

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PRODUCCIÓN DE LACASAS DE *ARMILLARIA* SP. CRECIDO EN
DIFERENTES SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

REYES KEVIN ROMERO CEDILLO

**DIRECTORA
DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2021

DEDICATORIAS

Agradezco a la Virgen de Guadalupe y a Dios, por haberme acompañado y guiado en este camino dándome fuerza, salud y sabiduría para seguir y lograr llegar a esta etapa de mi vida, gracias por las enseñanzas a lo largo de esta trayectoria y por rodearme de muy buenas personas para llegar hasta aquí.

A mi mamá (abuela)

Con amor a Mamá Elena, que desde el cielo me cuida, me protege y me guía, gracias por ser mi estrella, me enseñaste a valorar lo que se tiene alrededor y a esforzarse mucho para tener logros, sé que me acompañas a dónde quiera que vaya, gracias por no abandonarme en los momentos difíciles para superarlos y seguir adelante.

Esta tesis se la dedico con mucho cariño a ella, porque sé que estaría muy orgullosa de mí, aunque no está aquí conmigo, sé que estaría feliz por ser el primero de la familia en titularse y lograr este gran triunfo.

A mi mamá

Gracias Madre por todo el apoyo que me has brindado nunca me dejaste de apoyar gracias por tus sacrificios y el buen ejemplo que me has enseñado para luchar siempre por lo que quiero ante las adversidades.

Te agradezco ser mi madre y padre a la vez, reconozco tu gran esfuerzo por sacarme adelante, en muchos aspectos lograste formarme como persona, me enseñaste a ser fuerte y luchar siempre para lograr cada reto que me propusiera y a cumplir con éxito este gran logro, gracias por ser una gran mamá y la mejor que me pudo tocar.

A mi familia

A mi tío Alfredo que apesar de las adversidades siempre cuento con su apoyo, agradezco mucho su ayuda y confianza, se ha convertido como un padre para mí.

A mi tía María quién me apoyo en mis estudios y nunca dudó de mí, gracias por apoyarme y creer en mí, te agradezco porque en una etapa difícil de mi vida me mostraste tu apoyo y cariño tanto para mí, como a mi mamá gracias.

A mi abuela Yola por apoyarme en momentos difíciles, gracias por creer en mí, por enseñarme a encontrar el lado bueno de las cosas.

Gracias a todos ustedes por ser parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Maura Téllez Téllez por compartir de su gran conocimiento, su apoyo, su comprensión y su paciencia, por creer en mí y también por la gran ayuda durante este proyecto y consejos, muchas gracias doctora.

A mis sinodales: la Dra. Ma. De Lourdes Acosta Urdapilleta, Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, M. en MRN. Alma Rosa Agapito Ocampo y al Dr. Gerardo Díaz Godínez, gracias a ustedes por invertir de su tiempo, por sus sugerencias y aportaciones. Gracias por todos sus comentarios que formaron y aportaron parte de este proyecto.

A la M. en MRN. Alma que aparte de ser mi sinodal, mi compañera del laboratorio siempre positiva y dando ánimos, que me ha apoyado bastante en mi proyecto para realizar las actividades, una gran persona que me brindó su gran amistad incomparable, nunca faltaron esos días de risas y aventuras dentro y fuera del laboratorio, gracias Almis.

A Benjamín quien se convirtió en una gran amigo y compañero del laboratorio gracias por apoyarme a lo largo de este proyecto, te agradezco la confianza que me brindaste siempre ayudando y explicando lo que se me dificultaba, también no faltaron esos días de risas y experiencias, gracias tío Ben.

A mis compañeras y amigas de laboratorio Clara, Diana y Salma gracias por el apoyo durante el desarrollo de mi proyecto y por su amistad.

A mi amiga Paty que desde primer semestre se convirtió en una excelente amiga, siempre siguiéndome y apoyando, gracias por hacer más divertida la carrera en todos los sentidos y en momentos difíciles.

A mi amiga Tania por brindarme su amistad, apoyándome siempre, dándome consejos y enseñarme que se puede contar con los mejores amigos, pocos, pero muy valiosos.

A mi amiga Gris una persona increíble, gracias por confiar en mí, resultado de esta gran amistad, siempre motivándome a hacer las cosas, y pasar momentos divertidos.

A mis amigos Rocío y Roberto, Chío una amiga única que siempre estuvo apoyando y brindando sabiduría te lo agradezco, Roberto gracias por el apoyo, por tu amistad y por ser un gran compañero.

A mi amiga y compañera Samantha quien se convirtió en una amiga especial, gracias por el apoyo a lo largo de la carrera.

A mi amigo Daniel por ser un gran compañero y su fiel amistad, gracias por los consejos y apoyo, hiciste más amena la carrera.

A mis amigos de la prepa Yoselin y José María quienes son mis mejores amigos y son constantes a pesar de la distancia, les agradezco su enorme amistad, siempre dando ánimos para seguir y lógralo.

Gracias a todos ustedes por creer en mí, no fue fácil ni sencillo llegar hasta aquí, les agradezco el apoyo, cariño y aportes.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Resumen	v
1 Introducción	1
2 Antecedentes	3
2.1 Lacasas	3
2.2 Mecanismo de lacasas	3
2.3 Lacasas fúngicas	4
2.3.1 Producción de lacasas	6
2.4 Hongos comestibles	9
2.5 Características de <i>Armillaria mella</i> (Vahl:Fr.)	10
2.5.1 Taxonomía del género <i>Armillaria</i>	12
2.5.2 Importancia biotecnológica de <i>Armillaria mellea</i>	12
3 JUSTIFICACIÓN	15
4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
5 OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos particulares	15
6 MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Material biológico	17
6.2 Medios de cultivo e inoculación en caja Petri	17
6.2.1 Características morfológicas del micelio	17
6.2.2 Velocidad de crecimiento	17
6.2.3 Biomasa micelial	17
6.3 Crecimiento en cultivo solido	17
6.3.1 Preparación de sustratos	17
6.3.2 Inoculación en sustratos	18
6.4 Crecimiento en cultivo liquido	18
6.5 Determinación <i>in vitro</i> de lacasas de <i>Armillaria</i> sp	18
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
7.1 Características morfológicas, Biomasa y velocidad de crecimiento micelial en caja Petri	19
7.1.1 Biomasa micelial	20
7.1.2 Velocidad de crecimiento	21
7.2 Características morfológicas y velocidad de crecimiento de <i>Armillaria</i> sp. crecida sobre diferentes sustratos	22
7.3 Cuantificación de enzima lacasa	25
7.4 Producción de biomasa de <i>Armillaria</i> sp. medio líquido	27
7.5 Cuantificación de enzimas lacasas medio líquido	28
8 CONCLUSIÓN	31
9 PERSPECTIVAS	31
10 LITERATURA CITADA	32

	Anexos	41
I	Abreviaturas	41
II	Glosario	42
III	Trabajos académicos	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.	Descripción.	Pág.
1	Mecanismo molecular de reducción del oxígeno a agua catalizado por lacasas.	3
2	Cuerpo fructífero de <i>Armillariella</i> sp.	11
3	Diagrama general del proyecto.	16
4	Biomasa micelial de <i>Armillaria</i> sp.	21
5	Velocidad de crecimiento de <i>Armillaria</i> sp. en medio de cultivo de PDA con diferentes sustratos.	22
6	Velocidad de crecimiento en sustratos 100% y proporción 1:1.	25
7	Actividad de lacasas de <i>Armillaria</i> sp. en sustratos al 100%.	26
8	Actividad de lacasas de <i>Armillaria</i> sp. en las diferentes combinaciones.	26
9	Modelamiento matemático de <i>Armillaria</i> sp. medio líquido extracto de malta.	27
10	Modelamiento matemático de <i>Armillaria</i> sp. medio líquido extracto de malta con infusión de rosa.	28
11	Actividad de lacasas de <i>Armillaria</i> sp. en medio líquido.	29
12	Actividad de lacasas de <i>Armillaria</i> sp. en medio líquido extracto de malta con infusión de rosa.	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Pág.
1	Características de las lacasas de hongos.	7
2	Especies de <i>Armillaria</i> reportadas como comestibles en México.	14
3	Características morfológicas del micelio de <i>Armillaria</i> sp.	19
4	Características morfológicas del micelio de <i>Armillaria</i> sp. en sustratos al 100% y proporción 1:1.	23

RESUMEN

Los hongos poseen interesantes propiedades como alimento, medicina y han fascinado al hombre y despertado su curiosidad desde tiempos remotos. Dentro del área de la biotecnología se han utilizado los hongos para la producción de alimentos como setas (hongos comestibles), la producción de saborizantes y aromatizantes de los alimentos, obtención de enzimas y metabolitos secundarios con distintas propiedades medicinales y nutraceuticas. Uno de los hongos con gran potencial biotecnológico es *Armillaria* sp. este género es un tipo de hongo que crece en la madera caracterizándose por ser de pudrición blanca y produce enzimas extracelulares, una de ellas son las lacasas las cuales, son de mucho interés por sus uso biotecnológico, como el blanqueamiento de textiles, biorremediación y en la industria alimenticia mejora la apariencia del color a bebidas, además es comestible, crece en bosques caducifolios, coníferos y mixtos, de climas templados. El objetivo del este trabajo de investigación fue determinar las características morfológicas del micelio, velocidad de crecimiento (VC), biomasa micelial y actividad enzimática lacasas crecido en sustratos biodegradables y cultivo líquido. La cepa de *Armillaria* sp. se creció en seis medios con PDA y sustratos al (1%): *Pronus persica* (durazno), *Rosa* sp. (rosa), *Juniperus virginiana* (pino), *Quercus* (encino), *Cedrus deodara* (cedro) y *Sorghum* (sorgo). El micelio de *Armillaria* con durazno presentó color crema con densidad alta y en cedro fue blanco con densidad media. La mayor producción de biomasa fue en medio PDA/R y PDA/C fue de 0.237 g/caja Petri y 0.211 g/caja Petri y la mayor VC fue 0.021 mm/h (PDA/R) y 0.017 mm/h (PDA/D). En los sustratos al 100% presentó micelio blanco, aéreo y algodonoso en sorgo, pero con densidad baja, en cedro la densidad fue media, en *Rosa* sp. y durazno presentaron micelio crema con densidad alta. En combinación con paja de sorgo al 50%, las mejores características fueron con rosa, seguido de durazno presentando micelio crema, aéreo, algodonoso con densidad alta. La VC sobre los seis sustratos al 100%, en durazno que fue el sustrato mayor (0.02 mm/h), seguido de rosa (0.017 mm/h), y en los sustratos en combinación los mejores fueron rosa/sorgo (0.021 mm/h), seguido de durazno/s (0.019 mm/h). En la actividad de lacasas extracelular de *Armillaria* sp. crecida sobre diferentes sustratos al 100% hubo mayor actividad sobre sorgo y rosa, de sorgo fue a pH de 3.5 y 4.5 a los 30 días con 9.33 U/g X y 5.74 U/g X, respectivamente y la actividad en rosa fue mayor a pH 4.5 (7.13 U/g X), en cuanto a combinación de los sustratos, la mayor actividad de lacasas fue en rosa/sorgo a pH de 4.5 y 5.5 (8.59 U/g X y 10.18 U/g X, respectivamente). En cultivo líquido. Se creció en dos medios, uno fue únicamente caldo extracto de malta (CEM) y el otro fue CEM con infusión de rosa (10 g/L). La producción de biomasa micelial en medio líquido extracto de malta, se obtuvo una biomasa máxima (X_{max}) de 4.92 g, y en extracto de malta con infusión de rosa, la X_{max}

fue de 5.88 g, no fue posible determinar la fase estacionaria, ya que es un organismo de lento crecimiento. La cuantificación de la actividad de lacasas a diferentes pH, presentó mayor actividad a pH de 3.5 y 4.5 (92.29 U/L y 109.77 U/L respectivamente), en presencia de infusión de rosa, se observa que no incrementó la actividad comparada con la que no tenía infusión, donde hubo mayor actividad a pH de 3.5 y 4.5 (99.70 U/g X y 92.59 U/g X). Las especies del género *Armillaria* presentan baja actividad de lacasas comparada con otros hongos degradadores de madera, sin embargo, son especies interesantes debido a la presencia de los rizomorfos, que se ha reportado que la presencia de dichas estructuras está relacionada con la actividad de lacasas, dicho efecto se encontró en el trabajo, ya que el durazno y rosa fue donde más se observaron los rizomorfos y también hubo mayor actividad de lacasa. Por lo que es importante seguir estudiando esta especie de hongo.

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas tienen una enorme variedad de funciones dentro de la célula: degradan azúcares, sintetizan grasas y aminoácidos, copian fielmente la información genética, participan en el reconocimiento y transmisión de señales del exterior y se encargan de degradar subproductos tóxicos para la célula, entre muchas otras funciones vitales (Ramírez y Ayala 2014). Los hongos emplean gran conjunto de enzimas, que son liberadas al medio ambiente durante su crecimiento, tienen dos tipos de sistemas enzimáticos de degradación: intracelular, junto con la capa exterior de la envoltura celular, y extracelular, importante para la degradación de polisacáridos. Además, el sistema enzimático extracelular incluye dos tipos de enzimas: hidrolíticas, responsables de la degradación de los polisacáridos; y oxidantes, que degradan la lignina y los anillos de fenilo abiertos (Andlar *et al.*, 2018). Entre las que se encuentran las enzimas lacasas, que se ha empleado para la remoción de compuestos fenólicos en varios campos de la biotecnología: en la industria del papel, de textiles, tintes y de alimentos, existe una gran cantidad de organismos (bacterias y hongos) con las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar la celulosa y hemicelulosa, pero en la degradación y mineralización de la lignina el número de organismos se limita únicamente a los hongos de la pudrición blanca (Saparrat *et al.*, 2002).

Los hongos del género *Armillaria* pertenecen al grupo de basidiomicetes e incluyen más de 40 especies, se encuentran en bosques caducifolios, coníferos y mixtos de climas templados, se pueden presentar como saprófitos en tocones, patógeno infectando raíces de árboles o viviendo simbióticamente en asociación micorrizica (Ross-Davis *et al.*, 2012). Los cuerpos fructíferos se desarrollan con mayor frecuencia en los meses de julio a noviembre y su distribución en México es en los estados de Baja California, Chiapas, Chihuahua, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Morelos, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y en las áreas forestales de la Ciudad de México (Valdés *et al.*, 2004). Los hongos son un componente de gran importancia en la biodiversidad, son esenciales para la sobrevivencia de otros organismos, cruciales en los procesos ecológicos, dentro del desarrollo sustentable, además, que muchas especies tienen gran importancia desde el punto de vista biotecnológico. Dentro de estas especies se encuentran algunas del género *Armillaria*, algunas especies crecen y se consumen de manera tradicional en ciertas zonas de México (Jiménez-González *et al.*, 2013). El estudio de *Armillaria* sp. es de gran importancia, no solo para contribuir al incremento del conocimiento general sobre la biología, si no, para determinar la capacidad terapéutica, culinaria y enzimática de dicho hongo, además *Armillaria* ha sido descrita como una fuente importante de antioxidantes naturales, esto lo convierte en un buen candidato para la industria alimentaria, además, se ha reportado que presenta actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Mycobacterium*) y bacterias gram-negativas

(*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), actividad antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Trichoderma viride* y *Candida albicans*, esta última levadura es de gran importancia farmacéutica (Kostić *et al.*, 2017). Hay reportes que indican que *Armillaria* sp. es un organismo modelo por su habilidad de degradar colorantes sintéticos, debido al sistema ligninolítico, ya que produce enzimas extracelulares tales como manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y lacasas que son capaces de degradar diferentes compuestos, por lo que es importante conocer la capacidad de producción de enzimas lacasas en condiciones de crecimiento, en este trabajo se caracterizó la fase micelial de *Armillaria* sp. en agar dextrosa papa suplementado con residuos de plantas deshidratadas, considerados como desechos de jardinería y forestales como: *Pronus persica* (durazno), *Rosa* sp. (rosa), *Junisperus virginiana* (pino), *Quercus* (encino), *Cedrus deodara* (cedro) y *Sorghum* (sorgo), de estos mismos residuos se creció al 100% y combinación con (sorgo) para obtener características y actividad enzimática, además se realizó crecimiento en medio líquido, caldo extracto de malta (CEM) y el otro fue CEM con infusión de rosa para determinar la actividad enzimática lacasas de *Armillaria* sp.

