA= Papa dextrosa agar. MLPD= Medio líquido papa y dextrosa	24
Figura 4.	Basidiocarpos cultivados de las cepas en estudio de <i>Ganoderma</i> spp. en substratos sólidos estériles a base de aserrín de encino. CP-145 es <i>Ganoderma lucidum</i> , CP-434 y CP-834 son <i>Ganoderma</i> spp.....	25
Figura 5.	Obtención de la fase acuosa del medio de cultivo líquido utilizado para cultivar las cepas de <i>Ganoderma</i> spp.....	29
Figura 6	Determinación del pH y conductividad de la fase acuosa de los medios de cultivo.....	29
Figura 7.	Determinación de la actividad volumétrica de lacasas en microplaca.....	30
Figura 8.	Crecimiento de cepas de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> , CP-434 y CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. en medio de cultivo papa dextrosa agar adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M y substrato enzimático ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 0.5 mM.....	33
Figura 9.	Área de crecimiento de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	34
Figura 10.	Área del halo de oxidación de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	34
Figura 11.	pH final que presentó la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> a los 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	35
Figura 12.	Conductividad eléctrica final (μ S/cm) de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	35
Figura 13.	Área de crecimiento de la CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	36

Figura 14.	Área del halo de oxidación de la CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	37
Figura 15.	pH final de la CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	37
Figura 16.	Conductividad eléctrica final (μ S/cm) de la CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	38
Figura 17.	Área de crecimiento de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	39
Figura 18.	Área del halo de oxidación de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	39
Figura 19.	pH final de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	40
Figura 20.	Conductividad eléctrica final (μ S/cm) de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).....	40
Figura 21.	Crecimiento de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> , CP-434 y CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M en condición de agitación a 155 rpm e incubación a 27 °C.....	41
Figura 22.	Producción de biomasa seca de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	42
Figura 23.	Variación de pH de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	43

Figura 24.	Variación de la conductividad eléctrica de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	43
Figura 25.	Producción de biomasa seca de la CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	44
Figura 26.	Variación de pH de la CP-434 <i>Ganoderma</i> spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	45
Figura 27.	Variación de la conductividad eléctrica de la CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	46
Figura 28.	Producción de biomasa seca de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	47
Figura 29.	Variación de pH de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	47
Figura 30.	Variación de la conductividad eléctrica de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	47
Figura 31.	Actividad volumétrica de lacasas de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> , a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M y substrato enzimático ABTS 0.5 M (n= 3).....	48
Figura 32.	Actividad volumétrica de lacasas de la CP-145 de <i>Ganoderma lucidum</i> durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	49
Figura 33.	Actividad volumétrica de lacasas de la CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M y substrato enzimático ABTS 0.5 M (n= 3).....	50

Figura 34.	Actividad volumétrica de lacasas de la CP-434 de <i>Ganoderma</i> spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	51
Figura 35.	Actividad volumétrica de lacasas de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp, a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M y substrato enzimático ABTS 0.5 M (n= 3).....	52
Figura 36.	Actividad volumétrica de lacasas de la CP-834 de <i>Ganoderma</i> spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).....	52
Figura 37.	Cepas en la fase de caracterización del material biológico empleado en esta investigación. Las cepas varían en textura, color y densidad micelial, así como en el contorno de la colonia.....	77
Figura 38.	Definición de la morfología de colonias de acuerdo a su interacción.....	78

LISTA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Número de genes de lacasas conocidos en algunas especies de hongos (Liu <i>et al.</i> , 2012; Floudas <i>et al.</i> , 2015)...	18
Cuadro 2.	Material biológico depositado en el UREGENHCFyM y empleado en esta investigación.....	24
Cuadro 3.	Análisis del área de la colonia (cm ²) por cada cepa nativa de <i>Ganoderma</i> en los diferentes tratamientos a tiempo final (n= 3).....	53
Cuadro 4.	Análisis entre cepas del área de la colonia (cm ²) de <i>Ganoderma</i> en los diferentes tratamientos a tiempo final (n= 3).	53
Cuadro 5.	Análisis del tamaño del halo de oxidación (cm ²) por cada cepa nativa de <i>Ganoderma</i> en PDA adicionado con AAS 100 µM y substrato enzimático ABTS 0.5 mM, a tiempo final (n= 3).....	54
Cuadro 6.	Análisis del tamaño de halo de oxidación (cm ²) entre las cepas nativas de <i>Ganoderma</i> en medio PDA adicionado con AAS 100 µM y substrato enzimático ABTS 0.5 mM a tiempo final (n= 3).....	54
Cuadro 7.	Análisis de la actividad volumétrica de lacasas (U/mL) de cada cepa nativa de <i>Ganoderma</i> en medio PDA adicionado con AAS 100 µM y substrato enzimático ABTS 0.5 mM, a tiempo final (n= 3).....	55
Cuadro 8.	Análisis entre cepas de la actividad volumétrica de lacasas (U/mL) de cepas nativas de <i>Ganoderma</i> en PDA adicionado con AAS 100 µM y substrato enzimático ABTS 0.5 mM a tiempo final (n= 3).....	55
Cuadro 9.	Análisis por cepa de la biomasa seca (mg/mL) producida por cepas nativas de <i>Ganoderma</i> durante la cinética en medio de cultivo líquido papa dextrosa (MLPD) y MLPD + AAS 100 µM (n= 3).....	56
Cuadro 10.	Análisis de la biomasa seca (mg/mL) producida entre las cepas nativas de <i>Ganoderma</i> durante cinética de cultivo en medio líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con AAS 100 µM (n= 3).....	57
Cuadro 11.	Análisis de la actividad volumétrica de lacasas (U/mL) por cepas nativas de <i>Ganoderma</i> durante cinética de cultivo en medios de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con AAS 100 µM (n=3).....	57
Cuadro 12.	Actividad volumétrica de lacasas (U/mL) de cepas nativas de <i>Ganoderma</i> durante cinética de cultivo en medios de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con AAS 100 µM (n=3).....	58

Cuadro 13.	Inducción (%) del ácido acetilsalicílico (AAS) en la producción de enzimas lacasas respecto al tratamiento testigo en el cultivo <i>in vitro</i> de tres cepas nativas de <i>Ganoderma</i>	60
Cuadro 14.	Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas de la estrategia propuesta.....	64
Cuadro 15.	Asignación de objetivos de la estrategia para el aprovechamiento de recursos genéticos nativos de <i>Ganoderma</i> spp. como cepas productoras de enzimas lacasas.....	67
Cuadro 16.	Material biológico depositado en el UREGENHCFyM empleado en el entrecruzamiento de cepas para confirmar el género de las cepas estudiadas.....	77
Cuadro 17.	Morfología de las colonias de acuerdo a su interacción.....	78

I. INTRODUCCIÓN

El hombre ha aprovechado los hongos silvestres durante miles de años ya sea como alimento o medicamento. De las 1.5 millones de especies de hongos estimadas, alrededor de 10,000 producen cuerpos fructíferos a los que llamamos setas. Mientras que la recolección de hongos silvestres continúa en la actualidad, la mayor parte de la oferta mundial proviene de productores comerciales de hongos (Barney, 1997).

En México el cultivo de los hongos comestibles inició a mediados de la década de los 30's; sin embargo, la actual industria en el país data de apenas 40 años, y a partir de 1974 se empezó con las orejas blancas o setas (*Pleurotus ostreatus*). Cultivar hongos comestibles en residuos agroindustriales ha demostrado sus bondades y siendo México un país esencialmente agrícola, en el que se producen millones de toneladas anuales de residuos, cuenta con un potencial enorme para el cultivo de los hongos en tales desechos (Guzmán *et al.*, 1993).

En la actualidad el cultivo de hongos comestibles es una actividad que se ha manifestado como una alternativa para la obtención de alimentos para el consumo humano y se puede lograr mediante técnicas sencillas de bajo costo y en cortos periodos de tiempo (Martínez-Carrera *et al.*, 2000). En cuanto al proceso de producción de alimentos, el objetivo del cultivo de hongos debe seguir el concepto holístico de la producción. Este enfoque intenta conectar diferentes objetivos, calidad y seguridad del producto, alta eficiencia de producción y aspectos medioambientales en el desarrollo de productos y la producción de alimentos. En la práctica, la gestión integrada del cultivo de hongos es el uso de substrato gastado, que es el medio de cultivo residual después de la cosecha. Uno de sus usos potenciales es el aprovechamiento de las enzimas lignocelulósicas (Rinker, 2002; Laufenberg *et al.*, 2003).

Actualmente, uno de los hongos comestibles con más propiedades es *Ganoderma lucidum* (Fr.), el cual es un basidiomiceto que pertenece a los Polyporaceae (o Ganodermataceae), con propiedades medicinales muy ampliamente conocido en China, Japón, Corea, y otros países asiáticos. Su producción en fermentación en

estado sólido incluye además de la obtención de cuerpos fructíferos, enzimas lignocelulósicas del substrato residual para usos industriales (Zhou *et al.*, 2012).

Ganoderma es también un hongo de pudrición blanca, éstos microorganismos son los más eficientes degradadores de biopolímeros, debido a su capacidad para sintetizar importantes enzimas extracelulares hidrolíticas (celulasas y hemicelulasas) y oxidativas (ligninolíticas), éstas a su vez poseen la capacidad de transformación de contaminantes orgánicos a moléculas más simples (Mougin *et al.*, 2009; Philippoussis, 2009). Sin embargo, una limitación para las aplicaciones industriales de estas enzimas es su elevado costo. Por lo tanto, una buena estrategia para aumentar la productividad en el proceso de fermentación sería la optimizar el substrato y usar inductores para aumentar la actividad de dichas enzimas (Manavalan *et al.*, 2013).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Biotecnología y desarrollo

La aplicación de la biología en la transformación natural es una tecnología muy antigua. Tiene como epicentro el uso de procesos biológicos como herramientas de transformación de materias primas en productos finales. Esos procesos fueron desarrollados a partir de mecanismos de prueba y error y “afinados” desde el siglo XIX con diversas técnicas. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, por sus siglas en inglés) define a la biotecnología moderna como la aplicación científica y tecnológica de organismos vivos, sus partes, productos y modelos destinados a modificar organismos vivos y/o materiales aplicados a la producción de conocimientos, bienes y servicios. Se trata de conocimientos que tienen un conjunto de principios científicos y técnicos comunes y una larga lista de especificidades técnicas aplicables a desarrollos específicos. Es una plataforma tecnológica que sirve de base para tecnologías específicas de uso concreto en actividades productivas (Bisang *et al.*, 2009). Así la biotecnología radica en un gradiente de tecnologías (Fig. 1), que van desde las técnicas establecidas desde hace tiempo y ampliamente utilizadas en la biotecnología tradicional, hasta las técnicas nuevas y en continua evolución de la biotecnología moderna.

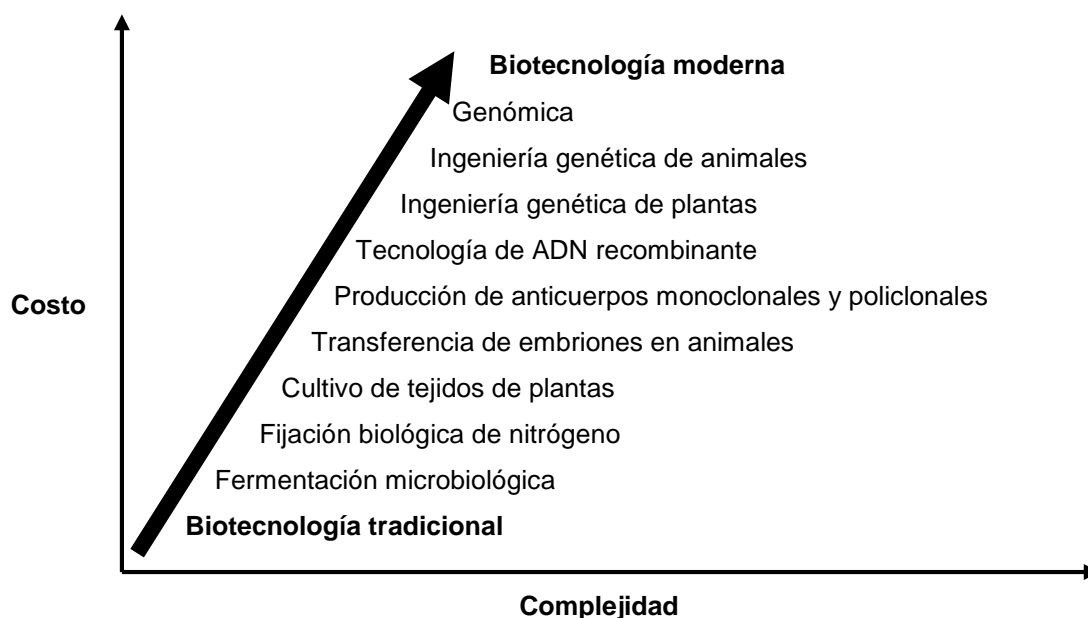


Figura 1. Gradiente de biotecnologías (Nangju, 2001).

La biotecnología, como nueva tecnología tiene un amplio impacto en muchos sectores productivos, será determinante para los logros de los objetivos de competitividad, sostenibilidad y equidad que exige el desarrollo de América Latina. Ello es particularmente válido para la agricultura y la agroindustria, industrias biológicas por excelencia llamadas a desempeñar un papel crucial en las perspectivas de desarrollo de la región. 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).

2.1.1. Biotecnología de hongos comestibles

El término hongo se ha utilizado de manera general aunque su uso más restringido incluye sólo a aquellos especímenes grandes que son comestibles o de valor medicinal. El término basidiocarpo se define como "un cuerpo fructífero distintivo que puede ser epigeo (encima del suelo) o hipogeo (bajo tierra) y lo suficientemente grande como para ser visto a simple vista y para ser recogido a mano" (Miles y Chang, 2004). El número de hongos filamentosos que son macrohongos en el sentido de esta definición es de al menos 14,000 y quizá tantos como 22,000. Sin embargo, el número real de dichas especies en la Tierra es, sin duda, mayor. Se conoce que la proporción de hongos aprovechados por el hombre es del 5%, esto sugiere que existen 7000 especies sin aprovechar que posiblemente aportarían beneficios a la humanidad. Desde el punto de vista taxonómico, los basidiomicetos y ascomicetos de algunas especies pertenecen a la categoría de los macrohongos, los cuales están ampliamente distribuidos en la tierra y aproximadamente el 10% de ellos se estudian (Hawksworth, 2001). La literatura menciona alrededor de 2,000 especies de hongos comestibles, pertenecientes a 31 géneros. Se han cultivado experimentalmente alrededor de 100

especies, 50 se utilizan económicamente y 20-30 especies se cultivan en diferentes partes del mundo (Upadhyay y Singh, 2010).

La biología de hongos consiste en dos componentes principales: la ciencia de hongos, la cual se ocupa de la producción de hongos y abarca los principios y técnicas de la tecnología de compostaje, la ingeniería ambiental, y la microbiología; y la biotecnología de hongos, que se ocupa de los productos de hongos y abarca los principios y prácticas de la tecnología de fermentación y procesamiento, y también la microbiología. Además, la comercialización y la gestión son segmentos importantes tanto para la ciencia como para la biotecnología de hongos (Miles y Chang, 2004).

Ahora ya pueden distinguirse dos grandes tendencias en la biotecnología de hongos comestibles a nivel mundial: 1) Biotecnología aplicada, y 2) Biotecnología moderna. La biotecnología aplicada en hongos comestibles se ha derivado de las técnicas tradicionales, enriquecidas con innovaciones biológicas, mecánicas, y experiencias locales derivadas de un contexto social, económico y ecológico. En cambio, la biotecnología moderna se ha desarrollado y visto fortalecida con poderosas tecnologías que permiten el estudio y manipulación directa del material genético de los hongos comestibles, concretamente del ácido desoxirribonucleico (ADN).

Actualmente, aunque con menor grado de desarrollo, pueden identificarse en México las tendencias predominantes a nivel mundial. La biotecnología aplicada cuenta con mayor desarrollo y ha dado lugar a la producción comercial de hongos comestibles, a pequeña o gran escala, por parte de los sectores privado y social. El sector privado lo ha hecho en mayor medida durante los últimos 70 años, mientras que el sector social inició más recientemente apoyándose en el sector público, tanto académico como de programas de desarrollo gubernamentales. La biotecnología moderna se ha iniciado recientemente en el sector académico, aunque su impacto potencial en el largo plazo es también bastante prometedor ya que se dispone de sistemas de transformación genética (Martínez-Carrera *et al.*, 2007).

2.1.2 Aprovechamiento de los hongos comestibles

Desde hace varios miles de años, se conoce la existencia de hongos comestibles y no comestibles, los cuales han atraído la atención de los seres humanos, no sólo por sus fascinantes formas, tamaños, colores y estructuras, sino también debido a sus propiedades nutraceuticas y sus aplicaciones prácticas en diversos productos industriales. Los hongos son una fuente de nutrientes y de minerales, hoy en día también se valoran a causa de sus moléculas bioactivas empleadas en el tratamiento de varias enfermedades. Dentro de las especies no comestibles, conocidas sólo por sus propiedades medicinales se incluyen *Ganoderma lucidum* y *Trametes ssp.*, estas destacan por ser gruesas, de textura dura, y poseer un sabor amargo (Ganeshpurkar *et al.*, 2010; Upadhyay y Singh, 2010).

La producción de hongos comestibles inició como una auténtica biotecnología tradicional, basada en técnicas sencillas de propagación, hace aproximadamente 1,000-1,400 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).

Los hongos comestibles no sólo pueden llegar a ser alimentos nutritivos ricos en proteínas, también pueden proporcionar productos nutraceuticos y farmacéuticos. Los hongos tienen un gran potencial para el consumo interno del país, así como para la exportación. El aspecto más significativo es el reciclaje de subproductos en cada etapa de la producción de hongos y la creación de un ambiente libre de contaminación. Por lo tanto, las setas con su gran variedad de especies complementan la nutrición y alivian el sufrimiento causado por ciertos tipos de enfermedades mediante sus propiedades medicinales, sus derivados nutraceuticos y farmacéuticos. Por los avances en el conocimiento biológico básico y los de la tecnología práctica en la industria relacionada

con los hongos, donde se utilizan los materiales celulósicos de desecho que se encuentran en abundancia en las zonas rurales y urbanas pueden tener un impacto global positivo a largo plazo en la conservación del medio ambiente (Miles y Chang, 2004).

2.2 Recursos genéticos de *Ganoderma lucidum* en México

Por "recursos genéticos" se entiende el material genético de valor real o potencial (ONU, 1992). *G. lucidum* (Fr.), es un basidiomiceto que pertenece a los Polyporaceae (o Ganodermataceae). Los hongos poliporales son clasificados por tener muchos poros pequeños en la parte inferior del cuerpo fructífero, los cuales contienen las esporas, y una apariencia leñosa o coriácea. Las especies de *Ganoderma* pertenecen al reino Fungi, 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 presentado por el micólogo finlandés Peter Adolf Karsten, en 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).

Ganoderma, es probablemente el género morfológicamente más complejo de los poliporáceos. Los cuerpos fructíferos son estipitados, dimidiado, o reniformes y rara vez suborbicular. Son gruesos y de color amarillento en los márgenes de crecimiento y marrón en la parte madura con brillo lacado en la superficie. El margen de los cuerpos fructíferos suele ser delgado o trunco y, a menudo ligeramente encorvado hacia

dentro. El estípite es lateral y rara vez excéntrico. Es espeso y oscuro, y luego se vuelve un color púrpura-marrón. El pie lacado es más visible y brillante que el píleo. Los poros son de color blanco en un primer momento y se vuelven de color marrón claro en una etapa posterior. Las esporas son de color marrón, ovoide y truncan en un extremo. Aunque la taxonomía del género *Ganoderma* todavía no está claramente definida, el análisis de las secuencias de la región ITS-ADN ha permitido identificar tres linajes de *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. *sensu lato* en México (Morales *et al.*, 2010).

2.3 Actividad enzimática de *G. lucidum*

Los hongos de la pudrición blanca comprenden a las especies cultivadas como *Ganoderma* spp. Su estrategia general en la obtención de fuentes de carbono consiste en descomponer la lignina de la madera para tener acceso a la celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, la expresión de las lacasas en los hongos está influenciada por las condiciones de cultivo, tales como la naturaleza y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, composición de los medios, pH, temperatura, presencia de inductores y materiales lignocelulósicos, etc. Muchos estudios han identificado el papel de la maquinaria enzimática (lacasas, lignina peroxidasa y la peroxidasa dependiente de Mn) de los hongos ligninolíticos en la capacidad de transformación de contaminantes orgánicos (Mougin *et al.*, 2009; Philippoussis, 2009). 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 (Janusza *et al.*, 2013; Manavalan *et al.*, 2013; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013).

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. Los estudios demuestran que bajo ciertas condiciones las lacasas y manganeso peroxidasas son capaces de oxidar tanto substratos fenólicos como no fenólicos. 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). Los hongos pueden detectar e inducir respuestas celulares apropiadas para muchos componentes de su entorno, tales como nutrientes, temperatura, feromonas, luz, y también xenobióticos. Se requiere una respuesta adecuada a diversos factores ambientales para la supervivencia de hongos, en particular bajo condiciones de estrés (Maciel *et al.*, 2013).

G. lucidum es uno de los hongos de pudrición blanca más importantes y ampliamente distribuidos en el norte América y se asocia con la degradación de una amplia variedad de maderas duras. Los estudios previos de *G. lucidum* se han concentrado principalmente en las propiedades medicinales de este hongo y, a excepción de dos informes preliminares breves, poco se sabe sobre el sistema ligninolítico de este organismo (D'Souza *et al.*, 1999).

2.4 Uso de inductores para la producción de enzimas

Una limitación para las aplicaciones industriales de lacasas es su elevado costo. Por lo tanto, una buena estrategia para aumentar la productividad en el proceso de fermentación sería la optimización del medio y el uso de inductores. Muchos compuestos aromáticos se han utilizado ampliamente para estimular la producción de lacasas. Por ejemplo, el ácido ferúlico y pirogalol han sido reportados como inductores eficaces para la producción de lacasas por *G. lucidum* y *Pleurotus sajor-caju*. Desafortunadamente, la mayoría de estos compuestos aromáticos son o muy dañinos para los humanos o bastante caros, lo que impide su uso de aplicaciones industriales (Manavalan *et al.*, 2013). El cobre es otro substrato que puede inducir la producción de lacasas debido a que este metal es parte de la estructura de la enzima (Valeriano *et al.*, 2009). Además de estar relacionado con la regulación de la expresión de lacasas

en basidiomicetos (Giardina *et al.*, 2010). Kuhar y Papinutti (2014), evaluaron la capacidad de cepas de *G. lucidum* para producir lacasas con metales pesados y compuestos fenólicos, encontrando que entre las sustancias ensayadas, el cobre y el ácido ferúlico son los mejores inductores de éstas enzimas. También se observó que los dos tipos de inductores (fenólicos y metálicos) producen diferentes patrones electroforéticos de lacasas. A la par encontraron que la enzima es más termoestable a valores de pH más altos.

2.5 Propiedades del ácido acetilsalicílico (AAS) como inductor de actividad enzimática

El ácido salicílico ha sido reconocido por tener un papel en la capacidad de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos. Por el contrario, las propiedades terapéuticas humanas del ácido salicílico (ácido 2-hidroxi-benzoico) se conocen desde hace más de 25 siglos. En medicina tradicional la corteza de los árboles de sauce (*Salix* spp.) se masticaba para proporcionar alivio del dolor y la inflamación, como se describe en los escritos por el médico griego, Hipócrates (Siglo V a. C.) y el médico y botánico Dioscórides (Siglo I d. C.). El ácido salicílico, componente terapéutico en la corteza de sauce, fue identificado por primera vez y aislado durante el siglo XIX y modificado químicamente en lo que se conoce hoy en día como la aspirina o ácido acetilsalicílico (Delaney, 2010).

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).

Rendón-Hernández (2015), indicó que el ácido acetilsalicílico tiene un efecto en la fisiología de los hongos *Fistulina guzmanii*, *Volvariella bombycina* y *Hericiium erinaceus*, así como en su eficiencia biológica y en el contenido de proteínas a una concentración de AAS 100 μ M. You *et al.* (2013), usaron aspirina 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, metabolitos secundarios con propiedades funcionales.

Martínez-Carrera *et al.* (2016), emplearon AAS μ 100 μ M en el cultivo de la 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. En tanto que Meneses *et al.* (2016), señalaron las propiedades hipocolesterolemiantes (reducción de nivel de colesterol en suero) y efectos prebióticos de extractos estandarizados de *G. lucidum* cultivado en substratos adicionados con ácido acetilsalicílico en una concentración de 10 mM en modelo animal (ratones, cepa C57BL/6) después de 43 días de dieta experimental.

