

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE
LACASAS Y LIGNINA PEROXIDASAS DE HONGOS
DEGRADADORES DE COLORANTES SELECCIONADOS
PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE
LA INDUSTRIA TEXTIL**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARITZA GARDENIA PÁEZ LLERENA

SANGOLQUÍ, 20 DE ABRIL DEL 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Srta. Maritza Gardenia Páez Llerena

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Tatiana Páez

DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

Ab. Carlos Orozco

Sangolquí, 20 de Abril del 2012

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. **MARITZA GARDENIA PÁEZ LLERENA**, como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

Sangolquí, 20 de Abril del 2012

M.C. Alma Koch
DIRECTORA

Dra. Blanca Naranjo
COORDIRECTORA

REVISADO POR

Ing. Tatiana Páez
DIRECTORA DE LA CARRERA

DEDICATORIA

A Dios y a María Auxiliadora mi patrona desde niña. A mi padre Rubén y a madre Gardenia que con su ejemplo han sabido guiarme y han estado junto a mí en cada acontecimiento de mi vida. A mi hermano Alejandro gracias por tu consejos. A Ximena por cuidarme como a su propia hija. A mi tía y mis abuelitas por darme siempre el amor de familia, a mi abuelito que es mi estrellita en el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a mi papi por su constante apoyo y ejemplo, a mi mamá por ser mi mejor amiga y ejemplo de mujer, gracias por los valores que me han inculcado y por enseñarme a ser una mujer emprendedora. A mi hermano gracias por estar junto a mí cuando más lo he necesitado y por no haberte ido de mi lado cuando más lo temía. A Ximena mi segunda madre por quererme como a tu hija. A mis abuelitas por darme ese amor incondicional y mi tía María por estar a mi lado. Patty gracias a ti también por quererme tanto. Les agradezco a todos por su apoyo constante y agradezco a Dios por darme una familia tan hermosa.

Le agradezco a mi Directora Almita Koch y a mi Codirectora Blanquita Naranjo, gracias por abrirme las puertas de un laboratorio lleno de amor y compañerismo y por su sabiduría en la guía constante de mi tesis. Agradezco al Ing. Abraham Oleas por impartirme un poco de su extenso conocimiento. A la Ing. Erica Castillo y al Ing. Mauricio Moreno amigos que nunca dudaron en ayudarme y guiarme constantemente. Gracias sin la ayuda de ustedes no hubiera alcanzado mi meta.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Danielin, Caro, Carlos, Cris, Denisse, Stephy, Henry, Fer, Majo, y sobre todo a ti Pablito por extensas horas de trabajo juntos llenos de anécdotas y risas.

A mis amigas bellas Patty, Karlita, Liz, por tantos momentos juntas y por ser más que amigas hermanas. Finalmente a ti Juanjo por apoyarme en los momentos que más te necesite por ser un hombre, amigo y compañero increíble mientras estuvimos juntos.

GRACIAS!!!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE FIGURAS	xi
LISTADO DE CUADROS	xiii
LISTADO DE ANEXOS	xiv
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del Problema	1
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Marco Teórico	5
1.4.1 Colorantes textiles	5
1.4.2 Efectos sobre la salud humana causada por los colorantes	6
1.4.3 Procesos de remoción	7
1.4.4 Hongos ligninolíticos	7
1.4.5 Enzimas ligninolíticas	8

1.5 Hipótesis	11
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Participantes	12
2.2 Zona de Estudio	12
2.3 Periodo de tiempo de investigación	12
2.4 Diseño	12
2.5 Procedimientos.....	13
2.5.1 Reactivación de los cinco hongos degradadores de colorantes.....	13
2.5.2 Actividad ligninolítica en un medio con guaiacol.....	15
2.5.3 Actividad celulolítica en agar carboximetilcelulosa	16
2.5.4 Presencia de la enzima lacasa en un medio con ABTS.....	17
2.5.5 Medios Naturales para la producción de enzimas.....	18
2.5.6 Cuantificación de la enzima lacasa con dos sustratos ABTS y O-toluidina	18
2.5.7 Cuantificación de la enzima lignina peroxidasa utilizando como sustrato	
ABTS.....	21
2.6 Diagrama de Flujo de los Procedimientos	23
2.7 Análisis de datos	24
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE RESULTADOS	25
3.1 Características macroscópicas y microscópicas de los cinco hongos	
degradadores de colorantes	25
3.2 Actividad ligninolítica en un medio con guaiacol	27
3.3 Actividad celulolítica en agar carboximetilcelulosa	31
3.4 Presencia de la enzima lacasa en un medio con ABTS	34
3.5 Cuantificación de la enzima lacasa con dos sustratos ABTS y O-toluidina	37
3.6 Cuantificación de la enzima lignina peroxidasa utilizando como sustrato ABTS	
.....	42

3.7 Efectividad de tres diferentes medios naturales para la producción de enzimas	47
3.7.1 Efectividad de tres diferentes medios para la producción de lacasas	47
3.7.2 Efectividad de tres diferentes medios para la producción de lignina peroxidasa	51
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	54
4.1 Características macroscópicas y microscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes	54
4.2 Actividad ligninolítica en un medio con guaiacol	55
4.3 Actividad celulolítica en agar carboximetilcelulosa	56
4.4 Presencia de la enzima lacasa en un medio con ABTS	56
4.5 Cuantificación de la enzima lacasa con dos sustratos ABTS y O-toluidina	57
4.6 Cuantificación de la enzima lignina peroxidasa utilizando como sustrato ABTS	58
4.7 Efectividad de tres diferentes medios naturales para la producción de enzimas	58
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	60
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	61
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	62

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1 Características macroscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes y su posible género.....	26
Tabla 3.2 Características microscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes.....	27
Tabla 3.3 Resultados de ANOVA para el crecimiento y cambio de color en medio con guaiacol según el tratamiento	30
Tabla 3.4 Subconjuntos homogéneos para la variable crecimiento y cambio de color en medio con guaiacol según el tratamiento.....	30
Tabla 3.5 Resultados de ANOVA para el diámetro de halo de hidrólisis de celulosa según el hongo.....	32
Tabla 3.6 Subconjuntos homogéneos para la variable diámetro de halo de hidrólisis de celulosa según el hongo.....	33
Tabla 3.7 Resultados de ANOVA para el cambio de coloración del medio con ABTS según el hongo.....	35
Tabla 3.8 Subconjuntos homogéneos para la variable cambio de coloración del medio con ABTS según el hongo.....	36
Tabla 3.9 Tabla de cotejo de mejor actividad enzimática de lacasa por tratamiento (sustrato.hongo.medio natural de producción de enzimas) a lo largo de 40 días	38
Tabla 3.10 Resultados de ANOVA para la actividad enzimática de lacasas según el tratamiento.....	39
Tabla 3.11 Subconjuntos homogéneos para la variable actividad enzimática de lacasas según el tratamiento.....	40
Tabla 3.12 Tabla de cotejo de mejor actividad enzimática de lignina peroxidasas por tratamiento (sustrato.hongo.medio natural de producción de enzimas) durante 40 días	43
Tabla 3.13 Resultados de ANOVA de actividad enzimática lignino peroxidásica según el tratamiento	43
Tabla 3.14 Subconjuntos homogéneos para la variable actividad enzimática lignino peroxidásica según el tratamiento.....	44
Tabla 3.15 Tabla de cotejo de efectividad de tres medios para la producción de enzimas durante 40 días de ensayo enzimático de lacasas	48

Tabla 3.16 Resultados de ANOVA de actividad enzimática de lacasas según el medio natural para la producción de enzimas	48
Tabla 3.17 Subconjuntos homogéneos para la variable actividad enzimática de lacasas según el medio natural de producción de enzimas	49
Tabla 3.18 Tabla de cotejo de efectividad de tres medios para la producción de enzimas durante los 40 días de ensayo enzimático de lignina peroxidasas	51
Tabla 3.19 Resultados de ANOVA de actividad enzimática de lignina peroxidasas según el medio natural de producción de enzimas	51
Tabla 3.20 Subconjuntos homogéneos para la variable actividad enzimática de lignina peroxidasas según el medio natural de producción de enzimas	52

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema de acción de la enzima lacasa.....	9
Figura 1.2 Esquema de acción de la lignina peroxidasa.....	10
Figura 2.1 Reactivación de cinco hongos degradadores de colorantes	15
Figura 2.2 Crecimiento por técnica de punción en medio con guaiacol y producto ligninocelulósico del hongo C7AL.....	16
Figura 2.3 Determinación de actividad celulolítica, proceso de tinción con rojo congo al 1%, y lavado con cloruro de sodio (NaCl) 2M.....	17
Figura 2.4 Medios naturales para la producción de enzimas.....	18
Figura 2.5 Filtración de medios naturales para la producción de enzimas con filtros millipore para jeringa de 0,2 μm	19
Figura 3.1 Morfología macroscópica de los cinco hongos degradadores de colorantes: A) C1BA; B) C18BL; C) C2BL; D) C7AL; E) C20AL.....	25
Figura 3.2 Morfología microscópica del hongos C1BA.....	26
Figura 3.3 Crecimiento de los cinco hongos degradadores de colorantes en medio con guaiacol a una concentración de 1 mL.L^{-1} en presencia de aserrín	28
Figura 3.4 Visualización microscópica con el lente 40x de los cinco hongos degradadores de colorantes seleccionado	29
Figura 3.5 Gráfico interactivo de medias de las repeticiones que presentaron crecimiento y cambio de color del medio con guaiacol de los cinco hongos degradadores de colorantes, por tratamiento.	31
Figura 3.6 Resultados positivos de actividad enzimática celulolítica	32
Figura 3.7 Media de diámetro del halo de hidrólisis de los cinco hongos degradadores de colorantes.....	34
Figura 3.8 Resultados positivos de la presencia de enzima lacasa en medio con ABTS.	35
Figura 3.9 Media de las repeticiones con cambio de coloración del medio con ABTS de los cinco hongos degradadores de colorantes	37
Figura 3.10 Actividad enzimática de lacasas del tratamiento ABTS.C1BA.M3 al día 40 del ensayo enzimático.....	41
Figura 3.11 Actividad enzimática de lacasas del tratamiento ABTS.C1BA.M3 durante 40 días.....	41