2. ANTECEDENTES

2.1 LACASAS

Las enzimas benzenodiol: dioxígeno oxidoreductasa (EC 1.10.3.2) contienen átomos de cobre en su centro activo y catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos aromáticos en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua (Solomon *et al.*, 2008) y pertenecen al grupo de las oxidasas multicobre, donde también se engloban ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina.

2.2 MECANISMO DE LACASAS

Estas enzimas, como ya se ha mencionado, catalizan la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua, a través de un mecanismo de transferencia de cuatro electrones acoplado a la oxidación de un sustrato, y sin la formación de intermediarios tóxicos. El mecanismo se inicia con el paso de la enzima a un estado completamente reducido cuando recibe cuatro electrones del sustrato, reacciona con el oxígeno suministrándole dos electrones y dando lugar al intermediario peróxido, en el que los dos átomos de cobre T3 y el cobre T2, están unidos a través de un grupo peróxido. En una segunda transferencia de dos electrones el intermediario peróxido es reducido, dando lugar al intermediario nativo. El intermediario nativo, que puede estar en forma oxo o hidroxilo, se reduce rápidamente en presencia del sustrato en la reacción de catálisis. Por el contrario, en ausencia del sustrato pasa lentamente al estado de reposo oxidado, en el que uno de los átomos de oxígeno está unido como grupo hidroxilo al cobre T2. Finalmente, el estado de reposo puede ser también reducido por el sustrato para dejar a la enzima completamente reducida (Solomon *et al.*, 2001) (Figura 1). Las lacasas se diferencian de otras polifenoloxidasas como las tirosinasas (EC 1.14.18.1) y el catecol oxidasas (EC 1.10.3.1) en que no pueden oxidar tirosina y no son inhibidas por monóxido de carbono.

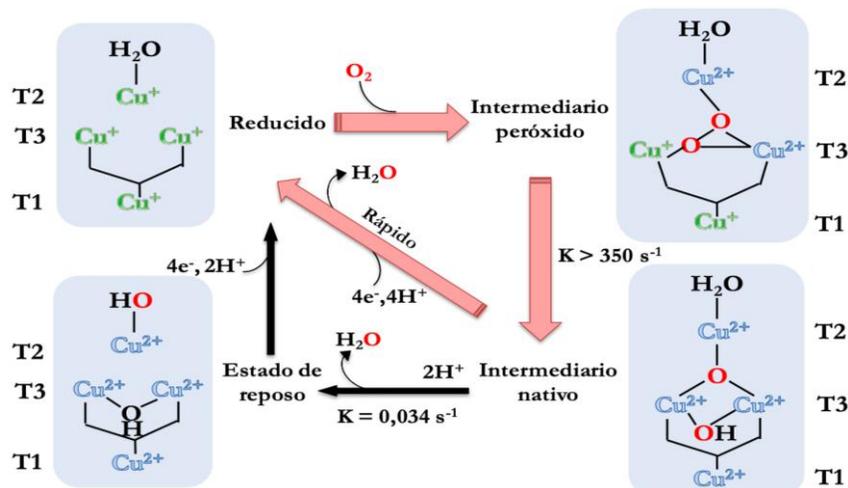


Figura 1. Mecanismo molecular de reducción del oxígeno a agua catalizado por lacasas. (Giardina *et al.*, 2010).

Las lacasas están ampliamente distribuidas entre los organismos eucariotas y procariotas, y se ha descrito su implicación en numerosos procesos biológicos, aunque en muchos casos, sea difícil elucidar con exactitud la función que realizan. Aparte de haberse detectado su existencia en plantas, insectos, hongos, bacterias y arqueas, cada vez son más los estudios que revelan la presencia de proteínas con actividad lacasa en los metagenomas de diversos medios como son, la microbiota de rumen bovino (Beloqui *et al.*, 2006) o muestras de suelos de diversa procedencia (Kellner *et al.*, 2008).

2.3 LACASAS FÚNGICAS

La mayor parte de la información sobre las lacasas fúngicas proviene de especies que pertenecen principalmente a Basidiomycota y Ascomycota. Las lacasas fúngicas están involucradas en la descomposición de polímeros de lignocelulosa, defensa / protección, virulencia, patogénesis, pigmentación y procesos de esporulación. La función principal de la lacasa fúngica es la biodegradación de la lignocelulosa y, por lo tanto, la contribución al ciclo del carbono en la biosfera, (Thurston, 1994; Martínez *et al.*, 2005; Ruiz-Duenas y Martínez, 2009). El polímero de lignina es altamente resistente a la degradación química y biológica, haciendo que la descomposición de la madera sea un proceso lento y biológicamente difícil. Se ha informado que las lacasas fúngicas, especialmente las de especies de podredumbre blanca, exhiben un alto potencial redox, lo que facilita la abstracción de electrones de sustratos, que también pueden actuar como mediadores redox durante el ataque de lacasa sobre la lignina. Según lo informado por (Munk *et al.*, 2015), la lacasa de hongos puede romper enlaces sin el uso de mediadores en compuestos modelo de lignina fenólica. En el caso de las subunidades no fenólicas de lignina, la división de enlaces covalentes por lacasa solo es posible mediante el uso de mediadores (Munk *et al.*, 2015) Además, la expresión del gen de lacasa puede ser inducida por derivados de plantas naturales ejemplo: Ácidos gálicos o ferúlicos (Gianfreda y Bollag, 1999).

La descomposición de materia orgánica es el paso clave en el reciclaje de nutrientes (es decir, un proceso altamente complejo mediado por varios taxones fúngicos con una rápida sucesión de especies saprotróficas) (Voriskova y Baldria, 2013). Entre los diferentes organismos equipados con enzimas extracelulares involucradas en este proceso, Ascomycota y Basidiomycota son dominantes, pero también se observan otros hongos, especialmente Zygomycota y Glomeromycota (Blackwood *et al.*, 2007; Das, 2007; Barlocher y Boddy, 2016). Se detectaron genes de lacasa en hongos que degradan materia orgánica y el número de genes de lacasa de basidiomiceto fue de 5 a 10 veces mayor en los organismos que se encuentran en el suelo del bosque con alto contenido de lignina que en un ambiente con bajo contenido de lignina (Mayer, 2006; Blackwood *et al.*, 2007). Curiosamente, a las especies de hongos acuáticos se reportaba que no presentaban la capacidad de descomponer la lignina durante muchos años. Sin embargo,

los taxones que pertenecen principalmente a Ascomycota, Chytridiomycota y Oomycota son los principales descomponedores de materia orgánica y también pueden producir lacasa (Sole *et al.*, 2008; Barlocher y Boddy, 2016). E encontraron dos fragmentos de genes que codifican lacasa, en cultivos puros de *Clavariopsis aquatica* y se sugirió que la lacasa es una enzima asociada a este tipo de células. Otros hongos pertenecientes a los hifomicetos acuáticos (Abdel-Raheem, 1997) y Ascomycota acuáticos, como *Phoma* sp. y *Coniothyrium*, también poseen actividad lacasa (Junghanns *et al.*, 2008).

En la naturaleza, el otro depósito importante de carbono son las sustancias húmicas (HS), que son materiales orgánicos de color oscuro formados durante la transformación química y biológica de principalmente residuos vegetales, pero también desechos animales y humanos (Shevchenko y Bailey, 1996; Hofrichter y Fritsche, 1996). Los principales componentes básicos del HS son los fenoles, las quinonas, los carbohidratos, así como los compuestos de mayor masa molecular, como las ligninas, los polisacáridos, las melaninas y las cutinas. Los microorganismos, especialmente los hongos que producen enzimas oxidantes juegan un papel clave en la formación, degradación, transformación y finalmente mineralización del HS (Grinhut y Hadar, 2007). Chefetz y Hadar (1998) confirmaron que la lacasa de *Chaetomium thermophilum* desempeña un papel importante en el proceso de humificación al formar polímeros solubles en agua que contienen ácidos hidrófobos. Por el contrario, la degradación y la transformación de HS son catalizadas principalmente por las enzimas de Basidiomycota. La vía de transformación (humificación frente a degradación de HS) depende de la disponibilidad del sustrato y de las condiciones de reacción como el valor del pH, la humedad y la presencia de co-sustratos (Grinhut *et al.*, 2007). Dado que el pH juega un papel crítico, el compromiso de diferentes isoenzimas de lacasa puede ser importante para mejorar la eficiencia de la degradación/transformación de HS (Feng *et al.*, 2015), sugirió una correlación entre la abundancia y diversidad de la actividad lacasa de hongos y bacterias en el suelo subtropical cultivable, y la actividad lacasa fue principalmente de origen bacteriano.

La secreción de lacasa se considera una de las respuestas fúngicas básicas a la presencia de condiciones antagónicas: otros microorganismos, xenobióticos, metales, toxinas y compuestos biológicamente activos. Las lacasas fúngicas oxidan no solo compuestos fenólicos sino también sustratos no fenólicos, como aminas aromáticas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, colorantes sintéticos, antibióticos y otros sustratos de lacasa no evidentes (Polak, 2012). De esta manera, la lacasa es una "herramienta" enzimática muy útil para la eliminación de toxinas naturales o sintéticas que se producen en el medio ambiente y, por lo tanto, participa en la defensa activa fúngica. La inducción de la secreción de lacasa por cultivos de *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* como respuesta a la presencia de *Trichoderma* sp. fue demostrado

(Saboya y Mata, 1999; Velázquez-Cedeño *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2009). Según lo descrito por (Sjaarda *et al.*, 2015) la expresión de los genes de la lacasa de *Agaricus bisporus* también es inducida por la presencia de un extracto tóxico de *Trichoderma aggressivum* en el medio, y la resistencia se correlaciona con la actividad de la lacasa. Curiosamente, la secreción de lacasa de *Trichoderma viride* aumenta en presencia de células de *Bacillus* sp. y *Aspergillus ochraceus*. Lakshmanan y Sadasivan (2016) informaron recientemente que la inhibición de la lacasa de *T. viride* provoca la incapacidad de este hongo para competir con microorganismos antagonistas.

Se ha reportado que en *Daldinia concentrica* y *Lentinus edodes*, la actividad de lacasa está asociada con la formación de pigmento en estructuras que son más rígidas que un simple agregado micelial. En *Armillaria mellea* la función biológica es en la formación de rizomorfos (formaciones de micelios en un gran número de hifas fuertemente comprimidas) es un cambio de desarrollo diferente que está asociado con síntesis de lacasa (Worrall *et al.*, 1986). Es posible que también, lacasa sea responsable de hacer un pegamento polifenólico que pega las hifas para que se mantengan juntas. Esta idea debe ser tratada con cierta cautela, sin embargo, en cultivos líquidos de laboratorio de *Armillaria mellea*, la actividad de lacasa se acumula en el medio en forma coordinada con la aparición de la formación rizomorfa, la manipulación del pH en medio puede alterar sustancialmente la cantidad de actividad de lacasa que se acumula, sin que se tenga algún efecto significativo sobre la masa de rizomorfo formado (Rehman y Thurston, 1992).

2.3.1 PRODUCCIÓN DE LACASAS

Las enzimas se pueden producir en cultivo sólido y en sumergidos, se pueden inducir mediante la adición de compuestos aromáticos como la xilidina y el ácido ferúlico (Bourbonnais y Paice, 1992). Las lacasas tienen la capacidad de reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de agua simultáneamente, trabajan en la oxidación de un electrón de muchos sustratos aromáticos (Thurston, 1994). El rango de sustratos oxidables es amplio, e incluye polifenoles, monofenoles metoxi sustituidos, aminas y otros compuestos aromáticos fácilmente oxidables. Generalmente las lacasas son más estables en pH alcalinos que en pH ácidos, lo cual se debe probablemente a la inhibición del grupo hidróxido sobre el proceso de auto-oxidación (Gianfreda *et al.*, 1999). Las lacasas conservan su actividad en un rango de pH de 3 a 10 y en un rango de temperatura de 5 a 55 °C. Estas enzimas las encontraron en hongos en el año 1896, a partir de entonces se ha incrementado el interés y el conocimiento de estas enzimas, descubriendo más aplicaciones y usos (Desai y Nityanand, 2011). Las enzimas lacasas se ha reportado en Ascomycetos y Basidiomicetos (Tabla 1) y que son las encargadas de la degradación de la lignina y, por lo que, son abundantes en hongos de pudrición blanca (descomponen la madera) y son secretadas en múltiples isoformas dependiendo de la especie del hongo y las condiciones de desarrollo (Giardina *et al.*, 1999). Las lacasas fúngicas no tienen un sustrato específico, por lo que pueden transformar y algunas veces

mineralizar por completo gran variedad de contaminantes ambientales (Wikolazka *et al.*, 2002).

Tabla 1. Características de las lacasas de hongos

Espece	Peso molecular (kDa)	Punto isoelectrico	pH DMP	Temperatura optima °C	Referencia
<i>Agaricus blazei</i>	66	4.0	5.5		Ullrich <i>et al.</i> (2005)
<i>Armillaria mellea</i>	59	4.1	3.5		Rehman y Thurston (1992)
<i>Botrytis cinerea</i>	74	4.0	3.5	57	Slomczynski <i>et al.</i> (1995)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	71	3.4	3.0		Fukushima y Kirk (1995)
<i>Coniothyrium minitans</i>	74	4.0	3.5	60	Dahiya <i>et al.</i> (1998)
<i>Coprinus friesii</i>	60	3.5	8.0	41	Heinzkill <i>et al.</i> (1998)
<i>Coriolopsis rigida</i>	66	3.9	3.0		Saparrat <i>et al.</i> (2002)
<i>Daedalea quercina</i>	69	3.0	4.0	55	Baldrian (2004)
<i>Dichomitus squalens c1</i>	66	3.5	3.0		Perie <i>et al.</i> (1998)
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	190	5.6	4.5		Edens <i>et al.</i> (1999)
<i>Lentinula edodes Lcc1</i>	72	3.0	4.0	40	Nagai <i>et al.</i> (2002)
<i>Mauginiella sp.</i>	63	4.8–6.4	3.5		Palonen <i>et al.</i> (2003)
<i>Physisporinus rivulosus Lacc 1</i>	66	3.3	3.0		Hakala <i>et al.</i> (2005)
<i>Physisporinus rivulosus Lacc 2</i>	67	3.3	3.0		Hakala <i>et al.</i> (2005)
<i>Pleurotus ostreatus POXA1w</i>	61	6.7	3.0-5.0	45–65	Palmieri <i>et al.</i> , (1997)
<i>Pleurotus ostreatus POXA2</i>	67	4.0	6.5	25–35	Palmieri <i>et al.</i> (1997)
<i>Pleurotus ostreatus POXA3a</i>	83–85	4.1	5.5	35	Palmieri <i>et al.</i> (2003)
<i>Pleurotus ostreatus POXA3b</i>	83–85	4.3	5.5	35	Palmieri <i>et al.</i> (2003)
<i>Pleurotus ostreatus POXC</i>	59	2.9	3.0–5.0	50–60	Palmieri <i>et al.</i> (2003)
<i>Rigidoporus lignosus B</i>	55	3.7	6.2		Bonomo <i>et al.</i> (1998)

<i>Rigidoporus lignosus S</i>	60	3.1	6.2		Bonomo <i>et al.</i> (1998)
<i>Trametes gallica Lac I</i>	60	3.1	3.0	70	Dong y Zhang (2004)
<i>Trametes gallica Lac II</i>	60	3.0	3.0	70	Dong y Zhang (2004)
<i>Trametes versicolor</i>	68	3.5	55		Rogalski <i>et al.</i> (1990); Hofer y Schlosser (1999)
<i>Volvariella volvacea</i>	58	3.7	4.6	45	Chen <i>et al.</i> (2004)

En los basidiomicetos, las lacasas extracelulares son producidas de forma constitutiva en pequeñas cantidades. Sin embargo, su producción puede ser estimulada mediante la adición de una serie de compuestos, todos ellos denominados inductores, principalmente compuestos aromáticos o fenólicos, relacionados a la lignina o sus derivados; esto da como resultado la biosíntesis de nuevas formas extracelulares. Así mismo, la concentración de tales compuestos en el medio de cultivo influye en la producción de lacasa. Sin embargo, el efecto de estos inductores depende de la especie de hongo a estudiar. Cada hongo presenta una respuesta diferente para el mismo compuesto y misma concentración. Las lacasas de origen fúngico han sido ampliamente estudiadas y en la actualidad tienen usos biotecnológicos (Kiiskinen *et al.*, 2004). Entre las aplicaciones potenciales de las lacasas se encuentran: deslignificación de biomasa lignocelulósica (Rodríguez *et al.*, 2003); bioblanqueamiento de pulpa de papel (Ibarra *et al.*, 2006); tratamiento de aguas residuales industriales (Berrio *et al.*, 2007); modificación enzimática de fibras y blanqueamiento de textiles (Kunamneni *et al.*, 2008); destoxificación de contaminantes y biorremediación (Alcalde *et al.*, 2002). En la industria alimenticia, la lacasa se puede aplicar a ciertos procesos en los cuales, se mejora o modifica la apariencia del color de los alimentos o bebidas eliminando los fenoles indeseables, responsables del oscurecimiento y formación de turbidez en zumos de frutas claros, cervezas y vinos (López, 2005). Muy recientemente las lacasas se están utilizando en área de la salud, contra el cáncer, específicamente en contra de la línea celular MCF-7 (cáncer de mama), la hep-G2 (carcinoma hepatocelular), pero se ha probado en otras líneas de cáncer, reportan que la lacasa actúa sobre tumores dependientes de hormonas y no presenta efecto sobre la viabilidad de las células no cancerosas (fibroblastos) (Guest y Rashid, 2016). Por lo que es de gran importancia seguir en búsqueda de organismo productores de dichas enzimas debido a su amplia gama de usos en la biotecnología.

