

Cuernavaca, Morelos a 18 de noviembre 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: **J. Carmen Ortiz Morales**, con el título del trabajo: **Producción de lacasas en *Pycnoporus* HEMIM-51 en diferentes medios.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el **voto de calidad** y pueda optar por la Modalidad de **Titulación 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. MAURA TÉLLEZ TÉLLEZ

VOCAL: M. EN B. ELIZABETH CUEVAS REYES

SUPLENTE: M. EN C. MARIEL ADAME ROMÁN

SUPLENTE: DR. PABLO NOÉ NÚÑEZ ARAGÓN



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:2021-11-24 14:32:33 | Firmante

uVDvuLoXvnCCFq7+ItPzFK+M0pMcFtWMLQsglD6OhjZdFuOpvUHX5n+sIneZFSNijHIAipKZlqeqyTBNrvWlio9OD9kH5dncmeeKiZyHnFjABLFTV1PbhKbV2dz15oWixvu0vRVqN1g1AmQ9S4WDgUNKIUGO/117bDz7dcl4jCLaRqFdueSRcLpNmimggZtP/gmyUz6BYCO4N43zkHC4JIKVekt+4470iyK13f42ZtXjgPPTZDQZYLNE19oGvvrnk4/niK3fsBi+ZH3jdMAP3DyAlWK7hYpeWoF+wMmBu5rHYJDFw+SREUu6HU3ATfPABvWK6ctFoW38jav4m9CGSA==

ELIZABETH CUEVAS REYES | Fecha:2021-11-24 23:20:50 | Firmante

mWpdX3YBeaSjRwSAvw3ZiH00aFRoCccU8/FPRoX4ctxoQbQz/ik1EA0euYrAmZVPLTKClqpFvg67dJouplqRi74XiWnwj9o4Wpelrr5tAotHo0MOy1PBdZiTLyJztGHGfKOpMAqbX0Cs6SQYT41A3vtAPAFd40yC+rGTD/R3SjFSNI3iYdckdrXlvm36B7/oHH0D9KDPaWOVGKhaAwATfmJepuM78fAS3v6DBnSwjBvp4eKyx6Zpp79r8OChLLf/PoylHF8cyN5Y0chlPVObhKcJbqxdw2nhNTYzIgrtk7X6TeMqKqkHBRjddaD/ddSsn1aH2KDNsXGM/Rcw==

MA DE LOURDES ACOSTA URDAPILLETA | Fecha:2021-11-25 09:58:56 | Firmante

IJga4SoeHgUV2sY50Pu70LI8OHix0vQvSipk0IOHjXulBGJ3uJ8QxcDEL8j2KIIT4GiBwXah3Q+KrmV2B5pBCnICCAAUxlgFvgqVe6ZjOx8sy2E9BYeaGyVSfRC+pcH5Nsp6IB103E3yP3trhCnRMdJ8p9VOp2kRtQxsLKiy5HRfmufssn2W0I48Jvpz4r15k/QMuUVSjHt8tseX4BuHmRQBXTWf7EHPdwihIP/83f9DXCRZljatZd8KqzndHiDF7d4N8NiHHKwExosVC9T60GuTm/nZYhXvcgFglmHfhZ9z4NRU6058e3Bpbx/onfXlg3G33xXzbKyUDGdtFS9Q==

MARIEL ADAME ROMÁN | Fecha:2021-11-25 13:08:52 | Firmante

I/W4TL+7WqNfnAgDdy9h6u0ID9Qnjg7aVQUPYIh4SjFvJMd5klt+FZEzNw39kRjGrBYFLYXwqFfls45RPv3z6GvZxzUTxe5ppq/tuem0kpUmn4tgUR4Z0kPtaWYpm0y8Aw+cbgGGjvPuPe62tK5viJc9gfOx8c7DKcMuvFpukLdvsDIL0Im6vRPXhAktdc5icDNICv56/NZIQFszZ6mIlbWkTw3vOJT/KJHnqwxp1j5ey0Emd3HNoClcqR35q7GheWyD3nrPLMuW485XunKG4L5RlpUdBk5r02mQ6Q9vNw3FS2shpzWMCi3OYq2wvOfzuvJpMCgH4x1hQMGgvRiGQ==

PABLO NOÉ NUÑEZ ARAGÓN | Fecha:2021-11-25 22:38:17 | Firmante

BOQj8rP76znYe4AbJdfZPI5DDqsDpztWmHoK3laoRhTz9yRBtbpGRyO5BMHWA/ITOGqQHU/wSjmmRMihZOYInggAZ2vmVH4arO7fMu2X2s6P6+1B9wL6FsQraTG9UDReUQOzBko4nzvSTthyHMunB2CPXgF9df6zq6JVMLdQ+SeauV0kRvUobqesr17bdckK3lpjxi3r6pifM6+K2bz3UfPsaqYSM5eb0kbVX1DFBllwxl/1191N7Z18thiLsxiEg94FxZ7NfeGWGIhemHaDizrOly4zrmQLfKQx1jy7rYC2I+xc4UFQoView0D+17ZuGstJkq4YAfxfvifsoQ==

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



B5uQqDEpC

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JgUYHo0B9VYxHP0JfB46HkYm3vwSEJ96>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Producción de lacasas en *Pycnoporus* HEMIM-51 en
diferentes medios.**

**TESIS PROFESIONA POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

BIÓLOGO

PRESENTA:

J. CARMEN ORTIZ MORALES

CODIRECTORES DE TESIS:

**M. en B. ELIZABETH CUEVAS REYES
DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL**

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2021

Dedicatoria

A todas las personas que contribuyeron para que pudiera lograr uno de mis mayores objetivos en la vida.

Principalmente a mis padres que me alentaron a lo largo de mi trayecto y apoyaron incondicionalmente y siempre creyeron en mí.

INDICE

1.	Introducción.....	3
1.1.	Posición taxonómica de los basidiomicetos.....	4
1.2.	Características de los hongos del género <i>Pycnoporus</i>	7
1.3.	Descripción enzimática de las lacasas.....	8
1.3.1.	Estructura bioquímica de las enzimas lacasas.....	9
1.3.2.	Sitios catalíticos de las enzimas lacasas.....	10
1.3.2.1.	Sitio 1 o T1.....	10
1.3.2.2.	Sitio 2 y 3 o T2/T3.....	10
2.	Antecedentes.....	11
2.1.	Cultivo del hongo del género <i>Pycnoporus</i>	11
2.1.1.	Cultivo en medio sólido.....	12
2.1.2.	Cultivo en medio líquido.....	13
3.	Justificación.....	17
4.	Hipótesis.....	17
5.	Objetivos.....	17
5.1.	General.....	17
5.2.	Particulares.....	17
6.	Materiales y métodos.....	18
6.1.	Cepa de <i>Pycnoporus</i> sp. HEMIM-51.....	18
6.2.	Medios de cultivo para <i>Pycnoporus</i> sp. HEMIM-51.....	18
6.3.	Crecimiento radial.....	18
6.4.	Fermentación de <i>Pycnoporus</i> sp. HEMIM-51.....	19
6.5.	Obtención del extracto crudo y biomasa.....	19
6.6.	Actividad enzimática de las lacasas.....	19
6.7.	Zimogramas de lacasas.....	20
6.8.	Determinación de proteína total.....	20
6.9.	Análisis estadístico.....	21
7.	Resultados y discusión.....	22
7.1.	Determinación de crecimiento radial.....	22
7.2.	Determinación de biomasa y obtención de extracto crudo.....	25
7.3.	Actividad enzimática lacasas.....	27
7.4.	Zimografía de lacasas.....	28
7.5.	Determinación de proteína total.....	30
8.	Conclusión.....	32
9.	Perspectivas.....	32
10.	Referencias.....	33
11.	Anexos.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los hongos en México (Recuperado de https://rb.gy/monjcm).....	3
Figura 2. Anatomía general de un hongo macroscópico. (Recuperado de: https://rb.gy/gqyvbl).....	4
Figura 3. Desarrollo hemiangiocárpico (Recuperado de: https://rb.gy/leqjus)	5
Figura 4. <i>Pycnoporus</i> sp. Creciendo sobre un tronco caído. (Recuperado de: https://rb.gy/q3okc6).....	7
Figura 5: Estructura del ácido cinabarinico, tremesanguina y cinnabarina (Cuevas, 2016)	8
Figura 6. Método de óxido-reducción de las lacasas.....	10
Figura 7. Representación de una lacasa y su centro trinuclear.	11
Figura 8. Crecimiento de la cepa <i>P. HEMIM-51</i> al día 1, 4 y 7, en medio MMC	22
Figura 9. Crecimiento radial por día de <i>Pycnoporus</i> sp. HEMIM-51.	23
Figura 10. Crecimiento de la cepa de <i>Pycnoporus</i> sp., HEMIM-51 día final. ...	24
Figura 11. Fermentación medios líquidos: A) HEMIM-51 v/s B) HEMIM-53. ...	25
Figura 12. Zimograma de lacasas extracelulares de <i>Pycnoporus</i> sp., HEMIM-51 y HEMIM-53 en los medios de cultivo optimizados 17, 23 y 24.	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Posición taxonómica del género <i>Pycnoporus</i>	6
Tabla 2: Comparativo entre medios de cultivo	15
Tabla 3: Actividad de lacasas de <i>Pycnoporus</i> sp., en diferentes medios.....	15
Tabla 4: Composición de los medios de cultivo optimizados	18
Tabla 5: Comparación de velocidad de crecimiento radial	24
Tabla 6: Diferencia de producción de biomasa.....	26
Tabla 7: Comparación de actividad enzimática entre cepas HEMIM	28
Tabla 8: Proteína de total de cepas HEMIM.....	30
Tabla 9: Medio MTT	37
Tabla 10: Medio PDA	37
Tabla 11: Medio HIT.....	37
Tabla 12: Compuestos del gel separador	38
Tabla 13: Compuestos del gel concentrador	38
Tabla 14: Diluciones para la determinación de proteína total.	39
Tabla 15: Análisis de varianza de un factor.....	40
Tabla 16: Análisis de varianza	41
Tabla 17: Tukey hsd/kramer.....	41
Tabla 18: Q TEST	41

ABREVIATURAS

°C:	Grados Celsius
2,6-DMP:	2,6-Dimetoxifenol
3-HAA:	Ácido 3-hidroxiantranílico
µL:	Microlitros
ABTS:	2-2-bis-azino (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ([por sus siglas en inglés: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]).
A.C:	Ácido Cinabarinico
Abs:	Absorbancia
Eº:	Potencial normal de electrodo
E.C:	Extracto crudo
EPR:	Resonancia paramagnética electrónica
g/L:	Gramos por litro
HEMIM:	Herbario Micológico de Morelos
HIT:	Medio harina integral de trigo
kDA:	Kilodalton
L:	Litros
MTT:	Medio de cultivo Téllez-Téllez
m/L:	Miligramos por litro
mM:	Milimolar
mg/mL:	Miligramo por mililitro
mL:	Mililitro
mm:	Milímetros
nm:	Nanómetros
PDA:	Agar dextrosa papa
pH:	Potencial de hidrogeno
Rpm:	Revoluciones por minuto
Sp:	Especie
Spp:	Especies
U/L:	Unidad enzimática por litro
UT:	Unidades Totales

RESUMEN

Los hongos del género *Pycnoporus* son organismos versátiles dentro de la división de los basidiomicetos debido a las capacidades de degradar una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos. Esto debido a la variedad enzimática que poseen, por lo que son cultivables en una diversa gama de sustratos lignocelulósicos y medios de cultivo sólidos y líquidos. *Pycnoporus* es un hongo de importancia biotecnológica debido a que es productor de diferentes metabolitos y pigmentos, como el ácido cinabarinico, con importancia biotecnológica en áreas como farmacéutica, textil, cosmética, alimentaria, entre otras más. El ácido cinabarinico, la cinnabarina y tramesanguina, son sintetizados a partir de dos moléculas de ácido 3-hidroxiantranílico, dicha síntesis es mediada por una lacasa. Debido a la importancia de las lacasas para la producción de diferentes alcaloides, se utilizó a la cepa de *Pycnoporus* HEMIM-51 para la producción de lacasas, empleando los medios de cultivo llamados: 17, 23 y 24. Entre los tres medios varía la concentración de glucosa, extracto de levadura y CuSO_4 , los medios fueron utilizados tanto en estado sólido como líquido. Para la caracterización se midió el crecimiento micelial en medio sólido y la producción de biomasa y la actividad de lacasas en medio líquido. Los resultados indican que el mayor crecimiento radial fue en el medio 17, con crecimiento promedio de 7.56 mm en un total de 7 días en caja de Petri, mientras en el medio líquido se presentó una producción máxima de biomasa de 6.381 g/L en un total de 15 días de fermentación, en líquido la actividad enzimática más alta fue en el medio 23 con 32,584 U/L, dicho medio fue el que presentó el bandeo con mayor intensidad al momento de revelar los zimogramas con 2,6-DMP, seguido por el medio de cultivo 24, donde se presentó la segunda actividad enzimática más alta con 29,117 U/L. En lo que fue el medio 17 se pudo obtener la cantidad de proteína total más alta con 1.1435×10^{-7} g/L, determinado por el método de Bradford, seguido por el medio 23 con un total de 8.554×10^{-8} g/L.