Figura 3.12 Actividad enzimática lignino peroxidásica del día 8 de ensayo enzimático	45
Figura 3.13 Actividad enzimática lignino peroxidásica del tratamiento ABTS.C1BA.M3 durante 40 días.....	46
Figura 3.14 Medios naturales para la producción de enzimas en el día 8 de ensayo enzimático.....	47
Figura 3.15 Actividad enzimática de lacasas de la interacción sustrato ABTS y hongo C1BA utilizando los tres medio naturales para la producción de enzimas	50
Figura 3.16 Actividad enzimática de lignina peroxidadas de la interacción sustrato ABTS y hongo C1BA utilizando los tres medio naturales para la producción de enzimas	53

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Cofactores utilizados y reacciones realizadas por las enzimas ligninolíticas lacasas y lignina peroxidasas	11
Cuadro 2.1 Codificación de los cinco mejores hongos degradadores de acuerdo a su lugar de aislamiento	14

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A Medios de Cultivo..... **Error! Bookmark not defined.**

ANEXO B Preparación de reactivos y soluciones buffer..... **Error! Bookmark not defined.**

ANEXO C Análisis de ANOVA diarios de actividad enzimática de lacasas en dependencia de los tratamientos **Error! Bookmark not defined.**

ANEXO D Análisis de ANOVA diarios de actividad enzimática lignino peroxidásica en dependencia de los tratamientos **Error! Bookmark not defined.**

ANEXO E Análisis de ANOVA diarios de actividad enzimática de lacasas en dependencia de los medios naturales para la producción de enzimas **Error! Bookmark not defined.**

ANEXO F Análisis de ANOVA diarios de actividad enzimática de lignina peroxidadas en dependencia de los medios naturales para la producción de enzimas **Error! Bookmark not defined.**

ABREVIATURAS

DCA	Diseño completamente al azar
ABTS	ácido 2,2 azinobis, 3 etil-benzotiazolina-6-sulfónico
O-TOLUIDINA	4,4 diamino-3,3-dimetil bifenil
AEM	Agar Extracto de Malta
PDB	Potato Dextrosa Broth
CMC	Carboximetilcelulosa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
DO	Densidad óptica
U	Actividad enzimática
HR	Humedad relativa
HONGOS	C1BA, C18BL, C2BL, C7AL y C20AL
TRATAMIENTOS DE CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	sustrato.hongo.medio natural de producción de enzimas Ej: ABTS.C1BA.M3 O-TOL.C20AL.M2

RESUMEN

Se determinó la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas de la industria textil. Este trabajo se lo realizó por la necesidad de disponer de tratamientos biológicos y amigables al ambiente que erradiquen los problemas de contaminación provenientes de las industrias textiles.

Se reactivaron cinco hongos seleccionados por su alta capacidad de degradación de colorantes, C20AL, C18BL, C7AL, C2BL y C1BA. De acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas analizadas, todos pertenecen al género *Fusarium*.

Para determinar la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas se realizaron pruebas cualitativas con un diseño completamente al azar con tres repeticiones y pruebas cuantitativas con un arreglo factorial tomando en cuenta el sustrato, hongo y medio de producción de enzimas. En la prueba cualitativa de actividad ligninolítica en medio con guaiacol (Koduri & Ming, 2011), los cinco hongos degradadores de colorantes presentaron resultados positivos, identificados por el crecimiento y cambio de coloración del medio por oxidación del guaiacol. La prueba semi-cuantitativa de actividad celulolítica (Gaitán & Pérez, 2007; Valencia, 2009) dio resultados positivos, expresados por los halos de aclaramiento de hidrólisis de celulosa, el hongo con mayor diámetro de halo fue C18BL, mientras que el hongo C1BA exhibió el menor resultado. La presencia de la enzima lacasa se midió cualitativamente por el cambio de coloración del medio por oxidación del ABTS (Córdoba, 2009), en esta prueba todos los hongos seleccionados presentaron cambio de coloración. El hongo C1BA presentó el mejor resultado en esta prueba y el peor, el hongo C7AL.

En las pruebas cuantitativas se realizó un ensayo de cuantificación de actividad enzimática durante 40 días tanto para lacasas como para lignina peroxidasas. El mejor tratamiento a lo largo del ensayo enzimático de lacasas (Castillo, 2004), fue en el que se utilizó el sustrato ABTS, el hongo C1BA y el medio M3 de producción de enzimas (ABTS.C1BA.M3), con el valor más alto de 308,64 U.L⁻¹enz. El mejor tratamiento de actividad lignino peroxidásica (Castillo, 2004; Téllez, 2010), fue de igual forma el tratamiento ABTS.C1BA.M3, con el máximo valor de 210,53 U.L⁻¹enz.

ABSTRACT

This investigation determined the enzymatic activity of laccases and lignin peroxidases of selected dyes degrading fungi for the treatment of wastewater from the textile industry. This work was conducted because of the lack of biological and friendly environmental treatments that eradicate the pollution problems of the textile industry.

Five fungi selected for their high capacity to degrade dyes, were reactivated, C20AL, C18BL, C7AL, C2BL and C1BA. According to the macroscopic and microscopic characteristics analyzed, all belonging to the genus *Fusarium*.

To determine the enzymatic activity of laccases and lignin peroxidases qualitative tests were performed with a completely randomized design with three replications and quantitative tests with a factorial arrangement taking into account the substrate, fungus and enzyme production medium. In the qualitative test of ligninolytic activity in guaiacol medium (Koduri & Ming, 2011), all five dye-degrading fungi showed positive results, identified by the growth and change in coloration of the medium due to oxidation of the guaiacol. In the semi-quantitative test for cellulolytic activity (Gaitan & Perez, 2007; Valencia, 2009), all studied fungi presented positive results measured by the diameter of hydrolysis of cellulose haloes; the fungus with the best diameter of halo was the C18BL, while the fungus C1BA had the smaller diameter. The presence of the enzyme laccase was qualitatively measured by change of coloration of the medium by oxidation of ABTS (Cordova, 2009), in this test all selected fungi presented a change of coloration. The fungus C1BA presented the best result in this test and the worst was the fungus C7AL.

In the quantitative tests, a enzyme quantification assay was examined over a period of 40 days for both the laccase and lignin peroxidases. The best long term treatment of enzyme assay for laccase (Castillo, 2004) was the one that used the substrate ABTS, the fungus C1BA and the enzyme production medium M3 (ABTS.C1BA.M3), with the highest value of 308,64 U.L⁻¹enz. The best treatment for lignin peroxidase activity (Castillo, 2004; Tellez, 2010), was also the ABTS.C1BA.M3, with its maximum value of 210.53792 U.L⁻¹enz.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.

1.1 Formulación del Problema.

En Ecuador, la contaminación es cada vez más frecuente y constituye un grave problema tanto ambiental como de salud pública. Se reconoce que su control es de tanta trascendencia que la Constitución de la República le dedica todo un Capítulo a la naturaleza, su protección y restauración (Constitución del Ecuador, 2008). Una de las severas formas de continua contaminación ambiental es la ocasionada por las descargas de contaminantes al agua, aire o suelo, provocadas por actividades tanto domésticas como laborales, artesanales e industriales (Hughes & Cooper, 1996).

Es importante señalar que entre los contaminantes químicos que mayor preocupación generan en el mundo están los causados por la acción industrial, sin embargo, en Ecuador, la preocupación institucional por las alteraciones provocadas por los colorantes en la salud y el ambiente es muy reciente. Se reconoce que en el país su uso está ligado esencialmente a actividades artesanales e industriales como la tintorería y la curtiembre (Calle *et al.*, 2010).

La mayor parte de los tratamientos utilizados para reducir el impacto negativo de los colorantes al ambiente se concentra en la sustitución de sustancias químicas menos tóxicas, que en la aplicación de alternativas más seguras que erradiquen el problema. A pesar de que las sustancias utilizadas son de baja toxicidad, debido a la masificación de su uso estamos expuestos a altas dosis (Greenpeace, 2010). Lo señalado exige buscar un tratamiento biológico que elimine el problema de una manera segura tanto para el ambiente como para los seres humanos.