Dentro de las funciones biológicas de las lacasas en los organismos que se presentan, es en la defensa contra el estrés por medio de la formación de polímeros pigmentados (derivados de melanina) (Henson *et al.*, 1999), en la interacción entre el patógeno y el

huésped, el proceso de la morfogénesis y en el proceso de pigmentación de esporas de hongos (Camarão, 2010).

Los hongos presentan la capacidad de sintetizar isoformas (isoenzimas) de la lacasa. El número de isoformas varía entre las especies y aun dentro de la misma especie, dependiendo de las condiciones de cultivo empleadas. Las isoformas pueden variar significativamente en sus propiedades, punto isoeléctrico, pH, especificidad de sustrato, estabilidad, etc. (Manssur *et al.*, 2003). Así mismo, se ha visto que estas isoenzimas pueden tener diversos papeles en la fisiología del microorganismo, sometidos a diferentes condiciones de cultivo y la producción de isoenzimas. Los análisis filogenéticos y genéticos han demostrado que las isoenzimas pueden ser expresadas por el mismo gen o en diferentes genes dentro del genoma (Bertrand *et al.*, 2013). Hay numerosos estudios sobre la regulación de la expresión de los genes de las lacasas con objeto de incrementar la productividad de las lacasas nativas y también para descubrir el papel fisiológico de las diferentes isoformas producidas por el mismo organismo. La síntesis y secreción de lacasas están muy influenciadas por los niveles de nutrientes, etapa del desarrollo así como por la adición de una amplia variedad de inductores al medio de cultivo que varían entre las diferentes especies de hongos y las diferentes isoformas de una misma cepa. La transcripción de genes de lacasas está con frecuencia regulada por iones metales (Collins y Dobson, 1997), compuestos aromáticos relacionados con la lignina o con derivados de la lignina (Terrón *et al.*, 2004) y con los niveles de nutrientes (Soden y Dobson, 2001).

2.4 HONGOS COMESTIBLES

Los hongos son organismos eucariontes, carecen de clorofila y son portadores de esporas, por lo que son heterótrofos debido a que no son capaces de sintetizar sus propios alimentos, los obtienen infectando las células vivas de las plantas y animales (parásitos) o por degradación de materia orgánica en descomposición (saprófitos); sus células se organizan formando numerosos filamentos, denominados hifas, cuyo conjunto forma el micelio (Cervantes y Hernández, 2006), estos filamentos comienzan a crecer y a extender por el sitio periférico del hongo, por ejemplo unas veces bajo la superficie del suelo y otras bajo la corteza de los árboles débiles.

Los hongos comestibles silvestres son considerados un recurso forestal no maderable ya que contribuyen a la conservación de bosques, y forman parte de la estructura y funcionamiento de estos, estando entonces vinculados a la prestación de servicios forestales, tales como: recreación, captura de agua y carbono, conservación de la biodiversidad y ecoturismo (Pilz y Molina, 2002). Se ha estimado a nivel mundial 1,5 millones de especies de hongos (Chang y Miles, 2004), son aproximadamente 10,000 especies que forman cuerpo fructífero y sólo 2,000 son consideradas comestibles

(pertenecientes a 31 géneros), de los cuales, aproximadamente 100 especies se cultivan experimentalmente, 50 poseen valor económico y 30 son comercialmente cultivadas (Kües y Liu, 2000; Chang y Miles, 2004), Chang y Miles (2004) indican que seis especies se cultivan a nivel industrial y Martínez-Carrera *et al.* (2006) reportan que 10 especies a nivel nacional.

En México existe una alta diversidad de especies fúngicas debido a que el país se ubica entre dos importantes regiones biogeográficas: el Neotrópico y Neártico. En el territorio mexicano existen bosques templados de gimnospermas y angiospermas, los cuales favorecen el desarrollo de alrededor de 200,000 especies de hongos (Guzmán, 2008a). Se ha estimado que en México existen más de 300 especies de hongos silvestres comestibles (Boa, 2004). Los hongos han sido utilizados como alimento y medicina tradicional desde épocas prehispánicas e incorporadas en la dieta de diversos grupos étnicos (Guzmán, 2008b). Los hongos comestibles poseen alto contenido de proteínas, carbohidratos, vitaminas y son bajos en grasas (Colak *et al.*, 2009). El interés en los hongos comestibles ha crecido significadamente debido a que han demostrado propiedades nutrimentales y medicinales que han sido utilizadas en tratamientos terapéuticos. En México se conocen alrededor de 70 especies de hongos que han sido utilizadas en prácticas de medicina tradicional en el tratamiento de aproximadamente 40 tipos de problemas de salud humana (Guzmán, 2008a).

Algunas especies son susceptibles a cultivo, en diferentes sistemas (sólido y líquido), por lo que es importante investigar el potencial de cultivo de los hongos silvestres, que, además, en algunos casos, está limitado por el escaso conocimiento de su ciclo de vida e interrelaciones ecológicas (Savoie y Largeteau, 2011). Son de gran importancia los estudios ecológicos y biotecnológicos de este importante recurso, a pesar de su gran relevancia, aún se encuentran en etapas muy tempranas y la información se encuentra dispersa. El proceso de estandarización el proceso de cultivo y producción de moléculas de importancia biotecnológica contribuiría a valorar la diversidad de este recurso, dar impulso a un modelo productivo que favorezca el equilibrio entre conservación y desarrollo, así como la creación de nuevas alternativas productivas que sean competitivas y sostenibles en un esquema de mercado global.

2.5 CARACTERÍSTICAS DE *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.)

La presencia de *Armillaria mellea* en viñedos se conoce desde hace tiempo, en Europa, la primera referencia se atribuye a Millardet quien, ya en 1880, localiza el hongo en diversos países entre los que incluye a España (Raabe, 1962). Sin embargo, hasta hace poco tiempo no existían datos sobre su incidencia e importancia en ese país. Fue significativo el aumento de diagnóstico sobre *Armillaria*, en el aumento que se observó en el periodo de 1987 a 1991. Año en que un 20% de las muestras de viñedos analizadas

presentaron a este hongo. Aguína *et al.* (2015) identificaron especies del género *Armillaria* a partir de raíces en viñedos al noroeste de España, tres especies: *A. mellea*, *Armillaria gallica* y *Armillaria cepistipes* fueron identificadas mediante análisis molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN) aislado de los basidiocarpos, el micelio presentó un tono rojizo intenso y rizomorfos poco abundantes, cilíndricos, que se corresponden con características de *A. gallica*, las demás colonias presentaron características típicas de *A. mellea*: algodonosas, rizomorfos abundantes, planos, de color blanco, que presentaban ramificación dicotómica. Mostrando que *A. mellea* se detectó en casi el 50% de los suelos de viñedo. El nombre significa en latín: *Armillaria*: con brazaletes; alude a la forma del anillo rodeando el pie, *mellea*: color de miel; por su color parecido al de la miel.

Características macroscópicas:

Píleo de 29-87 mm de diámetro, de hemisférico a convexo, finalmente deprimido o umbonado, margen algo estriado por transparencia. Cutícula marrón amarillenta, color de miel, cubierta de pequeñas escamas marrones más oscuras, más concentradas en el centro, evanescentes. Láminas subdecurrentes, blanquecinas a ocráceas. Estípite de 76-127 x 14-22 mm, cilíndrico, sinuoso, de color blanquecino a marrón rojizo, con anillo membranoso, persistente (Vahl y Fuhr, 1871) Olor herbáceo (Figura 2).



Figura 2. Cuerpo fructífero de *Armillaria* sp. Foto: Ma. De Lourdes Acosta-Urdapilleta.

Características microscópicas:

Basidios cilíndricos a claviformes, tetraspóricos, sin fíbula basal, de (32,9-)36,2-45,8(-51,4) x (8,3-)8,5-10,1(-11,0) μm ; N = 22; Me = 41,3 x 9,3 μm . Basidiosporas polimorfos, de globosas a cilíndricas, predominando elipsoidales, lisas, hialinas, gutuladas, apiculadas, de (5,4-)7,2-10,5(-12,8) x (3, 8-)4,8-6,9(-7,9) μm ; Q = (1,0-)1,2-1,8(-2,1); N = 61; Me = 8,8 x 5,9 μm ; Qe = 1,5. Cistidios polimorfos, con ápices digitados o coraliformes, de (20,7-)23,5-48,4(-63,8) x (5,1-)6,0-10,6(-18,8) μm ; N = 29; Me = 34,4 x 8,3 μm .

Píleipellis en paralelo, con terminaciones hifales erectas, con incrustaciones, sin fíbulas (Vahl y Fuhr, 1871). Esporas anchamente elípticas, lisas de 7-9 x 5-6 micras, de pared gruesa, esporada blanca.

2.5.1 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Armillaria*

Reino.	Fungi
División	Basidiomycota
Subdivisión.	Basidiomycotina
Clase.	Homobasidiomycetes
Subclase.	Agaricomycetideae
Orden.	Agaricales
Familia	Tricholomataceae
Género	<i>Armillaria</i>

(Indexfungorum, 2020)

2.5.2 IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA DE *Armillaria mellea*

Los hongos poseen interesantes propiedades como alimento, medicina y han fascinado al hombre y despertado su curiosidad desde tiempos remotos. Las biotecnologías que emplean hongos incluyen la producción de alimentos como setas, hongos comestibles, la producción de saborizantes y aromatizantes de los alimentos y la obtención de productos bioquímicos con distintas propiedades medicinales y nutraceuticas.

Un hongo con gran potencial biotecnológica y que es posible cultivar en condiciones *in vitro*, es *A. mellea* conocido como hongo miel, se ha utilizado como alimento y medicina. Se han investigado las propiedades que tienen como son los antioxidantes que posee la capacidad de eliminación de radicales libres, además de que tiene potencial antihiperoglucémico, por lo tanto es un candidato para el desarrollo de suplementos dietéticos y productos farmacéuticos debido a la cantidad de metabolitos que produce (Zavaistin *et al.*, 2015), la composición química y los componentes químicos bioactivos, pueden ser diferentes debido a las condiciones de cultivo (composición, pH, temperatura, etc.) (Zhang *et al.*, 2015). El cuerpo fructífero de *A. mellea* posee proteínas-polisacárido (Kim *et al.*, 1983) que se ha reportado que se han utilizado para el dolor de cabeza, la neurastenia (trastorno neurótico caracterizado por un cansancio inexplicable que aparece después de realizar un esfuerzo mental o físico), en el insomnio, la acroestesia (sensibilidad y dolor de las extremidades), la hipertensión, la epilepsia y la nictalopía (dificultad visual en condiciones de poca luz). En China el hongo *A. mellea* tiene una fuerte relación simbiótica con *Gastrodia elata* (orquídea) y es utilizada como medicina tradicional, pero es de crecimiento lento y costoso, en estudios realizados muestran que

las actividades biológicas y las aplicaciones clínicas de los productos de cultivo sumergido de *A. mellea* son similares a las de *G. elata* (Beijing, 1995).

El hongo *A. mellea* presenta carbohidratos abundantes con 81.25%, cenizas (8.84 %), grasas (1.97 %) y proteínas (1.81 %). Con un valor energético de 374.52 kcal por 100 g de peso corporal, representa un muy buen alimento bajo en grasa que podría utilizarse de manera regular. El manitol fue el azúcar más abundante (5.92%) comparado con la trehalosa (1.72%). Con respecto a los ácidos orgánicos, contiene ácido málico (5.64%), cítrico, fumárico y oxálico tiene cantidades bajas (0.57%, 0.52% y 0.03%, respectivamente). Estos resultados son importantes ya que los ácidos orgánicos presentes en los hongos están involucrados en la reducción del estrés oxidativo. Contiene 25 ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, con la prevalencia de ácidos linoleico (63.80%), oleico (15.47%) y palmítico (12.63%). Se ha encontrado que los ácidos poliinsaturados, que se consideran beneficiosos para la salud humana, son predominantes en *A. mellea*, seguido de ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados. Informes anteriores sobre la composición de ácidos grasos de *A. mellea* revelaron la presencia de 17 de estos ácidos grasos (Kostić *et al.*, 2017).

Algunos de los hongos comestibles, son óptimos a establecer su cultivo sólido en sustratos biodegradables, debido a que son saprobios, lo que permite que se pueda utilizar residuos de diferente naturaleza (forestales, agroindustriales, jardinería, etc.) para su crecimiento, ya que, dichos organismos tienen la capacidad de producción enzimática que le permite realizar el rompimiento de moléculas complejas y que el hongo absorba los nutrientes requeridos para su crecimiento, fructificación y producción de metabolitos (Orenzas y Navarro, 1976). En China la utilización de cuerpos fructíferos está restringidas, porque la fuente de obtención es a partir de especímenes silvestres y aun que se está trabajando en establecer el proceso de cultivo. En los países asiáticos como China y Japón, las investigaciones relacionadas con *A. mellea* se centra en producción artificial de cuerpos fructíferos para utilizarlos como hongos medicinales (Li *et al.*, 1993). Kim *et al.* (1992) informaron que el cuerpo de fructífero se desarrolló sobre aserrín de *Quercus* spp., Shim *et al.* (2006) indujeron la formación de primordios de *A. mellea* (IUM 949) mediante una cámara de crecimiento bajo la iluminación (350 lux) por 12 h, humedad relativa de 85% y 25°C, utilizando aserrín como sustrato, los primordios se formaron 10 días después de completarse la colonización y los cuerpos fructíferos se produjeron 7 días después de que se formaron los primordios.

Por lo que, los hongos comestibles constituyen una importante fuente de alimento, y algunos países los consideran una alternativa novedosa para la obtención de alimentos de bajo costo. Garibay-Origel y Ruan-Soto (2014) reportan que desde 1980 a la fecha se ha reportado el consumo tradicional alimenticio de 371 taxa de hongos, siendo México el segundo país con mayor riqueza de hongos comestibles, ya que China ocupa el primer

lugar. Los hongos comestibles están incluidos en 99 géneros, dentro de estos está el género *Armillaria* (Tabla 2).