Los diferentes ensayos que se llevaron a cabo permitieron determinar que el medio 17 es un medio adecuado para el desarrollo de la cepa de *Pycnoporus* HEMIM-51 para la producción de biomasa y para la producción de lacasas el medio 23. Estos medios podrían ser utilizados para la producción de enzimas o pigmentos para su posterior uso en áreas biotecnológicas, médicas y ambientales.

1. Introducción

Los hongos son organismos eucarióticos caracterizados por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas constituidas por una sección de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen el micelio (Guarro, 2012). El reino de los hongos representa uno de los más grandes acervos de biodiversidad con actividades ecológicas cruciales en todos los ecosistemas (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). Debido a que sin ellos la acumulación de residuos orgánicos formaría enormes cementerios de cadáveres vegetales y animales, produciendo grandes trastornos en la naturaleza (Gómez, 2017). En México existe una gran diversidad fúngica, con una observación de 13,803 ejemplares y 169 diferentes especies (Figura 1), su gran riqueza se debe a que está ubicado entre las grandes regiones del Neoártico y Neotrópico. Desde 1994, se demostró que la vegetación tropical, incluyendo la subtropical, es la más rica en especies micológicas (Guzmán, 1995).

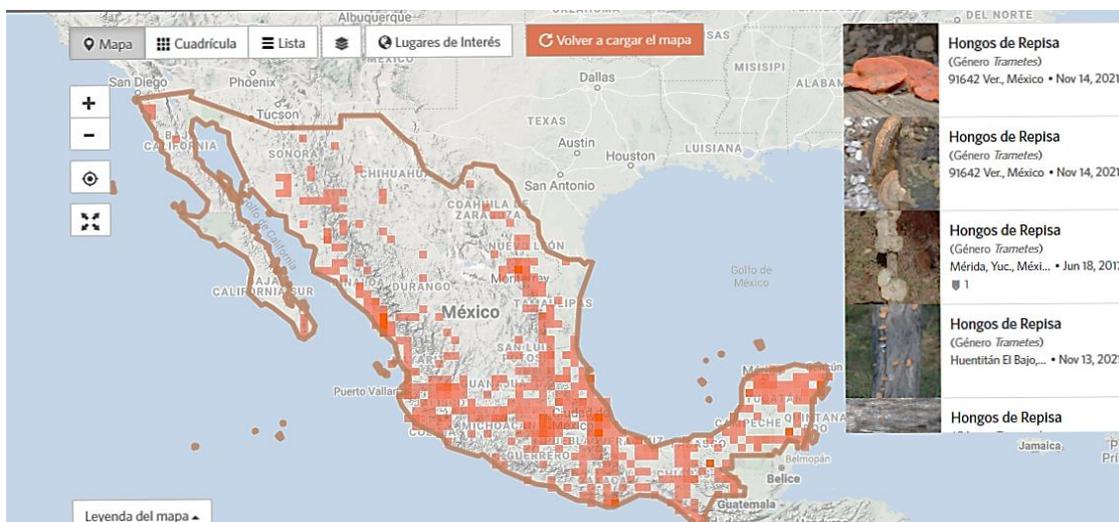


Figura 1. Distribución de los hongos en México (Recuperado de <https://rb.gy/monjcm>)

Estos organismos no pertenecen al reino de las plantas, ni animales, sino que están agrupados en un reino aparte, el reino de los hongos de acuerdo con Lynn Margulis. (Kuhar *et al.*, 2013).

Los hongos son organismos heterótrofos, dependientes de otros organismos para obtener alimentos. El cuerpo vegetativo puede ser unicelular o estar compuesto por filamentos (hifas), que está conformado por lo que es una volva, seguido por el pie el cual es el sostén del sombrero, donde se encuentran las láminas las cuales a su vez almacenan los basidios y las basidiósporas y son de crecimiento apical,

en la Figura 2, se muestra un diagrama general de la anatomía típica de los hongos basidiomicetos, sin embargo, no todos los hongos tienen exactamente la misma estructura (Sánchez *et al.*, 2011). El reino de los hongos tiene aproximadamente 103 órdenes, 484 familias, 1,979 géneros y unas 100,000 especies descritas. Se divide en cuatro grupos o *Phylum*: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota*.

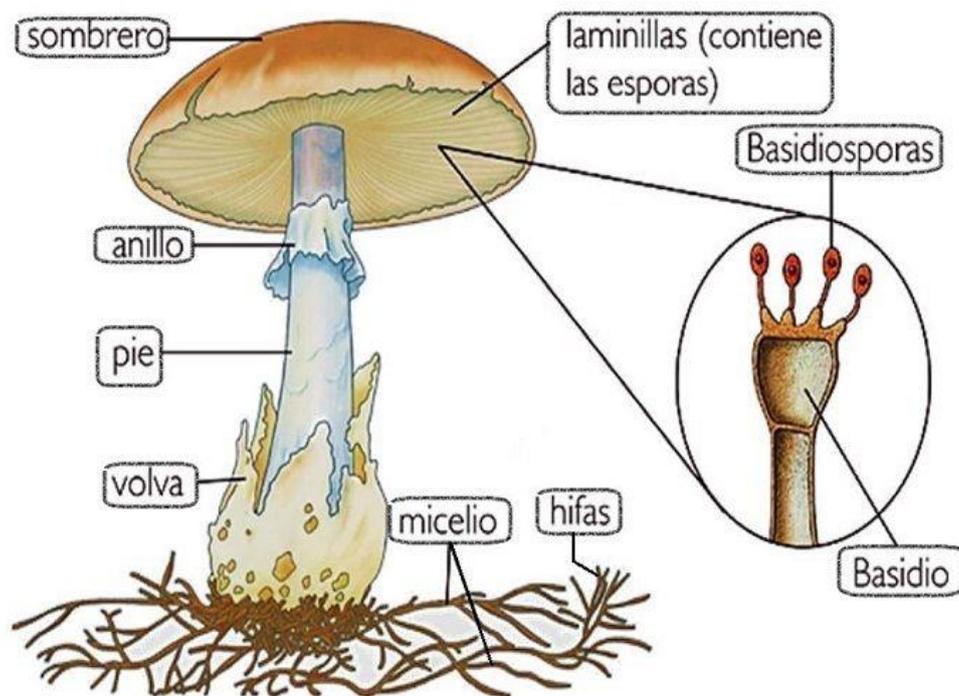


Figura 2. Anatomía general de un hongo macroscópico. (Recuperado de: <https://rb.gy/gqyvbl>)

El *Phylum* de los Basidiomycota, constituye un grupo de hongos que reúnen más de treinta mil especies. Estos hongos son considerados superiores por su complejidad morfológica y la presencia de basidios, característica principal que define su identificación y clasificación taxonómica (Ramírez, 2013).

1.1. Posición taxonómica de los basidiomicetos.

Dentro de los *Basidiomycota*, está la clase *Hymenomycetes*, que pueden ser *gimnocárpicos* (con un cuerpo fructífero que se abre desde etapas tempranas de su desarrollo para exponer la capa fértil que produce esporas) o

hemiangiocárpico (comienzan con una morfología angiocárpica que después se vuelve gimnocárpica) como puede destacarse en la Figura 3.

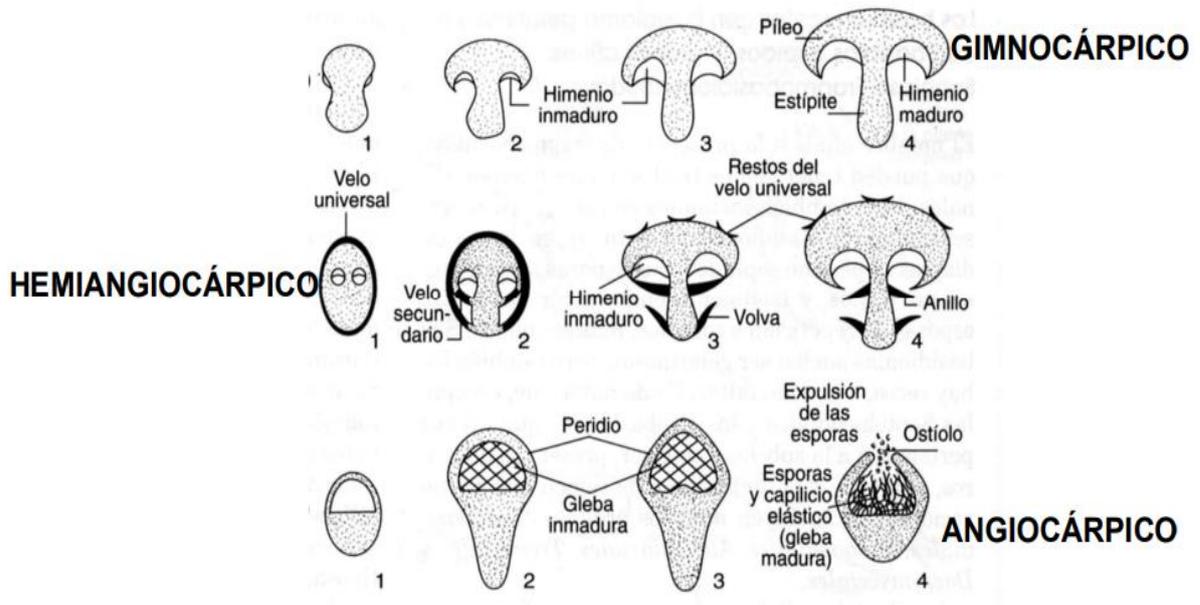


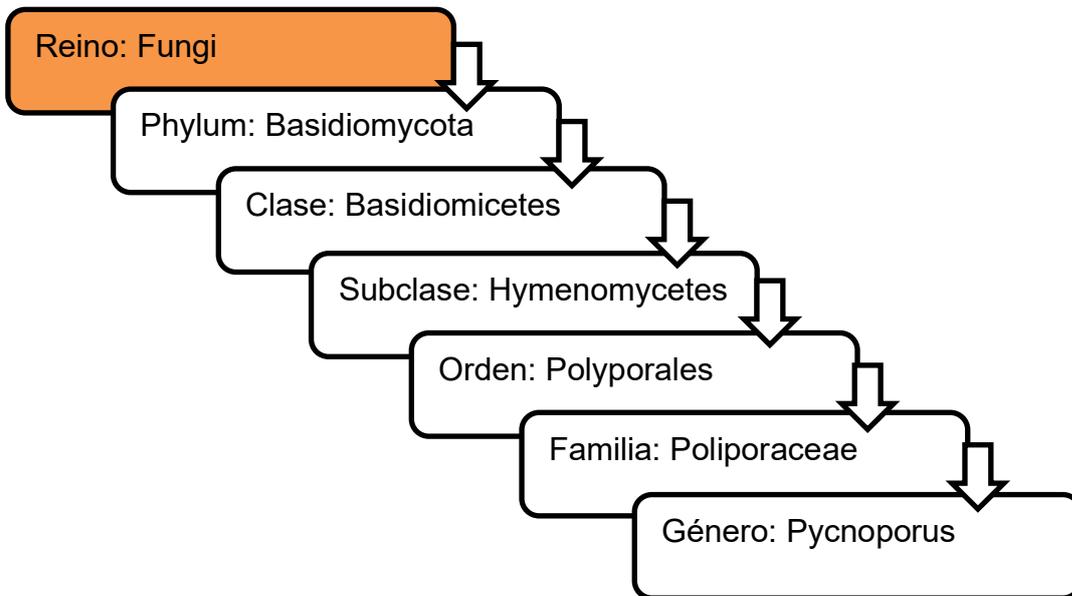
Figura 3. Desarrollo hemiangiocárpico (Recuperado de: <https://rb.gy/leqjus>)

Los hongos poseen un himenio que se puede formar como una capa plana sobre la superficie de la planta hospedera, o dentro de los cuerpos fructíferos o basidiocarpos, caso en el cual se encuentran dispuestos en poros o alveolos, en tubos, sobre dientes o agujijones, o sobre láminas.

En la clase *Hymenomyces* se encuentra el orden *Aphylliphorales*. La mayoría de estos hongos crecen sobre cortezas o madera, de la que extraen sus alimentos. Es un grupo heterogéneo que incluye hongos de tipos muy diversos como son los *cantharellus*: los hongos en forma de costra y de repisa o ménsula; los hongos dentados, y los hongos claviformes, los *coralloides* y los semejantes a la coliflor. Dentro del orden *Aphylliphorales* se encuentra la familia *Polyporaceae* (Tabla 1), que incluye a un gran número de especies generalmente en forma de costra y de repisa, pero también comprende a formas de abanico y de seta. El nombre de la familia alude a la característica del himenóforo casi siempre poroso. Los poros por su forma según los géneros y las especies pueden ser circulares o alargados, cuadrangulares o poligonales; generalmente quedan situados en la parte inferior de la fructificación, por ejemplo, en las formas de repisa, o debajo del píleo en las que semejan las setas; pero a veces están dispuestas hacia arriba, en formas

aplanadas o extendidas sobre sustratos, a manera de costra, las cuales reciben el nombre de resupinadas (Sánchez *et al.*, 2011).