2.6 Lacasas: origen, análisis y aplicaciones

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) representan una familia de polifenol oxidasas que contienen cobre y generalmente son llamadas oxidasas multicobre. Las lacasas catalizan la oxidación monoelectrónica de moléculas de sustrato a radicales reactivos con la ayuda de cuatro átomos de cobre que forman el núcleo catalítico de la enzima, acompañado de la reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua y la oxidación análoga de cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales. Las lacasas se detectaron por primera vez en los exudados del árbol de la laca japonesa *Rhus vernicifera*. Entre los hongos de la pudrición blanca los basidiomicetes, ascomicetes y deuteromicetes se han encontrado como los productores más eficientes de lacasas. Estudios recientes

relacionados con los elementos de respuesta a producción de lacasas, sugieren una visión compleja de la regulación de la expresión de las mismas. Dado que la expresión de las lacasas es a menudo inducida por diversos factores fisiológicos diferentes, su región promotora puede contener elementos que intervienen en los mecanismos de respuesta a metales, a xenobióticos, de choque térmico o al estrés oxidativo (Baldrian, 2006).

Las lacasas presentan una amplia gama de sustratos que varían de una lacasa a otra. A pesar de que se sabe que es difenol oxidasa, los monofenoles como fenol 2,6-dimetoxi o guayacol son mejores sustratos que los fenoles (por ejemplo, catecol o hidroquinona). Las lacasas pueden oxidar, polimerizar y escindir una amplia variedad de fenoles biológicos y sintéticos así como compuestos no fenólicos (Upadhyay *et al.*, 2016). Los tratamientos enzimáticos tienen amplio potencial en diversos campos industriales. Estos sistemas enzimáticos tienen ventaja respecto a los tratamientos físicos y químicos puesto que las enzimas son catalizadores biodegradables y de acción específica. Su empleo actual es el siguiente:

Deslignificación. La presencia de lignina en el forraje utilizado como alimento para rumiantes afecta a su digestibilidad. La deslignificación de tales materiales lignocelulósicos agrícolas también mejora su valor nutricional. La fermentación de la lignocelulosa para generar combustibles tales como etanol o butanodiol también requiere deslignificación (Mayer y Staples, 2002).

Biopulping y biolixiviación. Las lacasas de los hongos de pudrición blanca se pueden aplicar como agentes de biopulpeo a las astillas de madera antes de la fabricación de pasta, ya que degradan parcialmente la lignina y la suavizan. Esto mejora la resistencia del papel, ahorra energía eléctrica, mejora las propiedades, además es amigable con el medio ambiente debido a la menor toxicidad de los efluentes (Thakur *et al.*, 2012).

Transformación del tinte textil. La utilización de lacasas con la combinación de mediadores y celobiosa deshidrogenasa para la decoloración de los colorantes azoicos textiles ha demostrado ser una alternativa a los tratamientos químicos más

costosos, y menos favorables al medio ambiente de los residuos de colorantes textiles (Novotny *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2004).

Tratamiento de efluentes residuales. Las lacasas son empleadas en procesos de biorremediación mediante la polimerización entre sí o de copolimerización con otras sustancias no tóxicas tales como materiales húmicos contaminantes, lo que facilita una fácil extracción por medios tales como la adsorción, la sedimentación, o filtración (Couto y Herrera, 2006).

Biosolubilización del carbón. La solubilización de carbón ofrece la posibilidad de convertir el carbón en una amplia gama de productos químicos orgánicos que incluyen minerales de bajo peso y combustibles líquidos. La compleja estructura y naturaleza insoluble del carbón hacen que sea mucho menos susceptible. Las lacasas que utilizan sólo oxígeno molecular como un cofactor pueden resultar en un sistema económico. Las lacasas son capaces de decolorar ácidos húmicos derivados del carbón en condiciones en que la actividad de las lacasas son mínimas (Fakoussa y Hofrichter, 1999).

La degradación de los herbicidas. Los herbicidas con base fenol-urea son ampliamente utilizados para el control de hierbas y malas hierbas de hoja ancha en cultivos de cereales de invierno. Junto con otros xenobióticos los hidrocarburos aromáticos policíclicos, son las principales fuentes de contaminación en el suelo. Las lacasas pueden utilizarse para degradar tales moléculas recalcitrantes (Mayer y Staples, 2002).

El tratamiento de alimentos. Las lacasas son aplicables en la eliminación de compuestos fenólicos no deseables responsables de pardeamiento y el desarrollo de turbidez en zumos de frutas, cerveza y vino (Minussi *et al.*, 2002).

Aplicaciones en medicina. Las lacasas son empleadas para sintetizar productos de importancia farmacéutica. Las lacasas pueden ser usadas en la síntesis de compuestos médicos complejos como anestésicos, antiinflamatorios, antibióticos, sedativos, etc. (Nicotra *et al.*, 2004). La capacidad de oxidación de las lacasas

también puede emplearse para producir yoduro de potasio, un reactivo ampliamente utilizado como desinfectante (Xu, 1999).

Biosensor e inmunoquímicos. Un biosensor es un dispositivo que detecta, transmite y registra información relativa a un cambio fisiológico o bioquímico. Se han desarrollado biosensores para la detección de O₂, glucosa, aminas aromáticas, compuestos fenólicos, y una amplia variedad de sustratos que contienen la reducción de lacasas. Las lacasas que se conjugan covalentemente a un anticuerpo o antígeno se pueden utilizar como enzimas marcadoras para ensayos inmunoquímicos (Arora y Sharma, 2009).

Regulación de la expresión de lacasa. Una amplia gama de factores, incluyendo los niveles de nutrientes, condiciones de cultivo, la presencia de compuestos inductores así como la etapa de desarrollo han demostrado afectar los niveles de expresión génica de lacasas. La expresión de los genes de lacasas están regulados a nivel transcripcional, y que iones metálicos, diversos compuestos aromáticos, nitrógeno y todas las fuentes carbono pueden regular la expresión de genes de lacasas (Piscitelli *et al.*, 2010).

Las características más significativas de la expresión de lacasas en los hongos de la pudrición blanca son sus respuestas inductivas hacia iones metálicos y ciertos compuestos aromáticos, mediados por cobre. Los compuestos aromáticos como 2,5-xilidina, ácido ferúlico, o ácido verátrico se han añadido al medio de cultivo mejorando los niveles de producción de lacasas al inducir su expresión (Giardina *et al.*, 2010). Además de estos inductores la 2,5-xilidina, 2,6-dimetoxifenol, ácido vinílico, catecol y pirogalol también pueden ser utilizados para inducir la expresión de lacasas (Elisashvili y Kachlishvili, 2009; Furukawa *et al.*, 2014).

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1. Ciclo de vida de *G. lucidum*

G. lucidum es un hongo basidiomiceto, por lo que su ciclo de vida se enmarca dentro del ciclo general de los hongos pertenecientes a este filo (Fig. 2). Inicia cuando una basidiospora germina para formar una colonia de ramificación de hifas filamentosas. Este micelio joven está compuesto de múltiples compartimientos, separados por tabiques con doliporo y núcleo haploide. Estos núcleos se forman por mitosis, empezando por la primera división del único núcleo de la espora de origen. El micelio resultante se denomina homocarión debido a que todos sus núcleos son clones genéticamente idénticos. El micelio homocarión se expande a través del suelo y la madera, u otros materiales alimenticios. Cuando un par de homocariotes sexualmente compatibles se combinan producen micelio heterocariótico en el que cada compartimiento hifal contiene un par de núcleos, derivado de cada homocarión. Los términos dicarión y micelio dicariótico también se usan para describir estas colonias. La aparición de un hongo a partir de la colonia comienza con el desarrollo de un nudo de hifas. Este agregado es del tamaño de la punta de un alfiler, donde las células esperan las condiciones ambientales propicias para una rápida expansión del cuerpo fructífero.

Los basidios se forman en los extremos de las hifas cuyas puntas dejar de crecer en la superficie de las laminillas del cuerpo fructífero, éstos tejidos del cuerpo fructífero se conoce como himenio. Como los miles de millones de otros compartimientos de células dentro del tejido del hongo, los jóvenes basidios son heterocarióticos. Se fusionan y luego se someten a la meiosis para producir cuatro núcleos haploides, cada uno de los cuales se desplazan a una de las cuatro basidiosporas formadas a partir del basidio. Las esporas se caen desde la superficie de las laminillas por mecanismos diferentes. *Ganoderma* puede arrojar 30 mil millones de esporas por día, unos más de 5 billones en los 6 meses que el soporte perineal está activo cada año (Money, 2015).

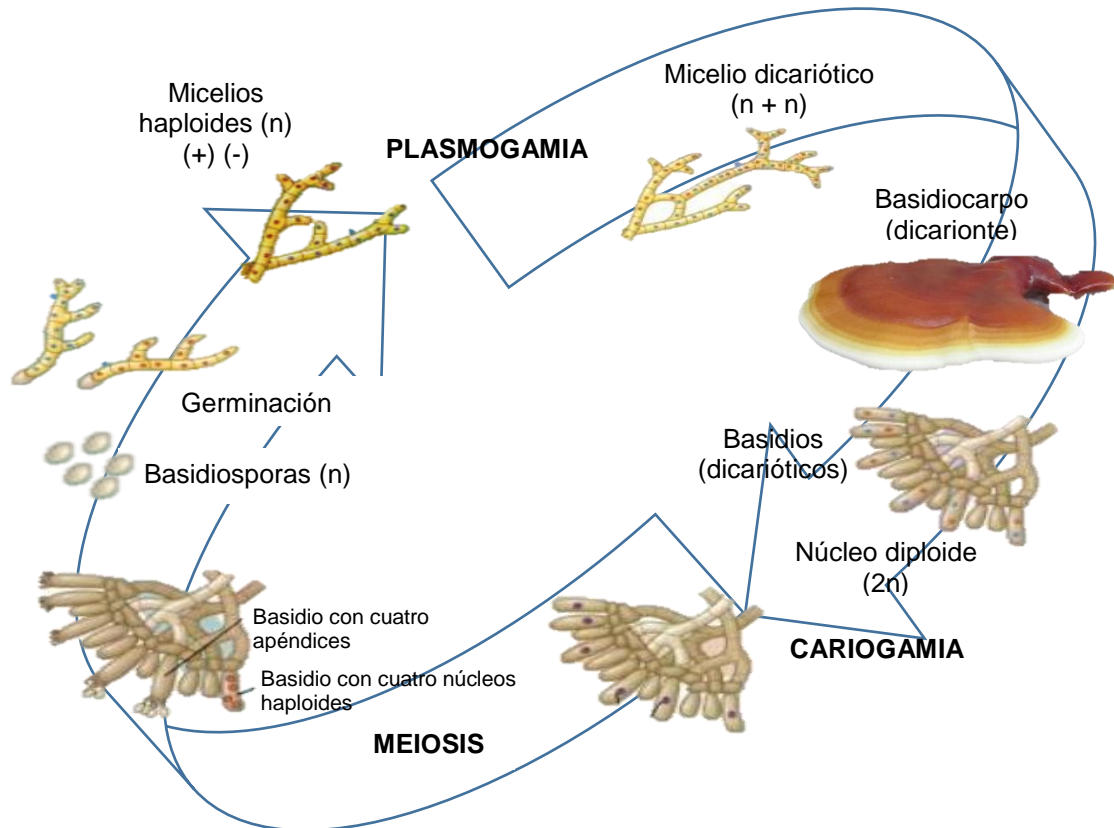


Figura 2. Ciclo de vida de *Ganoderma lucidum* (Modificado de: Mukhin y Votintseva, 2002; Campbell y Reece, 2007).

3.2 Fisiología de *G. lucidum*

Los Ganodermataceae son basidiomicetos cosmopolitas que causan la pudrición blanca de maderas duras como el roble y el arce, por la descomposición de la lignina, así como celulosa y polisacáridos relacionados. Los basidiocarpos producidos de forma natural por *G. lucidum* muestran varias características morfológicas; sésiles, estipitado, imbricados y no imbricados. El color de la superficie del píleo e himenóforo varían de color rojo oscuro, no lacado, lacado y amarillo claro a blanco, y la morfología también difiere entre los aislamientos. La variación morfológica parece ser afectada por las condiciones ambientales durante el desarrollo del basidiocarpo. En los *Ganodermataceae*, el sistema de las hifas es generalmente trimítico, ocasionalmente dimítico, las hifas generativas son hialinas, de paredes delgadas, ramificado, tabicado o no. Los basidios y basidiosporas son considerados como los más importantes para

la identificación de especies. Los basidios en *Ganoderma* alcanzan un tamaño relativamente grande y van desde ensanchados a piriformes. Las basidiosporas de *Ganoderma* son ovoides o elipsoide-ovoide, ocasionalmente cilíndrico-ovoide y siempre truncadas en el ápice. La pared no está engrosada de manera uniforme, la pizca del ápice siempre es más gruesa que la base. Es muy distintivo el que posea doble pared, la hialina exterior es más delgada, y la interior por lo general es más gruesa y equinulada (Seo y Kirk, 2000).

Los parámetros de crecimiento y la obtención de cuerpos fructíferos, se resumen en base a lo propuesto por Miles y Chang (2004):

1. Temperatura: La temperatura para el crecimiento micelial oscila de 15 a 35 °C y la temperatura óptima es de 24 a 25 °C. Para la iniciación de primordios oscila de 18 a 25 °C; y para el desarrollo de cuerpo fructífero es de 20 a 25 °C.
2. Contenido de agua en el sustrato: Se mantiene entre 60% a 65%.
3. Humedad relativa: El micelio requiere del 60% a 70% de humedad; la iniciación de primordios de un 85% a 90% y el desarrollo de fructificación entre 70% a 85%.
4. Ventilación: Durante el período de fructificación, la buena ventilación es necesaria.
5. pH: El óptimo es de 5,0 a 5,5.
6. Luz: Durante la iniciación de primordios, se requiere luz de aproximadamente 500 a 1000 lux; y para el desarrollo del cuerpo fructífero 750-1500 lux.

3.3 Cultivo de *G. lucidum* en sustratos sólidos

Las condiciones de nutrición para su crecimiento incluyen fuentes de carbono como celulosa, hemicelulosas y lignina, nitrógeno, sales inorgánicas y factores de crecimiento. El aserrín de árboles de hoja ancha y subproductos agrícolas, como la cáscara de la semilla de algodón, paja, rastrojo de maíz, salvado de trigo, polvo de maíz, polvos gruesos de salvado de arroz, sulfato de amonio, urea, etc., se emplean en el cultivo de los cuerpos fructíferos.

Los métodos de cultivo de *G. lucidum* se pueden dividir en dos tipos, en cultivo sumergido y en fermentación en estado sólido. La fermentación en medio sólido de *G.*

lucidum en contraste con el estado líquido, es el cultivo en ausencia de agua libre. Los ejemplos de producción de fermentación en estado sólido incluyen además de la obtención de cuerpos fructíferos, a las enzimas industriales, biocombustibles, biopesticidas y alimentos para animales enriquecidos con nutrientes, etc. (Zhou *et al.*, 2012).

3.4 Estado del arte de las enzimas en *G. lucidum*

En los últimos años se han realizado investigaciones sobre la identificación de genes de lacasas de diferentes hongos (Cuadro 1). Gracias a la secuenciación del genoma de *G. lucidum* se ha encontrado que en comparación con los modelos de los hongos de la pudrición blanca, como *Phanerochaete chrysosporium* y *Schizophyllum commune*. *G. lucidum* posee un conjunto grande de enzimas ligninolíticas como las lacasas, el cual apenas es superado por *Coprinopsis cinerea*. La distribución de genes de enzimas lignocelulósicas clasifica a *G. lucidum* como un hongo particularmente versátil equipado con un notable arsenal enzimático (Chen *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Número de genes de lacasas conocidos en algunas especies de hongos (Liu *et al.*, 2012; Floudas *et al.*, 2015).

Especie	Genes de lacasas
<i>Coprinopsis cinerea</i>	17
<i>Ganoderma lucidum</i>	16
<i>Pleurotus ostreatus</i>	12
<i>Agaricus bisporus</i>	12
<i>Laccaria bicolor</i>	11
<i>Volvariella volvacea</i>	11
<i>Trametes versicolor</i>	7
<i>Auricularia subglabra</i>	7
<i>Fomitopsis pinicola</i>	6
<i>Schizophyllum commune</i>	5
<i>Fistulina hepatica</i>	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1

Parte de la investigación molecular de enzimas de *G. lucidum* está basada en la generación de modelos computacionales para la identificación y selección de genes que codifican estas enzimas. Así como la clonación de genes sintéticos en *Pichia pastoris* para el diseño de sistemas de expresión (Sun *et al.*, 2012; You *et al.*, 2014; Rivera-Hoyos *et al.*, 2015).

La reciente investigación sobre lacasas de *Ganoderma* surge en el interés de encontrar enzimas de bajo costo capaces de degradar lignina y compuestos fenólicos contaminantes, por lo que se pretende su uso en aplicaciones ambientales tales como la degradación de colorantes textiles. En este caso, existen reportes sobre las características bioquímicas y la capacidad de decoloración de tintes industriales por parte de las isoenzimas de lacasas, pero las más recientes innovaciones radican en evaluar la acción sinérgica de diferentes isoenzimas de lacasas para decolorar los diferentes tipos de colorantes (Feng *et al.*, 2014). En el caso de compuestos lignocelulósicos, las lacasas de *G. lucidum* son candidatas en el procesamiento de biomasa debido a su acción de hidrolisis de lignina para mejorar la eficiencia en la producción de biocombustibles como el bioetanol (Fang *et al.*, 2015).

3.5 Avances en México de las investigaciones de *G. lucidum*

Aunque la taxonomía del género *Ganoderma* todavía no está claramente definida, el análisis de las secuencias de la región ITS-ADN ha permitido identificar 66 cepas del género *Ganoderma* aisladas en 5 estados del área central de México. Se encontraron tres linajes de *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. *sensu lato* en México. Asimismo, un segundo linaje incluye cepas de *Ganoderma* spp. que muestran distancia genética con respecto a las especies más cercanas, tales como *G. australe* (Fr.) Pat., *G. gibbosum* (Blume & T. Nees) Pat., *G. lobatum* (Schwein.) G. F. Atk., *G. pfeifferi* Bres. *G. resinaceum* Boud., *G. tornatum* (Pers.) Bres. y *G. tsugae* Murrill. (Tello-Salgado, 2010). Los recursos genéticos de *Ganoderma* son relevantes en virtud de las propiedades funcionales y medicinales de los compuestos bioactivos registrados en el género (Morales *et al.*, 2010). A nivel laboratorio están presentes los estudios realizados con cepas nativas de *Ganoderma* cultivadas en medio líquido para evaluar la capacidad de producción de enzimas lacasas de las cepas CP-145 y CP-205 a 40 y 10 días,

encontrando valores máximos de 8.9 U/mL y 1 U/mL, respectivamente (Spezzia-Mazzocco, 2012; Bernabé-González, 2015). En tanto que Guerrero-Torres *et al.* (2013), realizó el diseño de cebadores para el gen de la (1,3)- β -glucano sintasa la cual es una de las principales enzimas involucradas en la síntesis del β -(1,3) (1,6)-D-glucano, un compuesto de la pared celular de los hongos que presenta efectos inmunomoduladores y anticancerígenos utilizando como modelo la CP-132 de *G. lucidum*. Además, se han seleccionado especies con potencial de utilización a nivel comercial como la CP-388 de *Ganoderma* spp. depositada en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla (Sobal *et al.*, 2007). Esta cepa se cultiva de acuerdo al proceso biotecnológico de producción intensiva de hongos comestibles y medicinales, empleando sustratos estériles con protocolos ya establecidos. En tanto que a nivel comercial, en México durante el periodo 1991-2009 se registraron un gran número de nuevas empresas y productores de hongos comestibles y funcionales, quienes han realizado pruebas a escala comercial del cultivo de *G. lucidum* (Morales *et al.*, 2010).

3.6. Producción de enzimas lacasas de *G. lucidum*

La producción de lacasas de *G. lucidum* es recientemente investigada a nivel laboratorio, empleando inductores en forma de fuentes de carbono, compuestos fenólicos y iones metálicos para el incremento de la producción de éstos catalizadores biológicos en cultivos líquidos (Kuhar y Papinutti, 2014).

Una gran mayoría de los estudios sobre la producción de lacasas se han llevado a cabo con medios definidos e indican una amplia diversidad en su respuesta a las fuentes de carbono y su concentración en medio nutriente (Elisashvili *et al.*, 2002, Galhaup *et al.*, 2002, Mikiashvili *et al.*, 2005, Elisashvili *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Se han realizado estudios usando residuos agroalimentarios como salvado de maíz, salvado de soya, salvado de trigo, plátano y cáscaras de mandarina (Songulashvili *et al.*, 2007).

También se ha realizado investigación sobre la producción de lacasa por fermentación en estado sólido empleando *Ganoderma*, entre los desechos agrícolas utilizados, se

encuentran el salvado de trigo, salvado de arroz, bagazo de caña de azúcar, virutas de madera, salvado de avena, fibra de coco y la cáscara de cacahuate (Revankar *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2015).

IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

México posee una mega diversidad de recursos genéticos. Recientemente, ha existido un interés en la identificación, aislamiento y conservación de cepas del género *Ganoderma* para su empleo como alimento funcional y obtención de compuestos bioactivos. Actualmente, el cultivo de *G. lucidum* está enfocado a la producción de cuerpos fructíferos para la obtención de metabolitos con actividad nutracéutica y medicinal (Miles y Chang, 2004). Se sabe que por esta propiedad, existen diferentes presentaciones comerciales de *Ganoderma* para consumo humano. Debido a ello, se han realizado investigaciones para aprovechar sustratos de madera de árboles de rápido crecimiento o formulaciones que permiten valorar de mejor manera otros subproductos agrícolas para el cultivo de los hongos comestibles, funcionales y medicinales (Sobal *et al.*, 2010). Es de sumo interés estudiar y aprovechar los sustratos residuales o subproductos agroindustriales, los cuales poseen potencial para la obtención de enzimas empleadas en la industria papelera, ambiental, médica y biorremediación (Rinker, 2002). Estos sustratos también pueden considerarse como inductores naturales. Por otro lado, recientes investigaciones en el cultivo de hongos comestibles han demostrado la efectividad del uso de otros inductores, como sustancias policíclicas fenólicas y ácidos orgánicos que incrementan la producción de biomoléculas de interés durante su cultivo. Por tal motivo, es importante conocer en qué etapa del cultivo *in vitro* de este hongo, los inductores expresan en mayor proporción enzimas ligninolíticas y emplearlos para incrementar la producción de dichas enzimas. En este trabajo se estudió el efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) sobre la producción de enzimas lacasas en cepas nativas de *Ganoderma*. Esto permitirá considerar a este hongo como productor de dichas enzimas, las cuales tienen amplias aplicaciones biotecnológicas. Se propone una estrategia que permita un aprovechamiento integral del cultivo de *G. lucidum* en México.

V. HIPÓTESIS

El ácido acetil salicílico (AAS) adicionado a los medios de cultivo de *Ganoderma* spp. tendrá efecto sobre la actividad enzimática de lacasas en alguna de las cepas de estudio.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar a nivel laboratorio la producción de enzimas lacasas de cepas nativas de *Ganoderma* spp. empleando ácido acetilsalicílico (AAS) como inductor de las mismas en diferentes medios de cultivo.

6.2 Objetivos específicos

1. Cultivar tres cepas del hongo comestible *Ganoderma* spp. en medios de cultivo semisólidos y líquidos adicionados con AAS.
2. Cuantificar la actividad volumétrica de lacasas durante la cinética de crecimiento de *Ganoderma* spp. en los medios de cultivo adicionados con ácido acetilsalicílico (AAS).
3. Proponer una estrategia de cultivo de *Ganoderma* para desarrollar aplicaciones biotecnológicas para la producción de enzimas lacasas en la zona centro de México.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 3 se muestra el diagrama general de la metodología empleada en la presente investigación.

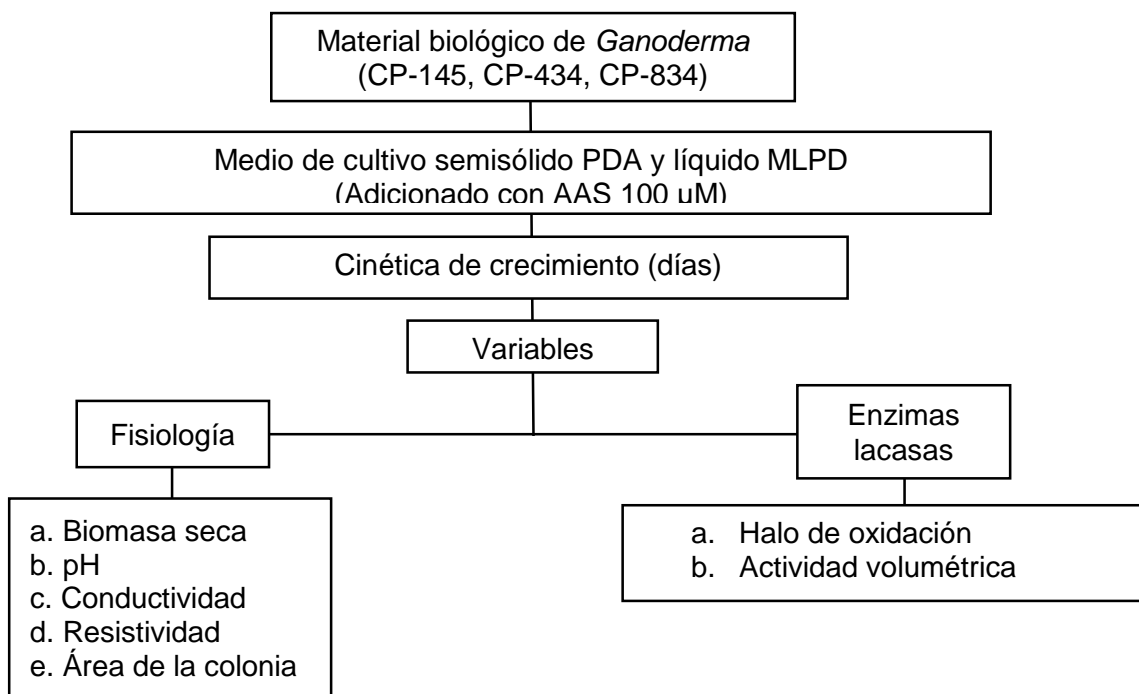


Figura 3. Metodología general empleada en este trabajo. PDA= Papa dextrosa agar. MLPD= Medio líquido papa y dextrosa.