Considerando lo mencionado el tratamiento biológico de agua residual contaminada con colorantes mediante la biodegradación con enzimas del tipo lacasas y lignina peroxidasas es utilizado cada vez con más frecuencia, debido a su capacidad de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos, no fenólicos y otros compuestos aromáticos (Mayer & Staples, 2002).

Las lacasas son las primeras enzimas ligninolíticas secretadas por el hongo alrededor del medio (Granda, 2009). Son enzimas fenoloxidasas de gran importancia en la biorremediación del ambiente, ya que oxidan algunos compuestos fenólicos considerados altamente cancerígenos. Estas enzimas catalizan la oxidación de aminos aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones (Dávila & Vásquez, 2006). Llegan incluso a polimerizarlos, precipitándolos y eliminándolos de agua contaminada por la industria textilera.

Las lignina peroxidasas (LiP) son hemo proteínas extracelulares, dependiente del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Gold & Alic, 1993). Además, la LiP es un fuerte oxidante, actuando no solo sobre compuestos tales como fenoles y anilinas, sino que también compuestos no-fenólicos y éteres aromáticos (Tuor *et al.*, 1992)

1.2 Justificación.

A nivel mundial, la alta producción industrial de colorantes y el inadecuado manejo de sus desechos está generando el deterioro acelerado del planeta y, ante ello, Ecuador no es la excepción. Cada vez es más frecuente el uso de colorantes en las industrias de tintorería y curtiembre a pesar de su alta toxicidad y la casi inexistente disponibilidad de procedimientos específicos para su remoción. Lo señalado exige ubicar alternativas costo-efectivas que garanticen la prevención de los daños al ambiente y la salud de la población (Ivester & Neefus, 2010).

Una de estas alternativas es la implementación de la biorremediación con la utilización de enzimas. Actualmente, países con un mayor desarrollo científico y tecnológico aplican la biorremediación con enzimas debido a los altos niveles de eficiencia y efectividad. Ecuador necesita acoger este tipo de procedimiento y con ello encontrar respuestas eficaces a los serios problemas que genera la contaminación por colorantes reactivos. Pero si hay algo que justifique plenamente el desarrollo y el apoyo para la investigación de los efectos de la contaminación por colorantes y alternativas de remoción es el inminente riesgo que representa para la naturaleza y la vida de las personas. Con relación al ambiente, bosques, ríos, lagunas, lagos, los

centros urbanos y rurales, sin discriminación, han sido y están siendo contaminados, destruyendo su biodiversidad (Ivester & Neefus, 2010).

Los contaminantes originados de actividades humanas están por doquier, pues se desplazan por el agua, aire, o suelo (Velasquí, 2004). En relación con la vida humana las intoxicación agudas generadas por colorantes causan afecciones pulmonares, dermatosis, ulceraciones cutáneas y perforación del tabique nasal (COOPSA, 2006).

Los investigadores se han enfocado en descubrir o perfeccionar procesos que puedan disminuir la contaminación. Dentro de estas formas de remediación se encuentran los procesos físicos y químicos, que tienen la desventaja de resolver un problema y crear otro. Son procesos que pueden eliminar un tipo de contaminación, pero pueden crear otros tipos de contaminación (Aburto & Quintero, 2001), por ello la importancia de encontrar alternativas de remediación biológicas que sean amigables con el ambiente y que anulen el problema de contaminación existente.

Una de estas alternativas de tratamientos biológicos para la contaminación con colorantes generados por las industrias textiles es la biodegradación mediada por el uso de enzimas. Para la obtención de las enzimas que puedan biodegradar colorantes, es preciso seleccionar primero a los microorganismos que posean la capacidad de producir enzimas para la biodegradación de ligninas, debido a que la estructura del monómero de la lignina es muy parecida a las estructuras de los colorantes (Castillo, 2004).

De los microorganismos estudiados, se ha encontrado que los hongos de la pudrición blanca de la madera, específicamente del grupo de los basidiomicetos, algunos ascomicetos y otros géneros de hongos tienen la capacidad de producir grandes cantidades de estas enzimas, tanto extracelular como intracelularmente (Martínez *et al.*, 2005).

Dos de estas enzimas capaces de la degradación de los colorantes son las lacasas y las lignina peroxidasas. Las lacasas han sido caracterizadas como enzimas de baja especificidad de sustrato, que reducen el oxígeno molecular a agua y son

capaces de oxidar monofenoles, difenoles, polifenoles, aminofenoles y diaminas (Arana *et al.*, 2003) y es probable que se considere la principal enzima relacionada con la decolorización de aguas contaminadas con colorantes (Kahraman & Gurdal, 2001). Las lignina peroxidasas complementan el trabajo de las lacasas por cuanto no solo oxidan compuestos fenólicos, sino también compuestos no fenólicos y aromáticos. Se ha demostrado que las enzimas peroxidasas y oxidasas (lignina peroxidasas y lacasas) trabajando como complejo enzimático son capaces de transformar o mineralizar una amplia gama de compuestos orgánicos persistentes (Rubilar, 2007).

Por el gran valor que tiene la aplicación de las lacasas y lignina peroxidasas en la industria para la oxidación de los compuestos aromáticos, tanto en los efluentes, como en el suelo contaminado, se generan investigaciones de procedimientos más eficaces para la producción de la mayor cantidad de estas enzimas y por lo tanto, su mayor aplicabilidad en muchos de los procesos biotecnológicos (Garzón, 2009). La producción de lacasas y lignina peroxidasas es afectada por muchos factores típicos de la fermentación como composición de los medios de crecimiento, fuentes de carbono y nitrógeno, pH, temperatura, entre otros (Guerra *et al.*, 2008). Por ello, la importancia de estudiarlos a nivel de laboratorio, con el fin de incrementar la producción de esta enzima para posteriores estudios de remediación.

1.3 Objetivos.

1.3.1 Objetivo general.

Determinar la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil.

1.3.2 Objetivos específicos.

- Determinar la actividad ligninolítica y celulolítica de los hongos seleccionados, mediante una prueba cualitativa con guaiacol y una prueba semi-cuantitativa con agar carboximetilcelulosa.
- Determinar la presencia de la enzima lacasa de los hongos degradadores de colorantes mediante una prueba cualitativa utilizando medio con ABTS.
- Evaluar la efectividad de tres diferentes medios naturales para la producción de lacasas y lignina peroxidasas de los hongos.
- Cuantificar la actividad enzimática de lacasas utilizando dos sustratos, ABTS y O-toluidina.
- Cuantificar la actividad enzimática de lignina peroxidasas utilizando como sustrato ABTS.

1.4 Marco Teórico.

1.4.1 Colorantes textiles.

El teñido textil se emplea cada vez con mayor frecuencia en el país, tanto a nivel artesanal como industrial, lamentablemente sin considerar las medidas de seguridad tanto personales como ambientales. Evidencia de ello es la fabricación de pantalones en Pelileo, ropa de todo tipo de Atuntaqui, Otavalo, Ibarra; ropa de cuero en Quisapincha y Cotacachi, ropa de cama en la Provincia del Cotopaxi. La actividad de la industria textil, vestuarios y cuero en el Ecuador consumía diariamente para el año 2005, 182.000 litros de agua (Rodríguez *et al.*, 2006).

Es frecuente observar efluentes con una alta carga de colorantes vertidos directamente a los ríos, acequias; incluso agua totalmente teñida, producto de los procesos artesanales y domésticos del teñido de telas y ropa, descargada directamente a la red pública de alcantarillado (Velasquí, 2004).

Una gran variedad y cantidad de productos químicos son utilizados en el proceso de teñido. Se estima que aproximadamente diez mil colorantes y pigmentos

diferentes son empleados en esta industria y que la producción mundial asciende a 7×10^5 toneladas anuales, de las cuales un poco más del 10% se pierde durante el proceso de coloración de fibras (Young & Yu, 1997).

Se reconoce que en la industria textil los residuos de colorantes son los más difíciles de tratar, debido a que la mayoría son de origen sintético y poseen estructuras moleculares aromáticas complejas lo cual hace muy complicado su proceso de biodegradación (Castillo, 2004).

Varias son las formas por las cuales es posible clasificar a los colorantes textiles, quizá la más utilizada es aquella que considera su aplicación a la fibra o composición química, también sus propiedades ácidas, básicas, directas, dispersos mordientes y reactivas (Garzón, 2009).

La clasificación que considera su composición química se hace con base al grupo cromóforo principal que constituye el colorante. El color Index se clasifica en: fenoles, polifenoles, nitrozo, nitro, azo, azoico, estilbeno, diarilmetano, triarilmetano, quinoleína, metino, acridina, azufre, tiazol, tiamina, indamina, azina, oxacina, lactona, antraquinona, indigoida, ftolacianina (Garzón, 2009).

1.4.2 Efectos sobre la salud humana causada por los colorantes.

La contaminación del agua por desechos industriales, cada vez es más agresiva, deteriorando la salud humana o produciendo efectos negativos en los seres vivos y el medio ambiente. Los desechos de colorantes provenientes de industrias textiles pueden ocasionar diversas enfermedades como alergias, dermatitis, gastritis, úlceras, infecciones pulmonares, infecciones digestivas, cáncer de vejiga, entre otras (Makagreenben, 2011).

1.4.3 Procesos de remoción.

Los tratamientos utilizados para la remoción de efluentes con colorantes provenientes de la industria textil son del tipo físico, químico y biológico (Castillo, 2004).