Tabla 1: Posición taxonómica del género *Pycnoporus*



Dentro de la familia de los *Polyporales*, se encuentra el género *Pycnoporus*, un hongo silvestre, este crece en bosques sobre troncos caídos, asoleados o quemados, principalmente en climas tropicales y subtropicales; el hongo produce diversos metabolitos (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2016) con importancia biotecnológica, en áreas industriales como: blanqueado de papel, clarificado de jugos y vinos, textil, farmacéutica e inclusive en biorremediación. Este hongo tiene una característica muy particular que es su coloración rojo anaranjado intenso que se lo confieren fenoxazinas como el ácido cinabarínico, Tramesanguina, entre otros. La morfología se puede apreciar en la Figura 4, *Pycnoporus* tiene un crecimiento flabeliforme o en forma de abanico, consistencia corchosa, prolifera sobre madera muerta, troncos caídos o quemados (Sánchez *et al.*, 2011).



Figura 4. *Pycnoporus* sp. Creciendo sobre un tronco caído. (Recuperado de: <https://rb.gy/q3okc6>)

1.2. Características de los hongos del género *Pycnoporus*

Pycnoporus spp. ha sido estudiado principalmente por su capacidad para degradar lignina (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010). Estos hongos tienen la característica de ser de lento crecimiento, saprófitos. (Carrillo, 2017). A principios de 1990 el hongo *Pycnoporus* se perfiló como una alternativa para la obtención de enzimas y metabolitos secundarios de interés biotecnológico (Pineda-Insuasti *et al.*, 2017).

Los pigmentos que produce *Pycnoporus* confieren la tonalidad rojo-anaranjado intenso, característicos del cuerpo fructífero, algunos de estos alcaloides como los antes mencionados: el ácido cinabarinico, cinnabarina y tremesanguina, los cuales tienen estructura heterocíclica también conocidos como fenoxazinas, son pigmentos que poseen actividad antiinflamatoria, antioxidante, antiviral, insecticida, antifúngica y antimicrobiana, etc (Días *et al.*, 2009; Carrillo, 2017). Estos pigmentos son derivados de dos moléculas de ácido 3-hidroxi-antranílico formando una estructura heterocíclica, la cual vamos a diferenciar por la composición de sus diferentes grupos R, como se muestra en la imagen (Eggert, 1997).

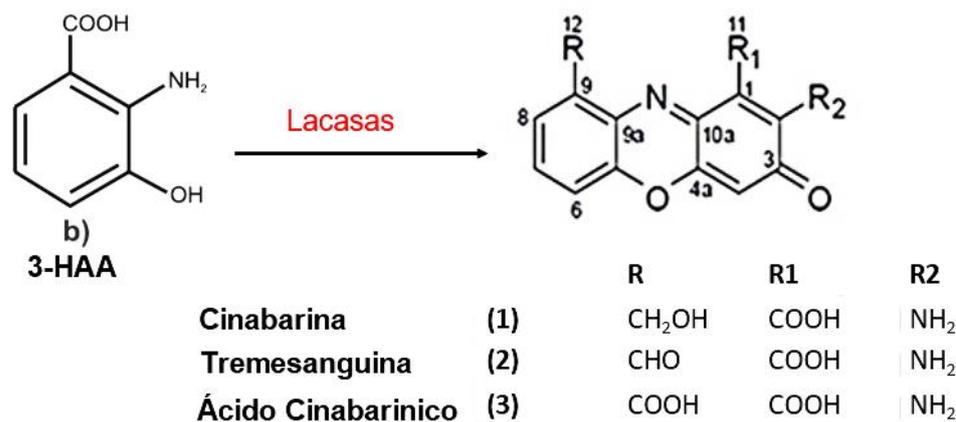


Figura 5: Estructura del ácido cinabarinico, tremesanguina y cinnabarina (Cuevas, 2016)

Pycnoporus es causante de la pudrición blanca, es un organismo capaz de degradar eficientemente la lignina hasta su completa mineralización. Este proceso se debe a que estos hongos poseen un sistema enzimático que oxida la lignina dando paso a moléculas más sencillas. Las enzimas ligninolíticas descritas hasta el momento son: manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa, peroxidasa versátil (comparte propiedades catalíticas con las dos anteriores) y lacasas (Mouso, 2003). Por lo anterior, *Pycnoporus* es un hongo con potencial biotecnológico por los pigmentos y enzimas que producen como las lacasas, capaces de degradar la lignina (Cruz *et al.*, 2015).

1.3. Descripción enzimática de las lacasas

Las lacasas (benzonodiol: dioxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) son enzimas, que tienen la capacidad de reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de H₂O (Ramírez, 2003). Las lacasas son producidas por hongos, bacterias y plantas macroscópicas. De manera que la función de las enzimas lacasas varía según su procedencia. En las plantas, la enzima participa en la síntesis de la lignina, por otro lado, en los hongos les confiere la capacidad de oxidar un sinnúmero de compuestos como: orto, paradifenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, lignina, aril-diaminas y algunos otros iones inorgánicos (Arana, 2002; Couto, 2006). Las lacasas cumplen un papel importante en la madera y la delignificación de la pulpa (Ramírez, 2003).

Las lacasas son proteínas con actividad enzimática conocida y estudiada desde finales del siglo XIX. Se describieron por primera vez en el látex del árbol *Toxicodendron vernicifluum* lo que dio origen al nombre de la enzima (del latín medieval *lacca* = laca o barniz). Más tarde se descubrió su presencia en los hongos y actualmente se sabe de su existencia en insectos, bacterias y arqueas, lo que demuestra su amplia distribución en la naturaleza, así como su implicación en múltiples procesos biológicos (Moya, 2011).

Las lacasas cuentan con actividad fenoloxidasa que catalizan la oxidación de diferentes sustratos fenólicos y no fenólicos mediante la transferencia de un electrón, resultando en la formación de radicales libres, lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, despolimerización, metilación y/o desmetilación de este tipo de compuestos (Arana *et al.*, 2002; Díaz, 2012).

La lacasa tiene un peso aproximado de 60-70 kDa, con un punto isoeléctrico ácido de pH 4.0 y con un óptimo de actividad entre 50°C y 70°C. Una característica importante es la glicosilación de las lacasas, ya que es la responsable de la estabilidad estructural de la enzima, además se ha encontrado que la protege de la proteólisis causada por radicales libres (Román *et al.*, 2010).

1.3.1. Estructura bioquímica de las enzimas lacasas

Las lacasas fúngicas poseen tres dominios similares a cupredoxina y presentan cuatro átomos de cobre que forman los centros T1, T2 y T3 típicos de las oxidasas multicobre (Moya, 2011). Los centros del cobre pueden ser clasificados en función de sus características espectrofotométricas y paramagnéticas. Por ejemplo, el cobre Tipo 1 o T1 presenta una intensa absorción a 660 nm lo que confiere el color azul característico de las lacasas, El cobre de Tipo 2 o T2 sólo presenta una débil absorción en la región visible, por otro lado, muestra afinidad por iones como F⁻ (ion fluoruro), N⁻³ (nitruro) y CN⁻ (anión de cianuro), los cuales actúan como inhibidores de la enzima. Los núcleos T1 y T2 pueden ser detectados por resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés). El cobre Tipo 3 o T3 está formado por dos átomos de cobre acoplados y presenta un máximo de absorción a 330 nm (Moya, 2011).

1.3.2. Sitios catalíticos de las enzimas lacasas

1.3.2.1. Sitio 1 o T1

El cobre T1 de las lacasas está coordinado con el átomo de azufre de una cisteína (Cys) y con dos nitrógenos procedentes de dos histidinas (His). Debido a su elevado potencial, es ahí donde tiene lugar la oxidación del sustrato, siendo transferidos a continuación los electrones a través del tripéptido conformado por His-Cys-His, hacia el centro trinuclear, donde tiene lugar la reducción del oxígeno a agua como se puede observar en la Figura 6. El sitio T1 se localiza en una cavidad a 7 Å por debajo de la superficie de la enzima que hace posible su papel como aceptor primario de electrones; con un potencial que varía entre 420 y 790 mV, frente al electrodo normal de hidrógeno (NHE). En este sentido, las lacasas son clasificadas en función de dicho valor como lacasas de alto potencial redox (E° superior a 710 mV), medio potencial redox (entre 470 y 710 mV) o bajo potencial redox (inferior a 470 mV) (Román *et al.*, 2010; Moya, 2011).

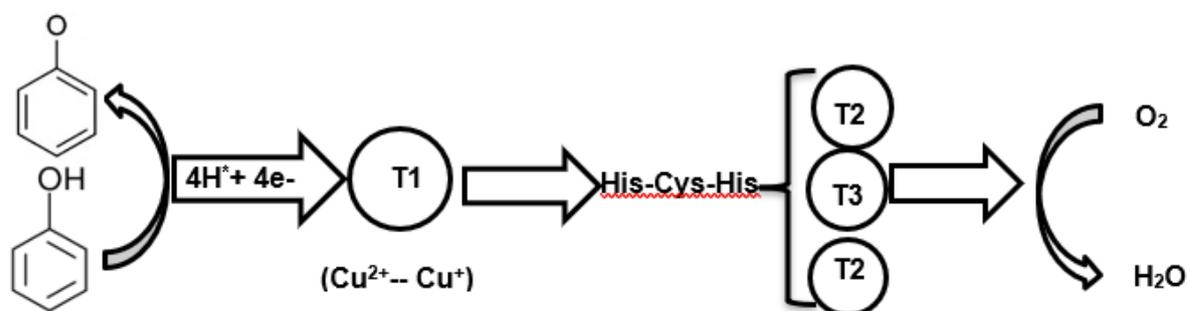


Figura 6. Método de óxido-reducción de las lacasas.

1.3.2.2. Sitio 2 y 3 o T2/T3

Los cobres T2 y T3 forman un centro trinuclear cuyos ligandos son átomos de nitrógeno correspondiente a ocho histidinas, las cuales se disponen según un patrón muy conservador.

El sitio activo es un centro trinuclear (Figura 7) donde tiene lugar la reducción del oxígeno molecular mediante un mecanismo. Este se inicia con el paso de la enzima a un estado completamente reducido cuando recibe cuatro electrones del sustrato. En ese estado, 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 (Moya, 2011). Por el contrario, en ausencia del sustrato pasa lentamente al estado de reposo oxidado, en el que uno de los átomos del 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. Al parecer las cargas aniónicas que rodean al centro trinuclear en la forma reducida, contribuyen a estabilizar su elevada carga positiva lo que a su vez facilita la reactividad con oxígeno (Moya, 2011).

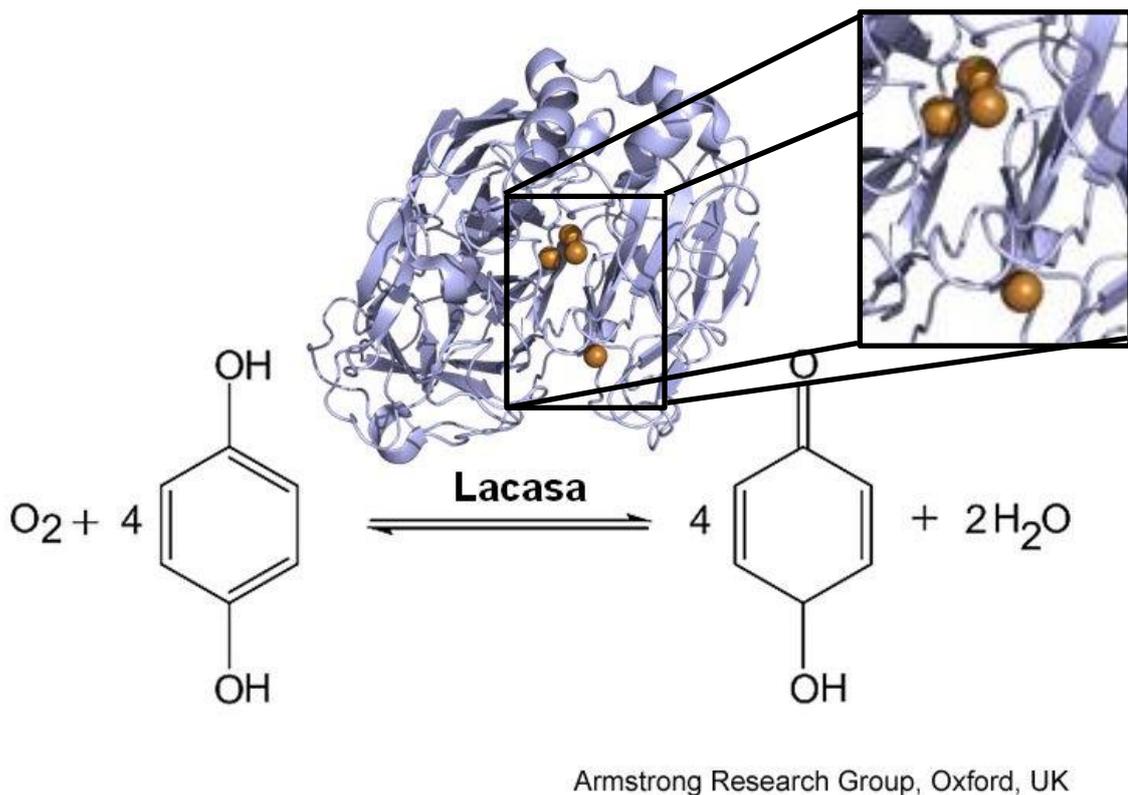


Figura 7. Representación de una lacasa y su centro trinuclear.