7.1 Material biológico

El material biológico utilizado durante la investigación se encuentra depositado en la Unidad de Recursos Genéticos de Hongos comestibles, Funcionales y Medicinales (UREGENHCFyM) del Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Material biológico depositado en el UREGENHCFyM y empleado en esta investigación.

Especie	Registro	Procedencia
<i>Ganoderma lucidum</i>	CP-145	Cuernavaca, Morelos
<i>Ganoderma</i> spp.	CP-434	Sierra Norte de Puebla
<i>Ganoderma</i> spp.	CP-834	Estado de Morelos

Las cepas se cultivaron en la Unidad de Productos Biotecnológicos (UPB) del Laboratorio de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del *Campus* Puebla, para la confirmación de su cultivo (Fig. 4).

CP-145



CP-434



CP-834



Figura 4. Basidiocarpos cultivados de las cepas en estudio de *Ganoderma* spp. en substratos sólidos estériles a base de aserrín de encino. CP-145 es *Ganoderma lucidum*, CP-434 y CP-834 son *Ganoderma* spp.

7.2 Elaboración de medios de cultivo

7.2.1 Medios de cultivo semisólidos

Para el mantenimiento del material biológico, la obtención del inóculo y la actividad enzimática por el cambio de color en el medio de cultivo semisólido, se empleó el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA, Bioxon), el cual se preparó pesando la cantidad requerida en base a 39 g/L. Para los medios adicionados con inductores se empleó una solución de AAS (ácido acetilsalicílico) 100 μ M (Sigma) y una de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 0.5 mM (ABTS, Sigma), disueltas en agua destilada. Los medios elaborados fueron PDA, PDA + AAS 100 μ M, PDA+ABTS 0.5 mM y PDA + AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM. Una vez esterilizado el medio PDA se le adicionaron las soluciones elaboradas, según el diseño experimental, filtrando la solución a través de un filtro de membrana de celulosa (Advantec) de 0.20 μ m para mantener las condiciones de esterilidad del medio. Una vez obtenidos los medios se vaciaron en calas de Petri desechables de 60 x 15 mm (SYM Laboratorios, México) y se reservaron para su uso.

7.2.2 Medios de cultivo líquidos

Para la realización de la cinética de cultivo en medio líquido de papa y dextrosa (MLPD) se empleó Potato Dextrose Broth (Difco™), el cual se preparó de acuerdo a las instrucciones del frasco (24 g/L). En esta condición se utilizó como inductor únicamente la solución de AAS 100 μ M disuelta en agua destilada. Con esa solución se elaboró el medio cultivo MLPD + AAS 100 μ M y MLPD sin inductor (testigo), se trasvasaron 100 mL de cada medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 125 mL con tapa de baquelita, posteriormente se esterilizaron a 121.5 °C 15 lb/in² durante 25 minutos en autoclave (All American). Se empleó cinta testigo para corroborar la esterilidad de cada matraz.

7.3 Cinética de cultivo

7.3.1 En medio de cultivo semisólidos

Las cajas con medio PDA y las adicionadas con AAS 100 μM , con ABTS 0.5 mM y con ambas soluciones (AAS 100 μM + ABTS 0.5 mM) se inocularon en condiciones de esterilidad empleando un círculo de 0.5 cm de diámetro de micelio previamente crecido, el cual se colocó en el centro de la caja con ayuda de una aguja de disección. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente. Se estableció la cinética de crecimiento con las variables área de la colonia (cm^2) y halo de oxidación (cm^2). Se consideró detener la cinética de crecimiento cuando el halo de oxidación alcanzara 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.

7.3.2 En medio de cultivo líquidos

Para éstas condiciones se necesitó inóculo homogeneizado, el cual se preparó con 5 círculos de 0.5 mm de diámetro del micelio previamente desarrollado en medio de cultivo PDA en cajas Petri, en 2 mL de agua destilada estéril, esta mezcla se homogeneizó empleando el homogeneizador (PRO Scientific) con un rotor de 20 x 150 mm previamente esterilizado, a 5,000 rpm durante 30 segundos. Los matraces con medio líquido se inocularon dentro de la cámara de flujo laminar (SEV), empleando 1 mL de inóculo. Posteriormente se incubaron a 22°C a 155 rpm en incubadoras orbitales (Thermo Scientific) hasta su muestreo. La cinética de cultivo en medio líquido consideró 7 momentos, 0, 10, 20, 30, 40, 80 y 100 días de incubación. Para cada tiempo se consideraron 3 matraces en cada toma de muestra.

7.4 Variables estudiadas

En los medios semisólidos las variables a analizar a parte del halo de oxidación (cm^2) y área de la colonia (cm^2), se midieron el pH, la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y así como la actividad volumétrica de las lacasas (U/mL). En los medios líquidos las variables a analizar fueron la producción de biomasa seca (g/mL), pH, conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y la actividad volumétrica de lacasas (U/mL).

7.4.1 Área de la colonia

Para la determinación del área de la colonia (cm^2) se tomaron imágenes digitales de las cajas Petri con ayuda de una cámara Canon 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).

7.4.2 Halo oxidativo

Se consideró la aparición del halo de oxidación (cm^2) 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 7.4.1.

7.4.3 Obtención de la biomasa

Una vez filtrado el contenido de cada matraz, la biomasa obtenida en el papel filtro se pesó en charolas previamente taradas a peso constante en balanza analítica (Ohaus), después de esto las charolas se colocaron en un horno de secado (Felisa) a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas, transcurrido ese tiempo se determinó el peso seco. La biomasa se calculó por diferencia de peso entre la charola más el filtro y biomasa posterior al secado, y el peso de la charola más el filtro previo a ello. Esta variable se expresó como mg/mL de biomasa seca.

7.4.4 Obtención de la fase acuosa de los medios semisólidos y líquidos

La obtención de la fase acuosa de los medios de cultivo semisólidos se realizó colocando el contenido de cada caja en tubos para centrifuga de 50 mL (Corning), en homogeneizador (PRO Scientific) con rotor de 20 x 150 mm, a 5,000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL y se reservó para su análisis.

La fase acuosa del cultivo en medio líquido se obtuvo filtrando el contenido de cada matraz empleando papel filtro de poro medio colocado en un embudo Buchner recuperando el sobrenadante en un matraz Kitazato conectado a bomba de vacío (Fig.

5). Del sobrenadante se reservaron 3 muestras de 2 mL en tubos Eppendorf para la determinación de lacasas.



Figura 5. Obtención de la fase acuosa del medio de cultivo líquido utilizado para cultivar las cepas de *Ganoderma* spp.

7.4.4.1 Determinación de pH y conductividad de la fase acuosa de los medios semisólidos y líquidos

Una vez obtenida la fase acuosa se midió el pH, temperatura, conductividad y resistividad en el potenciómetro multiparámetro (Seven Excellence, Mettler Toledo, Columbus, OH) de cada réplica (Fig. 6).

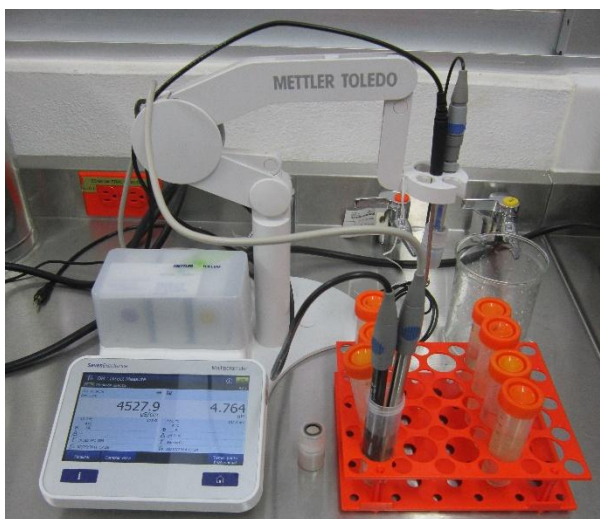


Figura 6. Determinación del pH y conductividad de la fase acuosa de los medios de cultivo.

7.4.5 Determinación de la actividad volumétrica de lacasa (U/mL)

Para la determinación de dicha actividad se utilizó el método de Bournonnais y Paice. (1990), que consiste en utilizar como sustrato indicador el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), a un máximo de absorbancia de luz de 420 nm. 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 μL de la solución reguladora de acetato de sodio pH 5 en cada pozo y se agregaron 20 μL de muestra o de agua (blanco) y 20 μL 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. Los resultados obtenidos se exportaron a una hoja de cálculo Excel y se analizaron (Fig. 7). 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 $29\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Bourbonnais *et al.*, 1998).

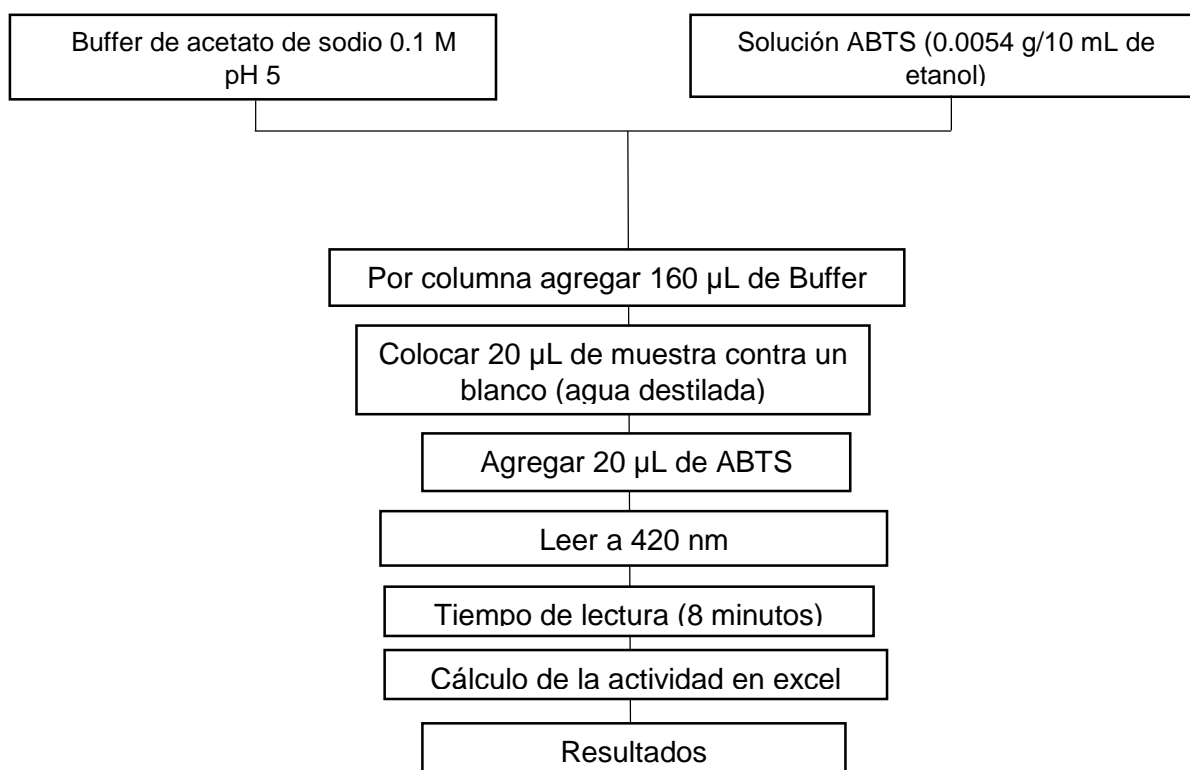


Figura 7. Determinación de la actividad volumétrica de lacasas en microplaca.

7.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($\alpha= 0.05$) empleando un diseño completamente al azar (Ntougias *et al.*, 2012; Postemsky *et al.*, 2014), para lo cual se empleó el paquete estadístico SAS Versión 9. Para las variables del medio semisólido (área colonizada y área del halo de oxidación) se realizó un análisis de varianza por cepa en los tratamientos y después un análisis completo comparando las tres cepas. Posteriormente, se realizó el análisis de medias para encontrar los grupos que fueran significativamente diferentes.

En el cultivo líquido se realizó el análisis de varianza de la biomasa seca producida y de la actividad volumétrica de lacasas por cepa, en los medios de cultivo empleados por cada punto de la cinética. Después, se realizó un análisis de medias para saber en qué condición y punto de muestreo de la cinética se presentaron los valores más altos y significativos por cepa y, después entre las tres cepas.

VIII. RESULTADOS

8.1 Fisiología de las cepas en medios de cultivo semisólido

En la figura 8, se muestra el crecimiento de las cepas de *Ganoderma* en los medios de cultivo semisólido utilizando el ABTS como indicador cualitativo de presencia de lacasas (halo de oxidación). La CP-145 de *G. lucidum* tardó 8 días para que halo llegara al borde de la caja, mientras que las CP-434 y CP-834 de *G. spp.* tardaron 13 días. La cepa CP-145 creció en todas las condiciones, tanto el área de la colonia como el halo de oxidación alcanzaron al mismo tiempo al borde de la caja de Petri. Se notó que las condiciones de cultivo cambiaron la apariencia de la colonia, siendo densa y abundante en PDA y PDA + AAS 100 μ M, y regular en PDA + ABTS 0.5 mM y PDA + AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM. Por el contrario, el desarrollo de halo de oxidación en la cepa CP-434 fue diferente, no formó halo en PDA ni PDA + AAS 100 μ M, un cambio de color azul-verde se notó alrededor de la colonia en el medio PDA + ABTS 0.5 mM, y una coloración más intensa y más grande que el área de la colonia en la condición de PDA + AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM. En tanto que la CP-834 mostró colonias pulvulentas circulares, color blanco y amarillo al centro así como elevación plana. El área de la colonia fue mayor en las condiciones PDA y PDA + AAS 100 μ M y menor en PDA + AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM, formando un halo de oxidación mayor en las dos últimas condiciones.

Visualmente al comparar el desarrollo de la colonia de cada cepa en las 4 condiciones estudiadas se evidenció que la CP-145 presentó un mejor comportamiento, seguida por la CP-834 y la CP-434. Estos criterios permitieron ampliar el uso de inductores de enzimas como el AAS y de inductores naturales provenientes de diversos substratos agrícolas.

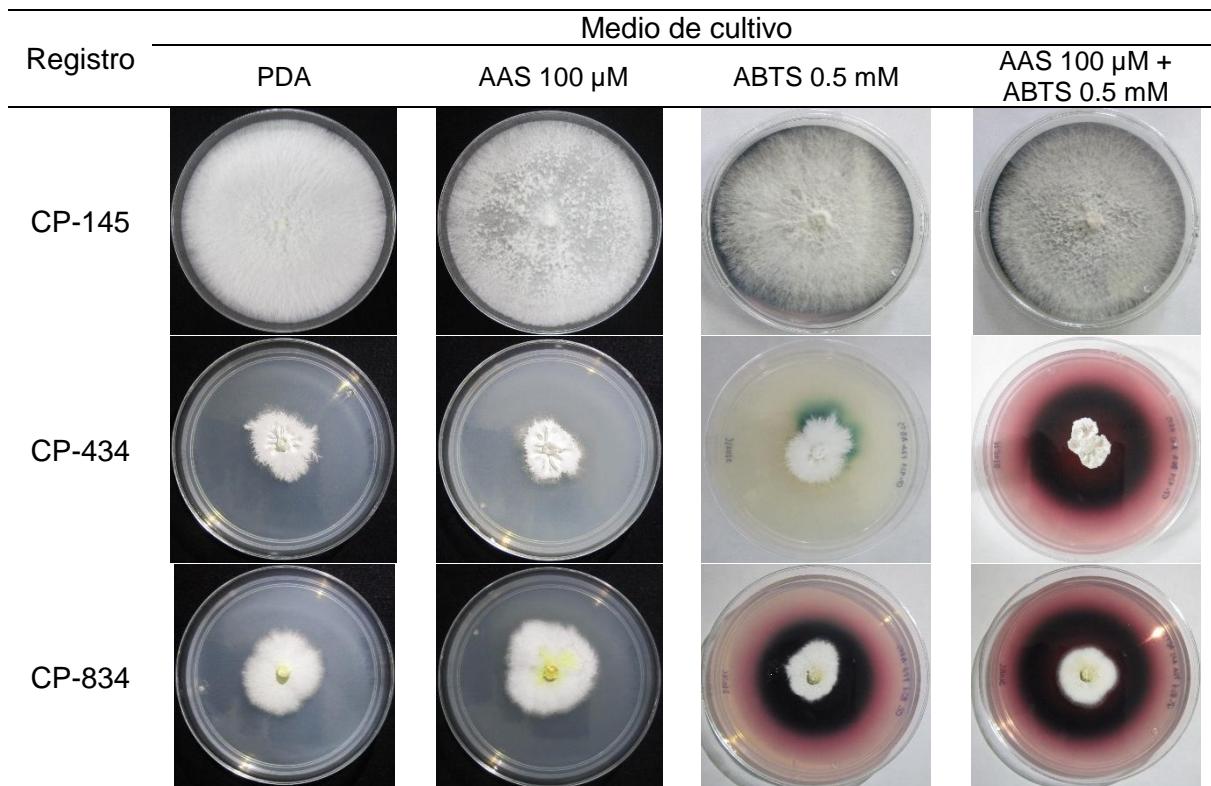


Figura 8. Crecimiento de cepas de la CP-145 de *Ganoderma lucidum*, CP-434 y CP-834 de *Ganoderma* spp. en medio de cultivo papa dextrosa agar adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M y substrato enzimático ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 0.5 mM.

8.1.1 CP-145 de *G. lucidum*

En la figura 9 se observan los valores del área de la colonia de la CP-145 de *G. lucidum* en los diferentes tratamientos. La cepa presentó una área de colonización de 52.99 ± 8.31 a 55.49 ± 1.19 cm^2 , siendo ligeramente mayor en AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM a 8 días de cultivo. Los valores obtenidos fueron casi similares en todas las condiciones estudiadas.

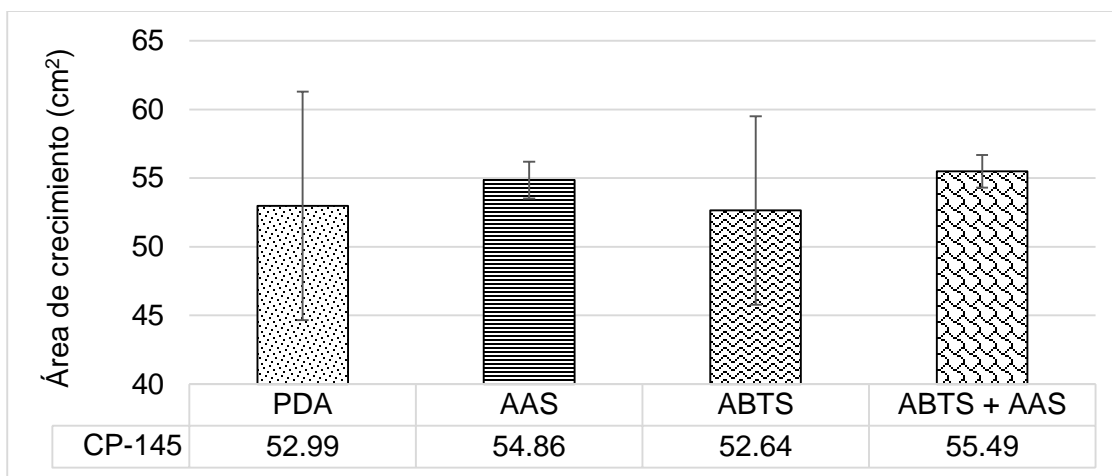


Figura 9. Área de crecimiento de la CP-145 de *Ganoderma lucidum* a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 µM, sustrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 µM + ABTS 0.5 mM (n= 3).

El tamaño del halo de oxidación producido por la CP-145 de *G. lucidum* a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con el sustrato enzimático ABTS 0.5 mM y ABTS 0.5 mM + AAS 100 µM se muestra en la figura 10, siendo levemente mayor en ABTS 0.5 mM (56.17 ± 6.74 cm²). Las otras dos condiciones no formaron halo de oxidación, aunque tuvieron un buen crecimiento micelial.

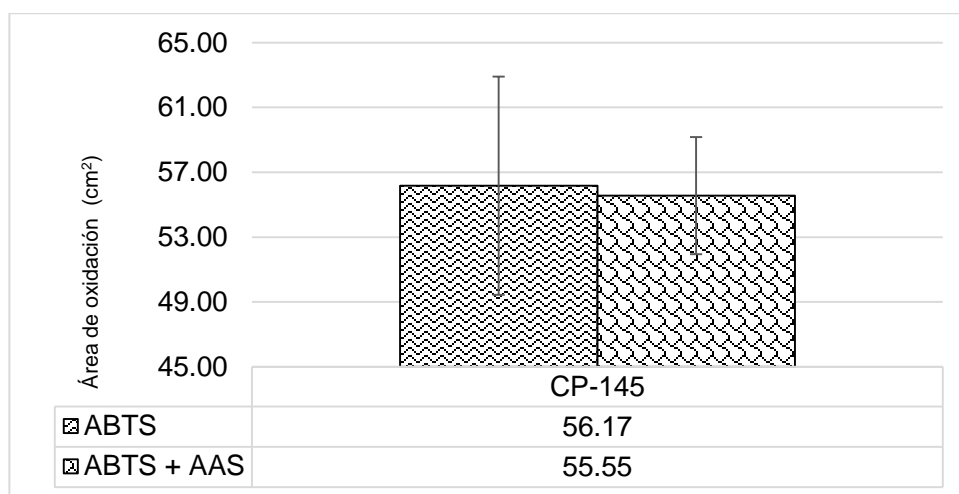


Figura 10. Área del halo de oxidación de la CP-145 de *Ganoderma lucidum* a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 µM, sustrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 µM + ABTS 0.5 mM (n= 3).

En la figura 11 se reportan las variaciones de pH de los medios de cultivo utilizados a tiempo final (8 días), el cual quedó entre 5.02 ± 0.14 (ABTS 0.5 mM) y 5.30 ± 0.10 (AAS 100 μM y ABTS 0.5 mM), destacado los tratamientos AAS 100 μM y AAS 100 μM + ABTS 0.5 mM como los más altos, de 5.20 y 5.30, respectivamente.

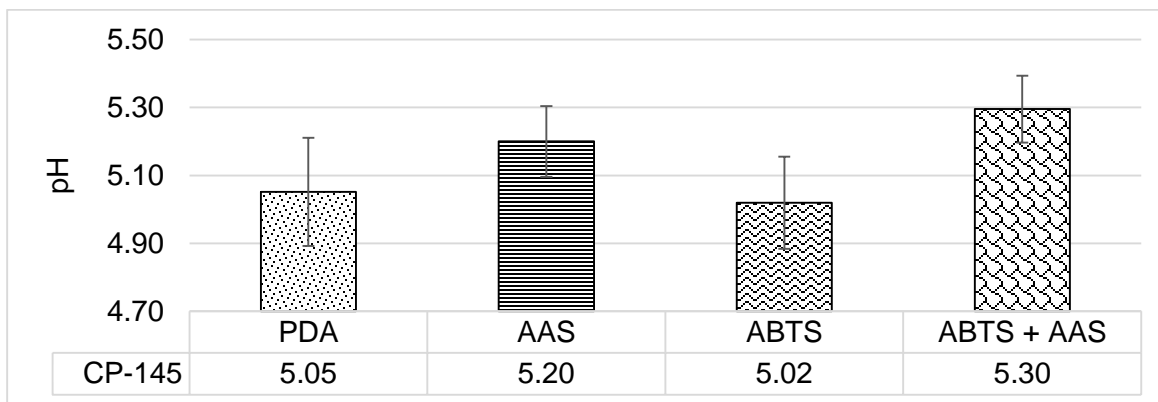


Figura 11. pH final que presentó la CP-145 de *Ganoderma lucidum* a los 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μM , substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μM + ABTS 0.5 mM (n= 3).