Los tratamientos físicos utilizan el carbón activado, especialmente en la remoción de colorantes del tipo catiónico y ácido, su eficiencia es menor en colorantes de tipo disperso, directo y reactivo (Robinson *et al.*, 2001).

Otro método de remoción física empleado frecuentemente, en efluentes acuosos contaminados con colorantes directos es la coagulación electrocinética, método que consiste en la adición de sulfato ferroso (Fe_2SO_4) y cloruro férrico (FeCl_3) al agua (Robinson *et al.*, 2001).

Los tratamientos químicos utilizan procesos oxidativos y de ozonificación. Los oxidativos son los más utilizados en la decoloración y el agente oxidante que más se usa es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Rhaghavacharya, 1997). El proceso de ozonificación permite degradar hidrocarburos clorinados, fenoles, pesticidas e hidrocarburos aromáticos, sin embargo el tiempo de vida media del ozono es muy corto, aproximadamente 20 minutos o menos en presencia de colorantes (Castillo, 2004).

Los tratamientos biológicos, aeróbico, anaeróbico o mixto, utilizan diferentes tipos de microorganismos como bacterias, algas, levaduras y hongos; son considerados efectivos para la remoción de sustancias tóxicas y del exceso de materia orgánica (Haug *et al.*, 1991).

1.4.4 Hongos ligninolíticos.

Los hongos ligninolíticos u hongos de podredumbre blanca forman parte de los microorganismos más utilizados para la biorremediación de efluentes contaminados por la industria textil, ello, considerando su capacidad para degradar la

lignina, polímero con una alta concentración de anillos aromáticos y un profundo grado de polimerización (Casillo, 2004). La biodegradación de lignina es fundamental en el reciclaje del carbono en los ecosistemas terrestres y después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y la forma más abundante de material aromático en la biosfera (Yaovapa, 2005).

La mayor parte de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo basidiomicetos, este grupo degrada completamente la lignina a través de la secreción de enzimas que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y en conjunto logran su degradación (Dávila & Vásquez, 2006).

El mecanismo enzimático producido por los hongos ligninolíticos viene dado por la acción de oxidasas y peroxidasas, estas enzimas no presentan una especificidad alta, por lo tanto pueden tener actividad sobre diferentes compuestos de tipo fenólicos y azo (Casillo, 2004).

1.4.5 Enzimas ligninolíticas.

Las enzimas o biocatalizadores son proteínas cuya función es catalizar las reacciones que realizan los seres vivos. Las enzimas se diferencian entre sí por su especificidad, actividad enzimática, cinética de reacción, temperatura, pH (Rubilar, 2007).

Se conoce que la degradación de la lignina es catalizada por un complejo extracelular que producen los hongos, cuando han sido expuestos a condiciones de limitación de nutrientes en el medio de cultivo (Córdoba 2009). Este complejo está compuesto por tres enzimas ligninolíticas involucradas en la degradación de lignina, la manganeso peroxidasa (MnP), la lignino peroxidasa (LiP) y las lacasas (Selvam *et al.*, 2003).

1.4.5.1 Lacasas.

Las lacasas (benzodiol:oxígeno, óxidoreductasas) son glicoproteínas que requieren de oxígeno (O_2) para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, sustratos orgánicos por medio de la sustracción de un electrón transformándolo en H_2O_2 y radicales activos (Selvam *et al.*, 2003).

Las lacasas son enzimas que poseen un centro activo compuesto por cobre, por lo que también son llamadas multicobre oxidasas, este centro activo es oxidado por el oxígeno o por un compuesto aromático, generando un intermediario deficiente de un par de electrones. Dicho componente será oxidado nuevamente por O_2 o por sustratos fenólicos. El ciclo es completado gracias a cuatro oxidaciones posteriores, provocando que la enzima vuelva a su estado relajado (Figura 1.1, según Castillo 2004). De los tres átomos de cobre que poseen las lacasas, uno de ellos es responsable de la coloración azul. La enzima que no posee este átomo de cobre se denominan lacasas blancas o amarillas (Khusal *et al.*, 2010).

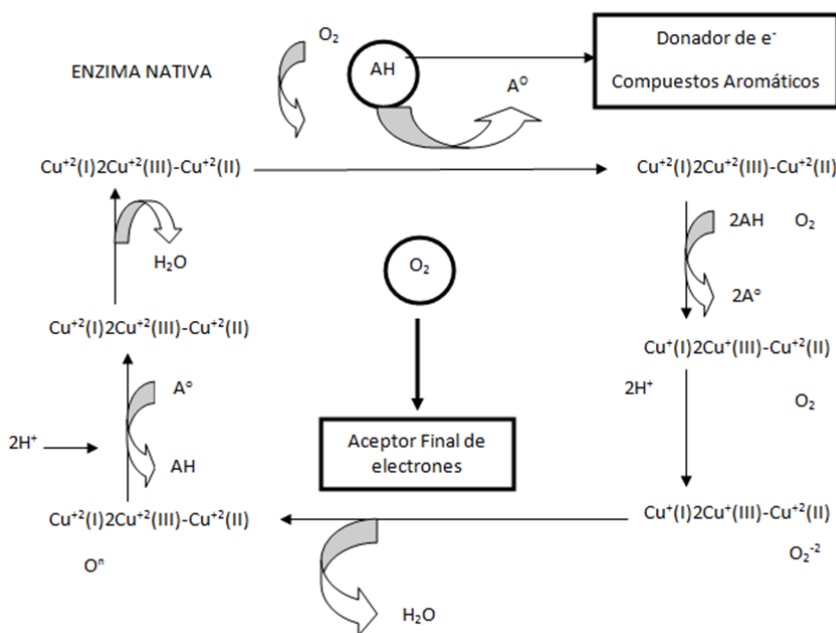


Figura 1.1 Esquema de acción de la enzima lacasa (Castillo, 2004).

El pH óptimo de esta enzimas, dependiendo del sustrato que se esté oxidando puede variar entre 3.5 y 7.5 (González, 2009). Se ha reportado que son enzimas

capaces de oxidar principalmente sustancias recalcitrantes, como clorofenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos organofosforados, fenoles y colorantes aromáticos (Sandoval & Ospina, 2008).

1.4.5.2 Lignina Peroxidasas.

Las lignina peroxidasas contienen un grupo hemo-férrico y es oxidada por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generando un intermediario deficiente de electrones el cual es conocido como compuesto I: dicho componente puede ser reducido ya sea por un donador de electrones o por sustratos fenólicos, generando el compuesto II el cual regresará a su estado de reposo inicial por medio de una reducción posterior (Figura 1.2, según Castillo 2004), que dará como resultado un compuesto fenólico oxidado y agua (Dávila & Vasquez, 2006).

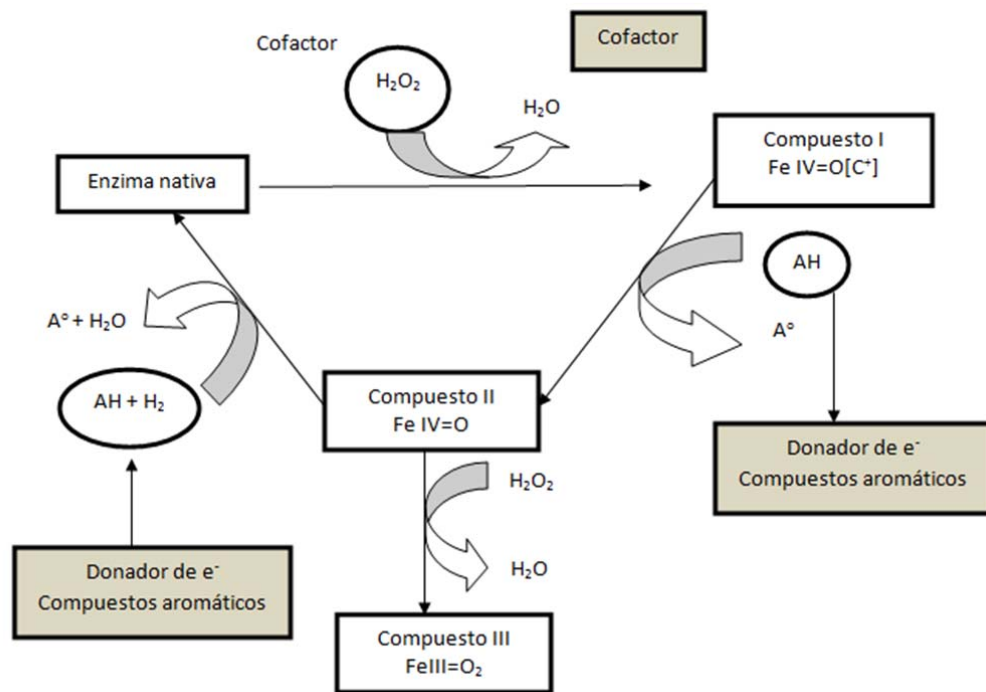


Figura 1.2 Esquema de acción de la lignina peroxidasa (Castillo, 2004).

Las lignina peroxidadas se diferencian de otras peroxidadas por su alto potencial de óxido-reducción, lo que permite oxidar directamente compuestos aromáticos no fenólicos (Usnayo, 2007), y presentan un pH óptimo menor/igual a 3 (Quintero *et al.*, 2006).