2. Antecedentes

2.1. Cultivo del hongo del género *Pycnoporus*

Debido a la gran capacidad catalítica de sus núcleos como bien se ha mencionado anteriormente las lacasas pueden tener un gran potencial en el ámbito biotecnológico, como también ser una alternativa para la industria alimentaria, petroquímicas, textil, cosmética, farmacéutica, blanqueado de papel, en el ámbito

de biorremediación de suelos, efluentes, y en la síntesis química (Couto, 2006). Lo que ha llevado a varios investigadores a interesarse por estas enzimas, lo que los ha llevado a utilizar diversos medios de cultivo tanto sólidos como líquidos para la producción enzimática.

2.1.1. Cultivo en medio sólido

Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) demostraron que la cepa HEMIM-51 fue capaz de crecer a nivel micelio sobre todos los sustratos (granos de trigo, paja de avena, aserrines de encino y pino) evaluados con micelio denso y de coloración blanca. El aserrín de pino fue el mejor sustrato para producir lacasas, ya que se obtuvieron 5 U/g de sustrato, 1.8 U/mL, 1,750 UT, las resinas y lignina contenidos en el aserrín de pino puede ser un factor que induce la producción de lacasas.

Cruz *et al.* (2015), reportaron la evaluación del crecimiento y producción del pigmento de *P. sanguineus* en 5 medios de cultivo sólidos como: agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (EMA), agar harina integral de trigo (HIT), agar extracto de casuarina (ECA) y agar extracto de mango (EMaA). A un pH de 7.0, 8.0 y 9.0, para los cuales se usaron basidiocarpos del hongo obtenidos de material vegetal en descomposición de árboles de casuarina (H1) y mango (H2). El estudio duro 30 días y se determinaron las condiciones de crecimiento y producción del pigmento del hongo. Para el crecimiento de H1 se reportó un crecimiento radial de 6.1 mm por día a pH 8.0, mientras que para pH 7.0 tuvo una velocidad de crecimiento de 4.8 mm y para pH 9.0 se tuvo un crecimiento de 4.6 mm en el medio de extracto de casuarina. Para H2, se obtuvo un crecimiento radial de 6.1 mm a pH 7.0 y un crecimiento de 4.6 mm para los pH de 8.0 y 9.0 en el medio extracto de mango. Se determinó que esto se debe a la afinidad por las fuentes de donde ellos fueron aislados. A pesar de que *Pycnoporus* crece en medio sólido y líquido. El medio líquido ha resultado más eficiente en la producción de lacasas, por lo que las comparaciones de acuerdo con Solís-Oba *et al.* (2007), reportaron 8600 U/L y 0.37 U/mg de actividad enzimática de la lacasas. Es importante mencionar que las determinaciones de actividad se realizaron con siringaldazina y de ABTS a una concentración de 5 mM.

2.1.2. Cultivo en medio líquido

Dantán-González *et al.* (2008), aislaron una cepa de *Pycnoporus sp. sanguineus* (HEMIM-51) de un sitio contaminado por petróleo en un área tropical en Veracruz, México. Donde *Pycnoporus sp.* HEMIM-51 se inoculó en matraces de 125 mL que contenían 75 mL de medio de cultivo de Bran flakes. La composición del medio de cultivo de salvado de trigo es: 3% de hojuelas de salvado Bran flakes Kelloggs® molidas, en buffer de fosfato 60 mM a pH 6. Una vez inoculado se incubado a 28 °C durante, 200 rpm por 14 días. La actividad de lacasa fue monitoreada diariamente por oxidación de 1 mM de ABTS en buffer de acetato (pH 4.5). La mayor actividad enzimática se determinó al día 7 con 6000 U/L, aunque se detectaron niveles considerables de actividad enzimática hasta el día 14 con alrededor de 4000 U/L

Valeriano *et al.*, en el 2009, reportó el efecto de diferentes concentraciones de etanol y 2,5-xilidina en el crecimiento y producción de lacasas por *P. sanguineus*, donde el medio que contenía 200 mg/L de 2,5-xilidina y 50 g/L de etanol produjo la máxima actividad de lacasa que fue de 2,019 U/L, siendo la 2,5-xilidina un mejor inductor para esta enzima.

Acosta-Urdapilleta *et al.* (2010) utilizó la cepa de *Pycnoporus sp.* HEMIM-51 en un medio líquido que contenía 3% de medio de cultivo de bran flakes (peso/volumen), en donde obtuvo la máxima actividad enzimática de lacasas a 28 °C, en el día 5, con 6000 U/L. Se determinó que la producción de lacasas cesa a 46 °C, esto puede deberse a estrés en el hongo al aumentar la temperatura, lo que ocasiona que incremente el tamaño del micelio y esto a su vez provoca que la producción enzimática de lacasa cese.

En el día 7 se observó un incremento de 4400 U/ L con la misma tendencia a todas las temperaturas estudiadas. El tamaño del micelio a 28 °C fue de 1.0 mm de diámetro, mientras que, al aumentar la temperatura a 46 °C, este aumentó 10 mm, lo que indicó un estrés debido al aumento de la temperatura y una disminución en la actividad, lo que indica que el óptimo de crecimiento y de producción enzimática radica en una temperatura de 28 °C (Acosta-Urdapilleta., *et al.*, 2010).

Mientras tanto dentro del grupo de trabajo y reportado por Guadarrama (2016), utilizando *Pycnoporus* sp. HEMIM-53 sembrado en diferentes sistemas de fermentación en el medio MTT, se produjo A.C, el cual es sintetizado con ayuda de las lacasas. Utilizando el A.C producido se realizó el ensayo de susceptibilidad bacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*, dando resultados positivos inhibitorios contra dichos organismos.

Amezcuca, en el 2016 empleando la cepa de *Pycnoporus* sp., HEMIM-51, analizó la actividad enzimática en el medio MTT (Téllez-Téllez *et al.*, 2008). Para la determinación de actividad enzimática de lacasas utilizó 2,6-DMP como sustrato en buffer a pH 4.5 y 6.5, donde la máxima actividad de lacasas se presentó a pH 4.5 con buffer de acetatos al día 14 con una actividad de 54,000 U/L, en cambio en el buffer de fosfatos a pH 6.5 presentó una actividad enzimática de 2,600 U/L en el día 12 de la fermentación.

Por otro lado, López en el 2016, de igual modo utilizando el medio MTT (Téllez-Téllez *et al.*, 2008), pero empleando la cepa de *Pycnoporus* sp., HEMIM-74, determinó la actividad de las lacasas producidas en el medio, utilizando como sustrato 2,6-DMP en buffer de acetatos a pH 4.5 y de fosfatos a pH 6.5. Dando como resultado la mayor actividad enzimática a pH 4.5 con 17,890 U/L, mientras que en buffer de fosfatos pH 6.5 fue mucho más baja, resultado una actividad de 1,800 U/L, en lo que se concluye que la mayor actividad de lacasas se lleva de manera más eficiente en buffers ácidos, como el de acetatos a un pH 4.5.

En la investigación realizada por Cuevas en el 2017, se optimizó el medio de cultivo para *Pycnoporus* HEMIM-53 para la producción de metabolitos de interés biotecnológico. El medio de cultivo se basó en la composición del medio MTT (Téllez-Téllez *et al.*, 2008), la composición final del medio es la que se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Comparativo entre medios de cultivo

Componentes	Medio MMT (Téllez-Téllez <i>et al.</i> , 2008)	Medios modificados por Cuevas, 2017 (MMC)
	g/L	
Glucosa	10	1-12
Extracto de levadura	5	2-15
K ₂ HPO ₄	0.4	0.4
KH ₂ PO ₄	0.6	0.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5
CuSO ₄	0.25	0.01-1
pH final 6.5.		

Para poder medir la respuesta que tiene la composición y las concentraciones de los componentes del medio de cultivo sobre la producción de metabolitos y lacasas en *P. cinnabarinus* HEMIM-53, se utilizó un diseño factorial 2^k, teniendo K=3 variables, las cuales fueron: fuente de carbono (glucosa), nitrógeno (extracto de levadura) e inductor de lacasas (CuSO₄), dando como resultado 24 diferentes medios. De los 24 medios de cultivo, el medio 23 fue el óptimo para la producción de A.C, obteniendo 3.4 µg/mL. Mientras que el medio número 24 obtuvo el mayor rendimiento del hongo ya que se obtuvo 6.4 g/L de biomasa y 519,500 U/L de lacasas. Finalmente, el medio 17 tuvo el mayor rendimiento de 3-HAA con 1.2 mg/mL.

En la tabla 3, se observa un comparativo entre cepas HEMIM, medios de cultivo y sus rendimientos obtenidos de metabolitos y enzimas, en algunos casos únicamente se reportan actividad enzimática.

Tabla 3: Actividad de lacasas de *Pycnoporus* sp., en diferentes medios

Cepa	Medio de cultivo	Ácido cinabarínico (µg/mL)	Lacasas (U/L)	Autor
HEMIM-51	V8	NR	6,000	Dantán-González <i>et al.</i> , 2008.
HEMIM-51	MTT	NR	54,000	Amezcuca, 2016.
HEMIM-53	MMC	3.4	519,500	Cuevas, 2017.
HEMIM-74	MTT	NR	55,000	López, 2016.

NR: no reportado

Con base en estos resultados, los medios de cultivo modificados por Cuevas (MMC), principalmente los medios 17, 23 y 24 mostraron los mejores rendimientos, por lo tanto, los medios MMC son una opción para utilizar para

cultivar alguna otra cepa de *Pycnoporus* HEMIM, caracterizar el crecimiento y producción de metabolitos, así como la actividad enzimática, siendo de interés la cepa HEMIM-51, es una de las cepas mejor caracterizada dentro del grupo de estudio. La cepa HEMIM-51 fue encontrada creciendo sobre un derrame de petróleo, por lo tanto, puede llegar a tener potencial como productor enzimático y poseer gran capacidad degradativa.

3. Justificación

Pycnoporus spp. es un hongo basidiomiceto de especial interés por las enzimas como lacasas que produce, las cuales presentan funciones como: biodegradación de colorantes de la industria textil, el blanqueado de papel y la síntesis de pigmentos como es el caso del ácido cinabarinico, cinnabarina y tramesanguina empleando como precursor el 3-HAA, que poseen actividad insecticida, antiviral, antibiótica e inclusive como colorante, entre otras.

Debido a esto, se propone el cultivo de *Pycnoporus* sp., HEMIM-51 en tres medios de cultivo distintos, los cuales fueron optimizados en trabajos anteriores para la producción de diferentes metabolitos y enzimas provenientes de *Pycnoporus*, en este trabajo se determinará la producción de lacasas, lo cual será de utilidad para determinar la eficiencia de la cepa para la producción enzimática al igual que la eficiencia al utilizar los medios de cultivo con esta cepa en la producción de biomasa.

4. Hipótesis

La fuente de carbono, nitrógeno y la utilización de un inductor en los medios de cultivo influirán en el crecimiento fúngico y producción de lacasas de *Pycnoporus* sp. HEMIM-51.

5. Objetivos

5.1. General

Evaluar el crecimiento, producción de biomasa y actividad enzimática de *Pycnoporus* sp. HEMIM-51 en diferentes medios.

5.2. Particulares

- Caracterizar el crecimiento de *Pycnoporus* sp. HEMIM-51 en medio sólido en los medios de cultivo
- Caracterizar el crecimiento de *Pycnoporus* sp. HEMIM-51 en medio líquido en los medios de cultivo
- Evaluar la actividad enzimática de las lacasas de los extractos crudos.