En cuanto a la conductividad eléctrica a 8 días de cultivo en los diferentes tratamientos en estudio, se obtuvieron valores en un rango de $8,638 \pm 92.31$ $\mu\text{S/cm}$ (AAS 100 μM y ABTS 0.5 mM) a $9,377 \pm 388.45$ $\mu\text{S/cm}$ (PDA), mostrando una diferencia del 8% entre las condiciones (Fig. 12).

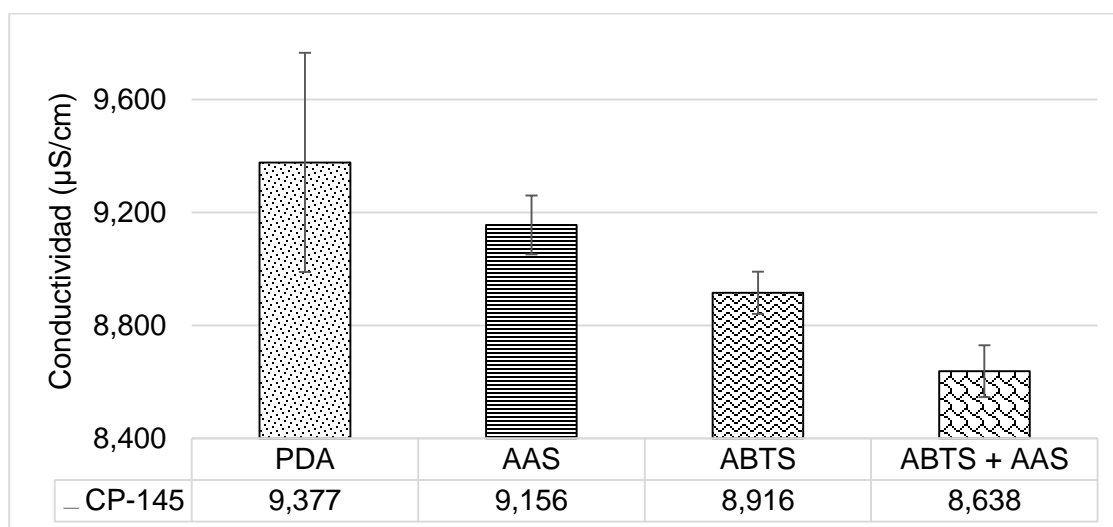


Figura 12. Conductividad eléctrica final ($\mu\text{S/cm}$) de la CP-145 de *Ganoderma lucidum* a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μM , substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μM + ABTS 0.5 mM (n= 3).

8.1.2 CP- 434 de *Ganoderma* spp.

En la figura 13 se observa el área colonizada por la CP-434 en los medios de cultivo a 13 días de incubación, siendo mayor en PDA ($9.17 \pm 0.76 \text{ cm}^2$), comparado con el medio PDA adicionado con AAS $100 \mu\text{M}$ y ABTS 0.5 mM ($2.50 \pm 0.09 \text{ cm}^2$), resultando 2.7 veces menor. Para esta cepa ningún inductor ayudó a incrementar el desarrollo de la colonia, al contrario, se observa que los valores del área fueron menores que en el medio PDA, donde alcanzó un área de $9.17 \pm 0.76 \text{ cm}^2$ con respecto al área total de la caja de Petri que es de 70 cm^2 .

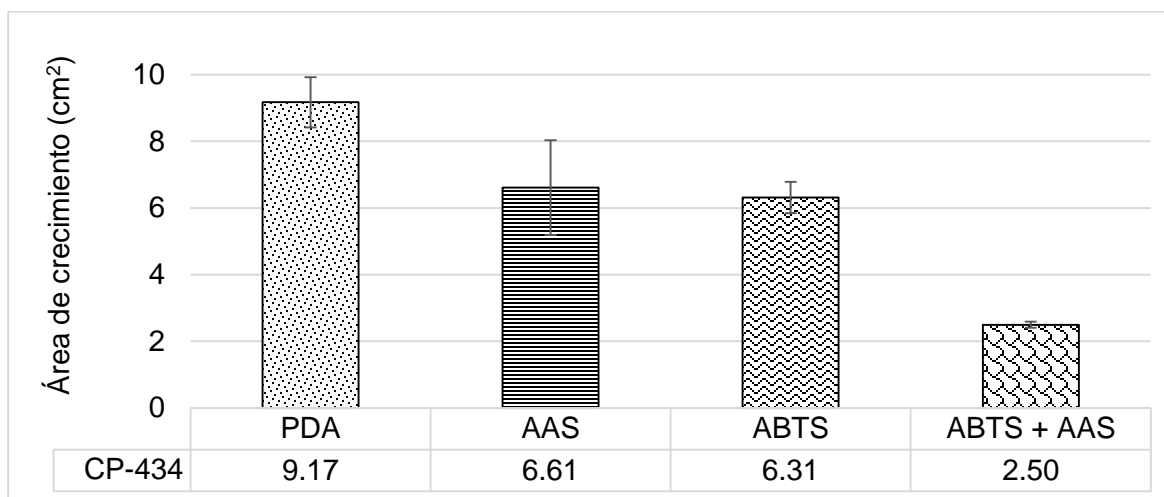


Figura 13. Área de crecimiento de la CP-434 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS $100 \mu\text{M}$, sustrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS $100 \mu\text{M}$ + ABTS 0.5 mM ($n= 3$).

En cuanto el halo de oxidación generado por la CP-434 en el medio con ABTS 0.5 mM se observó mayor desarrollo que en el tratamiento AAS $100 \mu\text{M}$ + ABTS 0.5 mM ($41.04 \pm 0.81 \text{ cm}^2$), resultando 3.4 veces más grande (Fig. 14).

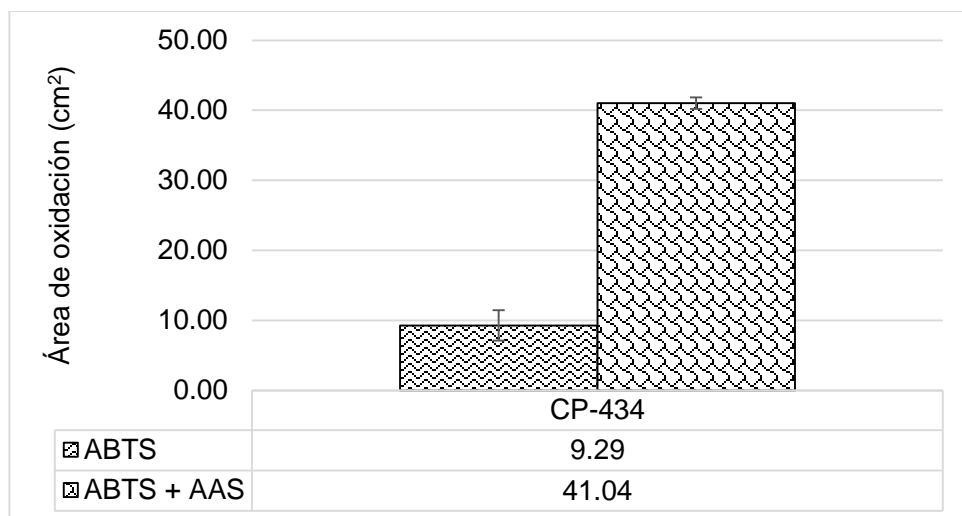


Figura 14. Área del halo de oxidación de la CP-434 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).

La figura 15 muestra la variación de pH a 13 días de cultivo en los medios semisólidos inoculados con la CP-434. Dicha variación se observa en un rango de 5.84 ± 0.02 (ABTS 100 μ M) a 6.1 ± 0.01 (AAS 100 μ M y ABTS 0.5 mM). Los cambios de pH en esta cepa fueron mínimos, quedando casi igual que el pH a tiempo inicial siendo de 5.3.

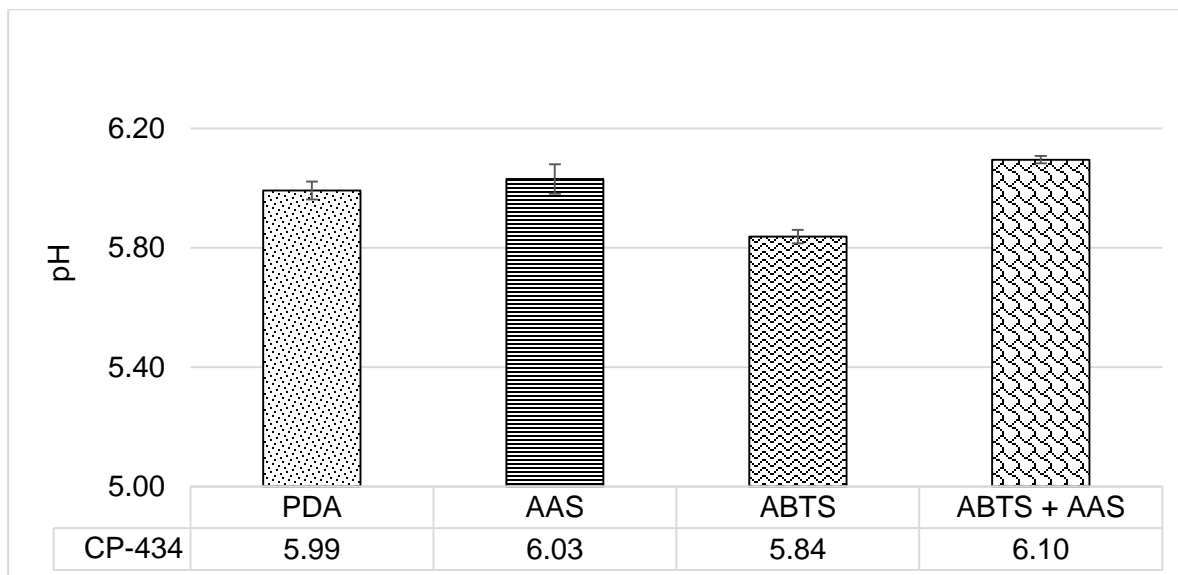


Figura 15. pH final de la CP-434 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).

En la figura 16 se observan los valores de la variación de conductividad eléctrica entre los medios de cultivo analizados a 13 días de cultivo. A tiempo inicial el valor de la conductividad varió entre los 4,285 a 4,581 $\mu\text{S}/\text{cm}$, en las condiciones estudiadas. Al final de la cinética el valor más alto correspondió al PDA ($9,340 \pm 119.05 \mu\text{S}/\text{cm}$) en tanto que el menor fue en el medio adicionado con las soluciones AAS $100 \mu\text{M}$ y ABTS 0.5 mM ($8,982 \pm 364.35 \mu\text{S}/\text{cm}$). Los resultados muestran un aumento de iones disueltos en el medio debido al crecimiento de la colonia, el cual fue mayor en PDA respecto a los medios adicionados con los inductores.

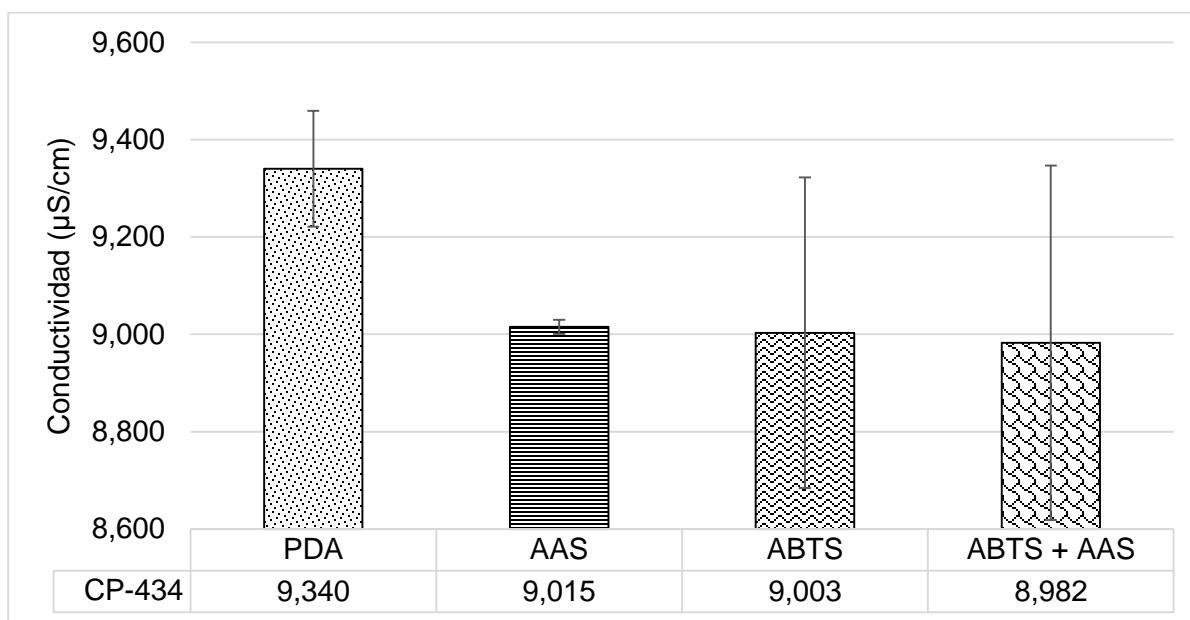


Figura 16. Conductividad eléctrica final ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de la CP-434 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS $100 \mu\text{M}$, sustrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS $100 \mu\text{M}$ + ABTS 0.5 mM ($n= 3$).

8.1.3 CP-834 de *Ganoderma* spp.

En la figura 17 se observa el área de colonización de la CP-834 a 13 días de cultivo. El crecimiento en AAS $100 \mu\text{M}$ fue el mayor ($13.62 \pm 1.33 \text{ cm}^2$) en tanto que el menor fue en ABTS 0.5 mM ($4.49 \pm 1.31 \text{ cm}^2$) existiendo una diferencia del 67%.

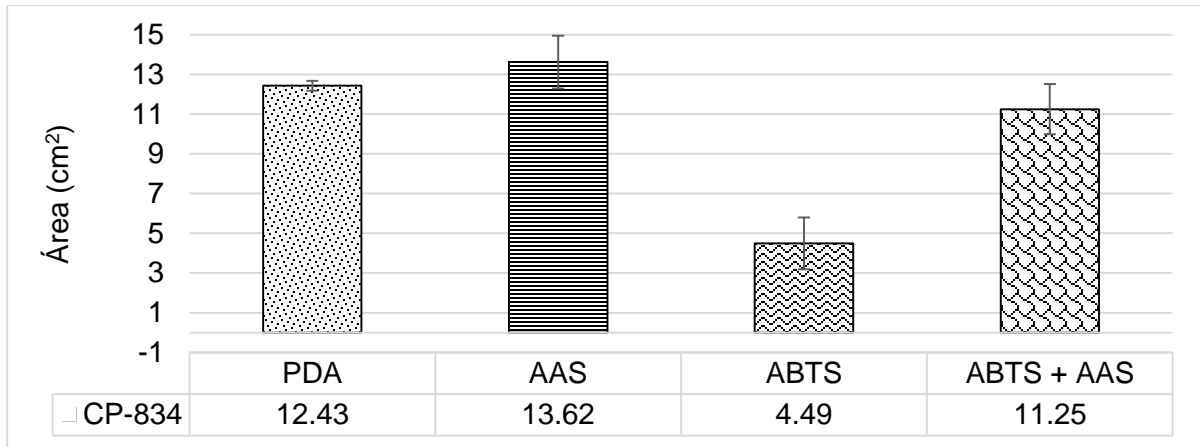


Figura 17. Área de crecimiento de la CP-834 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 µM, sustrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 µM + ABTS 0.5 mM (n= 3).

La figura 18 muestra el tamaño del halo de oxidación de la CP-834 en medios de cultivo semisólidos adicionados con ABTS 0.5 mM, siendo apenas mayor en el medio adicionado con AAS 100 µM (51.50 ± 2.84 cm²). La cepa no mostró oxidación en los otros tratamientos.

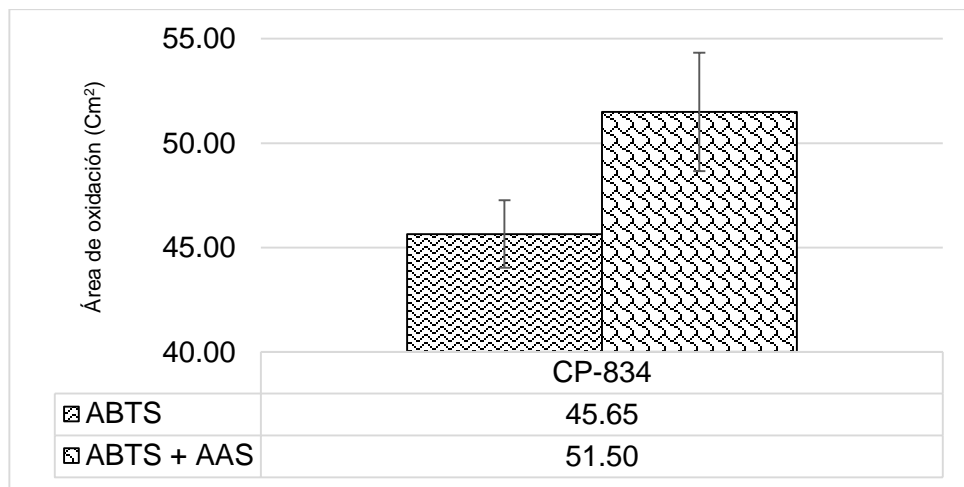


Figura 18. Área del halo de oxidación de la CP-834 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 µM, sustrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 µM + ABTS 0.5 mM (n= 3).

En la figura 19 se observan las variaciones de pH en los medios de cultivo semisólidos estudiados a 13 días de colonización por parte de la CP-834. Los resultados quedaron entre 5.84 ± 0.04 (AAS 100 µM) y 6.02 ± 0.06 (ABTS 0.05 mM).

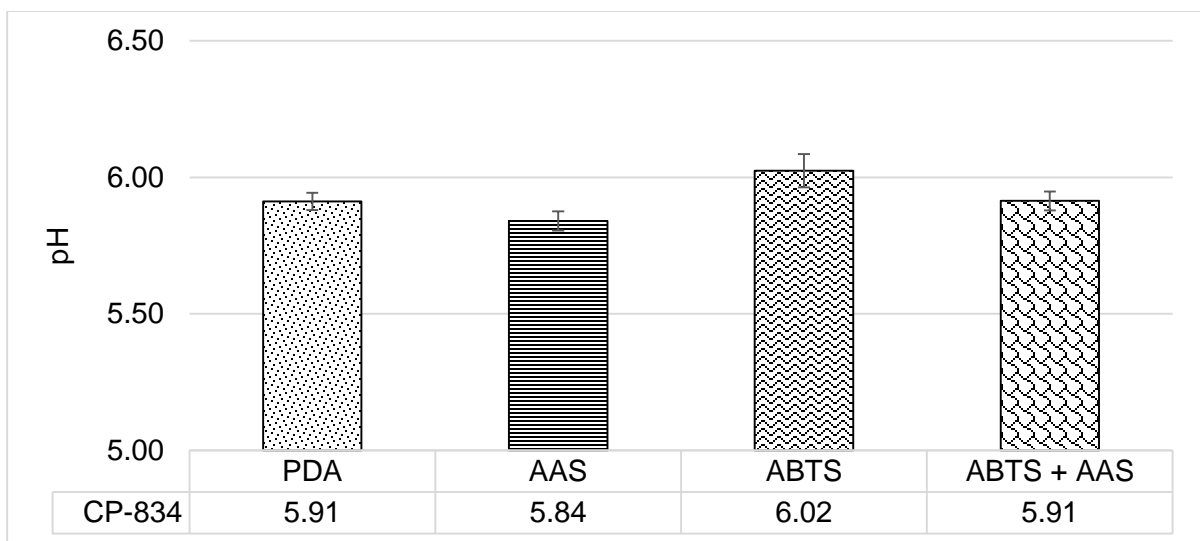


Figura 19. pH final de la CP-834 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).

La figura 20 muestra la variación de la conductividad eléctrica a 13 días de crecimiento de la CP-834 en los medios de cultivo estudiados, destacando el medio PDA con el valor más alto siendo de $9,326 \pm 74.61 \mu\text{S/cm}$.

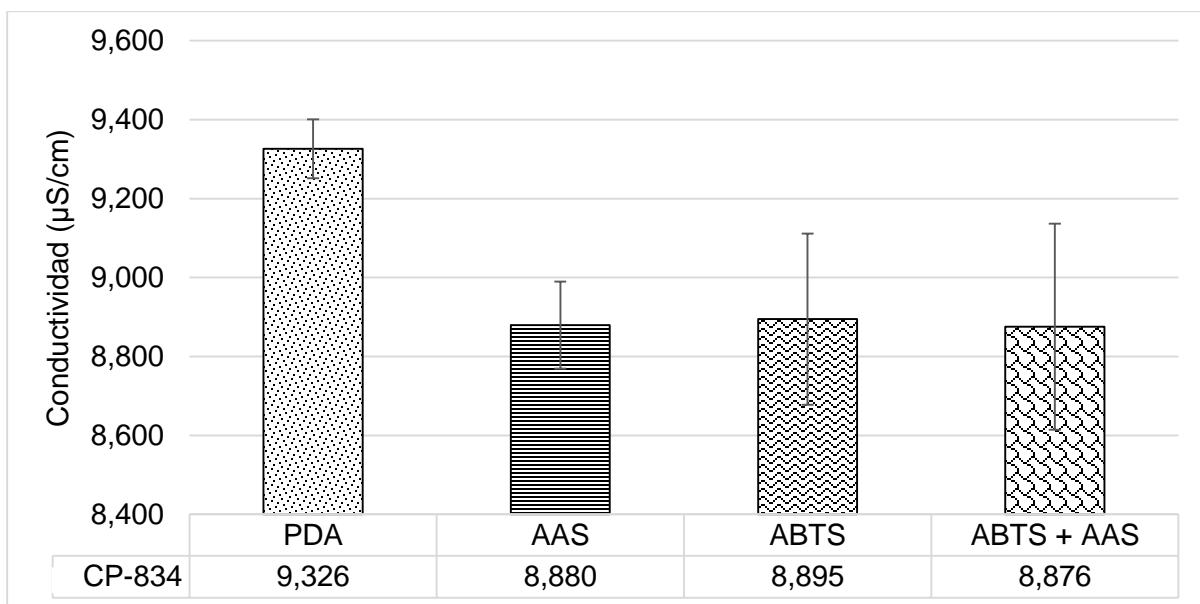


Figura 20. Conductividad eléctrica final ($\mu\text{S/cm}$) de la CP-834 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M, substrato enzimático ABTS 0.5 mM y con las soluciones AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (n= 3).

8.2 Fisiología de las cepas en medios de cultivo líquido

Los resultados de la cinética de crecimiento a 100 días de incubación en medio de cultivo líquido papa dextrosa (MLPD) adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) a una concentración 100 μM y a diferentes puntos de muestreo (0, 10, 20, 40, 80 y 100) días) se describen en esta sección.

En la figura 21 se observa la morfología de las cepas en estudio, donde el micelio de la CP-145 de *G. lucidum* presentó micelio aéreo a los 20 días de incubación. En tanto la CP-434 de *Ganoderma* spp. mostró escaso micelio en la superficie del cultivo. La CP-834 de *Ganoderma* spp. presentó micelio de consistencia rígida en la parte superior del cultivo. La coloración de los pellets de las tres cepas varió de blanco a crema durante la cinética. En tanto que el color del medio de cultivo adicionado con AAS 100 μM presentó una coloración amarillo opaco con respecto al testigo (Fig. 21).

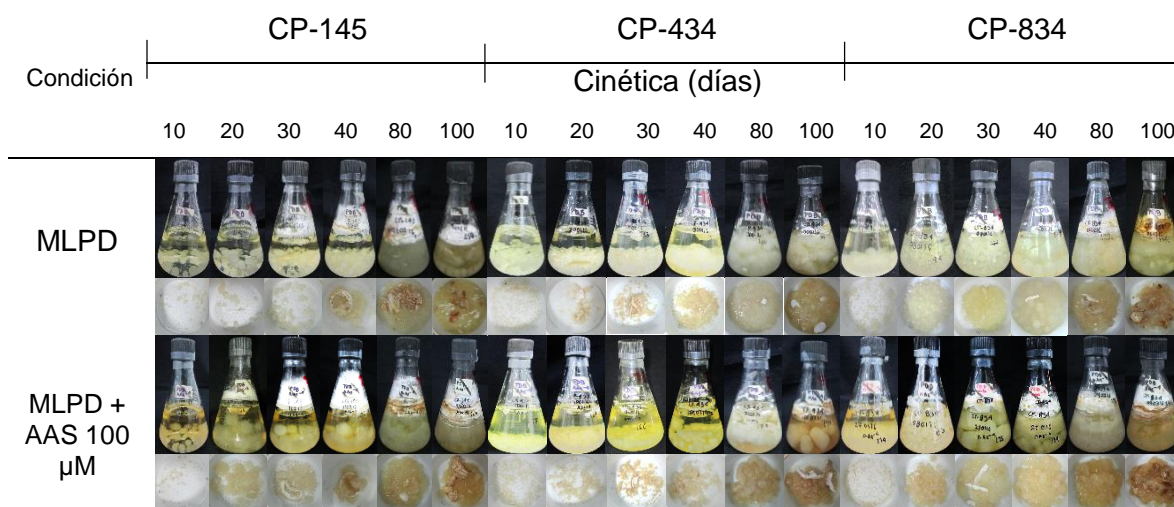


Figura 21. Crecimiento de la CP-145 de *Ganoderma lucidum*, CP-434 y CP-834 de *Ganoderma* spp. en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μM en condición de agitación a 155 rpm e incubación a 27 °C.