Tanto las lacasas como las lignina peroxidadas pueden ser fuertemente inducidas por la adición de elementos como cobre, manganeso, magnesio y determinadas por mediadores o sustratos como ABTS, siringaldazina, 2,6 dimetoxifenol, O-toluidina e intermedarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentran el alcohol veratrílico (Sandoval & Ospina, 2008).

A continuación en el cuadro 1.1 se puede observar las reacciones y cofactores utilizados por las dos enzimas ligninolíticas mencionadas (Sandoval & Ospina, 2008).

Cuadro 1.1 Cofactores utilizados y reacciones realizadas por las enzimas ligninolíticas, lacasas y lignina peroxidadas.

ENZIMA	COFACTOR	REACCIONES
Lacasas (EC1.10.3.2)	O ₂ , Cu ⁺²	Oxidación de fenoles a radicales fenoxilo
Lignina Peroxidasas (EC.1.11.1.14)	H ₂ O ₂	Oxidación de núcleos aromáticos no fenólicos hasta radicales catiónicos

Fuente: Sandoval & Ospina, 2008.

1.5 Hipótesis.

Los hongos seleccionados producen lacasas y lignina peroxidadas en medios naturales y con distintos sustratos.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Participantes.

En el presente estudio participaron, como directora, la M.C. Alma Koch y como codirectora, la Dra. Blanca Naranjo, docentes de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE.

Se contó también con la participación del Ing. Abraham Oleas MC., docente de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, ESPE. Como asesores en temas de actividad enzimática y estadística, la Ing. Erica Castillo y el Ing. Mauricio Moreno.

2.2 Zona de Estudio.

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la Escuela Politécnica del Ejército; ubicado en Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Sangolquí, situación geográfica: 0° 18' 53'', 52° S.

2.3 Periodo de tiempo de investigación.

Este proyecto de investigación se inició en febrero del 2011 y finalizó en octubre del mismo año.

2.4 Diseño.

En esta investigación se aplicó para las pruebas cualitativas y semi-cuantitativas un diseño completamente al azar (DCA) unifactorial (Gutiérrez & de la Vara, 2008), con tres repeticiones. La variable independiente estuvo constituida por los hongos degradadores de colorantes, mientras que las variables dependientes fueron en la prueba cualitativa de actividad ligninolítica el crecimiento del hongo y el cambio de color del medio, en la prueba cualitativa de presencia de enzima lacasa el cambio

de color del medio y finalmente en la prueba semi-cuantitativa de actividad celulolítica el diámetro del halo de hidrólisis.

En las pruebas cuantitativas, se implementaron un arreglo factorial. Para el análisis de actividad enzimática de lacasas, se utilizó un arreglo factorial mediante los siguientes factores $5 \times 3 \times 2 = 30$ con tres repeticiones, lo señalado corresponde a 5 hongos, 3 medios naturales para la producción de enzimas y 2 sustratos. Para el análisis de la actividad enzimática de lignina peroxidasas, se utilizó un arreglo factorial mediante los siguientes factores $5 \times 3 \times 1 = 15$ con tres repeticiones. Para esto se presentan 5 hongos, 3 medios naturales para la producción de enzimas y 1 sustrato.

2.5 Procedimientos.

La investigación realizada en el laboratorio abarcó la reactivación de los cinco hongos degradadores de colorantes a estudiarse, la evaluación cualitativa de actividad ligninolítica, la valoración semi-cuantitativa de la actividad celulolítica, la evaluación cualitativa de presencia de la enzima lacasa, la cuantificación de la actividad enzimática de lacasas utilizando dos sustratos y finalmente la cuantificación de lignina peroxidasas utilizando un sustrato.

2.5.1 Reactivación de los cinco hongos degradadores de colorantes.

En el presente proyecto de investigación se utilizaron hongos degradadores de colorantes reactivos aislados en el estudio realizado por Valenzuela (2011). Los cinco mejores hongos degradadores, cuya codificación se otorga por el lugar de aislamiento Cuadro 2.1, fueron conservados en refrigeración en agar extracto de malta (AEM).

Cuadro 2.1 Codificación de los cinco hongos degradadores de acuerdo a su lugar de aislamiento.

HONGO	LUGAR DE AISLAMIENTO
C20AL	Agua residual
C18BL	Lodo residual
C7AL	Agua residual
C2BL	Lodo residual
C1BA	Lodo residual

Fuente: Valenzuela, 2011.

Para la reactivación de los cinco hongos se procedió bajo condiciones estériles a sembrar por punción en medio de agar extracto de malta (AEM) con 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol. Tanto el medio como las cajas petri fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min (Usnayo, 2007).

Seguidamente se incubaron las cajas a 28°C y una humedad relativa de 80%, las cajas fueron observadas tanto macroscópica como microscópicamente para descartar cualquier tipo de contaminación.

En los hongos cultivados en medio AEM, la observación macroscópica se concentró en las características estructurales tales como: forma de crecimiento, color de la cepa fúngica, textura (Usnayo, 2007).

Para identificar las principales características microscópicas de los hongos, con la colaboración del Ing. Abraham Oleas, docente de la Carrera de Ciencias Agropecuarias de la ESPE, se utilizaron dos técnicas:

1. En la primera se utilizaron los hongos con crecimiento masivo previamente sembrados en AEM, con un asa, se realizó un raspado sobre la superficie del cultivo de cada hongo, y luego un frotis en un porta objetos con una

gota de Hidróxido de Potasio (KOH) 0,1 M, se colocó un cubre objetos y se observó en el microscopio (Sánchez, 2006).

2. En la segunda técnica, a los hongos con crecimiento masivo previamente sembrados en AEM, con un pedazo de cinta pegante se tomó parte del micelio y en un porta objetos se colocó una gota de azul de lactofenol, finalmente se colocó la cinta scotch con el micelio en el porta objetos y se observó al microscopio (Vallejos, 2007).

Para la conservación de los hongos, se procedió a resembrarlos en un medio estéril de potato dextrosa broth (PDB) con 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol, se incubaron durante 3 días a 30°C y 100 r.p.m. Cuando los hongos han crecido, se refrigeraron para mantenerlos (Usnayo, 2007).

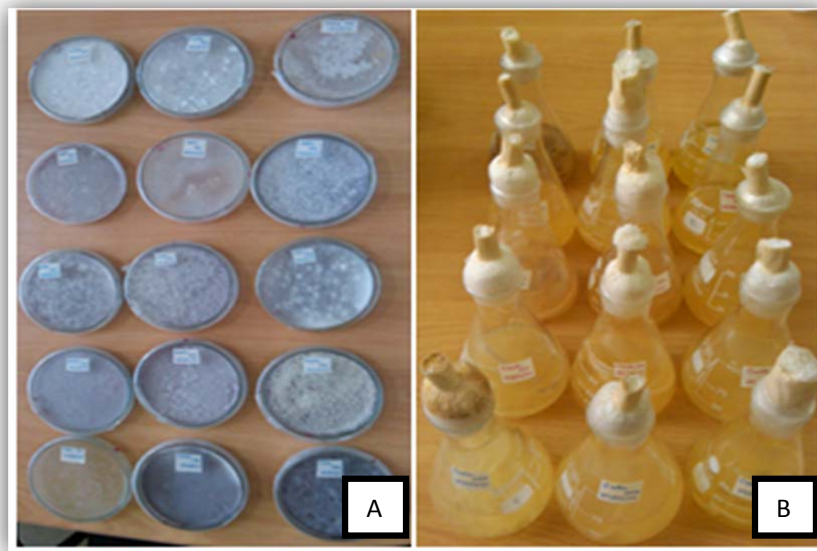


Figura 2.1 A) Reactivación de cinco hongos degradadores de colorantes en AEM.
B) Reactivación de cinco hongos degradadores de colorantes en PDB.

2.5.2 Actividad ligninolítica en un medio con guaiacol.

A partir de los hongos obtenidos en la reactivación se realizó la primera prueba cualitativa de actividad ligninolítica en un medio con guaiacol. El medio con guaiacol consta de AEM con diferentes concentraciones de guaiacol según el crecimiento de los hongos en este alcohol (Koduri & Ming, 2011).

Se utilizaron concentraciones de guaiacol de 1, 2 y 3 mL.L⁻¹, con y sin la presencia de producto lignocelulósico, aserrín, en una concentración de 4 g.L⁻¹ (Usnayo, 2007). La siembra fue empleando la técnica de punción en medio sólido a partir de medio líquido PDB. Tanto el medio como las cajas petri fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min.

El crecimiento de los hongos en cajas Petri fue evaluado microscópicamente todos los días, después de dos y cuatro semanas de incubación a 28°C y una humedad relativa del 80-85%.

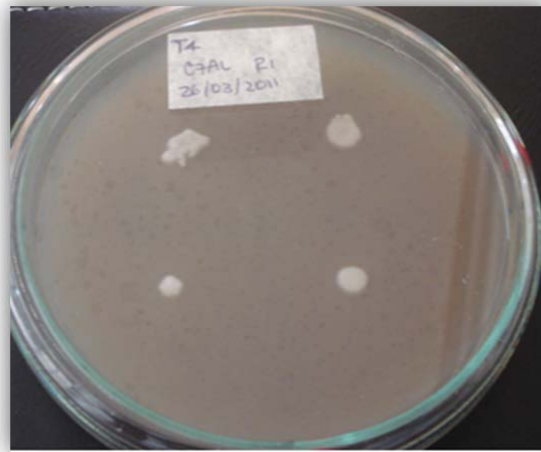


Figura 2.2 Crecimiento por técnica de punción en medio con guaiacol y producto lignocelulósico del hongo C7AL.