6. Materiales y métodos

6.1. Cepa de *Pycnoporus* sp. HEMIM-51

La cepa de *Pycnoporus* sp. con la clave HEMIM-51 (Herbario Micológico de Morelos, UAEM). se mantiene activa en el laboratorio de Estructura, Función e Ingeniería de proteínas, CEIB-UAEM, la cual fue donada del cepario de hongos comestibles del Laboratorio de Micología (CIB-UAEM) por la Dra Acosta-Urdapilleta. Para el mantenimiento de la cepa se utilizó medio PDA. Resembrándose cada 7 días, a una temperatura de 25 °C.

6.2. Medios de cultivo para *Pycnoporus* sp. HEMIM-51

Se emplearon 3 medios de cultivo optimizados por Cuevas (2017), los cuales difieren en las concentraciones de glucosa, extracto de levadura y CuSO₄, en caso del medio sólido se agregó 16 g/L de agar bacteriológico. Las concentraciones de cada uno de los componentes de los medios se detallan en la tabla 4. Como control se utilizaron los medios MTT y PDA. (Anexo 11.1.1)

Tabla 4: Composición de los medios de cultivo optimizados

Composición del medio	Medio 17	Medio 23 g/L	Medio 24
glucosa	8	12	12
extracto de levadura	3	15	15
K ₂ HPO ₄	0.4	0.4	0.4
KH ₂ PO ₄	0.6	0.6	0.6
MgSO ₄	0.5	0.5	0.5
CuSO ₄	0.1	0.25	1

6.3. Crecimiento radial

Para evaluar el crecimiento radial del hongo se inocularon por triplicado discos con micelio activo de 3 mm de diámetro, en cajas Petri (15x60 mm). Se utilizaron los medios sólidos 17, 23 y 24, así como los medios MTT y PDA como referencia. Se incubaron a 25 °C, por un periodo de 7 días. Se determinó el crecimiento radial cada 24 h con una regla graduada en mm. Los resultados se graficaron en el eje de las Y el crecimiento en (mm) y en el eje de las X el tiempo (días) La tasa de crecimiento o velocidad específicos de crecimiento (μ) es el valor que se obtiene al realizar un análisis de regresión lineal (pendiente) de cada tratamiento para conocer la velocidad de crecimiento radial (Amezcuca, 2016). De igual manera se

realizó una comparación cuantitativa de la densidad de micelio y una cualitativa de la pigmentación producida por la cepa durante el periodo de crecimiento, siendo esto de utilidad para extrapolar una diferencia entre el crecimiento en los medios.

6.4. Fermentación de *Pycnoporus* sp. HEMIM-51

El crecimiento en medio líquido se realizó por triplicado en matraces de 125 mL, con 50 mL de los diferentes medios de cultivo. Se inocularon 3 discos, con micelio activo, de 3 mm de diámetro, y se mantuvieron en agitación a 125 rpm a temperatura de 25 °C ± 1 °C, durante un periodo de 15 días (Cuevas, 2017).

6.5. Obtención del extracto crudo y biomasa

Para la obtención del extracto crudo (EC) se filtró el medio de cultivo, después de los 15 días de cultivo. Se utilizó papel filtro de 9 cm de diámetro, previamente pesados. El EC se almacena a -20 °C, hasta su uso. El papel filtro con la biomasa se colocó en una estufa a 40 °C durante 24 horas, posteriormente se determinó la biomasa por diferencia de peso seco de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$pfb - pfs = dp * \frac{1000 \text{ mL}}{V2} = \text{Biomasa g/L}$$

Donde:

pfb: Peso del papel filtro con biomasa

pfs: Peso del papel filtro seco

dp: Diferencias del peso

V2: volumen del medio en que se cultivó la cepa (50 mL)

6.6. Actividad enzimática de las lacasas

La actividad enzimática del extracto crudo a punto final se determinó espectrofotométricamente midiendo la oxidación del 2,6-DMP. La oxidación del sustrato produce un cambio de absorbancia a 468 nm de una mezcla de reacción que contenía 2 mM de 2,6-DMP (0.0077075 gr) disuelto en 25 mL de buffer de acetatos (pH 4.5 a 0.1 mM), incubado en baño María a 40 °C .en una celda de 1mL se adiciono extracto enzimático (10 µL) y la mezcla de 2,6-DMP (990 µL); el

cambio de absorbancia se midió después de 1 minuto de reacción a 468 nm Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad necesaria para oxidar 1 μmol de 2,6-DMP mL/minuto. La actividad específica se calculó con la siguiente formula:

$$\frac{Abs * 1x10^6}{vm} = U/L$$

Donde:

Abs: Absorbancia 468 nm

vm: Volumen tomado de la muestra (10 μL)

6.7. Zimogramas de lacasas

Los Zimogramas se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida al 12% (Anexo 11.3), en condiciones semidesnaturalizantes, se cargaron 20 μL de muestra y 6 μL de buffer de carga por pozo. El gel se corrió a 100 V en frío durante 50 min. Al final se reveló con 2,6-DMP (2 mM) en buffer de acetatos a pH 4.5 incubado a 40°C, hasta el cambio de color en el gel a una tonalidad amarilla/naranja (Cuevas, 2017).

6.8. Determinación de proteína total

Para la cuantificación de proteína se procedió a realizar la técnica de Bradford en el cual se emplean 10 μL de muestra + 200 μL de reactivo. Esta técnica consiste en la unión no covalente del colorante azul de coomassie y la proteína; el colorante presenta dos formas coloreadas, café y azul. El color café cambia a azul cuando el colorante se ha unido a la proteína, la forma de este complejo colorante-proteína toma aproximadamente 5 min (Anexo 11.4). Después de los 5 min se cuantificó en un espectrofotómetro a 595 nm, para poder obtener la concentración de proteína se realizó una curva patrón, utilizando albúmina de suero bovino 10 - 90 $\mu\text{g/mL}$ (Bradford, 1976)

6.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, con la tasa específica de crecimiento por día, para poder determinar la correlación existente entre las diferentes medias de los crecimientos en los medios de cultivo. Para poder llevar a cabo el ANOVA se formuló una hipótesis nula (H_0) y una alternativa (H_a), las cuales consistieron en lo siguiente:

H_0 : Todos crecen iguales, no hay diferencia entre medios.

H_a : Existe diferencia entre los medios y el crecimiento.

Al igual que se realizó un análisis post hoc de Tukey, con un grado de libertad de 0.05 o Alpha (0.05) para poder determinar si existe diferencia entre los medios de cultivo, véase anexo 11.6 y 11.7.

7. Resultados y discusión.

7.1. Determinación de crecimiento radial

El medio de cultivo en las placas Petri se sembró por triplicado con un disco de micelio de 3 mm de diámetro, realizando un monitoreo día a día del crecimiento de la cepa en los medios como se muestra en la Figura 8.

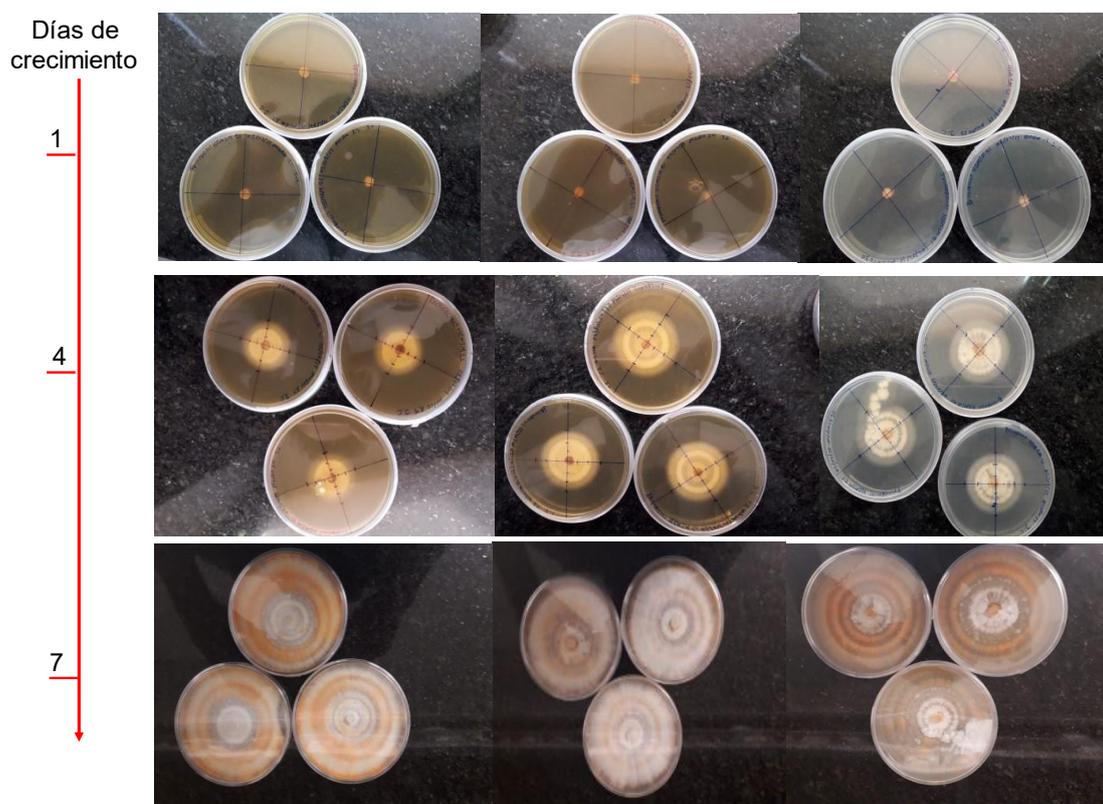
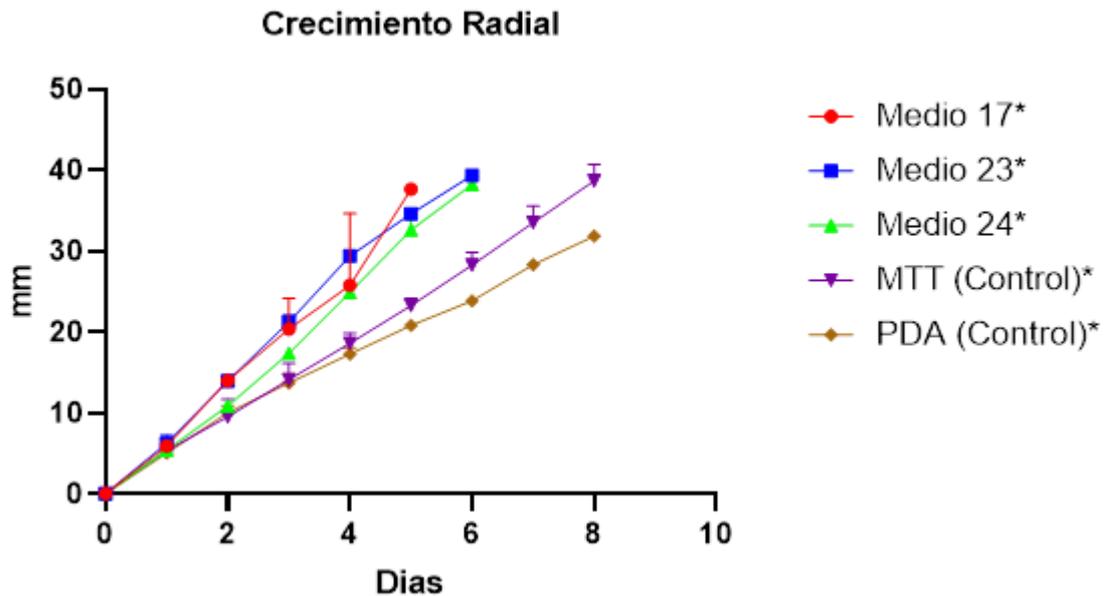


Figura 8. Crecimiento de la cepa *P. HEMIM-51* al día 1, 4 y 7, en medio MMC

En la Figura 9, se muestra el gráfico de crecimiento de la cepa, *Pycnoporus sp.* HEMIM-51, de los medios en sólido. El medio que destaca es el medio 17, debido a que *Pycnoporus* lleno por completo la caja de Petri de micelio en el 5º día de monitoreo, teniendo su mayor auge de crecimiento en el 2º día, con un crecimiento de 8.8 mm, mientras que el menor incremento en su crecimiento se presentó en el 6º día en medio PDA con un crecimiento de 3.3 mm. Para los medios MMC 23 y 24, el hongo colonizo la caja al día 6, mientras que para el MTT y PDA fue hasta el día 7. Los medios MMC resultan ser más adecuados para la producción de micelio comparado con PDA o MTT.



Prueba de Tukey

* Si existe diferencia significativa

Figura 9. Crecimiento radial por día de *Pycnoporus* sp. HEMIM-51.