8.2.1 CP-145 de *G. lucidum*

En la figura 22 se muestra la producción de biomasa seca de la CP-145 de *G. lucidum* durante los 100 días de cultivo. En el medio MLPD la máxima producción de biomasa fue al día 40 con 8.33 ± 0.61 mg/mL, posterior a ello se observó su descenso. En el

medio MLPD con AAS 100 μ M se observó que la producción máxima fue al día 40 con 11.61 ± 1.63 mg/mL (28% mayor en comparación con su testigo), después de ello se observó el descenso de la producción de biomasa en los siguientes puntos de la cinética, 6.7 mg/mL a los 100 días.

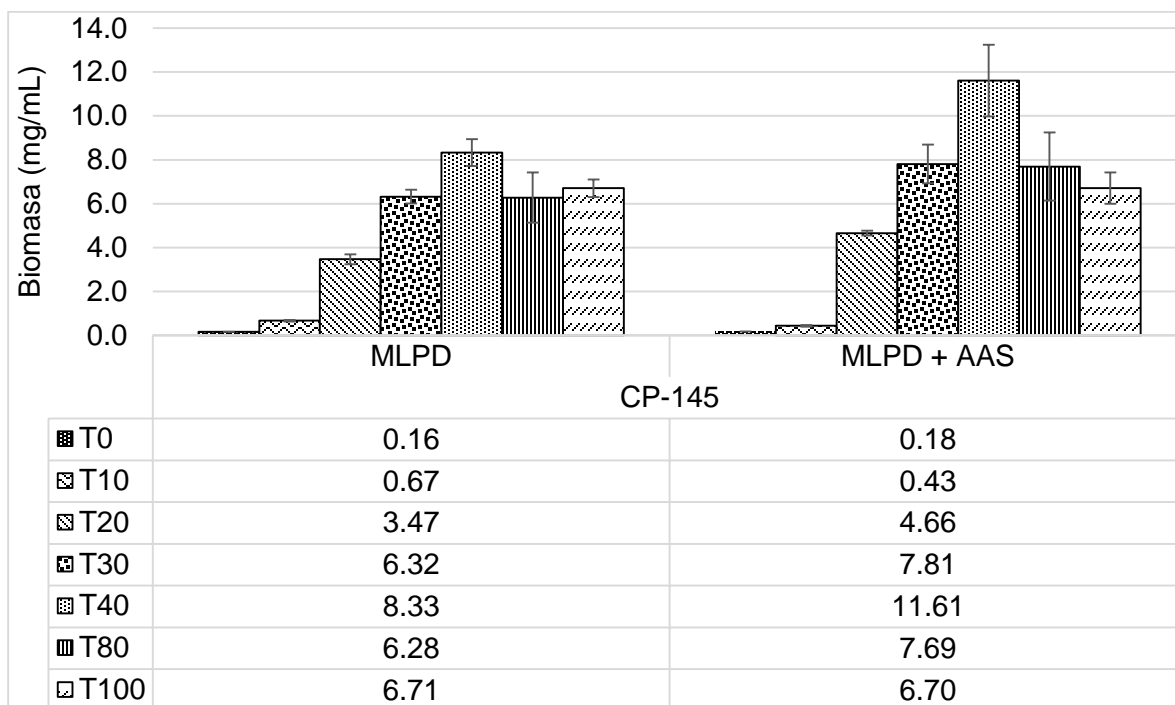


Figura 22. Producción de biomasa seca de la CP-145 de *Ganoderma lucidum* durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

En la figura 23 se observa la variación del pH en los medios de cultivo analizados. Observándose una tendencia de descenso hacia el tiempo 20 y posterior aumento hacia el día 100 en ambos medios, con pH inicial de 5.3 y final de 5.13 para el medio MLPD y de 5.74 cuando se adicionó con AAS 100 μ M.

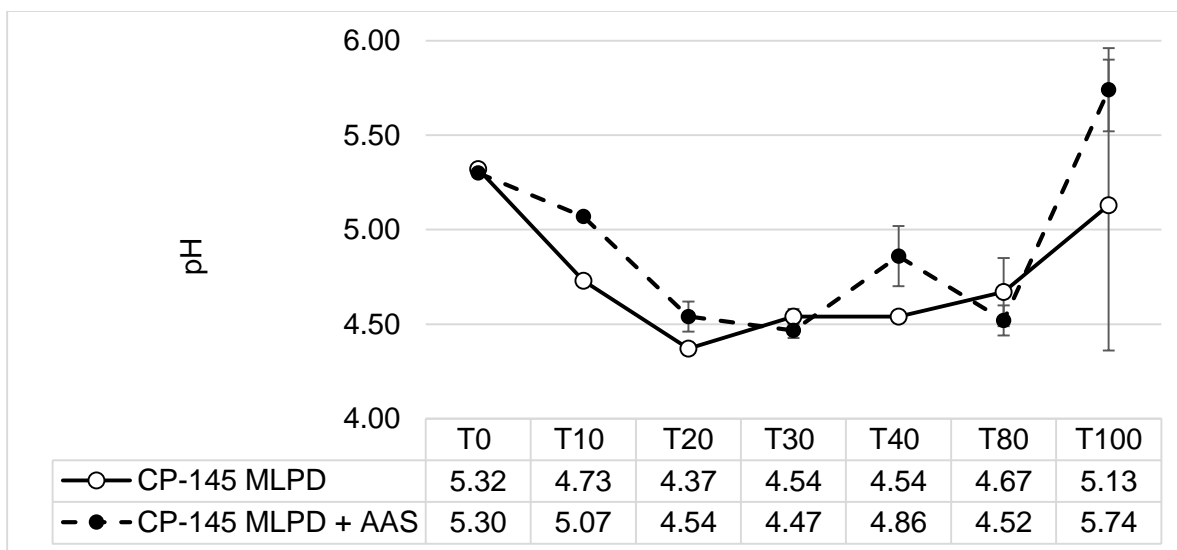


Figura 23. Variación de pH de la CP-145 de *Ganoderma lucidum* durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μM (n=3).

En la figura 24 se observa la variación de la conductividad de los medios líquidos durante la cinética de cultivo, mostrándose una tendencia de incremento con valores finales de $5912 \pm 1209 \mu\text{S/cm}$ para el MLPD y de $7966 \pm 748 \mu\text{S/cm}$ para el medio MLPD adicionado con AAS 100 μM .

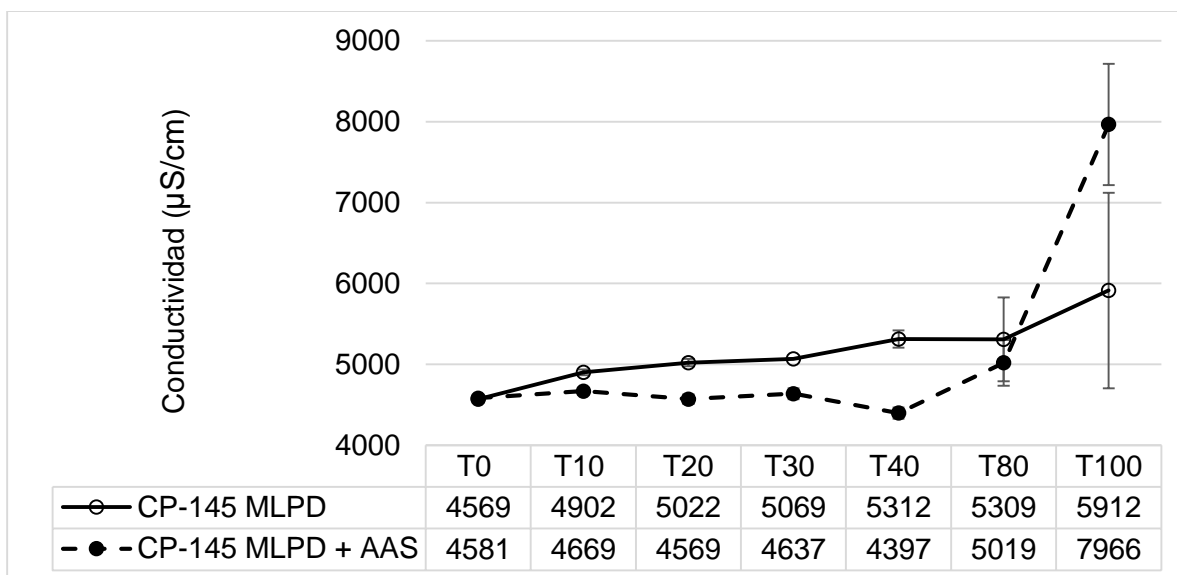


Figura 24. Variación de la conductividad eléctrica de la CP-145 de *Ganoderma lucidum* durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μM (n=3).

8.2.2 CP-434 de *G. lucidum*

La figura 25 muestra la producción de biomasa deshidratada de la CP-434. Se observa una tendencia de incremento hasta el día 80, el cual fue el punto máximo de crecimiento, para disminuir el día 100, en ambos medios de cultivo donde el tratamiento con AAS 100 μM fue apenas mayor en 0.51 mg/mL para el tiempo 80.

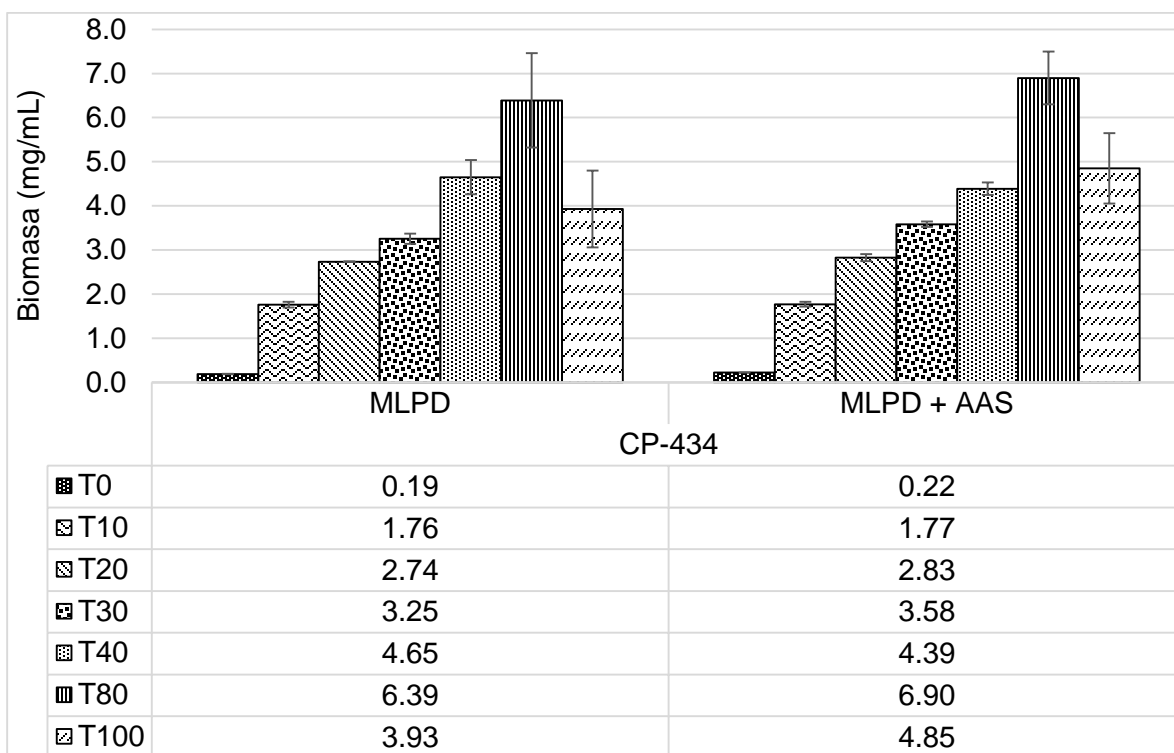


Figura 25. Producción de biomasa seca de la CP-434 de *Ganoderma* spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μM (n=3).

La variación del pH se muestra en la figura 26 donde se observa una tendencia de descenso hacia el día 10 y posterior incremento hacia el día 100. En el caso del AAS 100 μM se observó una tendencia hacia la neutralización (7.06) del medio, en tanto que en el testigo se vió un comportamiento de incremento del pH inicial que fue de 5.30.

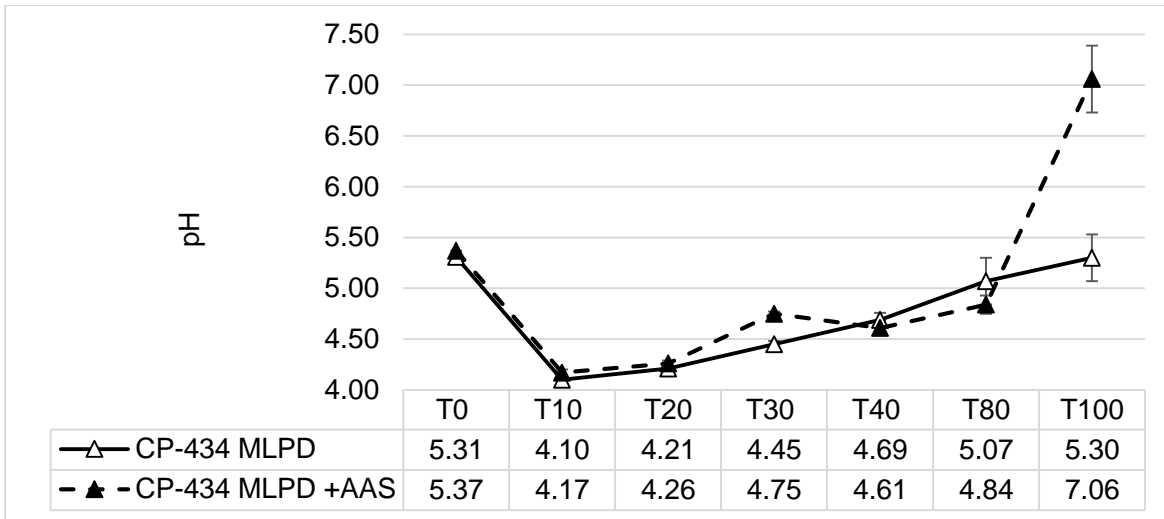


Figura 26. Variación de pH de la CP-434 *Ganoderma* spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

La figura 27 muestra la variación de la conductividad eléctrica de los medios de cultivo donde el tratamiento con AAS 100 μ M mostró un incremento con un valor final de 6488 ± 391 μ S/cm. En tanto que el testigo mostró incrementos y descensos durante la cinética con un valor final de 5036 ± 102 μ S/cm a los 100 días de cultivo.

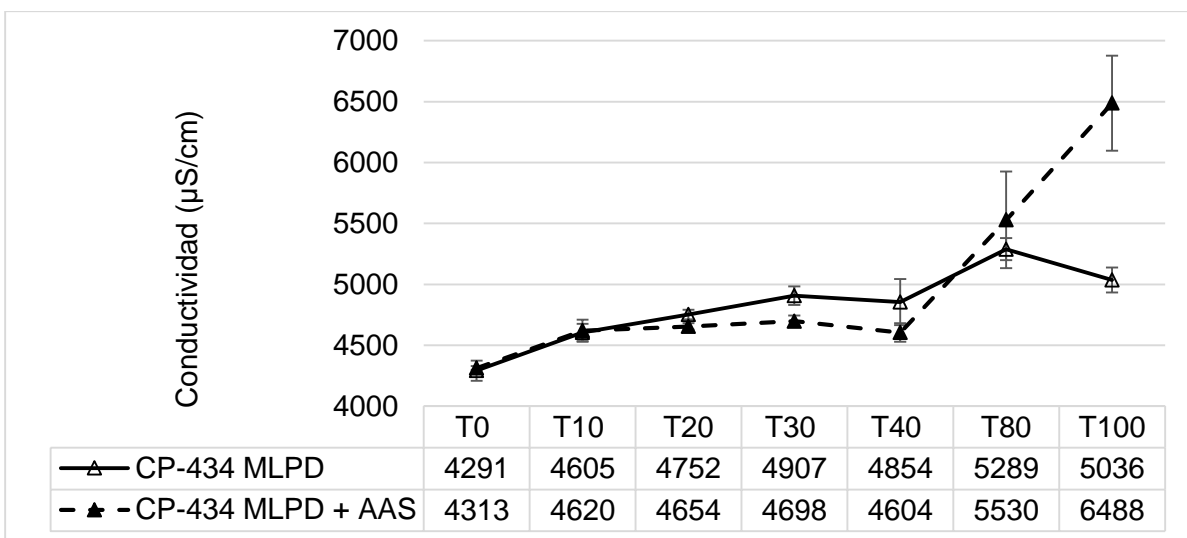


Figura 27. Variación de la conductividad eléctrica de la CP-434 de *Ganoderma* spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

8.2.3 CP-834 de *Ganoderma* spp.

La figura 28 muestra la producción de biomasa seca por parte de la CP-834 en los medios de cultivo líquido en estudio en los diferentes puntos de la cinética de crecimiento, mostrando el más alto rendimiento a los 40 días de desarrollo en ambos tratamientos, siendo mayor en el medio adicionado con AAS 100 μ M (10.28 ± 0.39 mg/mL) respecto al testigo (9.39 ± 0.37 mg/mL).

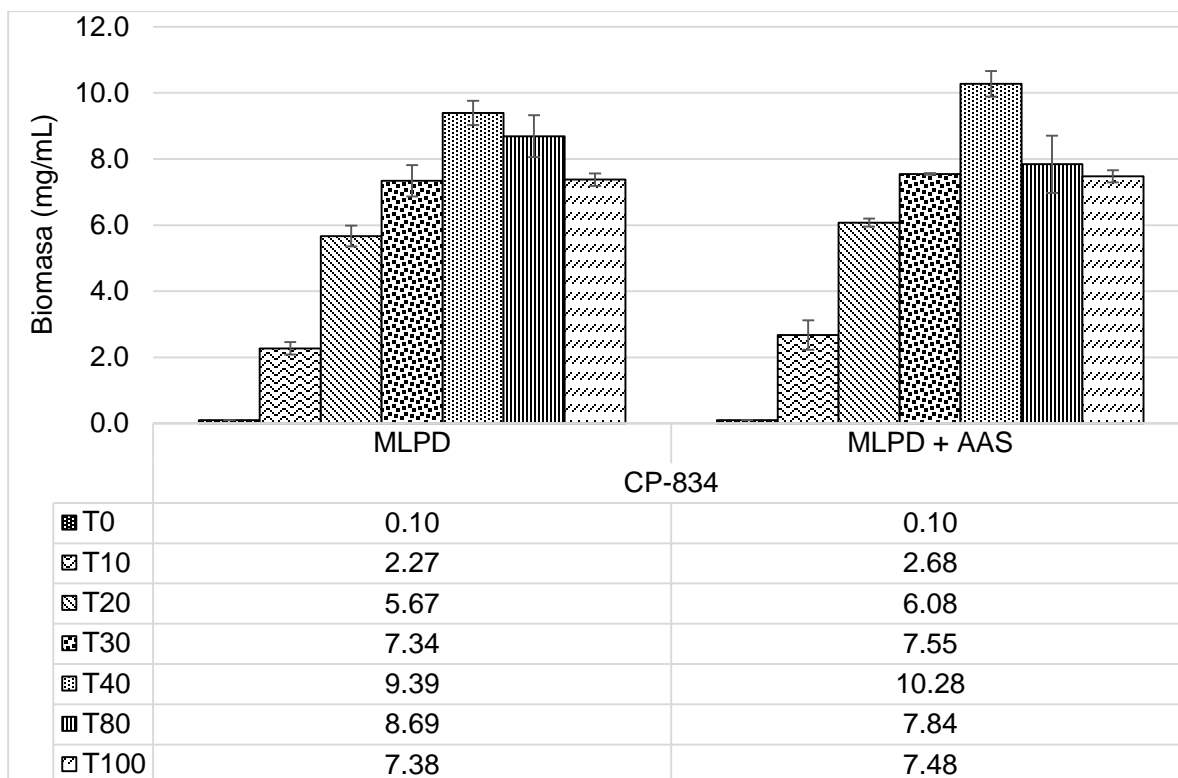


Figura 28. Producción de biomasa seca de la CP-834 de *Ganoderma* spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

La variación del pH de la CP-834 en los medios de cultivo líquidos se observa en la figura 29, donde se aprecia un descenso hasta al día 40 y posterior incremento al día 100, sin superar el valor del pH inicial de ambos medio.

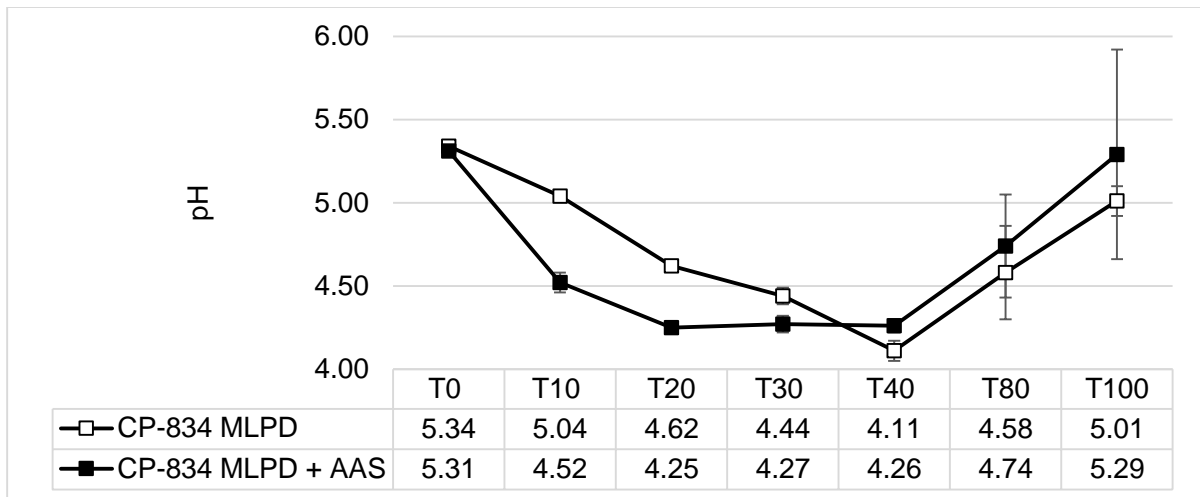


Figura 29. Variación de pH de la CP-834 de *Ganoderma* spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

La variación de la conductividad se muestra en la figura 30 donde se observa el incremento de esta variable durante los primeros 40 días en ambos medios estudiados (4997 μ S/cm en MLPD y 5107 μ S/cm en AAS), posterior a ello el tratamiento con AAS 100 μ M mostró descenso hacia los días 80 y 100 de cultivo, en tanto que el testigo tuvo el valor máximo a los 80 días (5641 μ S/cm), con el subsecuente descenso hacia el día 100.

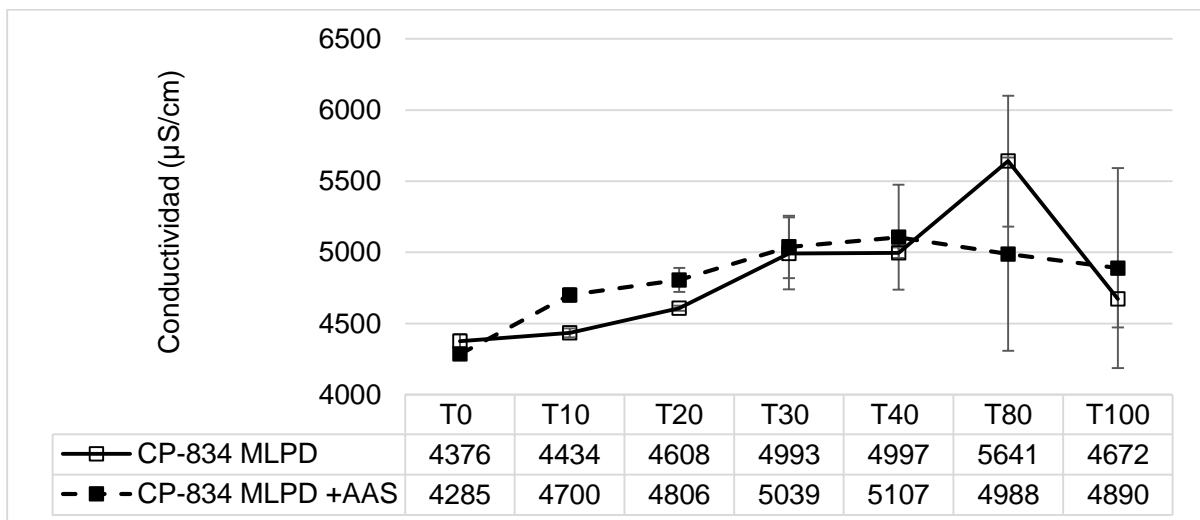


Figura 30. Variación de la conductividad eléctrica de la CP-834 de *Ganoderma* spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

8.3 Cinética enzimática de lacasas

8.3.1 CP-145 de *G. lucidum*

8.3.1.1 Medio de cultivo semisólido

La figura 31 muestra los valores de la actividad volumétrica de lacasas de la CP-145 a 8 días de crecimiento en los medios de cultivo adicionados con AAS 100 μM y ABTS 0.5 mM. El tratamiento con AAS 100 μM presentó el valor más alto (0.55 ± 0.04 U/mL), seguido por el testigo (0.29 ± 0.08 U/mL) y el tratamiento con AAS 100 μM + ABTS 0.5 mM (0.04 ± 0.01 U/mL), en tanto que el tratamiento con ABTS no mostró actividad.