Tabla 2. Especies de *Armillaria* reportadas como comestibles en México

Nombre científico	Hábito	Referencias
<i>Armillaria gemina</i>	saprobio	Aguilar Cruz. Y. y Villegas M. 2010
<i>Armillaria mellea</i>	saprobio	Burrola-Aguilar <i>et al.</i> , 2012
<i>Armillaria obscura</i>	saprobio	Alavez-Vargas, 2006
<i>Armillaria tabescens</i>	saprobio	Alvarado-Rodríguez, 2010

Los hongos que se cultivan sobre desechos lignocelulósicos debido a que presentan un sistema enzimático que le permite degradar ese tipo de sustratos, consta de varias enzimas. Pero de las que han tenido mayor importancia son las lacasas. El proceso enzimático de las lacasas es posiblemente uno de los más estudiados. Las enzimas lacasas están dentro del grupo polifenol oxidasas (PPO), cataliza la oxidación de fenoles a quinonas usando oxígeno molecular como un receptor de electrones terminal (Sharma y Kuhad, 2009). Son oxidasas esenciales en los sistemas biológicos, donde están involucrados en mecanismos de defensa, procesos biosintéticos, polimerización y desintoxicación de compuestos fenólicos de plantas (Mayer, 2006). Se cree que el papel catabólico de las lacasas fúngicas consiste en la degradación de polímeros naturales como la lignina, muy probablemente en sinergia con otras enzimas lignolíticas (Lundell *et al.*, 2010), que se clasifican en dos grupos: hemo peroxidasas (POD) y enzimas auxiliares que degradan la lignina (LDA). Las hemo peroxidasas comprenden lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13), versátil peroxidasa (EC 1.11.1.16) y peroxidasa decolorante de colorantes (EC 1.11.1.19). A su vez, las enzimas accesorias implicadas en la degradación de la lignina incluyen aril-alcohol oxidasa (EC 1.1.3.7), glioxal oxidasa (EC 1.2.3.5), piranosa 2-oxidasa (EC 1.1.3.10), glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.10), celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18) y haloperoxidasas de hemo-tiolato (Janusz *et al.*, 2017). Todas estas oxidasas reducen el oxígeno a H₂O₂ requerida por las peroxidasas, acoplado eficazmente polisacárido y el anabolismo lignina. Las deshidrogenasas de celobiosa (EC 1.1.99.18) mejoran este vínculo mediante la reducción de radicales fenoxi, cationes de metales de transición (p. ej., FeIII, CuII y MnIII) o quinonas que utilizan electrones de la oxidación de celobiosa a celobionolactona, un proceso que también contribuye a la disponibilidad de mediadores redox para lacasas (Sinsabaugh, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas de los hongos degradadores de madera tiene gran importancia biotecnológica debido a que se pueden aplicar en diferentes áreas de salud, alimentos, biorremediación, etc. por lo que se sigue en la búsqueda de fuente de obtención de enzimas lacasas. Los hongos son una fuente importante de obtención de enzimas y metabolitos secundarios, muchas especies de hongos de importancia biotecnológica son susceptibles a cultivo, por lo que se podría estandarizar el proceso de producción y obtención de enzimas y metabolitos secundarios utilizando desechos forestales y de jardinería. Por lo que, en este trabajo se caracterizó el crecimiento *in vitro* de *Armillaria* sp. sobre diferentes sustratos, para determinar sobre que sustratos presenta mejores características miceliales y actividad de enzimas lacasas.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será la producción de enzimas lacasas de *Armillaria* sp. crecido en diferentes sustratos lignocelulósicos?

5. OBJETIVOS

General:

Evaluar el crecimiento y la producción de enzimas lacasas de *Armillaria* sp.

Particulares:

- Caracterizar la fase micelial de *Armillaria* sp. crecido en agar dextrosa papa en caja de Petri.
- Caracterizar la fase micelial de *Armillaria* sp. crecido sobre sustratos lignocelulósicos en caja Petri.
- Evaluar la actividad de lacasas de *Armillaria* sp. crecido en cultivo sólido y líquido.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 3 se muestra el diagrama de la estrategia experimental de este trabajo de investigación.

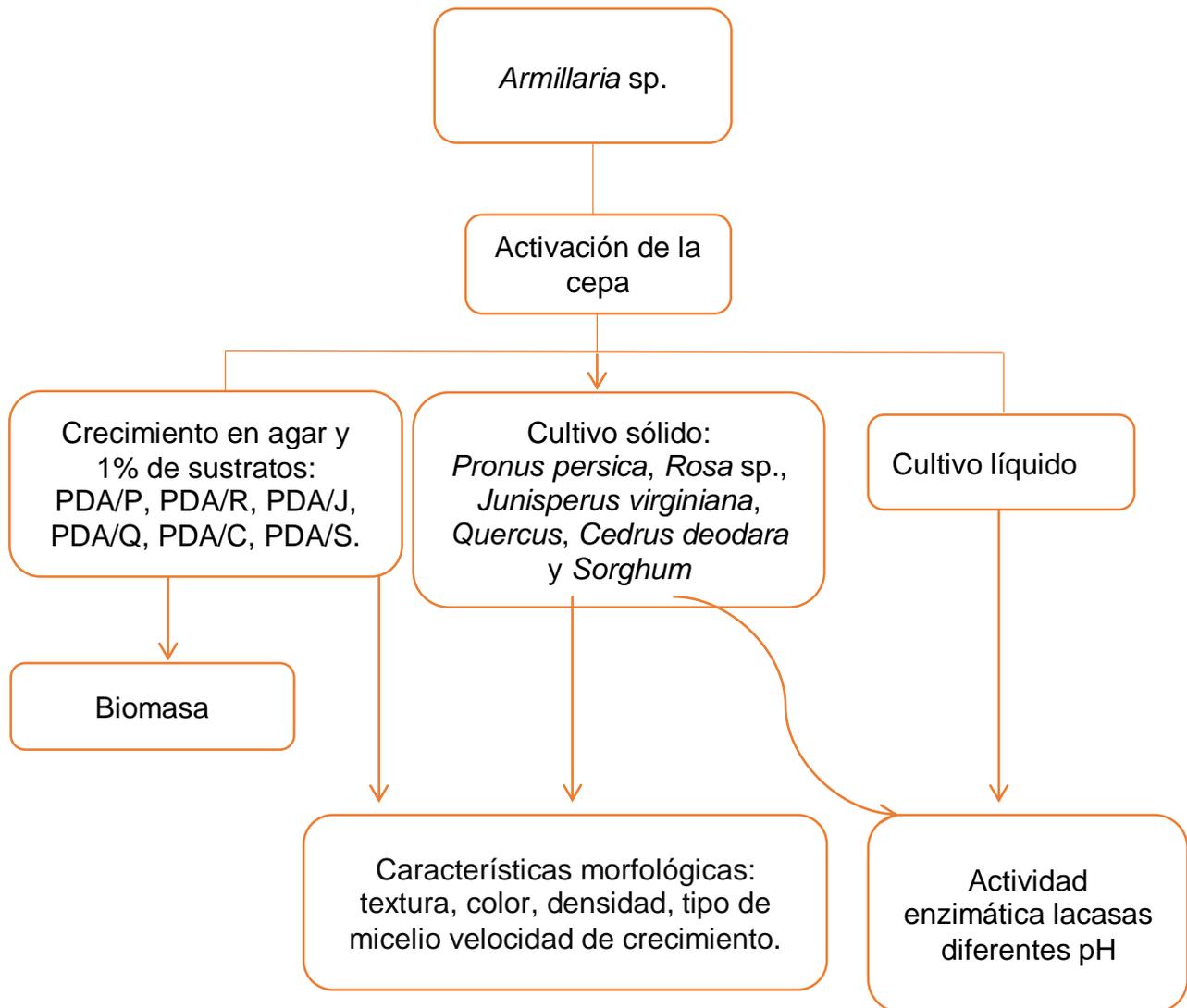


Figura 3. Diagrama general del proyecto.

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó una cepa de *Armillaria* sp. que pertenece al cepario del Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del estado de Morelos. *Armillaria* se recolectó en San Miguel Guerrero (junio 2017), ubicado en el municipio de Taxco de Alarcón, altitud 2358 msnm.

6.2 MEDIOS DE CULTIVO E INOCULACIÓN EN CAJA PETRI

La cepa se mantuvo en medio Agar dextrosa papa (PDA) y se resembró cada mes. Se preparó PDA adicionando residuos de plantas deshidratadas al 1%: *Pronus persica* (durazno; PDA/P), *Rosa* sp. (rosa; PDA/R), *Junisperus virginiana* (pino; PDA/J), *Quercus* (encino; PDA/Q), *Cedrus deodara* (cedro; PDA/C) y *Sorghum* (sorgo; PDA/S). Se esterilizaron (120°C/15 min). Se inoculó con un fragmento de micelio de 4 mm de diámetro de la cepa de *Armillaria* sp.

6.2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL MICELIO

La caracterización morfológica de la cepa se realizó a los 30 días considerando la textura, color, densidad, tipo de micelio durante su desarrollo micelial en seis sustratos: *Pronus persica*, *Rosa* sp., *Junisperus virginiana*, *Quercus*, *Cedrus deodara* y *Sorghum* (Stamets, 1993).

6.2.2 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

El crecimiento micelial de cada caja fue observado y monitoreado cada 48 h. Para determinar la velocidad de crecimiento (mm/h) en los seis medios de cultivo, se hicieron cinco réplicas en cajas Petri y se mantuvieron en la oscuridad a 25°C. La velocidad de crecimiento micelial se determinó midiendo los milímetros avanzados cada 48 h a partir del inóculo de 4 mm de diámetro colocado en la parte central de la caja Petri (Sánchez, 2001).

6.2.3 BIOMASA MICELIAL

Para estimar la producción de biomasa micelial de *Armillaria* sp. se hizo en g/caja Petri y se determinó por peso seco; el agar con micelio se calentó en horno de microondas, entre 1 y 1.5 minutos, la biomasa se separó del medio fundido, por filtración y se secó hasta peso constante a 50 °C (Sánchez y Viniegra-González, 1996).

6.3 CRECIMIENTO EN CULTIVO SÓLIDO

6.3.1 PREPARACIÓN DE SUSTRATOS

Cada sustrato se deshidrató y fragmentó para utilizarlos (2-3 cm). Cada uno de los sustratos se hidrato en agua caliente durante 20 min, después, se les quito el exceso de agua y posteriormente se colocaron en cajas Petri, se esterilizó durante 2 h. Se realizó el proceso utilizando los sustratos al 100% y combinados con paja de sorgo al (50%).

6.3.2 INOCULACIÓN EN SUSTRATOS

Los sustratos previamente esterilizados, se inocularon utilizando un horador de 9 mm de diámetro y con la ayuda de una aguja se colocó el corte de micelio de *Armillaria* sp. Se colocó el inóculo en el centro de la caja Petri y se incubó 25°C en oscuridad. Se determinaron las características del micelio (apartado 6.2.1) y la velocidad de crecimiento (apartado 6.2.2).

6.4 CRECIMIENTO EN CULTIVO LÍQUIDO

Se creció en dos medios, uno fue únicamente caldo extracto de malta (CEM) y el otro fue CEM con infusión de rosa (10 g/L). Se utilizaron matraces de 125 ml se añadió 50 ml de medio de cultivo y se esterilizaron. Posteriormente se inóculo con tres fragmentos de micelio y se incubaron a 25°C, 120 rpm y en oscuridad, se tomaron muestras cada cinco días, hasta los 30 días de crecimiento. Se obtuvo el caldo de cultivo por filtración y se congelaron hasta su uso para determinar la actividad de lacasas (apartado 6.5).

6.5 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LACASA DE *Armillaria* sp.

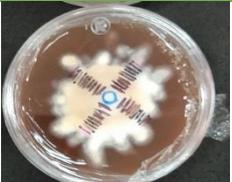
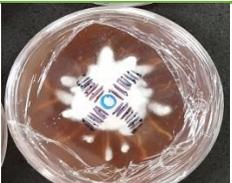
Se utilizaron las condiciones descritas en los apartados 6.2 y 6.3, hasta que la invasión fue total, se agregó 25 mL de agua destilada por cada gramo de biomasa seca y agitándose con movimientos circulares, posteriormente se mantuvo en refrigeración (6°C) por 16-18 h. Una vez pasado el tiempo se filtró con gaza y papel filtro siendo almacenado en Eppendorf para ser congelado a -20 °C. Para determinar la actividad de lacasas se utilizó 2,6-dimetoxifenol (DMP) disuelto en buffer 0.1 M, esta solución se depositó en tubos de ensayo junto con el extracto y se calentó a baño María 40 °C y se analizó en espectrofotómetro calibrado a 468 nm obteniendo la absorbancia. Se analizó la actividad a diferentes pH (pH2.5, pH3.5, pH4.5 y pH5.5) (Téllez-Téllez *et al.*, 2008).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOMASA y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO MICELIAL EN CAJA PETRI

En la tabla 3 se muestran las características morfológicas que presentó *Armillaria* sp. en general presentaron textura algodonosa, alta densidad, color blanco/crema, el mejor medio para tener por la densidad micelial fue al que se le agregó residuos de rosa, que visualmente se vio diferencia con los otros medios, además había mayor presencia de rizomorfos.

Tabla 3. Características morfológicas del micelio de *Armillaria* sp.

Medio	Tipo de micelio	Color	Textura	D	
PDA/Sorghum (Sorgo)	Aéreo	B/C	Algodonosa	Alta	
PDA/Rosa sp. (rosa)	Aéreo	B/C	Algodonosa	Alta	
PDA/Pronus persica (Durazno)	Aéreo	C	Algodonosa	Alta	
PDA/ Cedrus deodara (Cedro)	Aéreo	B	Algodonosa	Media	
PDA/Quercus (Encino)	Aéreo	B/C	Algodonosa	Baja	

**PDA/*Junisperus*
virginiana
(Pino)**

Aéreo

B

Algodonosa

Baja



Nota: D= Densidad, Color: B= Blanco, C= Crema; PDA= Papa Dextrosa Agar.

Destaca la apariencia del micelio crecido sobre PDA/*Sorghum* (Sorgo), PDA/*Rosa* sp. (Rosa) y PDA/*Pronus persica* (Durazno) estos presentaron textura algodonosa, densidad alta, color blanco/crema, mostraron micelio aéreo. Los medio de cultivo suplementados con sustratos lignocelulósicos ayudan al crecimiento del micelio, como lo reporta Gaitán-Hernández (2005) que utilizaron medios de cultivo con 11% de extracto de malta, 27% de agar bacteriológico, 5% de extracto de levadura y 57% de suplemento polvo de madera de encino (*Quercus* sp.) (MEA), y polvo de paja de trigo (*Triticum aestivum* L.) (MTA) y evaluaron el desarrollo micelial, de *Pleurotus eryngii*, obteniendo en general el micelio con color blanco, algodonoso y con una densidad regular. También Acosta-Urdapilleta *et al.* (2016) reportan que prepararon cuatro medios de cultivo: a) agar con harina integral de trigo (HIT), b) agar con dextrosa y papa (PDA), c) PDA con extracto de paja de trigo (PDA/T) y d) PDA con extracto de paja de arroz (PDA/A). Trabajando con cinco especies de *Pleurotus* las cepas de *P. ostreatus* (HEMIM-50, 126 y 127), *P. eryngii* (HEMIM-128 y 130) presentaron micelio de color blanco. La cepa de *P. pulmonarius* (HEMIM-129) y la cepa de *P. citrinopileatus* (HEMIM-132) presentaron tonos crema y la cepa de *P. djamor* var. *roseus* (HEMIM-104) mostró variación en su coloración según el medio de cultivo utilizado siendo crema sobre PDA y PDA/T, blanco con tonos rosas en HIT y crema con tonos rosas sobre PDA/A. Por lo en este trabajo el mejor sustrato para utilizar fue rosa, sorgo y durazno.

7.1.1 BIOMASA MICELIAL

En la figura 4 se muestra los resultados de biomasa de la cepa de *Armillaria* sp. y coincide que donde hubo mayor densidad (medio PDA/R) fue el que presentó mayor biomasa (0.237 g/caja Petri), seguido de PDA/C con 0.211 g/caja Petri, mientras que el de menor producción de micelio fue PDA/E con 0.085 g/caja Petri. Coello-Loor *et al.* (2017) utilizando dos cepas de *Pleurotus* spp. en medio cascarilla de arroz+PDA (CaPDA) obteniendo de biomasa 0.171 g/caja Petri, y cáscara de maracuyá+PDA (CmPDA) con 0.165 g/caja Petri.