Los cultivos solidos en caja Petri con los tres medios diferentes, cada uno presentaron un crecimiento y pigmentación peculiar para cada uno, como podemos apreciar en la Figura 10. Esto puede deberse a las concentraciones diferentes de CuSO_4 que contienen, la concentración de cobre en el medio influye induciendo la producción de enzimas lacasas y estas a su vez en la síntesis de pigmentos como ácido cinabarinico o cinnabarina (Eggert *et al.*, 1995). En caso del medio 24 podemos observar una pigmentación intensa en contraste con los medios 17 y 23, sin embargo, cabe destacar la intensa coloración que presento la cepa HEMIM-51 en el medio MTT (Medio Téllez Téllez). Por otro lado, el medio 23 y 24 presentan micelio más abundante que el medio 17. Del mismo modo el micelio fue mucho más abundante en el MTT, esto puede deberse a la diferencia en los micronutrientes, o inclusive a la combinación de glucosa, extracto de levadura y CuSO_4 , se debe tener en cuenta que algunas concentraciones altas de CuSO_4 son tóxicas (Bertrand *et al.*, 2013), y podrían impedir el correcto crecimiento del micelio, sin embargo, en ninguno de los casos presentes en este trabajo impidió el crecimiento del hongo.

En el medio PDA se presentó la menor pigmentación y abundancia de micelio, se debió a la falta de un inductor enzimático como es el CuSO_4 .

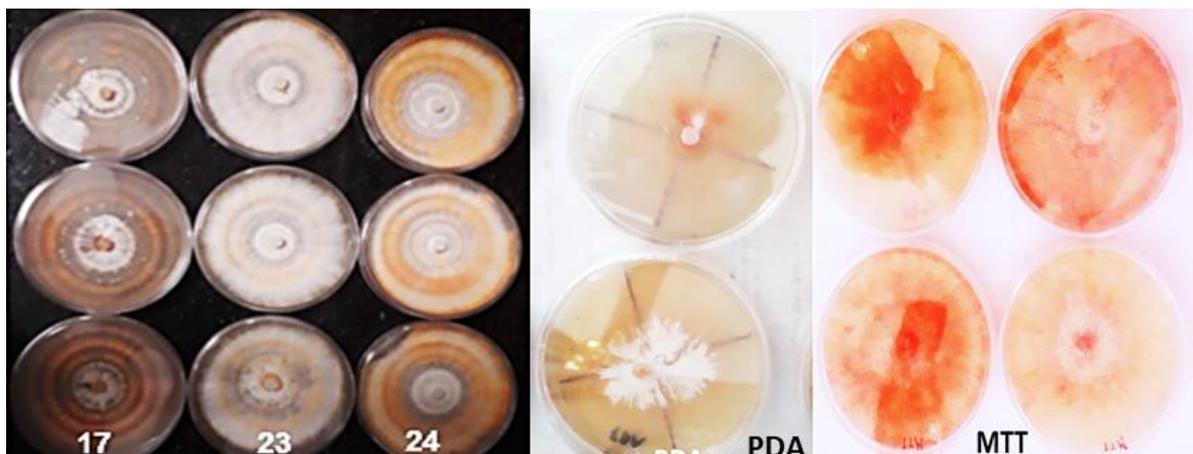


Figura 10. Crecimiento de la cepa de *Pycnoporus* sp., HEMIM-51 día final.

En experimentos realizados por Amezcua en el 2016, en el medio de cultivo de Harina Integral de Trigo (HIT), utilizando la cepa HEMIM-51, se midió el crecimiento radial dando una velocidad de crecimiento de 7.1 mm por día. Por otro lado, López en el 2016, empleando la cepa *Pycnoporus* HEMIM-74 en un medio HIT, tomó la velocidad de crecimiento radial obteniendo una velocidad de 7 mm por día, de acuerdo con los datos reportados y obtenidos en este trabajo, los medios MMC favorecen el crecimiento de la cepa HEMIM-51, debido a que esta termino su crecimiento antes de tiempo esperado, reportando un crecimiento de 7.56 m/día, siendo un crecimiento mayor en comparación con Amezcua y López, 2016, como podemos observar en la tabla 5.

La cepa HEMIM-51 presento mayor crecimiento en los medios 17, 23 y 24 modificados por Cuevas (MMC) en contraste con los medios MTT y PDA, siendo el medio 17 el que obtuvo la mejor tasa de crecimiento 7.56 mm/día, el cual es candidato para la caracterización en líquido y muestreo por día para ver la cantidad de biomasa y metabolitos.

Tabla 5: Comparación de velocidad de crecimiento radial

Cepa <i>Pycnoporus</i> .	Medios de cultivo	Velocidad de crecimiento (mm/día)
HEMIM-51	HIT	7.1
HEMIM-74	HIT	7
	MMC 17	7.56 p>
	MMC 23	6.53 p>
	MMC 24	6.33 p>
HEMIM-51	MTT	4.83 p>
	PDA	4.03 p>

Prueba de Tukey

P< No Hay diferencia

p> Si hay diferencia

7.2. Determinación de biomasa y obtención de extracto crudo

Los extractos crudos (E.C) y biomasa fueron tomados al día 15 (punto final). En los diferentes medios se observaron distintas tonalidades de pigmentación, esto puede deberse a las diferentes concentraciones de sulfato de cobre en cada medio (Zapata, 2013) y a la aeración que recibieron los medios, ya que fueron colocados de manera aleatoria en el agitador orbital (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016).

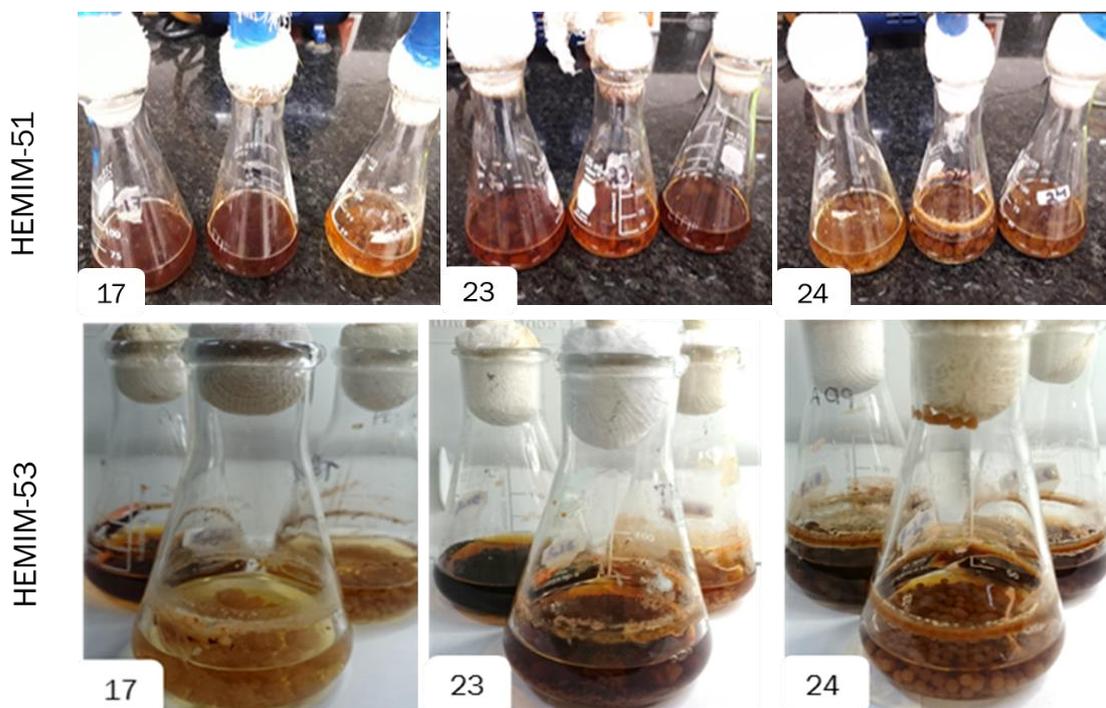


Figura 11. Fermentación medios líquidos: A) HEMIM-51 v/s B) HEMIM-53.

En la Figura 11 podemos observar las tonalidades de las fermentaciones al día 15 con las cepas HEMIM-51 y HEMIM-53. Como se puede notar la fermentación de HEMIM-51 en el medio 17 presenta una tonalidad marrón, mientras que HEMIM-53 presenta una coloración más tenue (amarillo claro). Mientras que en el medio 23 ambas cepas presentan un color muy similar, no obstante, la pigmentación no tiene relación con la producción de lacasas y por lo tanto del ácido cinabarinico, pero podrían estar presentes algunos otros pigmentos como la tramesanguina o cinnabarina, los cuales también son sintetizados por lacasas y afectan la pigmentación final (Cuevas, 2017 y Eggert *et al.*, 1995).

Con respecto a la producción de biomasa de la cepa HEMIM-51 el medio 17 obtuvo la mayor producción con 6.381 g/L, seguido de los medios 23 y 24, los

cuales obtuvieron una concentración de 5.049 g/L y de 2.285 g/L, respectivamente.

Comparando con trabajos anteriores, utilizando la misma cepa Amezcua en 2016 obtuvo 6.16 g/L de biomasa a los 12 días de fermentación. Con respecto a la producción de biomasa de otras cepas HEMIM de *Pycnoporus* se han reportado datos para las cepas HEMIM-74 y HEMIM-53 con valores de biomasa en el rango de 1.7 hasta 8.9 g/L, utilizando diferentes medios de cultivo (tabla 6).

Tabla 6: Diferencia de producción de biomasa

Medio de cultivo	HEMIM-51 Este trabajo	HEMIM-53 Cuevas, 2017	HEMIM-51 Amezcua, 2016	HEMIM-74 López, 2016
	g/L			
MMC 17	6.3 ± 0.68	1.7	N/R	N/R
MMC 23	5.0 ± 0.28	4.0	N/R	N/R
MMC 24	2.2 ± 0.68	6.4	N/R	N/R
MTT	N/R	4.1	6.16	8.9

N/R. No reportado. ± Desviación estándar.

Se observa en la tabla 6, que la mayor producción de biomasa se presentó con la cepa HEMIM-74 con una producción de 8.9 g/L, sin embargo, la cepa HEMIM-51 presento su mayor rendimiento en el medio 17 con 6.381 g/L, mientras que HEMIM-53 la presento en el medio 24, con 6.4 g/L, en cuanto a la HEMIM-51 en el medio MTT, solo se obtuvieron 6.16 g/L. Existen diferencias en los rendimientos de producción de biomasa entre las cepas, esto se puede deber a que son organismos diferentes al igual que los compuestos de los medios estén influyendo de una manera distinta en cada organismo.

Se determinó que la cepa HEMIM-51 tiene un crecimiento más rápido comparado con los otros medios con bajas concentraciones de CuSO₄, ya que en el medio 24 que contiene la cantidad de cobre más alta, esta presenta un crecimiento casi 3 veces menor en comparación con el medio 17 que contiene la concentración de CuSO₄ más baja, mientras que la cepa HEMIM-53 presenta un crecimiento totalmente opuesto, ya que su mayor crecimiento se presentó en el medio 24 el cual contiene 1 g/L de CuSO₄, lo que es 10 veces más que el medio 17, la tolerancia al cobre de la cepa HEMIM-51 es menor que la cepa HEMIM-53, se sabe que las altas concentraciones de CuSO₄ presenta actividad antifúngica, muchas veces es contrarrestado con la concentración de glucosa y extracto de

levadura que es una fuente de aminoácidos y fuente de carbono (Eugenio, M.E., *et al* 2009).

Llevando a cabo un análisis en cuanto a la producción de biomasa por cada replica, se obtuvo la división estándar, donde no existe una diferencia en los medios 17 y 24 en cuanto a la producción de biomasa, mientras que en comparación con estos medios lo que es el medio 17 si presenta una diferencia con respecto a los otros medios.

7.3. Actividad enzimática lacasas

Se determinó la actividad enzimática de los extractos crudos utilizando como sustrato 2,6-DMP disuelto en buffer de acetatos pH de 4.5, en donde la actividad enzimática más alta fue en el medio 23 con 32,584 U/L, mientras que los medios 17 y 24 registraron actividades de 9,556 U/L y de 29,117 U/L, respectivamente.