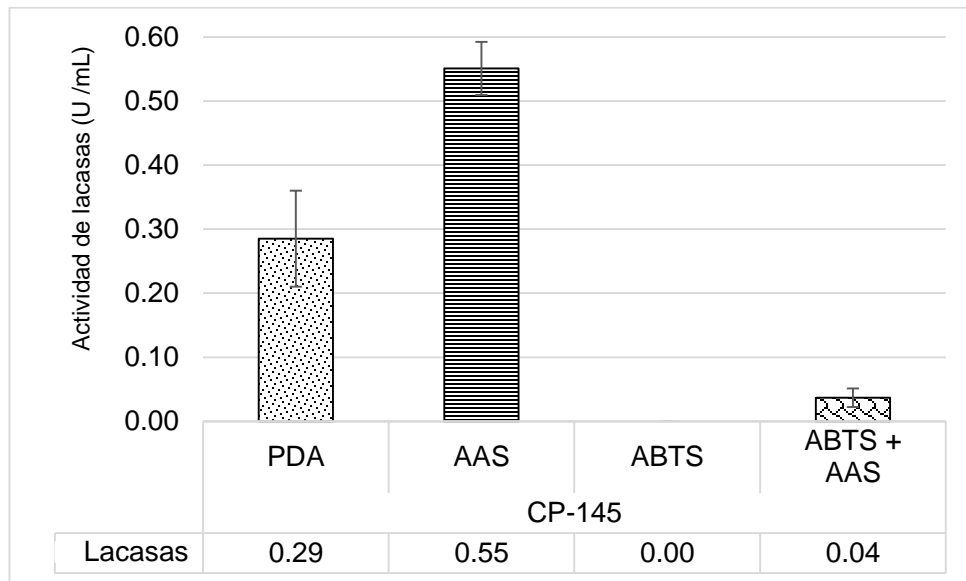


Figura 31. Actividad volumétrica de lacasas de la CP-145 de *Ganoderma lucidum*, a 8 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μM y substrato enzimático ABTS 0.5 mM (n= 3).

8.3.1.2 Medio de cultivo líquido

La figura 32 muestra la producción de lacasas de la CP-145 de *G. lucidum* en cultivo líquido, la producción máxima de lacasas fue de 11.01 ± 0.58 U/mL en el medio adicionado con AAS 100 μM y de 4.20 ± 0.43 U/mL en el testigo, a los 40 días de cultivo, llegando a producir más del 160% de actividad en el tratamiento que el testigo.

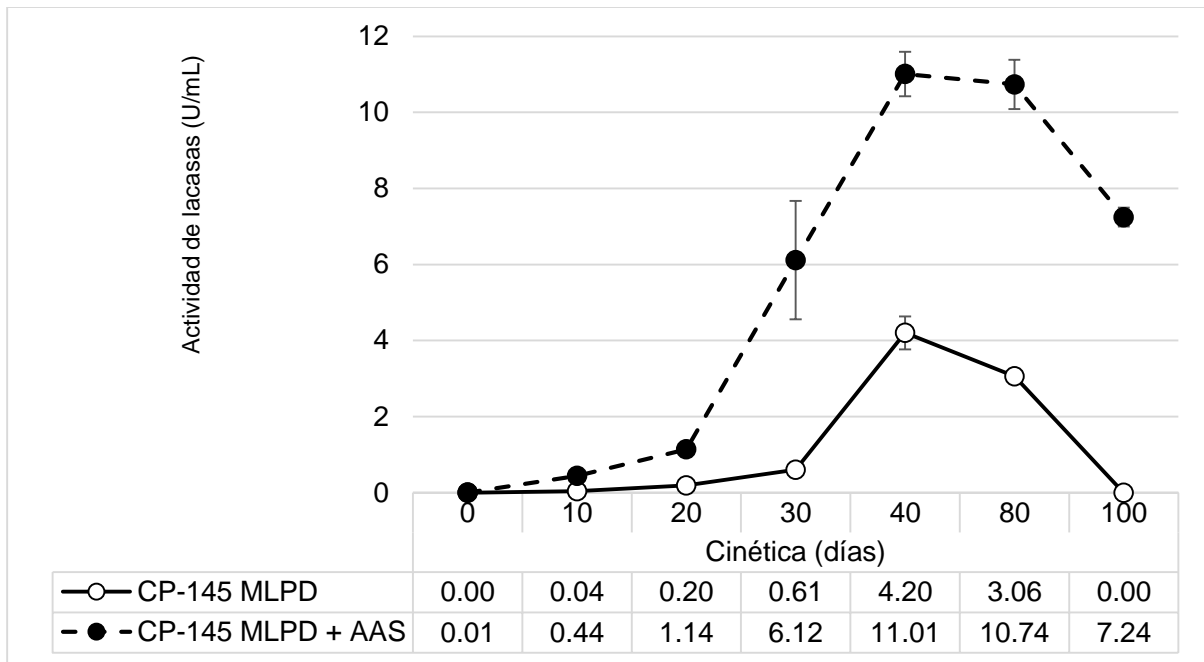


Figura 32. Actividad volumétrica de lacasas de la CP-145 de *Ganoderma lucidum* durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

8.3.2 CP-434 de *Ganoderma* spp.

8.3.2.1 Medio de cultivo semisólido

La figura 33 muestra la producción de lacasas por parte de la CP-434 de *Ganoderma* spp. en los medios de cultivo semisólidos analizados, encontrando en el medio PDA adicionado con AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM el valor más alto de actividad volumétrica de lacasas de 1.95 ± 0.02 (U/mL), seguido del tratamiento con ABTS 0.5 mM (0.81 ± 0.30 U/mL) y el tratamiento con AAS 100 μ M (0.36 ± 0.02 U/mL), siendo el tratamiento testigo el menor (0.14 ± 0.07 U/mL). La actividad volumétrica de lacasas del tratamiento AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM fue 1.4 veces mayor que el tratamiento ABTS 0.5 mM, 4.4 veces que el PDA adicionado con AAS 100 μ M, y 13 veces mayor que el testigo.

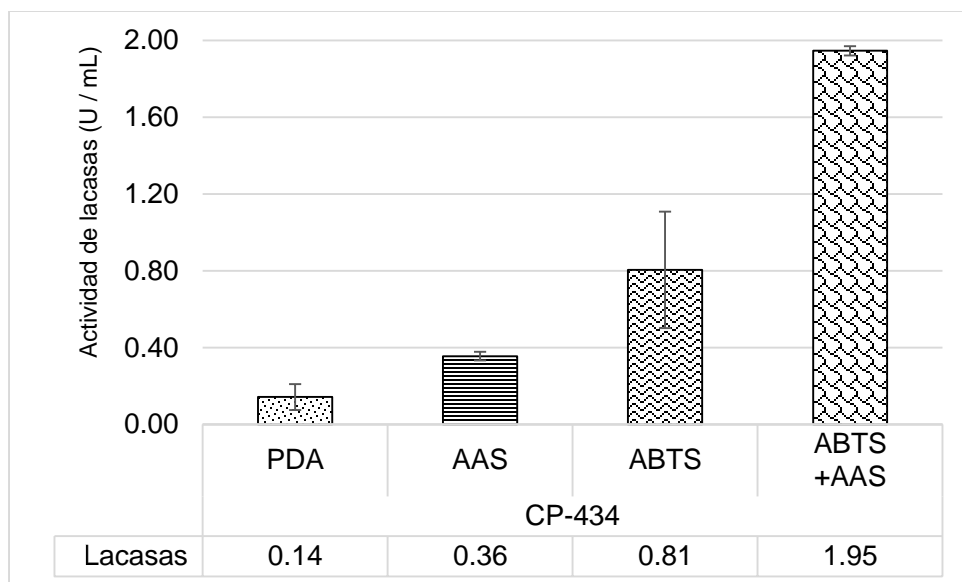


Figura 33. Actividad volumétrica de lacasas de la CP-434 de *Ganoderma* spp. a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M y substrato enzimático ABTS 0.5 mM (n= 3).

8.3.2.2 Medio de cultivo líquido

La figura 34 muestra el comportamiento de la actividad volumétrica de lacasas durante la cinética de cultivo de la CP-434 en los medios de cultivo analizados. En el medio adicionado con AAS 100 μ M se observó una tendencia al incremento de la producción de lacasas siendo a los 80 días de 12.51 ± 0.83 U/mL, y posterior a ello la actividad disminuyó. En tanto el testigo mostró un incremento de la actividad volumétrica de lacasas al día 40, posteriormente un descenso a los 80 días, y un repunte al final de la cinética (9.10 ± 0.14 U/mL), siendo éste el valor máximo observado en ésta condición.

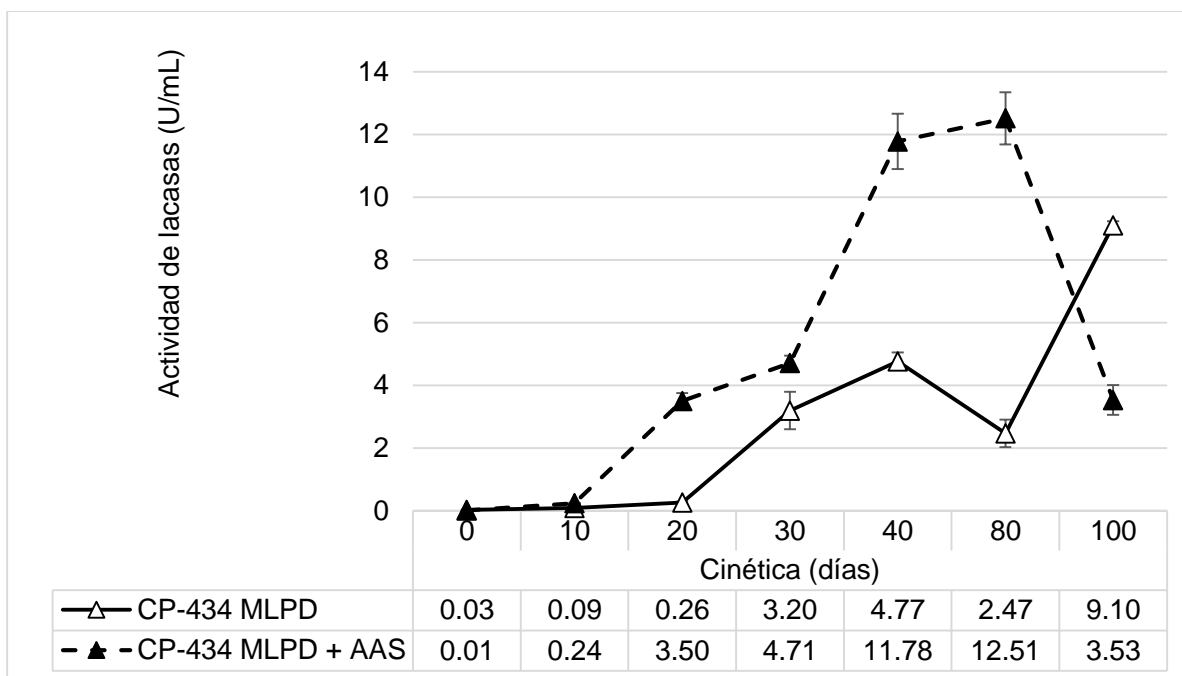


Figura 34. Actividad volumétrica de lacasas de la CP-434 de *Ganoderma* spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

8.3.3 CP-834 de *Ganoderma* spp.

8.3.3.1 Medio de cultivo semisólido

La figura 35 muestra la actividad volumétrica de lacasas de la CP-834 de *Ganoderma* spp. en los medios estudiados al final de la cinética de crecimiento. La producción más alta se detectó en el medio PDA adicionado con AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM (9.51 ± 0.43 U/mL), seguido por el tratamiento con AAS 100 μ M (5.57 ± 0.37 U/mL), el testigo (2.58 ± 0.19 U/mL) y el tratamiento con ABTS 0.5 mM (1.71 ± 0.13 U/mL). El medio con AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM fue 0.7 veces mayor que el medio con AAS 100 μ M, 2.7 veces mayor que el testigo y 4.5 veces mayor que el tratamiento con ABTS 0.5 mM.

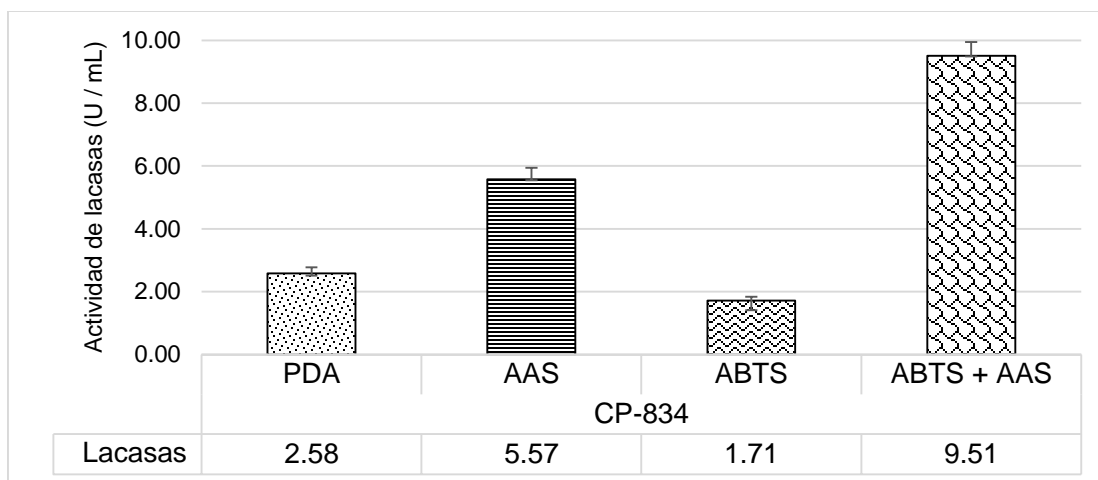


Figura 35. Actividad volumétrica de lacasas de la CP-834 de *Ganoderma* spp, a 13 días de cultivo en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M y substrato enzimático ABTS 0.5 mM (n= 3).

8.3.3.2 Medio de cultivo líquido

La figura 36 muestra la actividad volumétrica de lacasas encontrada en cada punto de la cinética de cultivo. En el medio adicionado con AAS 100 μ M se encontraron los valores más altos a los 40 días de cultivo con una producción de lacasas de 49.38 ± 3.4 U/mL, en tanto que el cultivo en el medio MLPD mostró la mayor actividad de lacasas a los 80 días de cultivo (24.42 ± 2.91 U/mL)

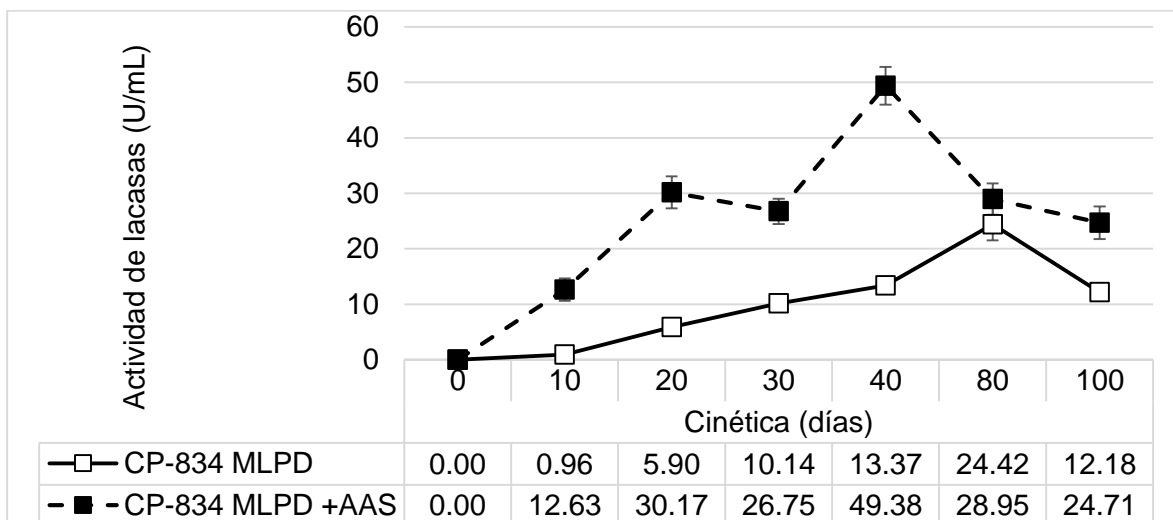


Figura 36. Actividad volumétrica de lacasas de la CP-834 de *Ganoderma* spp. durante la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS) 100 μ M (n=3).

8.4 Análisis estadístico

8.4.1 Medios de cultivo semisólido

El cuadro 3 muestra el análisis de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) del área de colonización por cepa en medio PDA adicionado con AAS 100 μM , ABTS 0.5 mM y la combinación de ambos. La CP-145 no mostró diferencia significativa en los medios de cultivo empleados. Por otra parte, la CP-434 presentó un área de colonización mayor y significativamente diferente en medio PDA. En tanto que la CP-834 en las condiciones PDA, AAS 100 μM , ABTS 0.5 mM + AAS 100 μM no presentó diferencia significativa, siendo menor el área colonizada en ABTS 0.5 mM y diferente a los demás tratamientos.

Cuadro 3. Análisis del área de la colonia (cm^2) por cada cepa nativa de *Ganoderma* en los diferentes tratamientos a tiempo final (n= 3).

Condición	Registro		
	CP-145	CP-434	CP-834
PDA	52.99 \pm 8.31 ^{a*}	9.17 \pm 0.76 ^a	12.43 \pm 0.25 ^a
PDA + AAS 100 μM	54.86 \pm 1.34 ^a	6.61 \pm 1.42 ^b	13.62 \pm 1.33 ^a
PDA + ABTS 0.5 mM	52.64 \pm 6.86 ^a	6.31 \pm 0.47 ^b	4.49 \pm 1.31 ^b
PDA + ABTS 0.5 mM + AAS 100 μM	55.49 \pm 1.19 ^a	2.50 \pm 0.09 ^c	11.25 \pm 1.26 ^a

PDA= Papa dextrosa agar. AAS= Ácido acetil salicílico. ABTS= Ácido 2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico). *Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

En el cuadro 4 se presentan los resultados del análisis de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) del área de colonización entre cepas. En el primer nivel de significancia se ubicaron las áreas correspondientes a la CP-145, las cuales presentaron los mayores valores de área colonizada, en contraste la CP-434 en medio adicionado con ABTS 0.5 mM + AAS 100 μM se ubicó en el último nivel de significancia.

Cuadro 4. Análisis entre cepas del área de la colonia (cm^2) de *Ganoderma* en los diferentes tratamientos a tiempo final (n= 3).

Condición	Registro		
	CP-145	CP-434	CP-834
PDA	52.99 \pm 8.31 ^{a*}	9.17 \pm 0.76 ^{bc}	12.43 \pm 0.25 ^b
PDA + AAS 100 μM	54.86 \pm 1.34 ^a	6.61 \pm 1.42 ^{bc}	13.62 \pm 1.33 ^b
PDA + ABTS 0.5 mM	52.64 \pm 6.86 ^a	6.31 \pm 0.47 ^{bc}	4.49 \pm 1.31 ^{bc}
PDA + ABTS 0.5 mM + AAS 100 μM	55.49 \pm 1.19 ^a	2.50 \pm 0.09 ^c	11.25 \pm 1.26 ^{bc}

PDA= Papa dextrosa agar. AAS= Ácido acetil salicílico. ABTS= Ácido 2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico). *Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

Halo de oxidación (cm²)

En el cuadro 5 se muestran los resultados del análisis de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) para el halo de oxidación formado por la colonia de las cepas estudiadas en los medios que contenían el substrato enzimático ABTS 0.5 mM. La CP-145 no presentó diferencia significativa en las condiciones estudiadas. Por otra, parte las cepas CP-434 y CP-834 en el medio AAS 100 μ M + ABTS 0.5 mM mostraron ser significativamente diferentes respecto al medio ABTS 0.5 mM. En las condiciones PDA y PDA + AAS 100 μ M no se formó el halo de oxidación.

Cuadro 5. Análisis del tamaño del halo de oxidación (cm²) por cada cepa nativa de *Ganoderma* en PDA adicionado con AAS 100 μ M y substrato enzimático ABTS 0.5 mM, a tiempo final (n= 3).

Condición	Registro		
	CP-145	CP-434	CP-834
PDA + ABTS 0.5 mM	56.2±6.74 ^{a*}	9.29±2.15 ^b	45.65±1.62 ^b
PDA + ABTS 0.5 mM + AAS 100 μ M	55.6±3.61 ^a	41.04±0.81 ^a	51.50±2.84 ^a

ABTS= Ácido 2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico). AAS= Ácido acetil salicílico. *Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

En el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos del análisis de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) entre las cepas estudiadas, encontrando que la CP-145 se ubicó en el primer nivel de significancia, no habiendo diferencia significativa entre ellos. Debido a lo anterior, la CP-434 en la condición ABTS 0.5 mM se ubicó en el último nivel, siendo significativamente diferente.

Cuadro 6. Análisis del tamaño de halo de oxidación (cm²) entre las cepas nativas de *Ganoderma* en medio PDA adicionado con AAS 100 μ M y substrato enzimático ABTS 0.5 mM a tiempo final (n= 3).

Condición	Registro		
	CP-145	CP-434	CP-834
PDA + ABTS 0.5 mM	56.2±6.74 ^{a*}	9.29±2.15 ^d	45.65±1.62 ^{bc}
PDA + ABTS 0.5 mM + AAS 100 μ M	55.6±3.61 ^a	41.04±0.81 ^c	51.50±2.84 ^{ab}

ABTS= Ácido 2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico). AAS= Ácido acetil salicílico. *Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

Las condiciones PDA y PDA AAS 100 μ M no se analizaron debido a que no formaron halo de oxidación.

Actividad volumétrica de lacasas (U/mL)

El cuadro 7 muestra los resultados del análisis de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) por cepa de la actividad volumétrica de lacasas de medios semisólidos adicionados con AAS 100 μM y ABTS 0.5 mM. La CP-145 presentó la mayor actividad volumétrica de lacasas en el medio adicionado con AAS 100 μM siendo diferente a las otras condiciones de cultivo. En tanto que la CP-434 y la CP-834 presentaron la mayor producción de lacasas en el medio AAS 100 μM + ABTS 0.5 mM, siendo significativamente diferente al resto de las condiciones experimentales.

Cuadro 7. Análisis de la actividad volumétrica de lacasas (U/mL) de cada cepa nativa de *Ganoderma* en medio PDA adicionado con AAS 100 μM y substrato enzimático ABTS 0.5 mM, a tiempo final (n= 3).

Condición	Registro		
	CP-145	CP-434	CP-834
PDA	0.29±0.08 ^{b*}	0.14±0.07 ^c	2.58±0.19 ^c
PDA + AAS 100 μM	0.55±0.04 ^a	0.36±0.02 ^c	5.57±0.37 ^b
PDA + ABTS 0.5 mM	0.00±0.00 ^c	0.81±0.30 ^b	1.71±0.13 ^d
PDA + ABTS 0.5 mM + AAS 100 μM	0.04±0.01 ^c	1.95±0.02 ^a	9.51±0.43 ^a

PDA= Papa dextrosa agar. AAS= Ácido acetil salicílico. ABTS= Ácido 2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico). *Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

El análisis de medias de la actividad volumétrica de lacasas de medios semisólidos adicionados con AAS 100 μM y con ABTS 0.5 mM entre las cepas y tratamientos se muestra en el cuadro 8. La producción de lacasas de la CP-834 en medio AAS 100 μM + ABTS 0.5 mM resultó ser la más alta y significativamente diferente al resto de las medias, con un valor de 9.51 ± 0.43 U/mL.

Cuadro 8. Análisis entre cepas de la actividad volumétrica de lacasas (U/mL) de cepas nativas de *Ganoderma* en PDA adicionado con AAS 100 μM y substrato enzimático ABTS 0.5 mM a tiempo final (n= 3).