2.5.3 Actividad celulolítica en agar carboximetilcelulosa.

Se realizó una prueba semi-cuantitativa de actividad celulolítica a partir de los hongos obtenidos en la reactivación. Esta prueba se realizó mediante una siembra en punción, en agar carboximetilcelulosa (CMC). En el Anexo A se describe el contenido del agar CMC. Las cajas fueron incubadas a 30°C, por 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una tinción con la adición de 5 mL de rojo congo al 1%, como revelador. Se dejó actuar el colorante durante 15 min, se retiró el exceso y se lavó con 5 mL de una solución de cloruro de sodio (NaCl) 2M, durante 15 min. La descripción de la preparación del reactivo revelador y de la solución de cloruro de sodio (NaCl) se encuentra en el Anexo B. Finalmente, se cerraron las cajas con

parafilm y se llevaron a refrigeración durante 12 h (Gaitán & Pérez, 2007; Valencia, 2009).

Luego de las 12 h, se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas de aclaramiento (halos) debido a la hidrólisis de la celulosa, cuyo diámetro fue medido en centímetros (Gaitán & Pérez, 2007; Valencia, 2009).

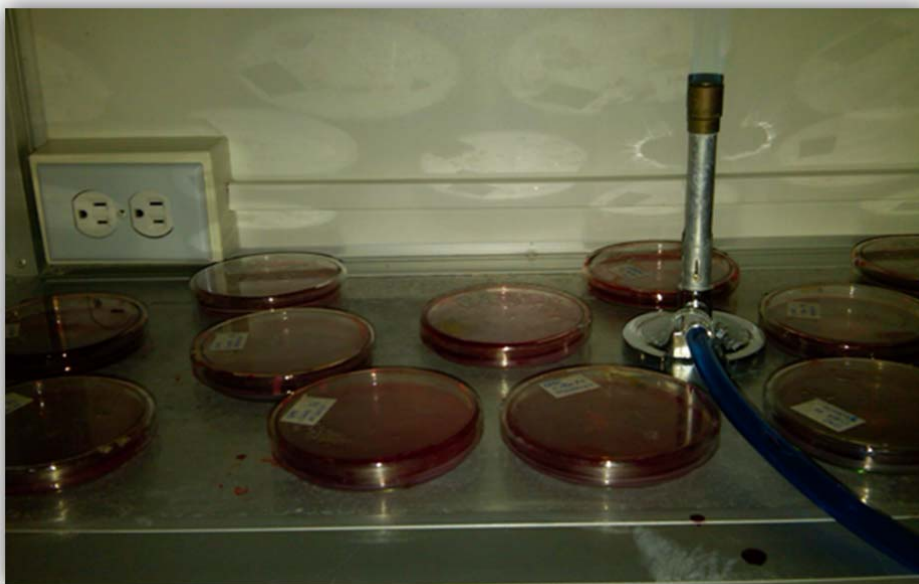


Figura 2.3 Determinación de actividad celulolítica, proceso de tinción con rojo congo al 1%, y lavado con cloruro de sodio (NaCl) 2M.

2.5.4 Presencia de la enzima lacasa en un medio con ABTS.

Para la prueba cualitativa con ABTS, los hongos degradadores fueron sembrados en un medio con ABTS, cuya composición se encuentra detallada en el Anexo A. La técnica de siembra fue en forma de discos de agar provenientes de la reactivación de los hongos en AEM. La presencia de la enzima lacasa fue evaluada por el cambio de coloración del medio con ABTS (Córdoba, 2009).

El pH se ajustó a 5,8-6,0 con la adición de sales de fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) al 0,1% y sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 0,05%. La preparación de las soluciones se encuentran en el Anexo B (Herrera & Rosas; 2003).

2.5.5 Medios Naturales para la producción de enzimas.

Los hongos reactivados en medio PDB, fueron sembrados en tres medios naturales para la producción de enzimas. Los medios naturales se diferencian por el tipo de sal utilizada y su concentración. Los medios se homogenizaron y se incubaron durante 40 días para la ejecución del ensayo enzimático. El sobrenadante se filtró para eliminar los restos celulares antes de medir la concentración de enzima (Castillo, 2004). La composición de los tres medios naturales se explican en el Anexo A.



Figura 2.4 Medios naturales para la producción de enzimas.

2.5.6 Cuantificación de la enzima lacasa con dos sustratos ABTS y O-toluidina.

Para la cuantificación de la actividad enzimática de lacasa se utilizaron dos sustratos ABTS y O-toluidina. En ambos casos se utilizó como extracto crudo el medio natural para la producción de enzimas, que se encontraban en incubación a 30°C y 100 r.p.m. al paso de los días en el que se realizó el ensayo enzimático. El extracto crudo fue previamente filtrado con filtros millipore para jeringa de 0,2 μm , tal como se indica en la figura 2.5. Todo el ensayo se realizó por triplicado.



Figura 2.5 Filtración de medios naturales para la producción de enzimas con filtros millipore para jeringa de 0,2 µm.

En los ensayos de cuantificación se utilizaron dos sustratos, cuyas técnicas se describen a continuación.

2.5.6.1 Sustrato ABTS.

En tubos de ensayo se colocó la mezcla de reacción la que contenía 2,85 mL de ABTS 0,5 mM en un buffer de acetatos 0,1M (pH 5) y 0,15 mL de extracto crudo (medios naturales para la producción de enzimas), de esta manera se obtuvo un volumen total de 3 mL (Castillo, 2004).

Posteriormente, los tubos se mantuvieron a baño maría a 30°C, por 1 h. Después fueron enfriados en agua e inmediatamente se procedió a leer la absorbancia a 420 nm (Castillo, 2004).

Para la preparación del blanco, se colocó 0,15 mL del extracto crudo y 2,85 mL de una buffer de acetatos 0,1M (pH5) (Sandoval & Ospina; 2008).

La actividad enzimática de lacasas se calculó a partir de las lecturas de D.O.₄₂₀ mediante la siguiente ecuación (Chaparro & Rosas; 2006):

$$AE = \frac{\Delta DO \times fd \times Vt}{\Delta t \times \varepsilon \times L \times Venz}$$

Donde:

AE: Actividad enzimática en unidades internacionales por litro de disolución de enzima (U.L⁻¹enz).

ΔDO: Diferencia de densidad óptica.

fd: Factor de conversión debido al coeficiente de extinción molar.

Vt: Volumen total de la solución (mL).

Δt: Tiempo de reacción en el baño maría (minutos).

ε: Coeficiente de extinción molar ($\varepsilon_{420nm} = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para ABTS).

L: Longitud de la celda (cm).

Venz: Volumen de la solución de extracto crudo utilizada (mL).

Una unidad (U) de actividad de lacasas se define como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μmol de ABTS, por minuto, a pH=5 y a 30°C.

2.5.6.2 Sustrato O-toluidina.

Este ensayo se realizó en tubos de ensayo que contenían una mezcla de reacción con 2,85 mL de O-toluidina 2 mM en un buffer de acetatos 0.1 M (pH 3,7) y 0,15 mL de extracto crudo (medios naturales para la producción de enzimas), de esta manera se obtuvo un volumen total de 3 mL (Castillo, 2004).

Posteriormente, los tubos fueron conservados a baño maría a 30°C, por 1 h. Después fueron enfriados en agua e inmediatamente se procedió a la lectura de la absorbancia a 627 nm (Castillo, 2004).

Para la preparación del blanco, se colocó 0,15 mL del extracto crudo y 2,85 mL de una buffer de acetatos 0,1M (pH 3,7) (Téllez *et al.*, 2010).

La actividad enzimática de lacasas se calculó a partir de las lecturas de D.O.₆₂₇ mediante la siguiente ecuación (Chaparro & Rosas; 2006):

$$AE = \frac{\Delta DO \times fd \times Vt}{\Delta t \times \varepsilon \times L \times Venz}$$

Donde:

AE: Actividad enzimática en unidades internacionales por litro de disolución de enzima (U.L⁻¹enz).

ΔDO: Diferencia de densidad óptica.

fd: Factor de conversión debido al coeficiente de extinción molar.

Vt: Volumen total de la solución (mL).

Δt: Tiempo de reacción en el baño maría (minutos).

ε: Coeficiente de extinción molar ($\varepsilon_{627nm} = 1,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para O-toluidina (Téllez *et al.*, 2010).

L: Longitud de la celda (cm).

Venz: Volumen de la solución de extracto crudo utilizada (mL).

Una unidad (U) de actividad de lacasas se define como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μmol de O-toluidina, por minuto, a pH=3,7 y a 30°C.