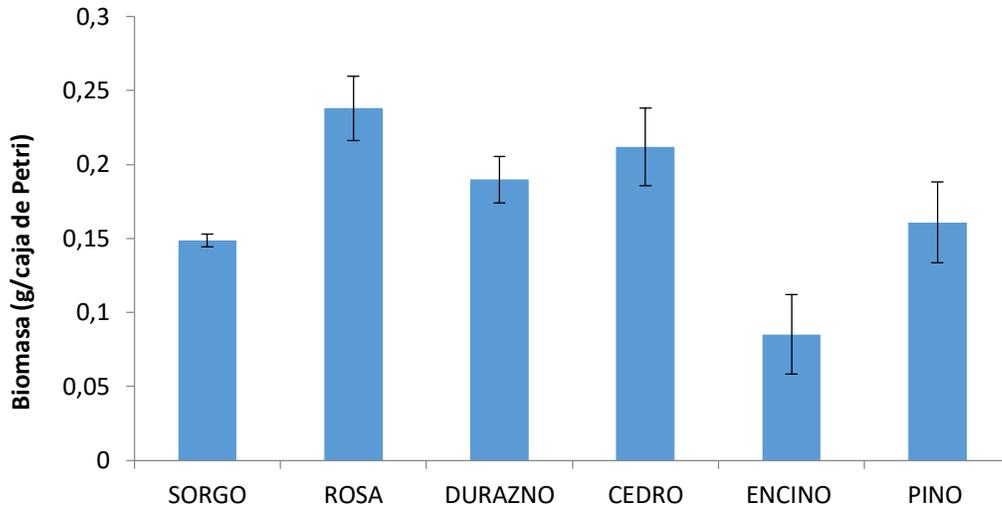


Figura 4. Biomasa micelial de *Armillaria* sp.

7.1.2 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

En la figura 5 se muestra la velocidad de crecimiento y creció más sobre el medio PDA/R (0.021 mm/h), seguido del medio PDA/D con (0.017 mm/h), mientras que el medio más lento fue en PDA/P (0.013 mm/h), debido al lento crecimiento se analizó hasta los 30 días. Martínez (2015) evaluó la velocidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* donde obtuvo intervalos de 24 a 48 h, en invasión de micelio en medio PDA/orujos de pera con (0.186 mm/h). Coello-Loor *et al.* (2017) evaluaron la cepa del *P. ostreatus* en cuatro medios de cultivo: CaPDA (cascarilla de arroz + PDA), CmpDA (cáscara de maracuyá + PDA), CaCmpDA (cascarilla de arroz 50% + cáscara de maracuyá 50% + PDA), PDA (agua destilada + PDA) a partir de las 120 h, en el medio cascarilla de arroz CaPDA obtuvo 0.283 mm/h siendo el más eficiente para su crecimiento, en los demás medios reporta aproximadamente 0.265 mm/h. *Armillaria* sp. es un hongo de crecimiento lento comparado con *Pleurotus*.

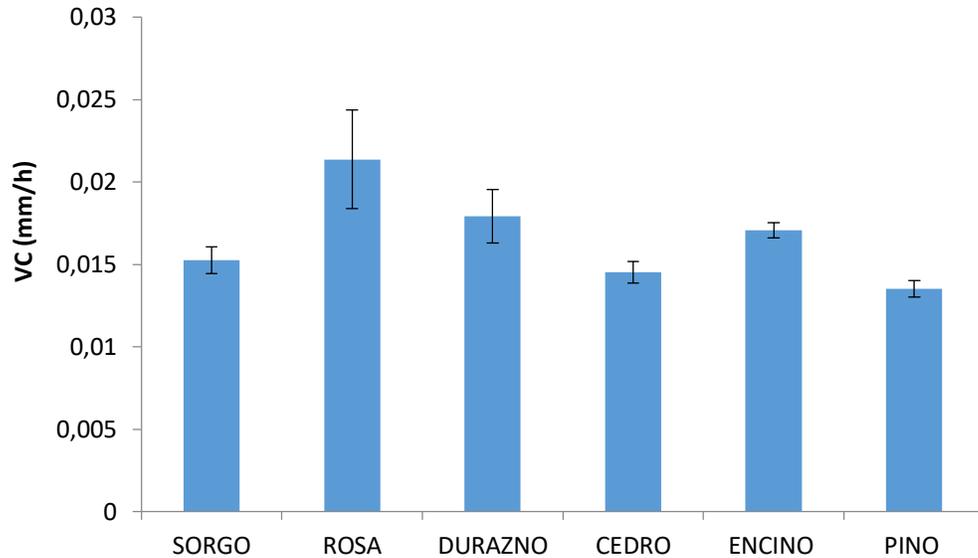


Figura 5. Velocidad de crecimiento de *Armillaria* sp. en medio de cultivo de PDA con diferentes sustratos.

7.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Armillaria* sp. CRECIDA SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS

Al utilizar los sustratos al 100% para crecer *Armillaria* sp. mostró mejores características sobre rosa y durazno, presentó micelio aéreo, textura algodonosa, densidad alta y color crema. En las combinaciones de proporción 1:1 fue en rosa/sorgo y durazno/sorgo donde el micelio fue tipo aéreo, textura algodonosa, densidad alta y color crema (Tabla 4).

Arana-Gabriel *et al.* (2019) utilizaron la cepa *Flammulina mexicana* (IE 986) usando como sustrato aserrín de *Quercus* sp. (encino), rastrojo de *Zea mays* (maíz) con aserrín de jara *S. cinerarioides* 50:50 y rastrojo de maíz al 100%, el sustrato encino con rastrojo de maíz presentó media a escasa densidad, mientras la combinación de aserrín de jara con rastrojo de maíz obtuvo una densidad alta tardando un promedio de 17 días en invadir el sustrato, Esto comparado con *Armillaria* sp., se obtuvo una densidad alta del micelio en los sustratos utilizados mostrando que los más eficientes son rosa y durazno, pero hasta los 30 días de crecimiento.

Tabla 4. Características morfológicas del micelio de *Armillaria* sp. en sustratos al 100% y proporción 1:1

Sustrato 100%	Tipo de micelio	Color	Textura	D	
<i>Sorghum</i> (Sorgo)	Aéreo	B	Algodonosa	Baja	
<i>Rosa</i> sp. (rosa)	Aéreo	C	Algodonosa	Alta	
<i>Pronus persica</i> (Durazno)	Aéreo	C	Algodonosa	Alta	
<i>Cedrus deodara</i> (Cedro)	Aéreo	B	Algodonosa	Media	
<i>Quercus</i> (Encino)	Aéreo	B	Algodonosa	Baja	
<i>Junisperus virginiana</i> (Pino)	Aéreo	B	Algodonosa	Media	

Sustrato (1:1)	Tipo de micelio	Color	Textura	D	
<i>Rosa/Sorghum</i>	Aéreo	C	Algodonosa	Alta	
<i>Pronus persica/Sorghum</i>	Aéreo	C	Algodonosa	Alta	
<i>Cedrus deodara /Sorghum</i>	Aéreo	B	Algodonosa	media	
<i>Quercus/Sorghum</i>	Aéreo	B	Algodonosa	Baja	
<i>Juniperus virginiana/Sorghum</i>	Aéreo	B	Algodonosa	Media	

Nota: D= Densidad, Color; B= Blanco, C= Crema

La velocidad de crecimiento micelial de *Armillaria* sp. en los seis sustratos al 100%, en durazno que fue el sustrato más eficiente (0.02 mm/h), seguido de rosa (0.017 mm/h), mientras que el sustrato donde creció menos fue encino (0.005 mm/h) (Figura 6). Con respecto al crecimiento micelial en la combinación con paja de sorgo, la mejor

combinación fue rosa/s (0.021 mm/h), seguido de durazno/s con (0.019 mm/h) y la combinación donde el crecimiento fue más lento fue pino/s (0.010 mm/h), no hubo diferencias en crecimiento entre utilizar los sustratos al 100% o en combinación, sin embargo, ya en la práctica convendría utilizar las combinaciones, ya que hay sustratos que es complicado realizar el secado, como el caso de la rosa, y al utilizar las combinaciones para crecer *Armillaria* sp. se requerirá menor cantidad de dicho sustrato.

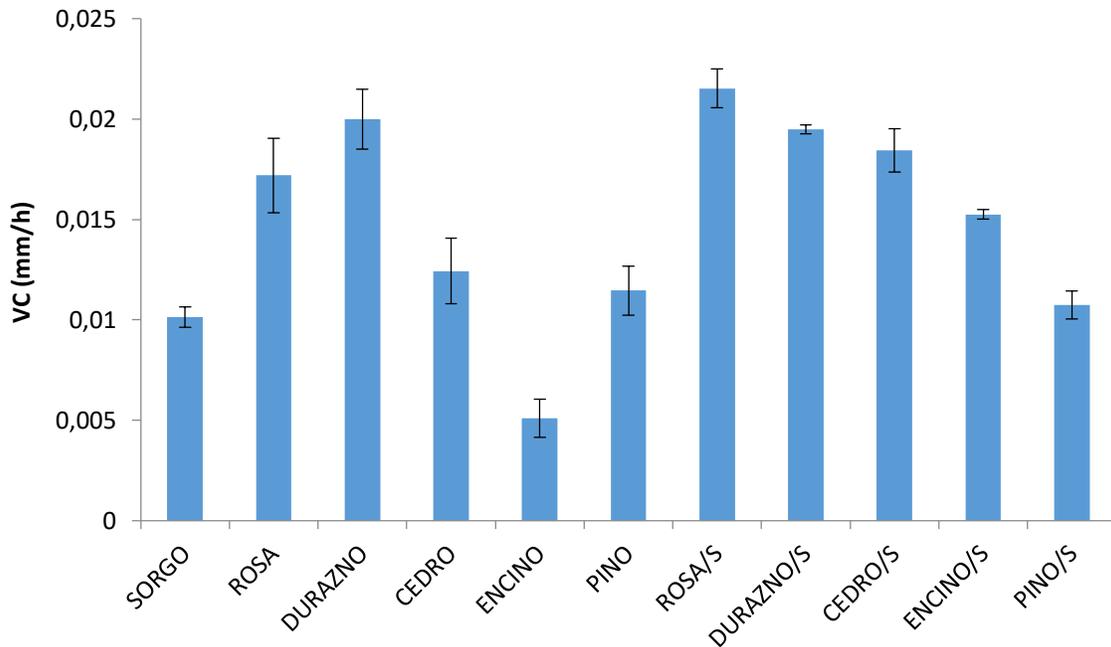


Figura 6. Velocidad de crecimiento en sustratos 100% y proporción 1:1

7.3 CUANTIFICACIÓN DE ENZIMA LACASA

La actividad de lacasas extracelular de *Armillaria* sp. crecida sobre diferentes sustratos al 100% se muestra en la Figura 7, hubo mayor actividad sobre sorgo y rosa. La mayor actividad de sorgo fue a pH de 3.5 y 4.5 a los 30 días con 9.33 U/g X y 5.74 U/g X, respectivamente y la actividad en rosa fue mayor a pH 4.5 (7.13 U/g X), las demás fueron más bajas, alrededor de 2 U/g X. En la Figura 8 se muestra la actividad de la combinación de los sustratos, la mayor actividad de lacasas fue cuando se creció en rosa/sorgo a pH de 4.5 y 5.5 (8.59 U/g X y 10.18 U/g X).

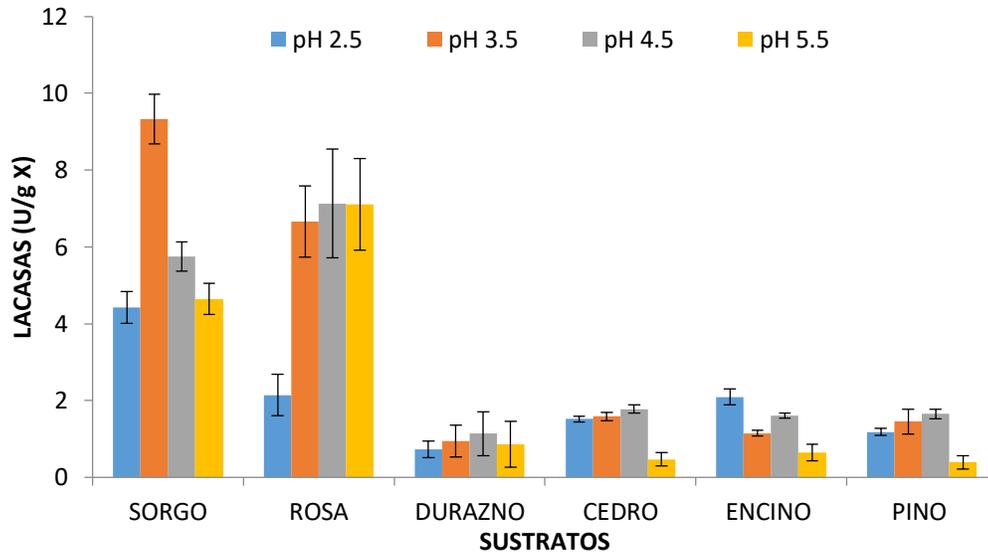


Figura 7. Actividad de lacasas de *Armillaria* sp. en sustratos al 100%

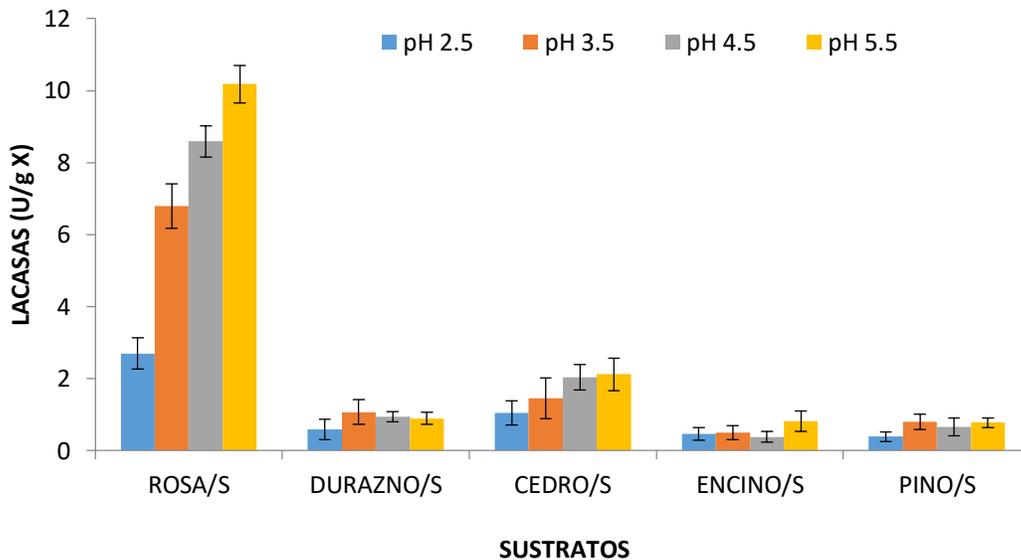


Figura 8. Actividad de lacasas de *Armillaria* sp. en las diferentes combinaciones.

Murrieta (2002) evaluó la actividad enzimática de lacasa de dos cepas de *P. pulmonarius* 137 y 225, se muestran una media general de 34.69 Ug^{-1} en sustrato de pulpa de café utilizando tampón fosfato-citrato pH 5, García-Oduardo *et al.* (2017) emplearon las cepas *Pleurotus ostreatus* (CCEBI 3021) y *Pleurotus ostreatus* (CCEBI 3024) las crecieron sobre maíz, sorgo y pulpa de café, en sorgo a los 7 días presentó 13.19 Ug^{-1} de actividad de lacasa (pH 6.4). Karp *et al.* (2015) reportaron 151.6 U/g a pH 5.5 de actividad de lacasa de *Pleurotus ostreatus* crecido sobre bagazo de caña de azúcar. Daâssi *et al.*,

(2016) evaluaron la actividad enzimática de *Corioloopsis gallica* crecido en residuos de aserrín, obteniendo una actividad de 4880 U/L. Chan *et al.* (2016) evaluaron la actividad enzimática de *Pycnoporus sanguineus* en paja de trigo teniendo una actividad de 118.2 U/L, bagazo de caña con 76.7 U/L y aserrín de pino con 100.1 U/L a pH 4.5, siendo valores más altos comparados con *Armillaria* sp. ya que obtuvo valores bajos.

Worrall *et al.* (1986) reportaron que el etanol y otras sustancias que inducen la formación de rizomorfos en *Armillaria* sp. también indujo la producción de lacasas, las lacasa se detectó por primera vez justo antes de la aparición de los rizomorfos iniciales. Su actividad alcanzó un pico cuando la tasa de crecimiento de los rizomorfos era más alta y cayó a casi cero cuando cesó el crecimiento de los rizomorfos, por lo que los autores sugieren un papel de la lacasa en la morfogénesis y/o el crecimiento de rizomorfos, lo que coincide con los resultados de crecimiento en PDA, donde fue visible la formación de los rizomorfos, y en sustratos biodegradables donde hubo mayor actividad de lacasa fue rosa y durazno.