En tanto Cuevas, 2016 con el medio 24 y la cepa HEMIM-53 obtuvo 519,500 U/L de actividad, mientras que Amezcua, 2016, en el medio MTT con la cepa HEMIM-51, reporto una actividad de 54,000 U/L, tanto que López, 2016, con HEMIM-74 y el medio MTT, registró una actividad de 17,890 U/L de actividad, mientras que Guadarrama, 2016, con el medio MTT, utilizando a la cepa HEMIM-53 registro una actividad de 114,000 U/L, a diferencia en este trabajo se obtuvo una actividad de 32,584 U/L en el medio 23, con la cepa HEMIM-51 en el medio MMC, como se puede interpretar por los datos reportados, lo que son las cepas HEMI-53 (medio MMC y MTT) y HEMIM-51 (medio MTT) presentaron actividades superiores a la cepa HEMIM-51 (medio MMC, este trabajo) a excepción de la cepa HEMIM-74 donde la actividad enzimática estuvo por debajo de la HEMI-51 (este trabajo) sin embargo debe de tomarse en cuenta que los experimentos fueron llevados a cabo con diferentes cepas y medios de cultivo, por lo tanto la variación de los resultados entre cepas puede deberse a las diferentes concentraciones de carbono, nitrógeno y a su vez el inductor, al igual que al mismo metabolismo que este empleando el mismo organismo para poder llevar acabo la degradación de los compuestos del medio de cultivo. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Comparación de actividad enzimática entre cepas HEMIM

Medio de cultivo	HEMIM-51 (Este trabajo)	HEMIM-53 (Cuevas, 2017)	HEMIM-51 (Amezcuca, 2016)	HEMIM-74 (López, 2016)	HEMIM-53 (Guadarrama, 2016)
			U/L		
Medio 17	9,556	10,197	N/R	N/R	N/R
Medio 23	32,584	130,733	N/R	N/R	N/R
Medio 24	29,117	519,500	N/R	N/R	N/R
Medio MTT	N/R	N/R	54.000	17.890	114,000

N/R: no reporto

Tomando en cuenta los resultados de ensayos anteriores con diferentes cepas HEMIM en distintos medios, se puede determinar que la cepa HEMIM-51 (este trabajo) presenta 16 veces menos actividad enzimática en el medio 23, en contraste con la cepa HEMIM-53 (Cuevas, 2017) en lo que es el medio 24, que son los medios donde estas dos cepas presentaron de las mayores actividades enzimáticas, sin embargo, cabe mencionar que en el medio 17, ambas cepas presentaron una actividad muy similar, quedando por debajo la cepa HEMIM-51 por tan solo un 6.29% de diferencia. No obstante, en los medios 23 y 24 las concentraciones de CuSO_4 son totalmente distintas ya que en el medio 23 la concentración es de tan solo 0.25 g/L y para el medio 24 es de 1 g/L por lo que se puede estar presentando una inhibición enzimática para el caso de la cepa HEMIM-51, lo que puede explicar una menor actividad, ya que el cobre es tóxico a altas concentraciones. Sin embargo, no hay que dejar de lado al resto de nutrientes contenidos en los medios ya que estos también pueden estar influyendo en la actividad enzimática (Bertrand *et al.*, 2013). También hay que tener en cuenta que son cepas distintas por lo que pueden estar aprovechando estos nutrientes de una manera totalmente diferente, estos análisis nos llevan a suponer la cepa HEMIM-53 es más tolerante que la cepa HEMIM-51 a concentraciones altas de CuSO_4 . Por lo tanto, no estaría de más llevar a cabo ensayos enzimáticos en la colección restantes de MMC en los cuales se varían las concentraciones de carbono, nitrógeno e inductor.

7.4. Zimografía de lacasas

Para determinar la presencia de isoformas de enzimas con actividad lacasa de la cepa HEMIM-51 se realizaron zimogramas de los extractos crudos en geles de

poliacrilamida en condición semi-desnaturalizante con lo que se obtuvieron los zimogramas que se muestran en la Figura 12.

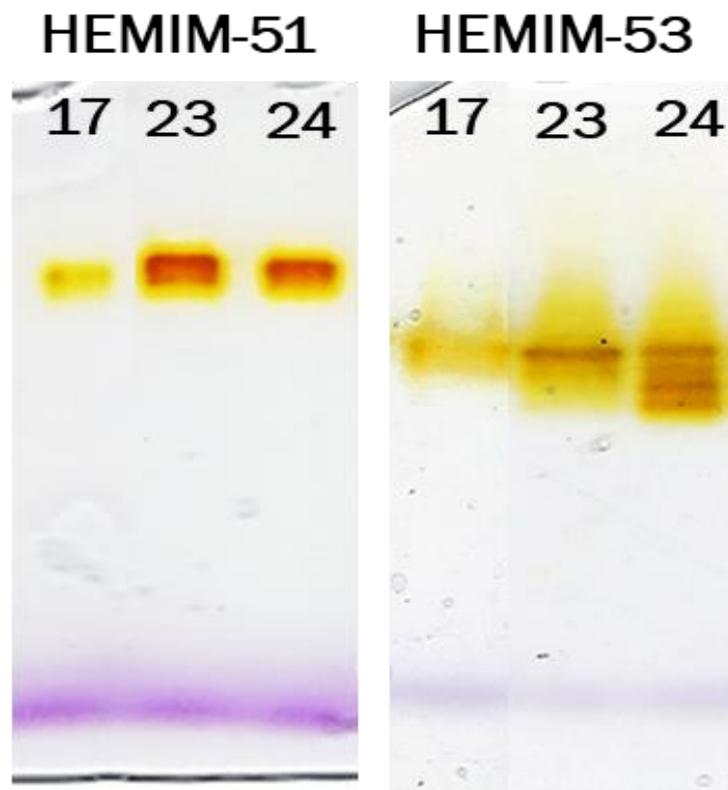


Figura 12. Zimograma de lacasas extracelulares de *Pycnoporus* sp., HEMIM-51 y HEMIM-53 en los medios de cultivo optimizados 17, 23 y 24.

El patrón de bandeo que se muestra en el zimograma de la Figura 12 entre HEMIM-51 y 53, difieren en el número de isoformas e intensidad de banda, principalmente en los medios 23, con 2 diferentes patrones de bandas y el 24 donde se presentaron 4 diferentes bandas para HEMIM-53. Se aprecia que el patrón de bandeo de HEMIM-51 es más intenso que la HEMIM-53, lo que sugiere que la lacasa presente es altamente activa. Es necesario realizar más estudios y caracterización de las enzimas, se requiere las secuencias de las bandas para poder realizar la comparación entre cepas, debido a que entre cepas de *Pycnoporus* existen diferencias entre la secreción de enzimas, por ejemplo *P. puniceus* presenta la Fenoxazina sintasa. Estudios posteriores son necesarios para determinar las masas y el patrón de glicosilación de cada una de las enzimas, y analizar si son capaces de sintetizar otros metabolitos como el ácido cinabarinico (Savinova *et al.*, 2019).

7.5. Determinación de proteína total

Se determinó proteína total de los extractos crudos de los tres distintos medios mediante la interpolación con una curva patrón con BSA, donde se obtuvo la producción de proteína más alta para el medio 23 con 0.11435 µg/ mL mientras que para los medios 17 y 24 la concentración de proteína fue de 0.08554 µg/mL y de 0.0629 µg/ mL, como se muestra a continuación en la tabla 8.

Tabla 8: Proteína de total de cepas HEMIM

Cepa	Medio de cultivo	Proteína total (g/L)	Tiempo de fermentación	Autor
HEMIM-51	MMC 17	8.554 x 10 ⁻⁸	15 días	Este trabajo
	MMC 23	1.1435 x 10 ⁻⁷		
	MMC 24	6.29 x 10 ⁻⁸		
HEMIM-74	MTT	3.2 x 10 ⁻⁷	16 días	López, 2016
HEMIM-51	MTT	3.65 x 10 ⁻⁷	16 días	Amezcuca, 2016

En comparación con estudios realizados anteriormente por: López, 2016, Amezcuca, 2016, se determinó que la cepa HEMIM-51 cultivada en los MMC, producen menos proteína que en el medio MTT, para determinarlo de una manera más concisa se llevó a cabo el siguiente análisis:

Mediante la regla de proporcionalidad simple directa se determinó que el medio 17 produce un -73.26% menos de proteína, el medio 23 un -64.26% y el medio 24 produce un -80.34% menos que la cepa HEMIM-74 (López, 2016) en el medio MTT, en cambio haciendo la misma comparación con la cepa HEMIM-51 en el medio MTT (Amezcuca, 2016), se determinó que la misma cepa en los MMC, produce un -76.56% menos en el medio 17, en el medio 23 produce un -68.67% y el en el medio 24 es un -82.76% menos de proteína.

Sin embargo, cabe mencionar que la técnica de medición de proteína total por método de Bradford se basa en la unión de un colorante (azul de coomassie) a la proteína, la cual nos permite cuantificar por espectrofotometría cuanta proteína soluble tenemos en nuestra muestra, pero, esta no es una cuantificación específica de cuanta proteína de interés tenemos en dicho medio (lacasas), por lo tanto no sabemos con exactitud cuanta de esta proteína pertenece a nuestra proteína de interés, por lo que podríamos estar presentando niveles muy altos de proteína pero no pertenecer a la de interés o por lo contrario, estar presentando niveles muy bajos pero podría estar perteneciendo a la de interés, por lo que se

proponen estudios más a fondo para poder saber con mayor exactitud cuanta de esta proteína pertenece a la proteína de interés

Por otro lado, también, puede deberse a las diferentes concentraciones de nutrientes en los diferentes medios utilizados y a la misma morfología y metabolismo de los organismos, debido a que se ha reportado que en basidiomicetos múltiples factores afectan a la producción de proteínas como el pH que regula la expresión de genes como las lacasas, las fuente de nitrógeno debido a que la mezcla de aminoácidos puede incrementar la formación de diversas proteínas y en el caso de ser carentes de aminoácidos como el extracto de papa, no van a presentar proteínas y mucho menos lacasas (Dong *et al.*, 2005)

8. Conclusión

Se determinó al medio 17, como óptimo para el crecimiento radial y obtención de biomasa de la cepa de *Pycnoporus* sp., HEMIM-51, ya que presentó un crecimiento de 8.8 mm en el 2° día de evaluación y una producción de biomasa de 6.381 g/L.

El medio 23 presentó la mayor producción de proteína total que fue de 0.11435 µg/mL, al igual que la mayor actividad enzimática con 32,584 U/L.

Por los datos anteriores, se puede determinar que no hay una relación entre producción de biomasa y actividad enzimática, ya que se puede presentar una gran concentración de biomasa, pero una baja actividad enzimática.

9. Perspectivas

- Monitorear día a día la producción de proteína, actividad enzimática y producción de biomasa, en los medios 17 y 23 para determinar si en algún punto existe una relación entre ellas.
- Determinar el punto máximo de actividad enzimática en los diferentes días de la fermentación al igual que la proteína total.
- Realizar tinción de azúcares.
- Realizar masas de las isoformas
- Evaluar la cantidad de producción de pigmentos producido por la cepa *Pycnoporus* sp., HEMIM-51.

10. Referencias

- Acosta-Urdapilleta, L., Alonzo-Paz, G.A., Rodríguez, A., Adame, M., Salgado, D., Montiel-Peña, M., Villegas-Villarreal, Elva Cristina. (2010). *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. Hacia un Desarrollo sustentable de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica. *Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Puebla*, 531-562.
- Acosta-Urdapilleta., L., Oscura, N., & Rossano, R. (2016). Uso del hongo *Pycnoporus sanguineus* para la elaboración de bebidas. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 675.
- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & y Venezuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, S76-S81.
- Amezcuca Castillo, M. (2016). *Producción de enzimas de Pycnoporus sp HEMIM-51 crecido en fermentación líquida (Tesis licenciatura)*. Cuernavaca Morelos.: Centro de investigación en biotecnología de la UAEM.
- Arana, A., Téllez, A., González, T., & González, A. (2002). Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *Bio-Tecnología*. 7(3), 40-55.
- Carrillo Ruiz, L. M. (2017). Extracción de colorante natural (cinabarina) del hongo rojo *Pycnoporus sanguineus*; utilizando dos solventes. *Bachelor's thesis*.
- Cazaban Lozado, D. (2014). Inmovilización y estabilización de lacasas para su uso en celdas de biocombustibles. *Universidad ORT Uruguay*.
- Couto, SR., Herrera, JLT. (2006). Aplicaciones industriales y biotecnológicas de las lacasas: una revisión. *Avances en biotecnología*, 24 (5), 500-513.
- Cruz Muñoz, R., Piña-Guzmán, A.B., Yáñez-Fernández, J., Toro, V.D., Bautista-Baños, S., Villanueva Arce, R. (2015). Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia*, 49(4), 347-359.
- Cuevas Reyes, E. (2017). Optimización del medio de cultivo de *Pycnoporus Cinnabarinus* HEMIM-53 para la producción de metabolitos de interés biotecnológico (Tesis de Maestría). *Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM*.
- Dantán-González, E., Vite-Vallejo, O., Martínez-Anaya, C., Méndez-Sánchez, M., González, M. C., Palomares, L. A., Folch-Mallol, J. (2008). Production of

- two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *Int Microbiol*, 11(3), 163-169.
- Dias, D. A., Urban, S. (2009). HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Natural product communication*, 4(4), 193457X0900400409.
- Díaz Godínez, R. (2012). Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas. *Doctoral dissertation*.
- Eggert, C. (1997). Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. . *Microbiological research*. 152(3), 315-318.
- Göçenoğlu, A., Pazarlioglu, N. (2014). Cinnabarinic acid:Enhanced production from *Pycnoporus cinnabarinus*, characterization structural and functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 42, 281-291.
- Gómez Andrade, W. E. (2017). Desarrollo de un proceso para el aislamiento, conservación y producción del hongo medicinal oreja de palo (*Pycnoporus* spp.) a partir de la biodiversidad fúngica eucariótica (Master's thesis).
- Guadarrama Pérez, V. (2016). Estudio de la producción de ácido cinabarinico a partir del cultivo de *Pycnoporus* HEMIM-53 en distintos sistemas de fermentación sumergida (Tesis Maestría). *Centro de Investigación en Biotecnología*. .
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30(1)., 30-39.
- Guzmán, G. (1995). La diversidad de hongos en México. . *Ciencias* (039).
- Kuhar, J. F., Castiglia, V. C., y Papinutti, V. L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos.
- López Galindo, D. (2016). Producción de enzimas de *Pycnoporus* HEMIM-74 crecido en fermentación líquida (Tesis Maestría). *Centro de Investigaciones en Biotecnología UAEM*.
- Mouso., N. P. (2003). Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. *Rev Iberoam Micol*, 20,, 176-178.