Condición	Registro		
	CP-145	CP-434	CP-834
PDA	0.29±0.08 ^{ef*}	0.14±0.07 ^{ef}	2.58±0.19 ^c
PDA + AAS 100 μM	0.55±0.04 ^{ef}	0.36±0.02 ^f	5.57±0.37 ^b
PDA + ABTS 0.5 mM	0.00±0.00 ^f	0.81±0.30 ^e	1.71±0.13 ^d
PDA + ABTS 0.5 mM + AAS 100 μM	0.04±0.01 ^f	1.95±0.02 ^d	9.51±0.43 ^a

PDA= Papa dextrosa agar. AAS= Ácido acetil salicílico. ABTS= Ácido 2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico). *Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$.

8.4.2 Medios de cultivo líquido

Biomasa

Los resultados obtenidos del análisis de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) por cepa de la biomasa seca producida por las cepas de *Ganoderma* en medio de cultivo líquido papa y dextrosa (MLPD) y MLPD + AAS 100 μM , se muestran en el cuadro 9. La CP-145 a 40 días de cultivo presentó el valor más alto y significativamente diferente. En cuanto a la CP-434 los valores más altos se encontraron en MLPD y MLPD + AAS 100 μM a 80 días de cultivo, ubicándose en el primer nivel de significancia. En tanto que la CP-834 a 40 días de cultivo medio MLPD + AAS 100 μM presentó la mayor producción de biomasa, ubicándose en el primer nivel de significancia.

Cuadro 9. Análisis por cepa de la biomasa seca (mg/mL) producida por cepas nativas de *Ganoderma* durante la cinética en medio de cultivo líquido papa dextrosa (MLPD) y MLPD + AAS 100 μM (n= 3).

Cinética (días)	CP-145		CP-434		CP-834	
	MLPD	MLPD + AAS	MLPD	MLPD + AAS	MLPD	MLPD + AAS
0	0.16±0.01 ^{f*}	0.18±0.00 ^f	0.19±0.01 ^f	0.22±0.00 ^f	0.10±0.00 ^g	0.10±0.00 ^g
10	0.67±0.03 ^{ef}	0.43±0.03 ^{ef}	1.76±0.06 ^e	1.77±0.05 ^e	2.27±0.19 ^f	2.68±0.45 ^f
20	3.47±0.22 ^{de}	4.66±0.11 ^{cd}	2.74±0.00 ^{de}	2.83±0.08 ^{de}	5.67±0.32 ^e	6.08±0.12 ^{de}
30	6.32±0.31 ^{bcd}	7.81±0.88 ^{bc}	3.25±0.12 ^{cde}	3.58±0.06 ^{bcd}	7.34±0.48 ^{cd}	7.55±0.03 ^{cd}
40	8.33±0.61 ^b	11.61±1.63 ^a	4.65±0.39 ^{bc}	4.39±0.14 ^{bc}	9.39±0.37 ^{ab}	10.28±0.39 ^a
80	6.28±1.14 ^{bcd}	7.69±1.56 ^{bc}	6.39±1.07 ^a	6.90±0.60 ^a	8.69±0.64 ^{bc}	7.84±0.87 ^{bc}
100	6.71±0.40 ^{bc}	6.70±0.71 ^{bc}	3.93±0.87 ^{bcd}	4.85±0.80 ^b	7.38±0.19 ^{cd}	7.48±0.18 ^{cd}

MLPD= Medio líquido papa dextrosa. AAS= Ácido acetilsalicílico. *Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$

Por otro lado, el cuadro 10 muestra los resultados de la biomasa seca producida y su análisis (Tukey $\alpha = 0.05$) entre cepas de *Ganoderma* en medio de cultivo líquido MLPD y MLPD + AAS 100 μM . Los resultados obtenidos muestran a la CP-145 en el medio MLPD + AAS 100 μM a 40 días de cultivo con el valor más alto (11.61 ± 1.63 mg/mL), ubicada en el primer nivel de significancia.

Cuadro 10. Análisis de la biomasa seca (mg/mL) producida entre las cepas nativas de *Ganoderma* durante cinética de cultivo en medio líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con AAS 100 µM (n= 3).

Cinética (días)	CP-145		CP-434		CP-834	
	MLPD	MLPD + AAS	MLPD	MLPD + AAS	MLPD	MLPD + AAS
0	0.16±0.01 ^{P*}	0.18±0.00 ^P	0.19±0.01 ^{OP}	0.22±0.00 ^{OP}	0.10±0.00 ^P	0.10±0.00 ^P
10	0.67±0.03 ^{nop}	0.43±0.03 ^{nop}	1.76±0.06 ^{mno}	1.77±0.05 ^{mno}	2.27±0.19 ^{kmno}	2.68±0.45 ^{lmnop}
20	3.47±0.22 ^{ijklm}	4.66±0.11 ^{ghijkl}	2.74±0.00 ^{klmn}	2.83±0.08 ^{klmn}	5.67±0.32 ^{efghi}	6.08±0.12 ^{fghij}
30	6.32±0.31 ^{defghi}	7.81±0.88 ^{bcdef}	3.25±0.12 ^{ijklm}	3.58±0.06 ^{Bijklm}	7.34±0.48 ^{cdef}	7.55±0.03 ^{cdef}
40	8.33±0.61 ^{bcde}	11.61±1.63 ^a	4.65±0.39 ^{ghijkl}	4.39±0.14 ^{hijkl}	9.39±0.37 ^{abc}	10.28±0.39 ^{ab}
80	6.28±1.14 ^{defghi}	7.69±1.56 ^{cdef}	6.39±1.07 ^{defghi}	6.90±0.60 ^{defg}	8.69±0.64 ^{bcd}	7.84±0.87 ^{bcdef}
100	6.71±0.40 ^{defgh}	6.70±0.71 ^{defgh}	3.93±0.87 ^{ijklm}	4.85±0.80 ^{ghijk}	7.38±0.19 ^{cdef}	7.48±0.18 ^{cdef}

MLPD= medio líquido papa dextrosa. AAS= ácido acetilsalicílico. *Prueba de Tukey α= 0.05

Actividad volumétrica de lacasas (U/mL)

En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos del análisis de medias por cepa (Tukey α= 0.05) para la actividad volumétrica de lacasas producida en medio de cultivo líquido papa dextrosa (MLPD) y MLPD + AAS 100 µM. La CP- 145 y CP434 a 40 y 80 días de cultivo en medio MLPD adicionado con AAS 100 µM, mostraron los valores más altos, ubicándose en el primer nivel de significancia. En tanto que la CP-834 tuvo la mayor producción de lacasas a 40 días de cultivo en MLPD adicionado con AAS 100 µM, siendo significativamente diferente al resto.

Cuadro 11. Análisis de la actividad volumétrica de lacasas (U/mL) por cepas nativas de *Ganoderma* durante cinética de cultivo en medios de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con AAS 100 µM (n=3).

Cinética (días)	CP-145		CP-434		CP-834	
	MLPD	MLPD + AAS	MLPD	MLPD + AAS	MLPD	MLPD + AAS
0	00.0±0.00 ^{f*}	0.01±0.01 ^f	0.03±0.01 ^f	0.01±0.00 ^f	0.00±0.00 ^g	0.00±0.00 ^g
10	0.04±0.01 ^f	0.44±0.01 ^{ef}	0.09±0.01 ^f	0.24±0.01 ^f	0.96±0.12 ^{fg}	12.63±2.01 ^d
20	0.20±0.02 ^{ef}	1.14±0.14 ^e	0.26±0.04 ^f	3.50±0.25 ^{de}	5.90±0.94 ^{ef}	30.17±2.88 ^b
30	0.61±0.06 ^{ef}	6.12±1.56 ^b	3.20±0.60 ^{de}	4.71±0.24 ^c	10.14±0.83 ^{de}	26.75±2.27 ^{bc}
40	4.20±0.43 ^c	11.01±0.58 ^a	4.77±0.28 ^c	11.78±0.88 ^a	13.37±0.83 ^d	49.38±3.40 ^a
80	3.06±0.06 ^d	10.74±0.65 ^a	2.47±0.44 ^e	12.51±0.83 ^a	24.42±2.91 ^c	28.95±2.82 ^{bc}
100	0.00±0.00 ^f	7.24±0.25 ^b	9.10±0.14 ^b	3.53±0.48 ^d	12.18±0.22 ^d	24.71±2.93 ^c

MLPD= Medio líquido papa dextrosa. AAS= Ácido acetilsalicílico. *Prueba de Tukey α= 0.05.

En el cuadro 12 se muestran los resultados obtenidos del análisis de medias entre cepas (Tukey $\alpha=0.05$) de la actividad volumétrica de lacasas de *Ganoderma* en medio de cultivo líquido papa dextrosa (MLPD) y MLPD + AAS 100 μM . La CP-834 a 40 días de cultivo en medio MLPD + AAS 100 μM fue significativamente superior que el resto de las medias analizadas. En tanto que los últimos niveles de significancia se encontraron a los 0 y 100 días.

Cuadro 12. Actividad volumétrica de lacasas (U/mL) de cepas nativas de *Ganoderma* durante cinética de cultivo en medios de cultivo líquido de papa y dextrosa (MLPD) y MLPD adicionado con AAS 100 μM (n=3).

Cinética (días)	CP-145		CP-434		CP-834	
	MLPD	MLPD + AAS	MLPD	MLPD + AAS	MLPD	MLPD + AAS
0	00.0±0.00 ^{n*}	0.01±0.01 ⁿ	0.03±0.01 ⁿ	0.01±0.00 ⁿ	0.00±0.00 ⁿ	0.00±0.00 ⁿ
10	0.04±0.01 ⁿ	0.44±0.01 ^{lmn}	0.09±0.01 ^{mn}	0.24±0.01 ^{lmn}	0.96±0.12 ^{klmn}	12.63±2.01 ^d
20	0.20±0.02 ^{lmn}	1.14±0.14 ^{klmn}	0.26±0.04 ^{lmn}	3.50±0.25 ^{ijklm}	5.90±0.94 ^{ghij}	30.17±2.88 ^b
30	0.61±0.06 ^{lmn}	6.12±1.56 ^{ghi}	3.20±0.60 ^{ijklmn}	4.71±0.24 ^{hij}	10.14±0.83 ^{def}	26.75±2.27 ^{bc}
40	4.20±0.43 ^{hijk}	11.01±0.58 ^{de}	4.77±0.28 ^{hij}	11.78±0.88 ^{de}	13.37±0.83 ^d	49.38±3.40 ^a
80	3.06±0.06 ^{ijklmn}	10.74±0.65 ^{de}	2.47±0.44 ^{ijklmn}	12.51±0.83 ^{de}	24.42±2.91 ^c	28.95±2.82 ^b
100	0.00±0.00 ⁿ	7.24±0.25 ^{fgh}	9.10±0.14 ^{efg}	3.53±0.48 ^{ijkl}	12.18±0.22 ^{de}	24.71±2.93 ^c

MLPD= Medio líquido papa dextrosa. AAS= Ácido acetilsalicílico. *Prueba de Tukey $\alpha=0.05$.

IX. DISCUSIÓN

Recientemente existe un interés en el estudio de las enzimas lignocelulósicas de *G. lucidum* con potenciales aplicaciones industriales. Los resultados presentados están enfocados principalmente a la caracterización de cepas nativas de este género en la producción de lacasas y en otras variables que permitan seleccionar los recursos genéticos de hongos comestibles, funcionales y medicinales.

El cultivo de cepas nativas de *Ganoderma* spp. en medios semisólidos PDA adicionados con ABTS 0.5 mM mostraron la aparición de un halo oxidación de color verde a negro-violeta derivado de la actividad de las lacasas producidas por los hongos, lo anterior coincide con lo reportado por Vantamuri y Kaliwal (2015) y Vrsanska *et al.* (2015). En cuanto al área de colonización los medios adicionados con AAS 100 μ M no mostraron diferencia significativa (Tukey $\alpha= 0.05$) con respecto al testigo en las cepas CP-145 y CP-834. No así en la CP-434, donde se observaron valores menores y significativamente diferentes al testigo (PDA). El área del halo de oxidación no fue significativamente diferente (Tukey $\alpha= 0.5$) en la CP-145, pero fueron diferentes en las cepas CP-434 y CP-834, siendo mayor en el medio adicionado con ABTS 0.5 mM + AAS 100 μ M, lo que permitió evidenciar el efecto de inducción de lacasas del AAS 100 μ M por cambio de color en área de medio de cultivo en estas 2 cepas. 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 μ M, específicamente en el caso de la CP-145, en el medio adicionado con AAS 100 μ M, en tanto que en las cepas CP-434 y CP-834 en los medios ABSTS 0.5 mM + AAS 100 μ M tuvieron actividades de 1.95 ± 0.02 U/mL y 9.51 ± 0.43 U/mL, respectivamente.

En cuanto al cultivo en medios líquidos las cepas CP-145 y CP-834 mostraron los valores más altos de producción de biomasa a 40 días en los medios adicionados con AAS 100 μ M, resultando significativamente diferentes (Tukey $\alpha= 0.5$), en la CP-145, pero no para la CP-834. En tanto que la CP-434 mostró la producción de biomasa más alta a los 80 días, sin encontrar diferencia estadística entre los medios. D'Souza *et al.* (1999), reportó valores para *G. lucidum* de 2.1 y 0.95 mg/mL de biomasa a 12 días de

cultivo con altos y bajos niveles de nitrógeno, respectivamente. En tanto Yang *et al.* (2009), reportaron valores de 1.56 mg/mL a 7 días de cultivo. Las cepas estudiadas en el presente trabajo mostraron una producción de biomasa de 0.43 mg/mL (CP-145 en AAS 100 μ M) y 2.68 mg/mL (CP-834 en AAS 100 μ M) a 10 días de cultivo, encontrándose en el rango reportado por dichos autores.

Los resultados de la actividad volumétrica de lacasas en cultivos líquidos mostraron valores altos y significativamente diferentes (Tukey $\alpha= 0.5$) en los medios adicionados con AAS 100 μ M. Para las CP-145 y CP-434 se encontraron valores altos a 40 y 80 días, en tanto que en la CP-834 se encontró únicamente a los 40 días. Trabajos previos sobre la producción de lacasas por parte de *G. lucidum* muestran valores de 0.0006 – 0.0495 U/mL (D´ Souza *et al.*, 1999), 0.001 U/mL (Coelho *et al.*, 2010) a 7 días y de 0.295 U/mL a 5 días de cultivo en medio líquido definido (Songulashvili *et al.*, 2007). Comparando los resultados con este estudio a 10 días de cultivo, se observan valores en un rango de 0.04 U/mL para la CP-145 en MLPD y de 12.63 U/mL para la CP-834 en MLPD + AAS 100 μ M. Martínez-Carrera *et al.* (2016), empleó AAS μ 100 μ M en el cultivo de la 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 hallando valores de 8.9 U/mL. Los resultados encontrados en esta investigación fueron de 11.01 ± 0.58 para la CP-145, 11.78 ± 0.88 para la CP-434 y 49.38 ± 3.40 para la CP-834 a 40 días de cultivo en iguales condiciones. Se encontraron valores de inducción en un rango de 193% a 248% en medio semisólido y de 162% a 400% en medio de cultivo líquido respecto al testigo (Cuadro 13).

Cuadro 13. Inducción (%) del ácido acetilsalicílico (AAS) en la producción de enzimas lacasas respecto al testigo en el cultivo *in vitro* de tres cepas nativas de *Ganoderma*.

Medio de cultivo	Registro		
	CP-145	CP-434	CP-834
Semisólido	193	248	216
Líquido	162	406	269

You *et al.* (2013), mencionan el uso de aspirina en una concentración de 0.5-8 mM en medio de cultivo MLPD durante 4 días para inducir la apoptosis de *G. lucidum* y

obtener ácidos ganodéricos, metabolitos secundarios de interés medicinal. En el presente trabajo se emplearon cantidades que representaron el 12.5% y 20% de las empleadas por los autores, encontrando la inducción de enzimas lacasas. Se comprueba en efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) en el cultivo de *Ganoderma* a nivel de crecimiento y actividad enzimática, adicionales a las ya comprobadas por Meneses *et al.* (2016) con la misma cepa.

La conductividad depende de la concentración de los electrolitos en una disolución, en la que están presentes como iones con libertad de movimiento y poseen la capacidad de conducir corriente eléctrica. Durante el desarrollo del micelio una liberación de electrolitos parece tener lugar debido al metabolismo del organismo, lo cual explica su variación dentro de la cinética (Hepler, 1968; Christen, 1986; Gómez-Alarcón *et al.*, 1986; Wilches-Zúñiga *et al.*, 2007).

X. CONCLUSIONES

Se evaluó el crecimiento de tres cepas nativas *Ganoderma* spp. en medios de cultivo semisólido y líquido así como la producción de enzimas lacasas empleando ácido acetilsalicílico (AAS) como inductor. Contrastando la hipótesis planteada en este trabajo el ácido acetil salicílico (AAS) adicionado a los medios de cultivo de *Ganoderma* spp. sí tuvo efecto sobre la actividad enzimática de lacasas en las cepas estudio. Con base en los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

1. Empleando ABTS 0.5 mM en medios semisólidos se encontró que las cepas en estudio producían lacasas, evidenciado por la aparición de un halo de color verde-morado oscuro. La medición del halo mostró que el área del mismo fue mayor y significativamente diferente cuando se empleó AAS 100 μ M en dos cepas (CP-434 y CP834).
2. La producción de lacasas se vió incrementada en más del 80% en las tres cepas por la adición del AAS 100 μ M en los medios semisólidos.
3. El área de colonización no se vió afectada por el uso del AAS en la CP-145 y CP-834, en tanto que en la CP-434 limitó su crecimiento.
4. En los medios de cultivo líquido la producción de biomasa incrementó en las CP-145 y CP-834 por el uso del AAS 100 μ M.
5. La actividad volumétrica de lacasas aumentó en más del 100% con el uso de AAS 100 μ M, encontrando los valores máximos de producción de lacasas a 40 días de cultivo.

La caracterización de recursos genéticos es ideal para la selección de los mismos en procesos y aplicaciones biotecnológicas. El empleo de inductores de baja toxicidad y fácil acceso como el AAS permitió potenciar la producción de lacasas en los organismos estudiados, lo cual amplía las aplicaciones de este compuesto como inductor de enzimas lignocelulósicas en hongos comestibles. El análisis bioquímico de la actividad volumétrica de lacasas de estas cepas abre un panorama para el estudio de la expresión génica de estas biomoléculas para conocer de forma específica su producción y aprovechamiento respecto a los tiempos de cultivo en substratos sólidos, derivados de la actividad agroforestal.

XI. ESTRATEGIA PARA EL APROVECHAMIENTO DE RECURSOS GENÉTICOS NATIVOS DE *Ganoderma* spp. COMO CEPAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS LACASAS

México es considerado un país donde converge una notable diversidad biológica, ecológica y cultural. En este contexto existe un panorama general de la diversidad de los recursos genéticos nativos de hongos comestibles funcionales y medicinales, los cuales son relevantes en virtud de las propiedades funcionales y medicinales de los compuestos y moléculas bioactivas. En virtud de ello existen propuestas para impulsar un círculo virtuoso conservación-investigación-innovación-desarrollo donde la generación de conocimiento e innovaciones promueven el desarrollo del sector y de la sociedad, y a su vez alientan la conservación, estudio y utilización de los recursos genéticos de hongos comestibles, funcionales y medicinales.

Es posible desarrollar estrategias integrales para los recursos genéticos nativos de hongos comestibles y medicinales, involucrando su recolección, conservación, identificación, caracterización y aplicaciones biotecnológicas. Para ello, resulta indispensable fortalecer la investigación científica básica y aplicada para resolver problemas de carácter cognoscitivo, y aquellos de posible interés social. Con el conocimiento generado, será posible desarrollar las innovaciones que el sector y la sociedad demandan, a través de procesos, técnicas, cepas comerciales, y modelos de utilidad inmediata, en los cuales el conocimiento no es un fin, sino un medio (Morales *et al.*, 2010).

Una estrategia describe el plan general de acción para un proyecto así como la secuencia de actividades particulares. Tener una estrategia consiste en estar consciente de hacia dónde ir y como se pretende llegar (Cross, 1999). En la presente estrategia se plantea el aprovechamiento del conocimiento obtenido encaminado hacia una nueva visión en la producción intensiva de cepas nativas de *Ganoderma* en substratos sólidos, resaltando el potencial de este hongo comestible y medicinal en la transformación de residuos lignocelulósicos agroforestales para la obtención de lacasas como producto de valor agregado además, de sus basidiocarpos con propiedades funcionales y medicinales.

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 14).

Cuadro 14. Matriz de potencialidades, limitaciones y problemas de la estrategia propuesta.

Área temática	Potencialidades	Limitaciones	Problemas
Recursos naturales y ambientales	Abundancia de recursos genéticos nativos Oportunidad de conversión de residuos agroforestales en nuevos productos de valor agregado	Falta de conocimiento en la implementación de tecnologías de aprovechamiento de residuos lignocelulósicos empleando recursos genéticos de hongos comestibles	1. Clima cambiante 2. Biopiratería 3. Sobre explotación de recursos maderables.
Sistema físico-natural	México en su variedad de climas, posee las condiciones para el aprovechamiento de <i>Ganoderma lucidum</i>	Fenómenos meteorológicos derivados del cambio climático que merman la producción de hongos comestibles	Transporte de materias primas y productos terminados
Área económica	El precio en el mercado de productos derivados del cultivo de <i>Ganoderma</i> (Hongo deshidratado, lacasas) es elevado	Falta de inversión en planes de desarrollo e innovación de la producción de <i>Ganoderma</i> en el sector público y privado	Disponer de financiamientos acorde a la tecnología necesaria a implementar
Demografía y mercado de trabajo	Ofrece una oportunidad de generación de nuevos empleos	Se requiere personal capacitado y calificado Falta de una cultura en el aprovechamiento de recursos fúngicos	Los actuales productores se encuentran dispersos en el país.
Infraestructura	La infraestructura requerida para la producción es de acceso relativamente sencillo. Existe información general del proceso productivo	Riesgos de contaminación en el cultivo por una infraestructura deficiente	El escalamiento de nivel laboratorio-planta piloto requiere investigación y desarrollo

Aspectos institucionales	Existe capacidad para realizar investigación tecnológica para potenciar el aprovechamiento de los recursos de hongos comestibles	Existe un número limitado de recursos humanos altamente capacitados	Falta de vinculación consolidada entre instituciones y productores de hongos comestibles
--------------------------	--	---	--

Actores sociales

En una estrategia las realidades y estructuras posibles son creadas y construidas por sus actores sociales (Arellano, 2004). En este sentido a continuación se describen los actores principales para la estrategia de aprovechamiento de recursos genéticos nativos de *Ganoderma* spp. como cepas productoras de enzimas lacasas.

Productores. Los productores y organizaciones de hongos comestibles y medicinales son esenciales en esta estrategia debido a su interés individual y necesidad de aprovechar recursos naturales en la obtención de nuevos productos de valor agregado que beneficien a la sociedad

Sector gubernamental. La importancia del sector gubernamental como actor encuentra relevancia en la regulación y la incentivación de nuevos modelos de aprovechamiento de los recursos de forma sustentable, así como apoyo económico en la implementación de nuevos proyectos de sustentabilidad.

Instituciones de investigación. Las instituciones y centros de investigación brindan a la sociedad de capital humano especializado en el desarrollo y aplicación de ciencia y tecnología. Una afinidad inter y transdisciplinaria de tecnólogos permite el aprovechamiento integral de los recursos naturales del país.

Consumidores. Son parte esencial de una cadena de aprovechamiento de los productos y conocimientos a generar. En esta estrategia los consumidores primarios del conocimiento generado implementarían la obtención de nuevos productos (lacasas) para la transformación de otras materias primas en nuevos productos y servicios.

Objetivos estratégicos y específicos

En el cuadro 15 se describe el objetivo general, así como los específicos, los resultados y las actividades a realizar en la implementación de esta estrategia.

Cuadro 15. Asignación de objetivos de la estrategia para el aprovechamiento de recursos genéticos nativos de *Ganoderma* spp. como cepas productoras de enzimas lacasas.

Objetivo general	Obtener productos de valor agregado derivados del proceso de producción de hongos comestibles y funcionales.
Objetivo específico	Aprovechar recursos genéticos nativos de <i>Ganoderma</i> spp. 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>Ganoderma</i>.3. Aprovechamiento de sustratos residuales del cultivo de <i>G. lucidum</i>.4. Dar un valor agregado al cultivo de <i>Ganoderma</i> a través de la obtención de enzimas lacasas a partir de sustratos.
Actividades	<ol style="list-style-type: none">1. Aislamiento y conservación de los recursos genéticos nativos de <i>Ganoderma</i>.2. Implementación de un modelo de producción de <i>G. lucidum</i> en sustratos sólidos.3. Determinación de la producción máxima de enzimas lacasas.4. Desarrollo de metodologías de obtención y uso de enzimas de sustratos colonizados por <i>G. lucidum</i>5. Caracterización de las enzimas lacasas a nivel bioquímico, e iniciar la caracterización a nivel molecular.6. Colocación en el mercado de productos de lacasas de <i>G. lucidum</i> derivadas de su cultivo en sustratos lignocelulósicos.