7.4 PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Armillaria* sp. MEDIO LÍQUIDO

En la producción de biomasa micelial en medio extracto de malta, se obtuvo una biomasa máxima (X_{max}) de 4.92 g y la mínima fue de 1.73 g, el cultivo se mantuvo hasta las 720 h y no fue posible determinar la fase estacionaria, por lo que se realizó el modelamiento por la ley de Maltus. El hongo *Armillaria* sp. presento una tasa específica de crecimiento de (μ) de 0.0015 h^{-1} (Figura 9).

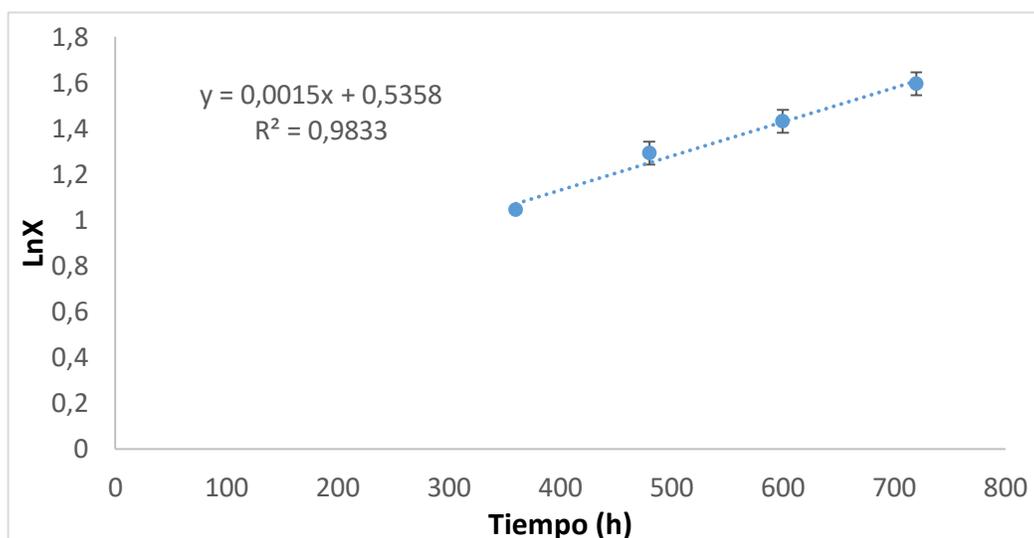


Figura 9. Modelamiento matemático de *Armillaria* sp. medio líquido extracto de malta.

La producción de biomasa en extracto de malta con infusión de rosa, la X_{max} fue de 5.88 g y la biomasa mínima fue de 1.26 g, se realizó el cultivo hasta las 720 h, *Armillaria* sp.

presentó una μ de 0.0023 h^{-1} (Figura 10). Comparado con los resultados anteriores, fueron valores un poco más altos en biomasa máxima y la μ , y disminuyó el tiempo de duplicación, sin embargo, se podría optimizar el cultivo para mejorar el crecimiento.

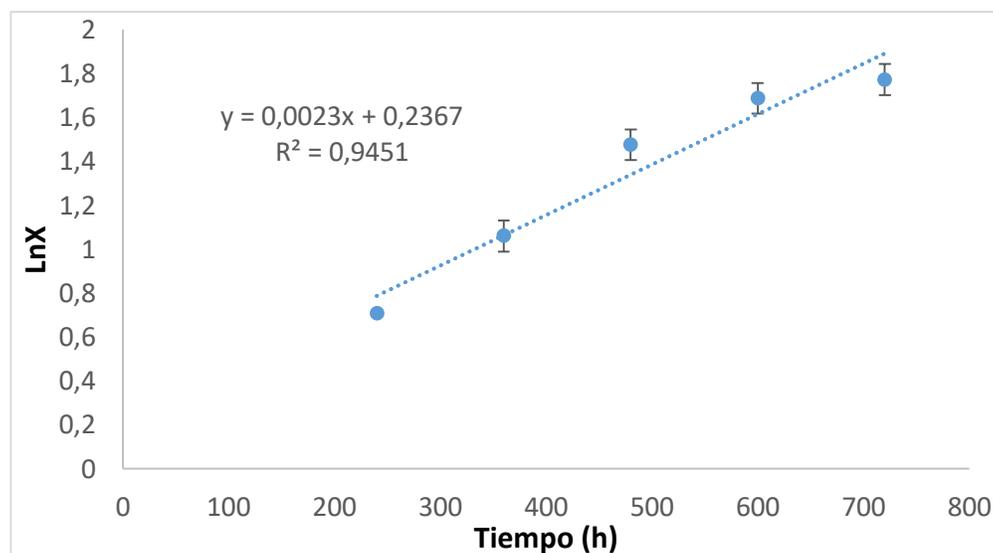


Figura 10. Modelamiento matemático de *Armillaria* sp. medio líquido extracto de malta con infusión de rosa.

Díaz (2009) reportó X_{\max} de 6.74 g/L a las 528 h a pH 6.5 de *Pleurotus ostreatus*, utilizó extracto de levadura. Hernández (2016) creció la cepa de *Lentinula boryana* (HEMIM-44) en cultivo líquido caldo dextrosa papa, reportó una X_{\max} de 3 g/L (792 h), también es un hongo de crecimiento lento como *Armillaria* sp. teniendo similitud en cuanto al tiempo de crecimiento y producción de biomasa. Por otro lado, Barchuk *et al.*, (2019) reportan que la cepa *T. villosa* BAFC 2755, en medio de cultivo líquido de extracto de malta con concentrado soluble de maíz (ME) obtuvo la mayor biomasa de 1.61 g/L (336 h). Ferrer-Romero *et al.*, (2018) creció a *Pleurotus ostreatus* (CCEBI 3024) en un medio de cultivo YPG que contiene glucosa, peptona y extracto de levadura, a las 168 h obtuvieron la fase estacionaria en la cual se alcanzó la máxima concentración de biomasa con un valor de 8.04 g/L. Con *Armillaria* sp. no fue posible llegar a la fase estacionaria, se obtuvo biomasa máxima de 5.88 g, fue más alta a lo reportado en *Lentinula boryana*, ambos hongos son de crecimiento lento, pero la diferencia podría deberse a que creció en un medio que presenta componentes que favorecen el crecimiento en hongos.

7.5 CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS LACASAS MEDIO LIQUIDO

Se cuantifico la actividad de lacasas a diferentes pH (Figura 11), presentó mayor actividad a pH de 3.5 y 4.5 (92.29 U/L y 109.77 U/L respectivamente), y en la Figura 12

se muestra la actividad de lacasas a diferentes pH en presencia de infusión de rosa, se observa que no incrementó la actividad comparada con la que no tenía infusión, hubo mayor actividad a pH de 3.5 y 4.5 (99.70 U/g X y 92.59 U/g X). La actividad a pH 3.5 y 4.5 en ambos casos de cultivo fue incrementado conforme al tiempo de crecimiento.

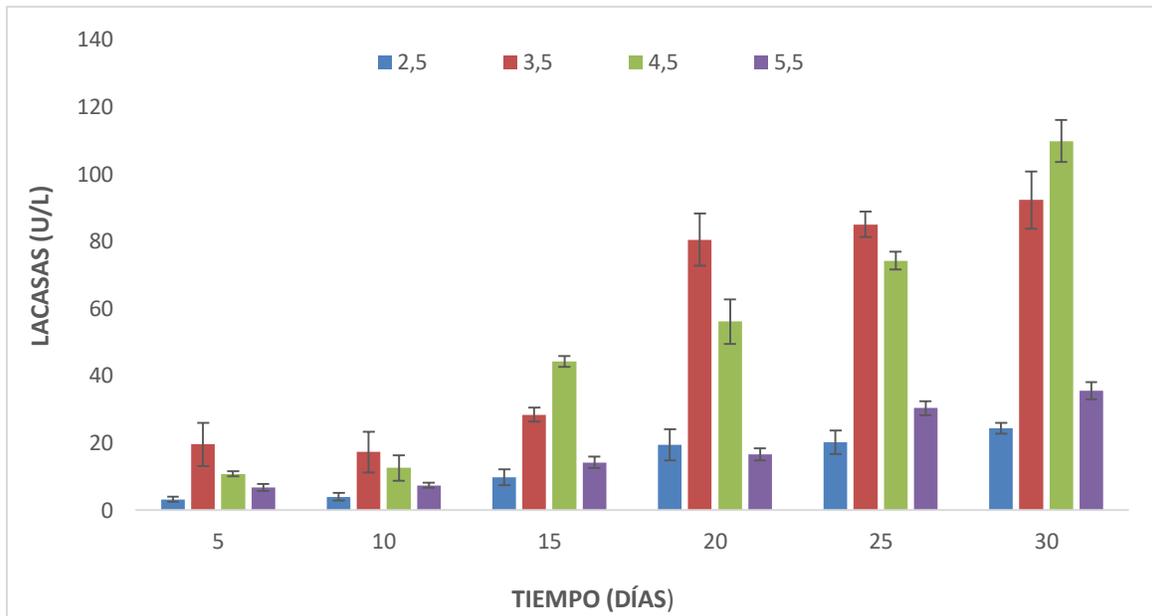


Figura 11. Actividad de lacasas de *Armillaria* sp. en medio líquido.

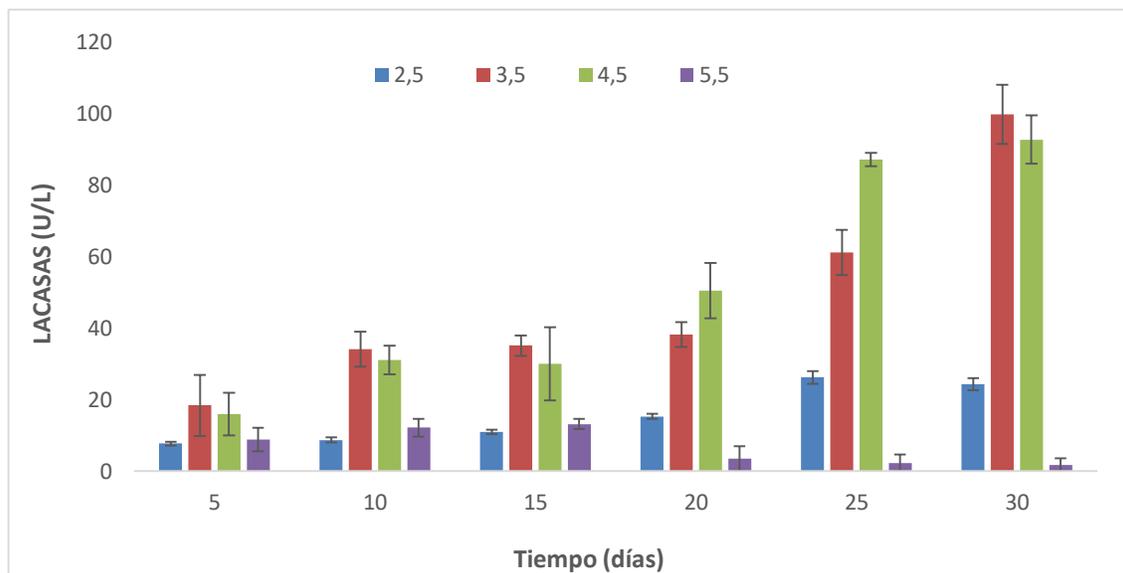


Figura 12. Actividad de lacasas de *Armillaria* sp. en medio líquido extracto de malta con infusión de rosa.

Entre las diversas fuentes de carbono que se han trabajado, se ha reportado que el extracto de malta resulta ser el mejor para la producción de lacasas por algunos hongos de pudrición blanca (Da Cunha *et al.*, 2003). En *Trametes villosa* (BAFC 2755), crecido en cultivo líquido de extracto de malta con 5 mL/L de concentrado soluble de maíz (ME), se analizó la actividad de lacasa con 2,6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato en buffer acetato de sodio 0.1 M a pH 3.5, obteniendo una actividad de ≈ 100 U/L a los 10 días y a los 14 días a pH 3.5 obtuvieron ≈ 150 U/L, y a pH 5.5 con ≈ 200 U/L, mencionan que el perfil isoenzimático de lacasas se vio influenciado por el pH y la temperatura, describieron tres isoenzimas para la cepa de *T. villosa* (Barchuk *et al.*, 2019). La actividad de lacasa a diferentes pH (rango de pH 1.0-5.5), reportaron que el medio con extracto de malta presentó mayor actividad a pH 3.0 y 3.5 con 160 U/L y 248 U/L, para la cepa *Pleurotus ostreatus* (Ramírez *et al.*, 2003).

Stoytchev y Nerud (2000) reportaron la actividad de cinco especies del género *Armillaria*, detectaron mayor rendimiento de actividades enzimáticas en el medio extracto de malta-glucosa, pero en ninguna cepa se detectó la actividad de lignina peroxidasa. Como muchos hongos de pudrición blanca, *Armillaria* parece utilizar una forma diferente de degradación de la lignina, en comparación con *Phanerochaete chosospurium*; este tipo de degradación de la lignina no utiliza LiP y es independiente de la concentración de nitrógeno en el medio. La enzima lacasa fue la primera enzima que apareció en todos los cultivos dentro de los 3 a 5 días posteriores a la inoculación, seguida de la peroxidasa independiente de manganeso y más tarde de la peroxidasa dependiente de manganeso. *Armillaria mellea* presentó 8.1 U/L de lacasas, 0.9 U/L de peroxidasa dependiente de manganeso y 0.4 U/L de peroxidasa independiente de manganeso.

Se ha reportado que la enzima lacasa muestra un pH óptimo que va de 2.5 a 3.5, a una temperatura óptima de 40 y 45°C, y que son inducibles con compuestos de tipo fenólico, además, de que el cultivo líquido es el sistema de producción de metabolitos más estudiada, debido que se pueden controlar de mejor algunos parámetros (Palmieri *et al.*, 1997). En este trabajo la actividad de lacasas de *Armillaria* sp. fue mayor a pH 3.5 a 40°C, no hay reportes de enzimas lacasas de este hongo, se podría sugerir que hay presencia de dos o más isoenzimas de lacasas, y por eso las diferencias de actividad a cada pH, por ejemplo, la actividad en los primeros días de crecimiento (5, 10 y 15 días) tiene un poco más actividad a pH 3.5, y los demás días de crecimiento incrementa la actividad a pH 4.5 (Figura 12), probablemente a los 15 días se presenta una y posteriormente es otra isoenzima la encargada de la actividad, sin embargo no se pudieron realizar zimogramas debido a la baja actividad, por lo que se tendría que concentrar los extractos para poder visualizar las bandas. Por último, la baja actividad pudo deberse también, a la presencia de proteasas y/o que la capacidad de degradar los sustratos lignocelulósicos es debido a otras enzimas hidrolasa, las cuales, no se cuantificaron en este trabajo de investigación.

8. CONCLUSIÓN

Los sustratos lignocelulósicos que favorecieron la fase micelial de *Armillaria* sp. presentando mejores características fue PDA/*Sorghum* (Sorgo), PDA/*Rosa* sp. (Rosa) y PDA/*Pronus persica* (Durazno) siendo una alternativa para desarrollo del hongo en caja de Petri. Al utilizar el desecho de rosa y durazno 100% y proporción 1:1 con sorgo, presentaron las mejores características morfológicas, la mayor VC y producción de biomasa, por lo que se pueden considerar para cultivar y obtener cuerpos fructíferos de dicho hongo.

En cuanto a la producción de lacasas en el cultivo sólido el mejor fue en presencia de rosa y sorgo al 100% y proporción 1:1 (rosa con sorgo), con respecto al cultivo líquido, se obtuvo mayor actividad de lacasas a pH de 3.5 y 4.5 (92.29 U/L y 109.77 U/L respectivamente), en ambos caso se podría optimizar la condición de cultivo para mejorar la actividad, además que podría haber diferentes isoenzimas en cada tipo de cultivo, ya que el sólido dependiendo el sustrato pudo haber algunos componentes que podrían actuar como inductores (cedro y encino), sin embargo no fue alta la actividad, pero, en el cultivo líquido no se le agregó ningún tipo de inductor, la presencia de rosa no tuvo ese efecto debido a que no se incrementó la actividad comparando los dos cultivos líquidos.