2.5.7 Cuantificación de la enzima lignina peroxidasa utilizando como sustrato ABTS.

Para cuantificar la actividad enzimática lignino peroxidásica se utilizó como sustrato ABTS, como extracto crudo el medio natural para la producción de enzimas, incubados a 30°C y 100 r.p.m. al paso de los días de ensayo enzimático. El extracto crudo se filtró con filtros millipore para jeringa de 0,2 μm, antes de proceder a las lecturas de igual manera que en la cuantificación de la actividad enzimática de lacasas. Todo el ensayo se realizó por triplicado.

Se continuó utilizando para la cuantificación tubos de ensayo, los que contenían una mezcla de reacción con ABTS 10mM (428 μ L), buffer de acetatos 100 mM pH 3 (1,71 mL), 428 μ L de extracto crudo (medios naturales para la producción de enzimas) y 428 μ L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De esta manera se obtuvo un volumen total de 3 mL (Usnayo, 2007).

Posteriormente, los tubos se mantuvieron a baño maría a 30°C, por 1 h. Luego fueron enfriados en agua e inmediatamente se leyó la absorbancia a 420 nm (Usnayo, 2007).

Para la preparación del blanco, se colocó 428 μ L de ABTS 10mM, 428 μ L del extracto crudo y 2,13 mL de buffer de acetatos 100mM (pH3) (Usnayo, 2007).

La actividad enzimática de lignina peroxidasas se calculó a partir de las lecturas de D.O.₄₂₀ mediante la siguiente ecuación (Chaparro & Rosas; 2006):

$$AE = \frac{\Delta DO \times fd \times Vt}{\Delta t \times \varepsilon \times L \times Venz}$$

Donde:

AE: Actividad enzimática en unidades internacionales por litro de disolución de enzima ($U \cdot L^{-1} \text{enz}$).

ΔDO : Diferencia de densidad óptica.

fd: Factor de conversión debido al coeficiente de extinción molar.

Vt: Volumen total de la solución (mL).

Δt : Tiempo de reacción en el baño maría (minutos).

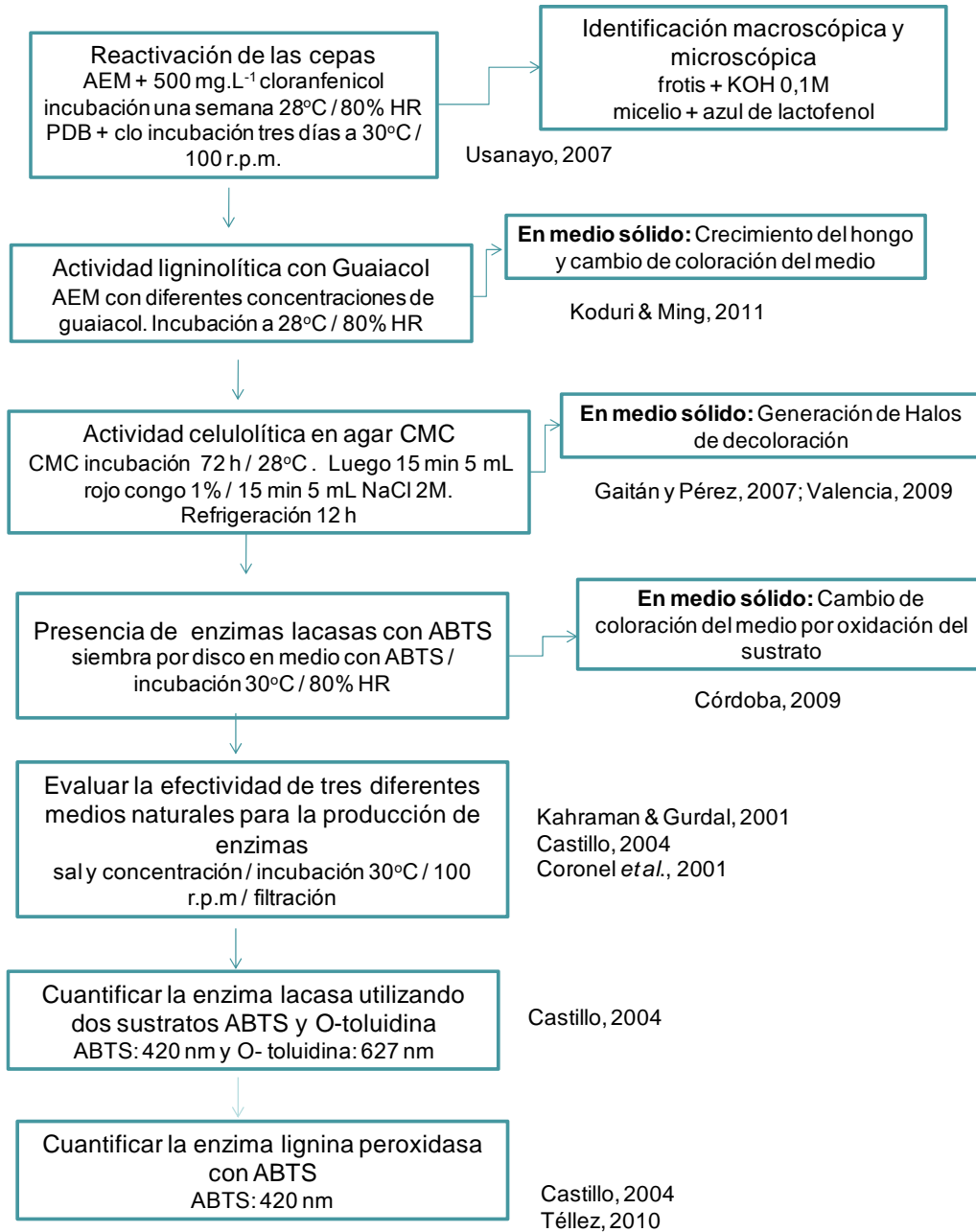
ε : Coeficiente de extinción molar ($\varepsilon_{420nm} = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para ABTS).

L: Longitud de la celda (cm).

Venz: Volumen de la solución de extracto crudo utilizada (mL).

Una unidad (U) de actividad lignino peroxidásica se define como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de ABTS, por minuto, a pH=3 y a 30°C.

2.6 Diagrama de Flujo de los Procedimientos.



2.7 Análisis de datos.

Para evaluar el efecto individual y en conjunto de las variables que se generaron en el presente estudio de investigación, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y para identificar las diferencias estadísticamente significativas, también se utilizó las pruebas de comparación de medias de Tukey y Duncan, al 95% de confianza (Martinez de Lejarza, 2004).

Los resultados fueron procesados en los programas estadísticos Excel Windows vista 2007 y SPSS 15.0.

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE RESULTADOS.

3.1 Características macroscópicas y microscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes.

Durante la reactivación de los hongos, proceso descrito en la sección 2.5.1, se observó una serie de características macroscópicas y microscópicas, que se describen a continuación.

Durante la observación macroscópica, las fotografías con las características morfológicas se presentan en la figura 3.1 y se describen en la tabla 3.1.

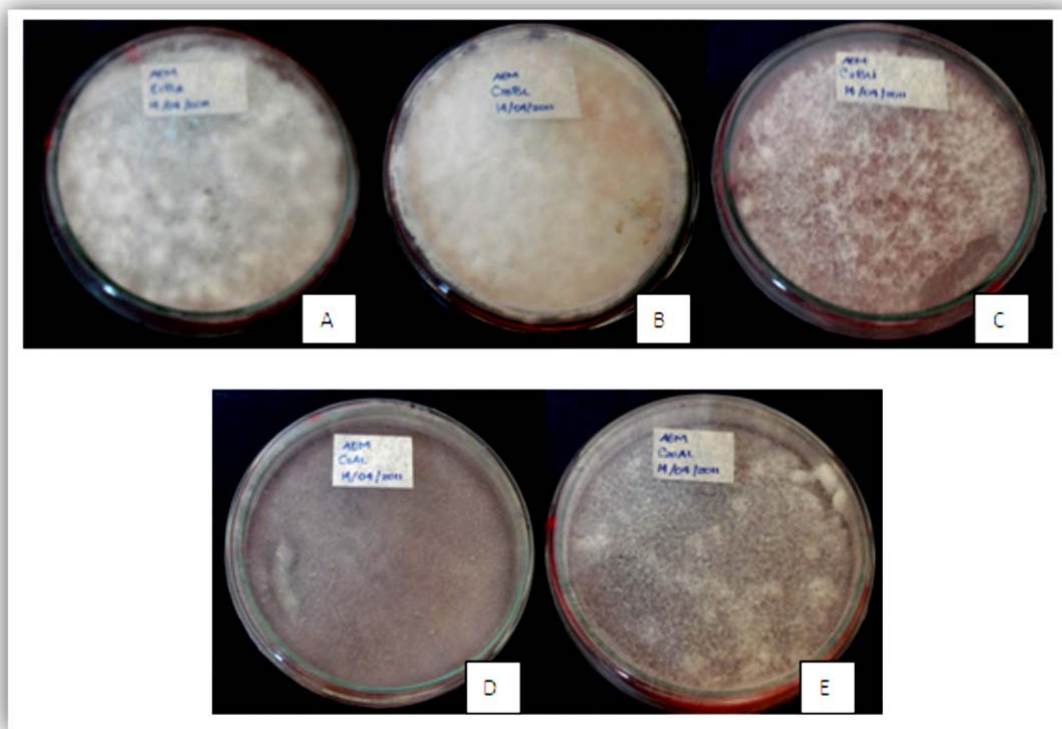


Figura 3.1 Morfología macroscópica de los cinco hongos degradadores de colorantes: A) C1BA; B) C18BL; C) C2BL; D) C7AL; E) C20AL.