- Moya Lobo, R. (2011). Caracterización de la lacasa de "Streptomyces cyaneus" CECT 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica (Tesis Doctoral). *Universidad de Alcalá, Madrid*.
- Pineda-Insuasti, J. A., Gómez-Andrade, W. E., Duarte-Trijillo, A. S., Soto-Arroyave, C. P., Pineda-Soto, C. A., Fierro-Ramos, F. J., Alvarez-Ramos, S. E. (2017). Producción de *Pycnoporus* spp y sus metabolitos secundarios. *Una revisión.ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51 (2), 60-61.
- Ramírez, L. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoriosa con impacto en la agricultura. *Fitosanidad* 17(1)., 49-55.
- Ramírez, N. E., & Ariza, J. C. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*,. *Revista colombiana de biotecnología*, 5(2),, 64-72.
- Reynoso-Cereceda, G. G.-C.-C.-R. (2016). Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: mass transfer coefficient kLa characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 379-390.
- Román , R., Torrez-Duarte, C., Ayala, M., Vázquez-Duhalt, R. (2010). Producción a escala piloto de lacasas de *Coriolopsis galilea*. *Revista mexicana de micología*, 32, 19-27.
- Sánchez Huamán, P.R., Valverde, B., Chany, N. (2011.). Cultivo del hongo *Pycnoporus sanguineus* (L: Fr) Murr para evaluar la actividad leishmanicida en promastigotes de leishmania.
- Solís-Oba, M., Bérzana, E., García-Garibay, M., & y Viniegra-González, G. (2007). El ABTS•+ agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato. *Revista mexicana de ingeniería química*, 6(3), 275-281.
- Téllez-Jurado, A., Arana-Cuenca, A., Loera, O., Viniegra-González, G., González, A. (2003). Decoloración de compuestos de uso textil por lacasa SMIcc2 de *Spiniger meineckellus*. *X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, Puerto Vallarta, Jalisco.
- Téllez-Téllez, M., Fernández, F., & Montiel-González, A. (2008). Crecimiento y producción de lacasa por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida y en estado sólido. *Appl Microbial Biotechnol*, 81, 675-679.
- Valeriano, V., Silva, A., Santiago, M., Bara, M., & y Garcia, T. (2009). Production of laccase by *Pynoporus sanguineus* using 2, 5-Xylidine and ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 790-794.

Yoshida, H. (1883). Chemistry of lacquer (urishi) part 1. *J. Chem. Soc. (Tokyo)*, 43: 472-486.

Zapata Marín, Y. A. (2013). Efecto de la concentración de nitrógeno y agentes inductores sobre la producción de lacasas (Tesis de grado).
UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA, 33-35.

Eugenio, M. E., Carbajo, J. M., Martín, J. A., González, A. E., & Villar, J. C. (2009). Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 49(5), 433-440.

11. Anexos

11.1. Crecimiento radial

11.1.1. Contenido de los medios de cultivo

Tabla 9: Medio MTT

Medio MTT (Medio de Téllez-Téllez <i>et al.</i> , 2008)	
	g/L
Glucosa	10
Extracto de levadura	5
KH ₂ PO ₄	0.6
MgSO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.4
CuSO ₄	0.25
FeSO ₄	0.05
MnSO ₄	0.05
ZnSO ₄	0.001
Ajustar a pH 4.5	

Tabla 10: Medio PDA

Composición medio PDA	
	g/L
Extracto de papa	4
Dextrosa	20
Agar	15
Ajustar a pH 4.5	

Tabla 11: Medio HIT

Composición medio HIT	
	g/L
Azúcar	15
Harina Integral de Trigo	30
Agar	20
Ajustar a pH 4.5	

11.2. Actividad enzimática

11.2.1. Concentraciones de las soluciones

- Buffer de acetatos 0.1M, 500 mL, pH 4.5
 - Ácido acético: $(0.036 \text{ mol/L})(60 \text{ g/mol})(0.5 \text{ L}) = 1.08 \text{ g}$
 $(1.08 \text{ g}/1.05 \text{ g})/1 \text{ mL} = 1.028 \text{ mL}$ para 0.5 L
 - Acetato de sodio: $(0.064 \text{ mol/L})(82 \text{ g/mol})(0.5 \text{ L}) = 2.624 \text{ g}$

- 2, 6-Dimetoxifenol (2,6-DMP) 2 mM, 50 mL
 - $(2 \text{ mMol/L})(1 \text{ mol}/ 1000 \text{ mMol}) = 0.002 \text{ M}$
 - $(0.002 \text{ mol/L})(154.16 \text{ g/mol}) = 0.3083 \text{ g/L}$
 - $(0.3083 \text{ g/L})(1 \text{ L}/1000 \text{ mL})(50 \text{ mL}/1) = 0.0154 \text{ g}$

11.3. Zimogramas

11.3.1. Geles de poliacrilamida

- Buffer Lower (Separador) 4X
 - Tris 18.17 g, disolver en 50 mL de agua destilada
 - SDS 20 %: 2 mL (para 20 %: 10 g de SDS en 50 mL en agua)
 - Aforar a 100 mL y ajustar el pH 8.8

- Buffer Upper (concentrador) 4X
 - Tris 6.06 g, disolver en 50 mL de agua destilada
 - SDS 20%: 2 mL (para 20 %: 10 g de SDS en 50 mL en agua)
 - Aforar a 100 mL y ajustar el pH 6.8

- Solución de acrilamida
 - Acrilamida 30%: 49.5 g
 - Bis-acrilamida 0.8%: 1.32 g
 - Aforar a 165 mL con agua destilada

- APS 10%
 - Persulfato de amonio: 0.1 g en 1 mL de agua destilada

Tabla 12: Compuestos del gel separador

Gel separador 12%		
Cantidad de geles	1	
Lower	1.5	
Acrilamida	2.5	mL
H ₂ O	2	
SDS	5	
APS (10%)	20	μL
TEMED	5	

Tabla 13: Compuestos del gel concentrador

Gel concentrador 4%		
Cantidad de geles	1	
Upper	0.63	
Acrilamida	0.33	mL
H ₂ O	1.54	
SDS	2.5	
APS (10%)	12.5	μL
TEMED	2.5	

- Buffer de corrida TANK, 10X.
 - Tris 15.2 g
 - Glicina 7.21 g
 - SDS 20%: 25 mL
 - Aforar a 500 mL de agua destilada y ajustar a pH 8

- Buffer de carga 2x, 12 mL.
- Upper Buffer 4X: 9.36 mL
- Glicerol 20%: 2.4 mL
- Azul de bromofenol 0.2%: 0.024 g
- SDS 20%: 240 µL

11.4. Cuantificación de proteína total.

11.4.1. Reactivo Bradford

- Disolver 5 mg de azul de Comassie en 2.5 ml de Etanol al 96 %.
- Añadir 5 ml de ác. ortofosfórico 85 %.
- Diluir hasta 50 ml con H₂O destilada.
- Dejar reposar 24 h en oscuridad y filtrar dos veces con papel de filtro o con filtros de 45 nm.

Nota: conservar en botella oscura no más de 15 días

Tabla 14: Diluciones para la determinación de proteína total.

Diluciones		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
µl	Proteína (BSA)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
	H ₂ O	800	790	780	770	760	750	740	730	720	710
	Bradford	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

11.5. Regla de proporcionalidad simple directa

Se llevo a cabo una regla de proporcionalidad simple directa, donde lo que se pretende es hallar el cuarto término de una proporción conociendo los otros tres. En esta regla se establece, por lo tanto, la relación de proporcionalidad entre dos valores conocidos **A** y **B**, y conociendo un tercer valor **C**, se calcula un cuarto valor **D**.

$$A \longrightarrow B$$

$$C \longrightarrow D$$

En la relación entre los valores, se cumple:

$$\left. \begin{array}{ccc} A & \xrightarrow{D} & B \\ C & \xrightarrow{D} & D \end{array} \right\} \frac{A}{C} = \frac{B}{D}$$

$$A \cdot D = C \cdot B$$

Y decimos que **A** es a **B** directamente proporcional, como **C** es a **D**.

De esta igualdad anterior, se deduce que, si se conocen los valores **A**, **B** y **C**, y queremos calcular **D**, éste último será:

$$D = \frac{C \cdot B}{A}$$

A: 1º Valor

B: Proporcionalidad, en este caso (100%)

C: 2º Valor

D: Valor desconocido

Nota: Al obtener el valor proporcional desconocido se llevó a cabo una resta entre 100% y el valor desconocido **D**, dándonos como resultado el porcentaje de la producción de la proteína.

11.6. Análisis de varianza de un factor ANOVA

Al realizar el análisis de los datos se concluyó que se rechaza lo que es la H_0 . Porque, el valor de p es mayor a 0.05 o alfa ($p > 0.05$), esto confirma que el resultado de F es menor al de F crítico, como podemos ver en la tabla 16.

Sin embargo, en la tabla 15 podemos observar la diferencia existente en lo que son el promedio de la velocidad de crecimiento al igual que la varianza entre medios de cultivo.

Por lo tanto, se determina que si existe diferencia significativa en la velocidad de crecimiento de las medias en los distintos medios de cultivo.

Tabla 15: Análisis de varianza de un factor

RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Días de monitoreo</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Medio 17	8	22,7	2,8375	1,5513	
Medio 23	8	22,2	2,775	1,6307	
Medio 24	8	20,4	2,55	1,7343	
MTT	8	17,2	2,15	1,3914	
PDA	8	15,1	1,8875	0,8355	

Tabla 16: Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	5,3735	4	1,343375	0,94031	0,452159	2,641465
Dentro de los grupos	50,0025	35	1,428643			
Total	55,376	39				

11.7. Análisis post hoc de Tukey

Se realizó un análisis post hoc de Tukey, con un grado de libertad de 0.05 o Alpha (0.05). Para poder determinar si existe diferencia entre los medios, se comparó el valor de Alpha 0.05 de la tabla 17, con el p-value de la tabla 18, donde el p-value es mayor a Alpha, determinando que, si existe diferencia entre los medios de cultivo, por lo tanto, se puede determinar al medio 17, como el mejor medio para el crecimiento de HEMIM-51.

Tabla 17: Tukey hsd/kramer alpha 0,05

<i>group</i>	<i>mean</i>	<i>n</i>	<i>ss</i>	<i>df</i>	<i>q-crit</i>
Medio 17	2,8	8	10,859		
Medio 23	2,8	8	11,415		
Medio 24	2,6	8	12,14		
MTT	2,2	8	9,74		
PDA	1,9	8	5,8488		
		40	50,003	35	4,066

Tabla 18: Q TEST

<i>group 1</i>	<i>group 2</i>	<i>mean</i>	<i>std err</i>	<i>q-stat</i>	<i>lower</i>	<i>upper</i>	<i>p-value</i>	<i>mean-crit</i>	<i>Cohen d</i>
Medio 17	Medio 23	0,0625	0,4226	0,1479	-1,6557	1,7807	1,0000	1,7182	0,0523
Medio 17	Medio 24	0,2875	0,4226	0,6803	-1,4307	2,0057	0,9886	1,7182	0,2405
Medio 17	MTT	0,6875	0,4226	1,6269	-1,0307	2,4057	0,7788	1,7182	0,5752
Medio 17	PDA	0,95	0,4226	2,2481	-0,7682	2,6682	0,5137	1,7182	0,7948
Medio 23	Medio 24	0,225	0,4226	0,5324	-1,4932	1,9432	0,9955	1,7182	0,1882
Medio 23	MTT	0,625	0,4226	1,4790	-1,0932	2,3432	0,8323	1,7182	0,5229
Medio 23	PDA	0,8875	0,4226	2,1002	-0,8307	2,6057	0,5787	1,7182	0,7425
Medio 24	MTT	0,4	0,4226	0,9465	-1,3182	2,1182	0,9617	1,7182	0,3347
Medio 24	PDA	0,6625	0,4226	1,5677	-1,0557	2,3807	0,8009	1,7182	0,5543
MTT	PDA	0,2625	0,4226	0,6212	-1,4557	1,9807	0,9919	1,7182	0,2196