9. PERSPECTIVAS

- Optimizar el cultivo de crecimiento (pH, temperatura, agitación, nutrientes, etc.)
- Cuantificar enzimas oxidasas (MnP, versátil peroxidasa) e hidrolasas (celulasas, xilanasas, pectinasas, etc.) que podrían participar en la degradación de sustratos.
- Se han reportado diferentes actividades biológicas (antioxidante, citotóxica y antimicrobiana) para este hongo, por lo que se podrían determinar.

10. LITERATURA CITADA

- Abdel-Raheem, A. M. (1997). Actividad de lacasa de hifomicetos acuáticos lignícolas aislados del río Nilo en Egipto. *Mycopathologia* 139: 145–150.
- Acosta-Urdapilleta, M. D. L., Téllez-Téllez M., Villegas E., Estrada A. y Díaz-Godínez, G. (2016). Caracterización de cinco especies de *Pleurotus* crecidas en cuatro medios de cultivo. *Mexican journal of biotechnology*, 1(1), 1-11.
- Aguilar Cruz. Y. y Villegas M. (2010). Especies de Gomphales comestibles en el municipio de Villa del Carbón, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología*. 31:1-8.
- Aguína, O., Abuínb, M., Lozano, B., Francisco., Ferreiroaa, Vanesa., Corralby, J., Mercedes., Mansilla, Pedro. (2015). Incidencia y distribución del género *Armillaria* enviñados de las cinco denominaciones de origen de vino de Galicia (noroeste de España) *Revista Iberoamericana de Micología*. 32 (1): 13–19.
- Alcalde, M., Bulter, T., Arnold, F. H. (2002). Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of Biomolecular Screening*, 7(6):547-553
- Alvarado-Rodríguez, R. (2010). Conocimiento Micológico local y micetismo: una aproximación a la etnomicología Tseltal de Kotolte: Tenejapa, Chiapas, México, Tesis de Maestría, ECOSUR, San Cristóbal de las Casas. 123.
- Alavez-Vargas, Mayren (2006). Conocimiento Micológico Tradicional en San Cerezo, Pachuca, Hidalgo: el caso de Baletaceau sensu Chevalier. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Arana-Gabriel, Y., Burrola-Aguilar C., Zepeda G. C., Franco-Maass S., Montes de Oca M. (2019). Colonización miceliar de *Flammulina mexicana* a partir de inóculo sólido y líquido en residuos agroforestales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10: 11-20.
- Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in life sciences*. 18(11): 768-778.
- Baldrian, P. (2004). Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiol Ecology* 50: 245–253.
- Barchuk, M. L., Fonseca, M. I., Giorgio, E. M., y Zapata, P. D. (2019). Efectos de pH, temperatura y tiempo de incubación sobre el crecimiento fúngico y la actividad lacasa en *Trametes villosa* BAFC 2755. *Revista De Ciencia Y Tecnología*, 32(1): 91-98.
- Barlocher, F. y Boddy, L. (2016). Ecología fúngica acuática: ¿en qué se diferencia de la terrestre? *Ecología fúngica*. 19: 5–13.
- Beijing, China. (1995). Instituto de Materia Medica. Academia china de ciencias médicas. En el estudio moderno de la medicina herbaria China; Beijing Unión Medical College y Beijing Medical University Associated Press. 48–77.
- Beloqui, A., Pita, M., Polaina, J., Martínez- Arias, A., Golyshina, O. V., Zumarraga, M., Yakimov, M. M., García-Arellano, H., Alcalde, M., Fernandez, V. M., Elborough, K., Andreu, J. M., Ballesteros, A., Plou, F. J., Timmis, K. N., Ferrer, M. y Golyshin, P. N. (2006). Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 22933-22942.

- Bertrand, B., Martínez M. F. A., Trejo H. M. R. (2013). Lacasas fúngicas: Inducción y producción. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12: 473-488.
- Berrio, J., Plou, F. J., Ballesteros, A., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2007). Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(2):130-134.
- Blackwood, C. B., Waldrop, M. P., Zak, D. R., Sinsabaugh, R. L. (2007). El análisis molecular de comunidades fúngicas y genes de lacasa en la hojarasca en descomposición revela diferencias entre los tipos de bosque, pero no el impacto de la deposición de nitrógeno. *Microbiology*. 9: 1306–1316.
- Boa, E. (2004). Los hongos silvestres comestibles, perspectiva global de su uso e importancia para la población. *Productos Forestales no Maderables*. FAO. Roma. 17: 161-163.
- Bonomo, R. P., Boudet A. M., Cozzolino R., Santoro E., Rizzarelli A. M., Sterjiades R. y Zapalla R. (1998). A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the “white-rot” fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 71: 205–211.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G. (1992). Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Applied Microbiol. Biotechnol.* 36: 823-7.
- Burrola-Aguilar, Montiel C., Garibay-Orijel R. y Zizumbo-Villarreal L. (2012). Conocimiento Tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología*.
- Camarão, M. J. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13 (6):14
- Cervantes, M. y Hernández M. (2006). *Biología general*. Publicaciones Cultural, México. 11-83.
- Chan, C., Wilberth, Heredia A., Gabriela P. y Rodríguez Refugio V. (2016). Aislamiento y Evaluación de la Actividad Enzimática Ligninolítica de Macromicetos del Estado de Veracruz, México *Revista de Contaminación Ambiental*. 32: 339-351.
- Chang, S.T., y Miles P.G. (2004). *Mushroom cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. Washington D.C., USA. 451.
- Chefetz, Chen B., y Hadar, Y. (1998). Purificación y caracterización de lacasa de *Chaetomium thermophilum* y su papel en la humificación. *Applied Reinar. Microbiology*. 64: 3175-3179.
- Chen, S, Ge W. y Buswell J. A. (2004). Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Journal Biochemistry*. 271: 318–328.
- Coello-Loor, Carol, D., Avellaneda-Cevallos, Juan H., Barrera-Álvarez, Alexandra E., Peña-Galeas, Mayra M., Yépez, Macías Piedad F. y Racines-Macías, Elizabeth R. (2017). Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas del género *Pleurotus* spp., cultivadas en un medio agar con diferentes sustratos. *Ciencia y Tecnología*. 10 (2): 33-39.
- Colak, A. Faiz, Ó. y Sesli, E. (2009). Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turkish Journal of Biochemistry*. 34: 25-31.
- Collins, P.J. y Dobson, A.D.W. (1997). Regulation of laccases gene expression in *Trametes versicolor*. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 3444-3450.
- Daâssi, D., Zouari-Mechichi H., Frikha F., Rodríguez-Couto S., Nasri M., Mechichi T. (2016). Residuos de aserrín como sustrato de soporte de bajo costo para la producción de lacasas y adsorbente para la decoloración de colorantes azoicos. *Journal Environ Health* 14: 10-1186.

- Da Cunha, M. A. A., Barbosa, A. M., Giese, E. C. y Dekker, R. F. H. (2003). The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. *Journal of Basic Microbiology*. 43: 385-392.
- Dahiya, J. S., Singh D. y Nigam P. (1998). Characterisation of laccase produced by *Coniothyrium minitans*. *Journal of Basic Microbiology*. 38: 349–359.
- Das, M., Royer, TV., Leff, LG. (2007). Diversidad de hongos, bacterias y actinomicetos en las hojas que se descomponen en una corriente. *Applied. Reinar. Microbiology*. 73: 756–767.
- Desai, S. y Nityanand C. (2011). Microbial lacases and their applications a review Asian
- Díaz Godínez Rubén (2009). Efecto del pH Inicial de Desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en Fermentación Sumergida Sobre su Actividad de Lacasas Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Aplicada Instituto Politécnico Nacional Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Ciba-ipn Tlaxcala.
- Dong, J. L. Y Zhang Y. Z. (2004). Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus *Trametes gallica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 34: 179–194.
- Edens, WA, Goins TQ, Dooley D. y Henson J. M. (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3071–3074.
- Feng, S. Z., Su, Y. R., Dong, M. Z., El, X. Y., Kumaresan, D., O'Donnell, A.; Wu, JS; Chen, XB (2015). La actividad de la lacasa es proporcional a la abundancia de genes bacterianos similares a la lacasa en el suelo de tierras cultivables subtropicales. *Journal of Microbiology. Biotecnología*. 31: 2039-2045.
- Ferrer-Romero, J. C., Mas-Diego, S. M., Beltrán-Delgado, Y., Morris-Quevedo, Humberto J. y Díaz-Fernández, U. (2018). Estudio cinético de la producción de biomasa y compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* en fase sumergida. Facultad de Ingeniería Química y Agronomía, Universidad de Oriente, Cuba. 1-16.
- Flores, C. Vidal, C., Trejo-Hernández, Galindo E., Serrano-Carre, L. (2009). Selección de cepas de *Trichoderma* capaces de aumentar la producción de lacasa por *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus bisporus* en cultivos duales. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 249–257.
- Folta, K. M. y Gardiner S. E. (2009). Genetics and genomics of Rosaceae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 6, *Springer Sciences*.11-83.
- Fukushima, y Kirk T. K. (1995) Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin degrading system. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 872–876.
- Gaitán-Hernández, R. (2005) Evaluación in vitro del hongo comestible *Pleurotus eryngii*. Efecto de diferentes suplementos orgánicos en el crecimiento micelial y producción de cuerpos fructíferos Revista Mexicana de Micología, 21: 77-84.
- García-Oduardo, N., Bermúdez-Savón, R. C., Téllez-Suarez, Ll., Chávez-Toledano, Madelin., Perraud-Gaime, Isabelle. (2017). Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus* spp. Tecnología Química, Universidad de Oriente Cuba, 1: 39-45.
- Garibay-Orijel, R. y Ruan-Soto, R. (2014). Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. En: Moreno-fuentes, Á. y R. Garibay-Orijel. La Etnomicología en México. Estado del Arte. Red de Etnoecología y Patrimonio Biocultural (CONACyT)-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-instituto de biología (UNAM)-Sociedad Mexicana

de Micología-Asociación Etnobiológica Mexicana, A.C.-Grupo Interdisciplinario para el Desarrollo de la Etnomicología en México-Sociedad Latinoamericana de Etnobiología. México, D.F.

- Gianfreda, L., Xu, F. y Bollag, J.-M. (1999). Lacasas: un grupo útil de enzimas oxidorreductoras. *Bioremediation Journal*. 3: 1–26.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. y Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and molecular life sciences*. 67: 369-385.
- Giardina, P., Palmieri G., Scalonì A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G. y Sannia G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341: 655-663.
- Grinhut, T., Hadar, Y. y Chen, Y. (2007). Degradación y transformación de sustancias húmicas por hongos saprotróficos: procesos y mecanismos. *Fungal Biology Reviews*. 21: 179-189.
- Grzegorz Janusz, Anna P., Swiderska-Burek U., Jolanta P., Justyna S., Jarosz-Wilkolazka A. y Andrzej P. (2020). Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*. 21: 7-15
- Guest, T. C. y Rashid, S. (2016). Anticancer laccases. reviews. *Journal of Clinical Oncology*. 5: 1-2.
- Guzmán, G. (2008a). Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. Reviews. *International Journal Medicinal Mushrooms* 10: 209-217.
- Guzmán, G. (2008b). Hallucinogenic mushrooms in Mexico: an overview. *Society for Economic Botany*. 62:404-412.
- Hakala, T. K, Lundell T., Galkin S., Maijala P., Kalkkinen N. y Hatakka A. (2005). Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 461–468.
- Heinzkill, M., Bech L., Halkier T., Schneider P. y Anke T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 1601–1606
- Henson, J. M., Butler, M. J. y Day, A. W. (1999). The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 37 (1): 447-471.
- Hernández, N. Rosa M. (2016). Determinación de la actividad enzimática de *Lentinula boryana* cepa nativa del estado de Morelos. Tesis por etapas para obtener el título de biólogo, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Hofer, C. y Schlosser D. (1999). Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Lett* 451:186–190.
- Hofrichter, M. y Fritsche, W. (1996). Despolimerización de carbón de bajo rango por sistemas extracelulares de enzimas fúngicas. Detección de actividades de despolimerización de carbón de bajo rango. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46: 220-225.
- Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M. J., Martínez, A. T. (2006). Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine free bleaching eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81 (7): 1159-1165.
- Indexfungorum. (2020). <http://www.indexfungorum.org/NAMES/NamesRecord.asp?RecordID=190066>.

- Jiménez-González, F. J. (2013). Las áreas naturales protegidas federales. En: CONABIO, la biodiversidad en Chiapas: estudio de Estado. CONABIO - gobierno del estado de Chiapas, México. 391-396.
- Junghanns, C., Parra, R., Keshavarz, T. y Schlosser, D. (2008). Hacia una mayor actividad de lacasa producida por hongos ascomicetos acuáticos mediante la combinación de inductores y un sustrato alternativo. *Life Sciences*. 8: 277–285.
- Karp SG, Faraco V., Amore A., Letti LAJ, Soccol V. T., Soccol C. R. (2015). Optimización estadística de la producción de lacasa y designificación del bagazo de caña de azúcar por *Pleurotus ostreatus* en fermentación en estado sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* 1155: 181-204.
- Kellner, H., Luis, P., Zimdars, B., Kiesel, B. y Busco, F. (2008). Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 638-648.
- Kiiskinen, L. L., Rättö, M., Kruus, K. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3):640-646.
- Kim, H. J., Ko, M. K., Yi, C. K., y Sung, J. M. (1992). Cultivation of *Armillaria mellea* mushrooms on a sawdust medium in polypropylene bags. *Kor. Journal Mycology*. 20: 273-277.
- Kim, J. S., Choi, E. C., Kim, H. R., Lee, C. K., Lee, C. O., Chung, K. S., Shim, M. J. y Kim, B. K. (1983). Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XXXVII)-Antitumor components of *Armillariella mellea*. *Kor. Journal of Mycology and Infection*. 11: 151-157.
- Kostić, M., Smiljković, M., Petrović, J., Glamočlija, J., Barros, L., Ferreira, I. C., Ciric A., Soković, M. (2017). Chemical, nutritive composition and a wide range of bioactive properties of honey mushroom *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer. *Food & Function* 8: 3239-3249.
- Kües, U, y Liu. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology Biotechnology* 54: 414-152.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., Alcalde, M. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*. 7(1):32.
- Lakshmanan, D. y Sadasivan, C. (2016). *Trichoderma viride* laccase juega un papel crucial en el mecanismo de defensa contra organismos antagonistas. *Frente. Microbiology*. 7.
- López, G. D. (2005). Situación y perspectivas de los polímeros biodegradables: diseño y formulación según la demanda del mercado. *Ingeniería Química*, 37:176-185.
- Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., Hildén, K. (2010). Enzimas modificadoras de lignina en basidiomicetos filamentosos: revisión ecológica, funcional y filogenética. *Journal Microbiol*. 50: 5–20.
- Mansur, M., Arias M. E., Copa-Patiño J. L., Flärdh M., Gonzalez A. E. (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isoenzymes with different substrate specificities. *Mycologia*. 95:1013-1020.
- Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. y del Río, J. C. (2005). Biodegradación de lignocelulósicos: aspectos químicos microbianos y enzimáticos del ataque fúngico de la lignina. *Journal Microbiol*. 8: 195-204.