Se estima que actualmente el mercado de enzimas a nivel mundial equivale a 8 mil millones de dólares, debido al incremento de la demanda (Li *et al.*, 2012). En este contexto las lacasas tienen una amplia demanda gracias a sus propiedades catalíticas en las reacciones de oxidación, lo que les otorga un gran potencial dentro de una amplia variedad de aplicaciones industriales, como los biocombustibles, papel, textil y

en industrias alimentarias (Couto y Herrera, 2006). Además las enzimas proporcionan una solución verde para las crecientes preocupaciones ambientales (Mishra y Kumar, 2009). Actualmente, el crecimiento continuo del mercado de enzimas industriales depende de la innovación tecnológica, la identificación y caracterización de nuevas enzimas procedentes de fuentes naturales (Cherry y Fidantsef, 2003). En este sentido, radica este estudio, el de valorar el potencial de producción de lacasas de los recursos nativos del hongo *Ganoderma*.

XI. LITERATURA CITADA

- Arellano, G. D. 2004. *Gestión estratégica para el sector público. Del pensamiento estratégico al cambio organizacional*. Fondo de cultura económica. México D. F. 264 pp.
- Arora, D. S. y R. K. Sharma. 2009. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1760–1788.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, 30: 215-242.
- Barney, D. L. 1997. *Growing Mushrooms Commercially - Risks and Opportunities*. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. Oklahoma State University.
- Bernabé-González, T. 2015. Cultivo de hongos con propiedades funcionales y medicinales: obtención, selección y caracterización de cepas de *Ganoderma* sobre subproductos de regiones forestales. Tesis de Doctorado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. 138 pp.
- Bisang, R., M. Campi y V. Cesa. 2009. *Biotecnología y desarrollo*. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). Naciones Unidas, Santiago de Chile. 107 pp.
- Bourbonnais, R. y M. G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267:9-102.
- Bourbonnais, R., M. G. Paice, D. Leech y B. Freiermuth. 1998. Reactivity and mechanism of laccase mediators for pulp delignification. *TAPPI Biological Science Symposium* 23: 335-338.
- 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 Mestría en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Puebla. 88 pp.
- Campbell, N. A. y J. B. Reece. 2007. *Biología*. Ed. Médica Panamericana. 1532 pp.
- Chang, S. T. 1995. *Ganoderma*-the leader in production and technology of mushroom nutraceuticals; Pp 43-52. *En: 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.
- Chen, S., J. Xu, C. Liu, Y. Zhu, D. R. Nelson, S. Zhou y H. Luo. 2012. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nature communications*, 3: 913. DOI: 10.1038/ncomms1923
- Cherry, J. R., y A. L. Fidantsef. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology*, 14(4): 438-443.

- Christen, H. R. 1986. *Fundamentos de la química general e inorgánica*. Reverté. Barcelona. 277 pp.
- Coelho, J. S., C. G. M. Souza, A. L. Oliveira, A. Bracht, M. A. F. Costa y R. M. Peralta. 2010. Comparative removal of bentazon by *Ganoderma lucidum* in liquid and solid state cultures. *Current Microbiology* 60: 350–355.
- Couto, S. R. y J. L. T. Herrera. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 24(5): 500-513.
- Cross, N. 1999. *Métodos de diseño. Estrategias para el diseño de productos*. Limusa Wiley. México. 175 pp.
- D'Souza, T. M., C. S. Merritt y C. A. Reddy. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5307–5313.
- Delaney, T. P. 2010. Salicylic acid. *En: Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction and action! 3ra edición*; Pp. 681–699. Ed. P. J. Davies. Springer. Dordrecht, Heidelberg.
- Elisashvili, V. y E. Kachlishvili. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. *Journal of Biotechnology* 144: 37–42.
- Elisashvili, V., E. Kachlishvili, N. Tsiklauri y M. Bakradze. 2002. Physiological regulation of edible and medicinal higher basidiomycetes lignocellulolytic enzymes activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4: 159–166.
- Elisashvili, V., M. Penninckx, E. Kachlishvili, M. Asatiani y G. Kvesitadze. 2006. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 998–1004.
- Fakoussa, R. M., y M. Hofrichter. 1999. Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(1): 25-40.
- Fang, Z., X. Liu, L. Chen, Y. Shen, X. Zhang, W. Fang, X. Wang, X. Bao y Y. Xiao. 2015. Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels* 8: 54-65.
- Feng, H., X. Qin, H. Zhang, Y. Yang, X. Zhang y Y. Yang. 2014. Characterization of laccase isoenzymes from the white-rot fungus *Ganoderma* sp.En3 and synergistic action of isoenzymes for dye decolorization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90: 2265–2279.
- Floudas, D., B. W. Held, R. Riley, L. G. Nagy, G. Koehler, A. S. Ransdell y A. Tritt. 2015. Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. *Fungal Genetics and Biology*, 76: 78-92.
- Furukawa, T., F. O. Bello y L. Horsfall. 2014. Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Frontiers in Biology* 9: 448–471.

- Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser y D. Haltrich. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 529–536.
- Ganeshpurkar, A., G. Rai y A. P. Jain. 2010. Medicinal mushrooms: Towards a new horizon. *Pharmacognosy Review* 4: 127–35.
- Giardina, P., V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle y G. Sannia. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369–385.
- Gómez-Alarcón, G., R. Lahoz y C. Saiz-Jiménez. 1986. Production of some enzymes in the autolysis of the white-rot fungus *Coriolus versicolor* in fermenter. *Microbiología* 2: 97-103.
- Guerrero-Torres, J. V., G. Mata, D. Martínez-Carrera, C. Garibay-Orijel, y R. Garibay-Orijel. 2013. Cebadores para la amplificación del gen de la (1, 3)- β -glucano sintasa y caracterización parcial de la enzima en *Ganoderma lucidum*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(4): 267-270.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velazco y L. Guzmán-Davalos. 1993. *El Cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales*. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 245 pp.
- Hawksworth, D. L. 2001. Mushrooms: the extent of the unexplored potential. *International journal of medicinal mushrooms* 3: 333–340.
- Hepler, L. G. 1968. *Principios de química*. Reverté. Barcelona. 356 pp.
- Hou, H., J. Zhou, J. Wang, C. Du, y B. Yan. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, 39(11): 1415-1419.
- 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 pp.
- Janusza, G., H. K. Katarzyna, A. Pawlik y M. Staszczak. 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* 52: 1-12.
- Kenealy, W. R., y T. W. Jeffries. 2003. Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments. Pp. 210-241. *En: ACS symposium series*. American Chemical Society. Washington, DC.
- Kuhar, F., y L. Papinutti. 2014. Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. *Revista argentina de microbiología* 46:144-149.
- Laufenberg, G., B. Kunz y M. Nystroem. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products. *Bioresource Technology* 87: 167–198.

- Li, S., X. Yang, S. Yang, M. Zhu, y X. Wang. 2012. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3): 1-11.
- Liu, D., J. Gong, W. Dai, X. Kang, Z. Huang, H. M. Zhang y Y. Chen. 2012. The genome of *Ganoderma lucidum* provide insights into triterpene biosynthesis and wood degradation. *PloS one*, 7(5), e36146.
- Maciel, G. M., F. D. Ignacio, A. B. de Sá-Nakanish, C. W. I. Haminiuk, R. Castoldi, J. F. Comar, A. Bracht y R. M. Peralta. 2013. Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. to the herbicide picloram: tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105: 84-92.
- Manavalan, T., A. Manavalan, K. Thangavelua y K. Heesed. 2013. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal* 70: 106–114.
- Martinez-Carrera, D., A. Aguilar, W. Martinez, M. Bonilla, P. Morales y M. Sobal. 2000. Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico; Capítulo 45. Pp. 471-488. *En: Coffee biotechnology and quality*. Eds. T. Sera, C. Soccol, A. Pandey, y S. Roussos. Kluwer Academic Publishers, Dordrech.
- Martínez-Carrera, D., A. Larqué-Saavedra, A. Tovar, N. Torres, M. E. Meneses, M. Sobal, P. Morales, M. Bonilla, H. Escudero, I. Tello-Salgado, T. Bernabé-González, W. Martínez y Y. Mayett. 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. Capítulo 30. Pp 581-640. *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.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. 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.
- Mayer, A. M., y R. C. Staples. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6): 551-565.
- Meneses, M. E., D. Martínez-Carrera, N. Torres, M. Sánchez-Tapia, M. Aguilar-López, P. Morales, M. Sobal, T. Bernabé, H. Escudero, O. Granados-Portillo y A. R. Tovar. 2016. Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice. *PLOS ONE*, 11(7), e0159631.

- Mikiashvili, N., V. Elisashvili, S. Wasser y E. Nevo. 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters* 27: 955–959.
- Miles, P. y S.-T.Chang. 2004. *Ganoderma lucidum* a leader of medicinal mushrooms; Capítulo 19. Pp. 357-372. *En: Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. Eds. P. G. Miles y S.-T. Chang. CRC Press, U. S. A.
- Minussi, R. C., G. M. Pastore, y N. Durán. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6): 205-216.
- Mishra, A., y S. Kumar. 2009. Kinetic studies of laccase enzyme of *Coriolus versicolor* MTCC 138 in an inexpensive culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 46(3): 252-256.
- Moncalvo, J. M. y L. Ryvarden. 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.
- Moncalvo, J. M. y L. Ryvarden. 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. *Synopsis Fungorum* 11:1–114
- Money, N. P. 2015. Fungal diversity; Capitulo 1. Pp. 1-36. *En: The Fungi. Third edition*. Eds. S. C. Watkinson, L. Boddy y N. P. Money. Academic Press. U.K.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, P. Ramírez-Carrasco, I. Tello, T. Spezzia, N. Lira, R. De Lima, S. Villa. E. Montiel y D. Martínez-Carrera. 2010. Los hongos comestibles y medicinales en México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo; Capítulo 7. Pp. 91-108. *En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales- COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla.
- Mougin, C., H. Boukcim y C. Jolival. 2009. Soil bioremediation strategies based on the use of fungal enzymes; Capítulo 7. Pp. 123-150. *En: Advances in Applied Bioremediation*. Eds. A. Singh, R. C. Kuhad, O. P. Ward. Springer, Berlin.
- Mukhin, V. A., y A. A. Votintseva. 2002. Basidiospore germination and conidial stages in the life cycles of *Fomes fomentarius* and *Fomitopsis pinicola* (Fungi, Polyporales). *Polish Botanical Journal*, 47(2): 265-272.
- Nangju D. 2001. *Agricultural Biotechnology, Poverty Reduction and Food Security: A Working Paper*. Asian Development Bank:Manila, Philippines.
- Nicotra, S., M. R. Cramarossa, A. Mucci, U. M. Pagnoni, S. Riva y L. Forti. 2004. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron*, 60(3), 595-600.

- Novotný, Č., P. Erbanova, T. Cajthaml, N. Rothschild, C. Dosoretz, y V. Šašek. 2000. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6): 850-853.
- Ntougias, S., P. Baldrian, C. Ehaliotis, F. Nerud, T. Antoniou, V. Merhautová y G. I. Zervakis. 2012. Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. *Chemosphere* 88(5):620–626.
- ONU, 1992. Convenio sobre la Diversidad Biológica. Rio de Janeiro, 5 de junio de 1992. En <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- Philippoussis, A. 2009. Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates; Capítulo 9. Pp. 163-196. *En: Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Eds. P.S. Nigam y A. Pandey. Springer Science Business Media, Athens Greece.
- Piscitelli, A., C. Pezzella, P. Giardina, V. Faraco, y G. Sannia. 2010. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs* 1: 252–262
- Postemsky, P. D., S. E. Delmastro, y N. R. Curvetto. 2014. Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93: 25-32.
- 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.
- 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. y S. S. Lele. 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochemistry* 41: 581–588
- Revankar, M. S., K. M. Desai y S. S. Lele. 2007. Solid-state fermentation for enhanced production of laccase using indigenously isolated *Ganoderma* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 143: 16-26.
- Rinker, D. 2002. Handling and using “spent” mushroom substrate around the world. *En: Mushroom Biology and Mushroom Products*. Eds. J. Sánchez, G. Huerta, y E. Montiel. UAEM, Cuernavaca.
- Rivera-Hoyos, C. M., E. D. Morales-Álvarez, R. A. Poutou-Piñales, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez y J. M. Delgado-Boada. 2013. Fungal laccases. *Fungal biology reviews* 27: 67-82.
- Rivera-Hoyos, C. M., E. D. Morales-Álvarez, S. A. Poveda-Cuevas, E. A. Reyes-Guzman, R. A. Poutou-Pinales, E. A. Reyes-Montaño, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez y A. M. Cardozo-Bernal. 2015.

- Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes GILCC1 from *Ganoderma lucidum* and POXA 1B from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. *PLoS One* 10: e0116524.
- Seo, G. S. y Kirk P. M. 2000. *Ganodermataceae: Nomenclature and classification*; Capítulo 1. Págs. 3-45. *En Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. Eds. J. Flood, P. D. Bridge y M. Holderness. CABI, U. K.
- Sharma, A., B. Shrivastava y R. C. Kuhad. 2015. Reduced toxicity of malachite green decolorized by laccase produced from *Ganoderma* sp. rckk-02 under solid-state fermentation. *3 Biotech* 5: 62-631.
- Sharma, K. K., D. S. Sapna, B. Singh y R. C. Kuhad. 2013. Ligninolytic enzymes in environmental management; Capítulo 12. Pp. 219-238. *En: Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*. Eds. R. C. Kuhad y A. Singh. Springer, New York.
- Sobal, M., D. Martínez-Carrera, P. Morales y S. Roussos. 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 19: 15-23.
- Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, W. Martínez, F. Galván, D. Sihuana, F. Quiriz, M. Juárez y D. Martínez-Carrera. 2010. Formulaciones para la producción intensiva de *Lentinula edodes* y *L. boryana* en México; Capítulo 13. Pp. 189-220. *En: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Eds. D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales y V. M. Mora. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla.
- Songulashvili, G., V. Elisashvili, S. P. Wasser, E. Nevo, e Y. Hadar. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 57–61.
- Spezzia-Mazzocco, T. (2012). Selección de cepas de hongos comestibles productoras de lacasas y su potencial de aplicación a procesos de biorremediación en zonas contaminadas con hidrocarburos en México. Tesis de Doctorado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. 179 pp.
- Sun, J., R. H. Peng, A. S. Xiong, Y. Tian, W. Zhao, H. Xhu, D. T. Liu, J. M. Chen y Q. H. Yao. 2012. Secretory expression and characterization of a soluble laccase from the *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 in *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports* 39: 3807-3814.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. Secondary metabolites and plant defense; Capítulo 13. Pp. 369-396. *En: Plant Physiology*. Eds. L. Taiz y E. Zeiger Sinauer Associates Sanderland. Inc. Massachusetts.

- Tello-Salgado, I. (2010). Diversidad de los recursos genéticos mexicanos del hongo funcional ganoderma (Fungi, Ganodermataceae), conocido como reishi en los mercados internacionales, y su relevancia para el desarrollo regional. Tesis de Doctorado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional. Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla*. 166 pp.
- Thakur, S., H. Patel, S. Gupte, S., & Gupte, A. (2012). Laccases: The biocatalyst with industrial and biotechnological applications. In *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology* (pp. 309-342). Springer Netherlands. Capítulo 16
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(1):1-12.
- Upadhyay, R.C. y M. Singh. 2010. Production of edible mushrooms; Capítulo 4. Pp. 79-97. *En: The Mycota X Industrial Applications (2nd Edn)*. Ed. M. Hofrichter. Springer-Verlag. Bochum, Germany.
- Valeriano V. S., A. M. F. Silva, M. F. Santiago, M. T. F. Bara, A. G. Telma. 2009. Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5-xylidine and ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology [online]*. 40(4): 790–794.
- Vantamuri, A. B. y B. B. Kaliwal 2015. Isolation, screening and identification of laccase producing fungi. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 6: 242-250.
- Vrsanska, M., D. Palovcikova y S. Voberkova. 2015. Monitoring of laccase production by fungal isolates from Czech forest. Conference MendelNet 2015, 11-12 November, 2015. Faculty of Agronomy. Mendel University, Brno Zemědělská. mnet.mendelu.cz/mendelnet2015.
- Wang, P., X. Hu, S. Cook, M. Begonia, K. S. Lee y H. M. Hwang. 2008. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2205–2212
- Wasser, S. P. y A. L. Weis. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1:31–62.
- Wilches-Zúñiga, M., L. F. Ruíz Monsalve y M. Hernández Valdivieso. 2007. *Bioingeniería IV: Fundamentos de instrumentación para la química clínica y las radiaciones ionizantes*. Universidad de Antioquia. Colombia. 173 pp.
- Xu, F. 1999. Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production, and applications; Pp. 1545–1554. *En: Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalyses, bioseparation*. Eds. M.C. Flickinger, S.W. Drew. John Wiley & Sons Inc, New York.
- Yang, F. C., M. J. Yang, y S. H. Cheng. 2009. A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(2), 148-154.

- You, B. J., M. H. Lee, N. Tien, M. S. Lee, H. C. Hsieh, L. H. Tseng, Y. L. Chung y H. Z. Lee. 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.
- You, L. F. , Z. M. Liu, J. F. Lin, L. Q. Guo, X. L. Huang y H. X. Yang. 2014. Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology* 54: 134–141
- Zhou, X. W., K.Q. Su y Y. M. Zhang. 2012. Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 941–963.

XIII. ANEXO

Se realizaron entrecruzamientos entre cepas para confirmar el género, debido a que se encuentran en proceso de definir la especie de las cepas CP-434 y CP-834. El material biológico empleado corresponde al descrito en el cuadro 16.

Cuadro 16. Material biológico depositado en el UREGENHCFyM empleado en el entrecruzamiento de cepas para confirmar el género de las cepas estudiadas.

Especie	Registro	Procedencia
<i>Ganoderma lucidum</i>	CP-145	Cuernavaca, Morelos
<i>Ganoderma</i> spp.	CP-434	Sierra Norte de Puebla
<i>Ganoderma</i> spp.	CP-834	Estado de Morelos
<i>Ganoderma lucidum</i>	CP-400	Cd. Chapultepec Morelos
<i>Trametes maxima</i>	CP-717	Tlalnelhuayocan Veracruz

La figura 37 muestra las colonias de cada cepa crecidas en medio papa dextrosa agar (PDA) en su fase dicariótica.

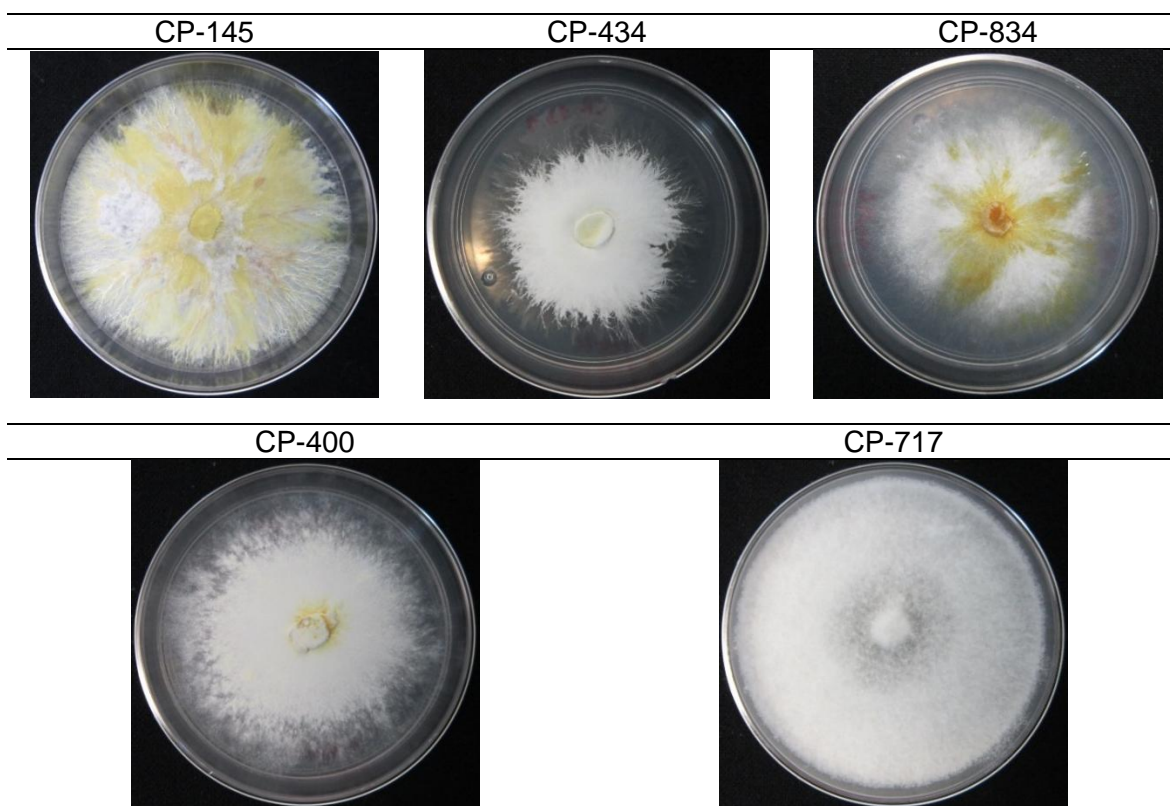


Figura 37. Cepas en la fase de caracterización del material biológico empleado en esta investigación. Las cepas varían en textura, color y densidad micelial, así como en el contorno de la colonia.

El cuadro 17 resume las características morfológicas de la colonia de las cepas cuando se entrecruzaron entre ellas. Las afines no formaron una barrera. Las cepas de género diferente formaron una barrera o permanecieron separadas las colonias.

Cuadro 17. Morfología de las colonias de acuerdo a su interacción.

Registro	CP-145	CP-400	CP-434	CP-717	CP-834
CP-145	Fusionada				
CP-400	Barrera	Fusionada			
CP-434	Barrera	Barrera	Fusionada		
CP-717	Barrera	Barrera	Barrera	Fusionada	
CP-834	Barrera	Separación	Separación	Barrera	Fusionada

La figura 38 ejemplifica los comportamientos de las cepas cuando se confrontaron las colonias.

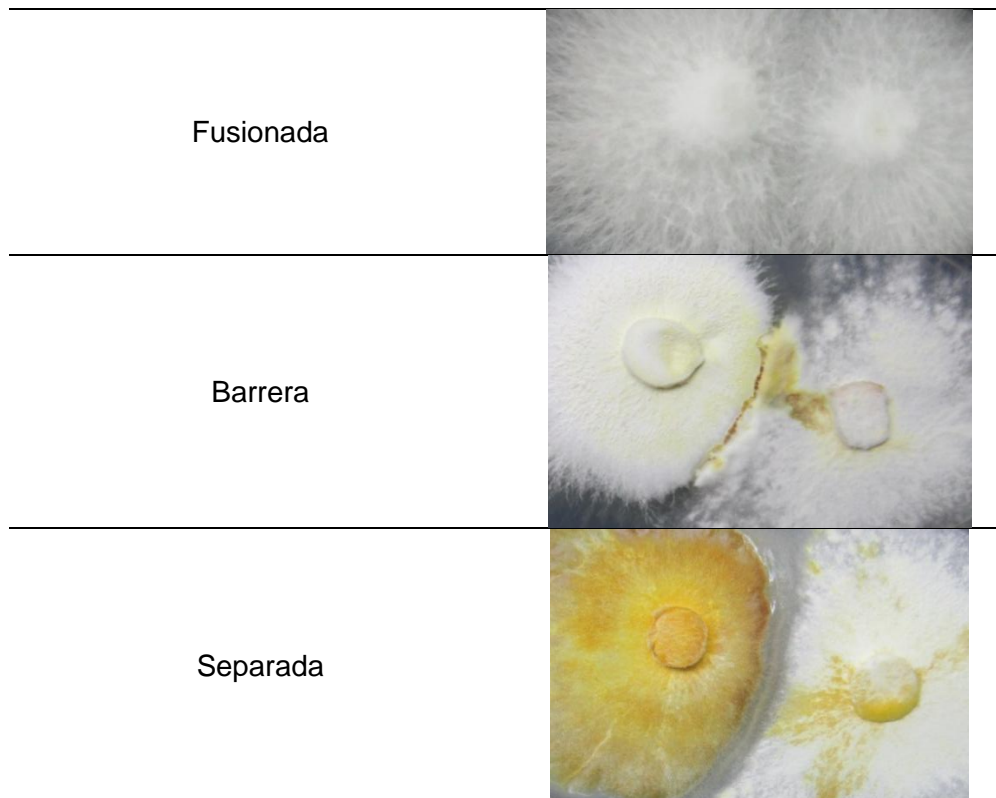


Figura 38. Definición de la morfología de colonias de acuerdo a su interacción.

Es necesario confirmar la especie de la cepa CP-834 de *Ganoderma* spp. debido a los resultados obtenidos.