- Martínez-Carrera, D. P., Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. (2006). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción-consumo de los hongos comestibles. In: El cultivo de *Pleurotus* en México. ECOSUR-IE-UNAM-COLPOS, México, D.F.
- Mayer, A. M. (2006). Polifenol oxidasas en plantas y hongos: ¿a lugares? Una revisión. *Phytochemistry*. 67: 2318–2331.
- Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D. y Meyer, A. S. (2015). ¿Pueden las lacasas catalizar la división de enlaces en lignina? *Biotecnología*. 33: 13-24.
- Murrieta, Hernández D. M., Mata Gerardo, y Iglesias Andreu, L. G. (2002). Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. Cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. *Foresta Veracruzana*, 4 :47-52.
- Nagai, M., Sato T., Watanabe H., Saito K., Kawata M. y Enei H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiol Biotechnol* 60: 327–335.
- Orensanz, J. y Navarro, C. (1979). Cultivo del *Pleurotus ostreatus* sobre madera. Hojas Divulgadoras. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 3:1-20.
- Palmieri, G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A. y Sanni G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 31301–31307.
- Palonen, H., Saloheimo M., Viikari L. y Kruus K. (2003). Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme Microb Technol* 33: 854–862.
- Perie, F. H., Reddy G. V. B., Blackburn N. J. Y Gold M. H. (1998). Purification and characterization of laccases from the white- rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Arch Biochem Biophys* 353: 349–355.
- Pilz, D. y Molina, R. (2002). Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Ecology and Management*.155:3-16.
- Polak, J. (2012). Estructura / relación potencial redox de compuestos orgánicos simples como precursores potenciales de colorantes para la transformación mediada por lacasa. *Biotecnología*. 28: 93-102.
- Raabe, R. D. (1962). Host list of the root rot fungus, *Armillaria mellea*. *Hilgardia*. 33 (2): 25-88.
- Ramírez, Nubia E., Vargas, María C., Ariza, Juan C. y Martínez, César. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2: 64-72.
- Ramírez, Ramírez, J. y Ayala Aceves M. (2014). Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria*. 15: 11.
- Rehman, A.U., Thurston, C.F. (1992). Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. *J Gen Microbiol* 138: 1251-1257.
- Rodríguez, R. A., y Huerta C. J. (1995). Usos industriales de la madera de *Juniperus*. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 4: 27-30.
- Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R., Morris, H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20 (4): 164-168.

- Rogalski, J., Dawidowicz A. L. y Leonowicz A. (1990). Purification and immobilization of the inducible form of extracellular laccase of the fungus *Trametes versicolor*. *Biotechnology*. 10: 261–269.
- Ross-Davis, A. L., Hanna, J. W., Kim, M. S., Klopfenstein, N. B. (2012). Avanza hacia DNA - basado Identificación y filogenia de América del Norte. Especies de *Armillaria* utilizando el factor de alargamiento - 1 gen alfa. *Mycoscience*. 53: 161-165.
- Ruiz-Duenas, F. J. y Martínez, A. T. (2009). Degradación microbiana de la lignina: cómo se recicla eficientemente un voluminoso polímero recalcitrante en la naturaleza y cómo podemos aprovecharlo. *Microbiología Biotecnología*. 2: 164-177.
- Saboya, J. M. y Mata, G. (1999). Acción antagonista de *Trichoderma* sp. hifas a *Lentinula edodes* hifas cambia las actividades lignocelulolíticas durante el cultivo en paja de trigo. *Mundo Journal Microbiología. Biotecnología*. 15: 369–373.
- Sánchez J. E. (2001). III. "Crecimiento y fructificación". En: La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. 49-66.
- Sanchez, C. y Viniegra-Gonzalez G. (1996). Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2deoxy-d-glucose in starch-based media. *Mycology*. 100: 455-461.
- Sánchez, Vázquez J. E., Martínez Carrera D., Mata Gerardo y Leal Lara H. (2007). El cultivo de setas *Peurotus* spp. en México. México ECOSUR 7-20.
- Saparrat M. C. N., Guillen F., Arambarri A. M., Martinez A. T., Martinez M. J. (2002). Induction, isolation, and characterization of two laccases. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (4): 1534-1540.
- Saparrat, M., Martínez, M., Cabello, M., Arambarri, A. (2002). Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 181-185.
- Savoie, J. M. y Largeteau M. L. (2011). Production of edible mushrooms in forests: trends in development of a mycosilvi-culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 971-979.
- Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (SAGARPA). 2006. Anuario estadístico de la de la producción agrícola. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. México, D. F. (fecha de consulta, mayo 2006).
- Sharma, K. K., Kuhad, R. C. (2009). Una evidencia de lacasas en arqueas. *Indian Journal of Microbiology*. 49: 142–150.
- Shevchenko, S. M., Bailey, G. W. (1996). Vida después de la muerte: las relaciones lignico-húmicas reexaminadas. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 26: 95-153.
- Shim, JO, Chang K. C., Lee Y. S., Park C. H., Kim H. Y., Lee U.Y., Lee T.S., Lee M.W. (2006). The fruiting body formation of *Armillaria mellea* on oak sawdust medium covered with ground raw carrots. *The Korean Society of Mycology* 34: 206-208.
- Sinsabaugh, R. L. (2010). Fenol oxidasa, peroxidasa y dinámica de la materia orgánica del suelo. *Journal of Biological Biochemistry*. 42: 391–404.
- Sjaarda, C. P., Abubaker, K. S., Castle, A. J. (2015). La inducción de la expresión y actividad de *lcc2* por *Agaricus bisporus* proporciona defensa contra extractos tóxicos de *Trichoderma aggressivum*. *Microbiología y Biotecnología* 8: 918–929.

- Slomczynski, D, Nakas J. P. Y Tanenbaum S. W. (1995). Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61–34. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 907–912.
- Soden, D. M. y Dobson, A. D. W. (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147: 1755-1763.
- Sole, M., Kellner, H., Brock, S., Buscot, F. y Schlosser, D. (2008). Actividad de lacasa extracelular y niveles de transcripción de genes de lacasa putativos durante la eliminación del nonilfenol técnico de xenoestrógeno por el hígomiceto acuático *Clavariopsis aquatica*. *FEMS Microbiology*. 288: 47–54.
- Solomon, E. I., Augustine, A. J. y Yoon, J. (2008). O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton Transactions*. 3921-3932.
- Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S. K., y Palmer, A.E. (2001). Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 40 (24): 4570-4590.
- Stamets, P. (1993). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. Berkeley. 553.
- Stoytchev, I., Nerud, F. (2000). Lignolytic enzyme complex of *Armillaria* spp. *Folia microbiologica*, 45(3), 248.
- Téllez Téllez, M., Fernández J. F., Montiel González A. M., Sánchez C., Díaz Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81: 675-679.
- Terrón, M. C., González, T., Carbajo, J. M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A. D. W. y González, A. E. (2004). Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the lignolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics Biology*. 41: 954- 962.
- Thurston, C. F. (1994). Estructura y función de las lacas fúngicas. *Microbiology*. 140: 19-26.
- Ullrich, R., Huong L. M., Dung N. L. y Hofrichter M. (2005). Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 357–363.
- Vahl, P. Kumm. y Fuhr. Pilzk. Zerst. (1871). *Armillaria mellea* 134: 1-5.
- Valdés, M., Córdova, J., Valenzuela, R. y Fierros, A. M. (2004). In-cremento del topatógeno *Armillaria mellea* (Vahl.:Fr.) Karsten en bosque de pino-encino, en relación al grado de disturbio por tratamiento silvícola. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 10: 99-103.
- Velázquez-Cedeño, M., Farnet, A. M., Billette, C., Mata, G. y Savoie, J. M. (2007). Las interacciones interespecíficas con *Trichoderma longibrachiatum* inducen reacciones de defensa de *Pleurotus ostreatus* basadas en la producción de isoenzimas de lacasa. *Bioteconología Letón*. 29: 1583-1590.
- Voriskova, J. y Baldrian, P. (2013). La comunidad de hongos en la hojarasca en descomposición sufre cambios sucesivos rápidos. *ISME Journal*. 7: 477–486.
- Wilkolazka, A. J., Kochmanska-Rdest J., Malarczyk E., Wardas W. y Leonowicz A. (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:566-572.
- Worrall, J.J., Chet, I., and Hüttermann, A. (1986). Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. *Microbiology*, 132(9), 2527-2533.

- Zavastin, C. M., Aprotosoiaie, A. C., Gherman, S., Hancianuand M. y Miron, A. (2015). *Armillaria mellea* contenido fenólico, antioxidante in vitro y efectos antihiperoglucémicos, *Revista Med.-Chir. Medicina.* 119: 273 -280.
- Zhang, S., Liu, X., Yan, L., Zhang, Q., Zhu, J., Huang, Na., y Wang, Z. (2015). "Composiciones químicas y actividades antioxidantes de los polisacáridos de los esporóforos y productos cultivados de *Armillaria mellea* ". *Moléculas* 20: 5680-5697.

ANEXOS

I ABREVIATURAS

g/l	Gramos / Litros
°C	Grados centígrados
<i>et al.,</i>	Y otros
h	Horas
DMP	2, 6- Dimetoxifenol
mm/h	Milímetro / hora
U/g X	Unidad / gramo de biomasa
Xmax	Biomasa máxima
U/L	Unidades / Litro

II GLOSARIO

Biomasa: materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

Caldo extracto de malta: medio de cultivo (hogos y bacterias).

Cultivo: bioproceso, pero generalmente se asocia a organismos o microorganismos superiores.

Enzima: proteína que actúa como catalizador de una reacción química acelerándola. Reconoce una molécula específica, llamada sustrato. Cada enzima une a su sustrato específico en un sitio activo y provoca en él un cambio químico, por el cual se obtiene un producto.

Especie: clasificación taxonómica que agrupa a un conjunto de individuos que pueden cruzarse naturalmente (generar descendencia fértil) y que presenta características similares.

Género: agrupación de organismos vivos formando un conjunto de especies con características morfológicas.

Hidrolasas: catalizan la ruptura de enlaces químicos con la participación de las moléculas de agua.

Hongo: seres vivos que no presentan clorofila, son de reproducción sexual y mayoritariamente asexual.

Inóculo: microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales).

Lacasas: enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul. Catalizan la oxidación de un sustrato orgánico o inorgánico y la reducción del oxígeno molecular a agua, por medio de un mecanismo de transferencia de un electrón.

Micelio: conjunto o masa de hifas que construye el cuerpo vegetativo un talo de un hongo.

III TRABAJOS ACADÉMICOS

LA SOCIEDAD MEXICANA DE MICOLOGÍA (AMEH A.C.), LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

otorgan la presente **CONSTANCIA A:**

**Maura Téllez-Téllez, Rocío de Guadalupe Arias, Reyes Kevin Romero Cedillo,
Ma. de Lourdes Acosta-Urdapilleta, Alma Rosa Agapito-Ocampo, Emmanuel Salgado Agüero,
Gerardo Díaz-Godínez**

por su participación con el **CARTEL**

Crecimiento micelial de *Armillaria* sp. sobre diferentes medios cultivo

En el marco del **XII Congreso Nacional de Micología**
en Xalapa, Veracruz del 15 al 19 de Octubre del 2018.

Dr. Roberto Garibay Orjuel

Presidente

Sociedad Mexicana de Micología (AMEH A.C.)



2º CONGRESO DE BIOPROSPECCIÓN

Moléculas Bioactivas y sus aplicaciones

La Universidad Autónoma del Estado de Morelos a través
del Cuerpo Académico de Bioprospección
otorga el presente reconocimiento a

REYES KEVIN ROMERO CEDILLO

Por su Asistencia



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTACIÓN



CENTRO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
UAJEM

Elba C. Villegas V.

Dra. Elba C. Villegas V.
Representante del Cuerpo Académico

Maura Téllez Téllez

Dra. Maura Téllez Téllez
Integrante del CA

Edgar Martínez Fernández

Dr. Edgar Martínez Fernández
Integrante del CA

PFCE

“Los recursos de PFCE son de carácter público y queda prohibido su uso con fines partidistas o de promoción personal”

Una universidad de excelencia

RECTORIA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

a través de la

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Otorga el presente

Reconocimiento

A: Romero Cedillo Reyes Kevin, Téllez Téllez Maura

Por su participación en la presentación en CARTEL con la ponencia:

CRECIMIENTO MICELIAL DE *Armillaria* sp. SOBRE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, en la XXXII Semana de la Investigación "Dr. J. Félix Frías Sánchez", las XVII Jornadas de las Ciencias Biológicas y el IV Encuentro de Estudiantes de Ciencias Naturales.



Dra. Michelle Monterosas Brisson
Directora de la Facultad de Ciencias Biológicas

Cuernavaca, Morelos, 10 Febrero 2020

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



La Ingeniería Química, el Desarrollo Nacional
y la Responsabilidad Social

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Reyes Kevin Romero-Cedillo, Alma Rosa Agapito-Ocampo, Benjamín Amaro-Guadarrama,
Gerardo Díaz-Godínez, Maura Téllez-Téllez

Por la presentación del trabajo:

ACTIVIDAD DE LACASAS DE Armillaria sp. CRECIDO EN DIFERENTES SUSTRATOS
LIGNINOCELULÓSICOS

ID: 263

Dra. María del Rosario Enriquez Rosado
PRESIDENTE DEL AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR

Dr. Tomás Viveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

Evento virtual del 22 al 24 de octubre 2020

Cuernavaca, Morelos a 11 de mayo de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **REYES KEVIN ROMERO CEDILLO**, con el título del trabajo: **PRODUCCIÓN DE LACASAS DE ARMILLARIA SP. CRECIDO EN DIFERENTES SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MA. DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA

SECRETARIO: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

VOCAL: DRA. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

SUPLENTE: BIOL. ALMA ROSA AGAPITO OCAMPO

SUPLENTE: DR. GERARDO DIAZ GODINEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MAURA TELLEZ TELLEZ | Fecha:2021-05-11 19:08:39 | Firmante

mrylZr+RQGG7f8ckHsEZl68GDKUyQqOWbO5a7J39ZE2rT1zCYyBd8TJbBk9Ev6BAAbJ8N3og3d2ReKQoMcJkx9eq31utJirhgX93O5CQILj7NzLlcliHC+h/c5IDnINnNcjHZtgyrSJe5MnUY4fH0rvZ2sKOWqfaZ/ch3SELZpds8c+pwCOjSpWd0y2n3XiVRXDeSibAVRIZ94wzgv/eeQcJwPSJPPzVcO6Wk+et22aBs57Fi3wM7+7QZ0HNnShTcZkdSK93Q+icUR+infGU PdbVETJ0FckJbcxyvjvrLppyKVb0lbANNH2n44B7LcMvkMIW59S1xAkxt3Rhw+q6ug==

GERARDO DÍAZ GODÍNEZ | Fecha:2021-05-11 20:24:38 | Firmante

SUJvfe6zMgf7ybuxOk5EW5tVvwyVHGjbtFhP453gHurSBOMNsOc4YX1X6d0HRz8QU3L2idT0wY5pHZQe9KGTBFYXtmnsY2JTYXmamWA3gilk2RahA87D95ohtbsJRXUxfs1GuneCUum7xYuaYtcVNP5bUxceGXZsN0hIXU6iL2pcQDNGI+8ryMuMTKubcbr7p8uxAILyZjVgRlefuQdXofX9DvpROkh3lfkqCPYN6UA8kp64A9FjcRcloRVhJmF3TZIQ1ufue8vVtcsSzQnf5/Dlf63iA74h/rf6waSrkmZjvTWm6FGJrzKhvivi8QBITJkwmcnprF/zUCr+UA==

MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA | Fecha:2021-05-11 20:47:25 | Firmante

CtDluTHvVWmmwH3UaEv0MECLySEGZoVRZepL30FZdmaVcJTwbjsU0VmWFaGDthy2V7yxs2t4KS9rQpFoliFOupyt+PsQU1fOIVYuyaFV+xFahXK585+rdCVrhq/lhS4D1JuZBllP446G0PFsdY+mjpXpCu6y0wKCTDgwYKrXEVI70mQMFMD0/JX4u/SSH11OZKkkf+eviCmSdsbMvaEON1FCzFfRRp6WeAVH8etYT2cZ5HONU5kgz05BN0EciYWBSeRsid9DldUNmsCgm+jLcTDrdCuubm3Kr6VP11VvIRPb+1ALYB1yKmM7OkNKLzTDvqoqGs2qftVCyPCpBg==

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2021-05-14 12:52:20 | Firmante

QDzIOEbrFcWSqkltrr5Y50uxOjmmYbQssUr5+2tN+qEOhwuEDnkagbo8L6+sUt8ppj4Xu9HHdhedhAGtZcwGAW56q2LinY4KQsVzHejEaAPqX74XuvEZRKqsJXyJZLmIONh6/a2Z/ox471/2J2PkQ+u6rwT4GroTsoJQp9c/iYLKCIxLYUSdk8u0vz8ZCb6fZa1W2zDp45muw0+8BW1aaU5JJVnZUWK28GvYsDjJHFao1XZ/topS2iZoTTCsFX9cja1IID3OZTgE+lmKcygf7nSIC0+asCvWcmdotrH2MNJsvZZLYvD8sM1CDKB/3W+mnIMtr9n1ldDYW7KIQAQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



sqb8tQ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gwV8hEUwDqYprq3EJtvSm08SWvPBipl>