Tabla 3.1 Características macroscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes y su posible género.

HONGOS	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DEL CRECIMIENTO
C1BA Género: <i>Fusarium</i>	Blanco algodonoso. Reverso color rosado
C18BL Género: <i>Fusarium</i>	Blanco algodonoso, ciertos lugares color rosa-salmón. Parte posterior color rosa-salmón más tenue.
C2BL Género: <i>Fusarium</i>	Blanco no tan algodonoso. Reverso color morado a rojizo
C7AL Género: <i>Fusarium</i>	Blanco y morado no tan algodonoso. Reverso misma coloración que la parte delantera.
C20AL Consortio con dos hongos ambos del Género: <i>Fusarium</i>	Blanco algodonoso. Reverso color morado claro.

Durante las observaciones microscópicas, figura 3.2, fue posible describir las características presentadas en la tabla 3.2.

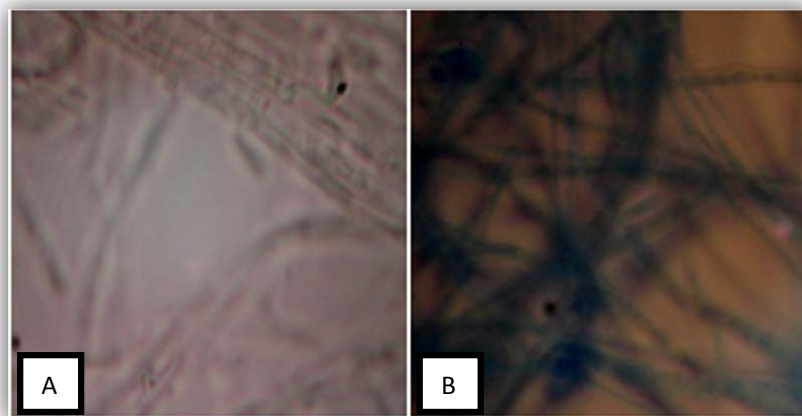


Figura 3.2 Morfología microscópica del hongos C1BA.

- A) Observación de hifas tabicadas con hidróxido de potasio (KOH) 0,1 M.**
B) Observación de clamidosporas con azul de lactofenol.

Tabla 3.2 Características microscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes.

HONGOS	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
C1BA Género: <i>Fusarium</i>	Conidias pequeñas. Hifas tabicadas. Clamidospora.
C18BL Género: <i>Fusarium</i>	Población integralmente de microconidias, muy pocas macroconidias. Hifas tabicadas. Conidióforo simple.
C2BL Género: <i>Fusarium</i>	Población rica en microconidias. Hifas tabicadas. Ausencia de conidióforos.
C7AL Género: <i>Fusarium</i>	Macroconidias grandes y pequeñas unicelulares. Ausencia clamidospora. Conidióforos unicelulares. Hifas tabicadas. Ocasionalmente formación de rizomorfos.
C20AL Consortio con dos hongos ambos del Género: <i>Fusarium</i>	Consortio con dos hongos del género <i>Fusarium</i> diferencia en el tamaño de esporas. Microconidias. Hifas tabicadas.

3.2 Actividad ligninolítica en un medio con guaiacol.

En los cinco hongos degradadores de colorantes reactivados se realizó una prueba cualitativa de actividad ligninolítica en un medio con guaiacol, se observó el crecimiento del hongo y el cambio de color del medio a las concentraciones de 1, 2 y 3 mL.L⁻¹ en presencia y ausencia de aserrín. El crecimiento del hongo y cambio de color del medio fue posible observar rápidamente a concentraciones de 1 y 2 mL.L⁻¹, a una concentración de 3 mL.L⁻¹ el tiempo de crecimiento fue mayor. En la figura 3.3 se observa el crecimiento del hongo a una concentración de 1 mL.L⁻¹ en presencia de aserrín.



Figura 3.3 Crecimiento de los cinco hongos degradadores de colorantes en medio con guaiacol a una concentración de 1 mL.L^{-1} en presencia de aserrín A) C7AL; B) C20AL; C) C2BL; D) C1BA; E) C18BL.

Es importante indicar que todo el ensayo fue observado microscópicamente para comprobar que el crecimiento del hongo en el medio. En la figura 3.4 se observa el crecimiento microscópico de los hongos.

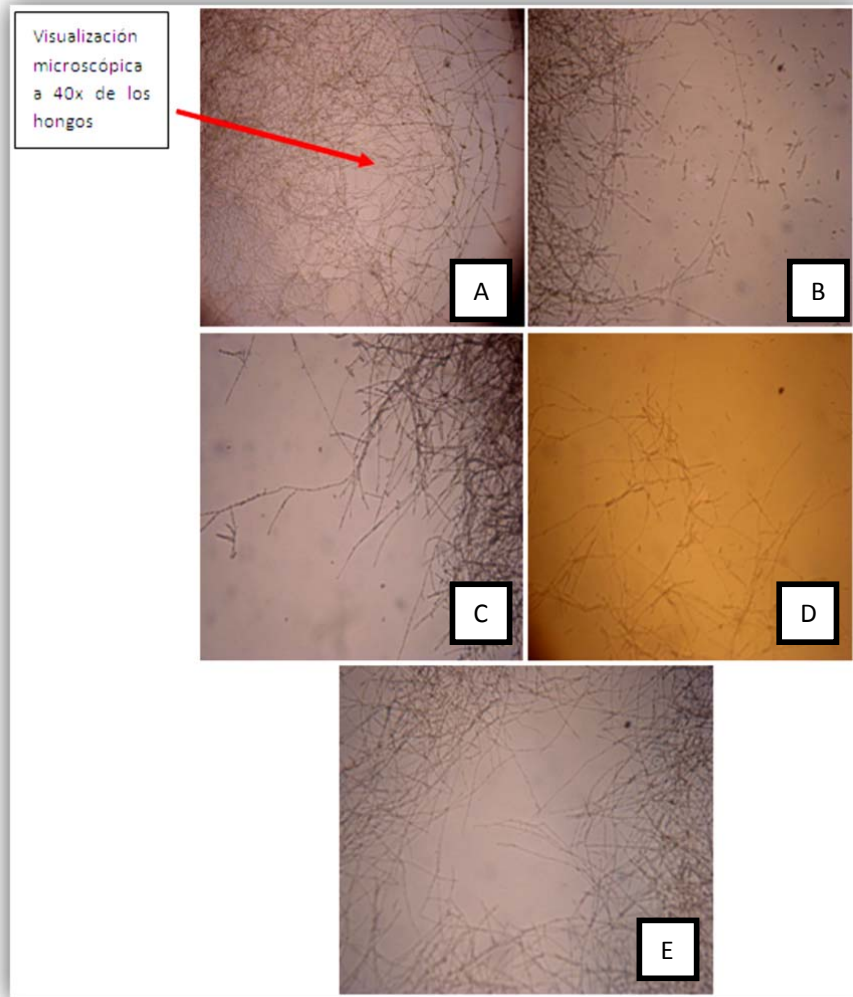


Figura 3.4 Visualización microscópica con el lente 40x de los cinco hongos degradadores de colorantes seleccionado: A) C1BA; B) C2BL; C) C18BL; D) C7AL; E) C20AL.

En la tabla 3.3 se presentan los resultados obtenidos del análisis de ANOVA para el crecimiento y cambio de color del hongo en medio con guaiacol en dependencia del tratamiento.

Tabla 3.3 Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10,889	5	2,178	16,141	0,000
Intra-grupos	11,333	84	0,135		
Total	22,222	89			

El valor de $p < 0,05$ ($p=0,000$) indica que al menos un tratamiento es significativamente diferente. Debido a esta diferencia significativa encontrada, se realizó la prueba de análisis de subconjuntos de Duncan. En la tabla 3.4, se exponen los subconjuntos formados para la variable crecimiento y cambio de color, según el tratamiento.

Tabla 3.4 Subconjuntos homogéneos para la variable crecimiento y cambio de color del medio con guaiacol según el tratamiento.

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		2	3	1
3 mL.L ⁻¹ sin aserrín	15	0,1333		
3 mL.L ⁻¹ con aserrín	15	0,2000		
2 mL.L ⁻¹ sin aserrín	15	0,4000	0,4000	
2 mL.L ⁻¹ con aserrín	15		0,6000	
1 mL.L ⁻¹ sin aserrín	15			1,0000
1 mL.L ⁻¹ con aserrín	15			1,0000
Sig.		0,063	0,140	1,000

En la tabla, se muestran 3 subconjuntos homogéneos. Se puede observar que con un valor de 1,00 tanto el tratamiento de 1 mL.L⁻¹ con aserrín, como el 1 mL.L⁻¹ sin aserrín presentan mayor número de repeticiones en la que se observó crecimiento de hongo y cambio de color del medio.

A continuación en la figura 3.5 se indica el valor de media de las repeticiones que presentaron crecimiento y cambio de color del medio de los cinco hongos degradadores de colorantes por tratamiento, en esta figura se observa que todos los hongos presentaron crecimiento y cambio de color a los tratamientos implementados.

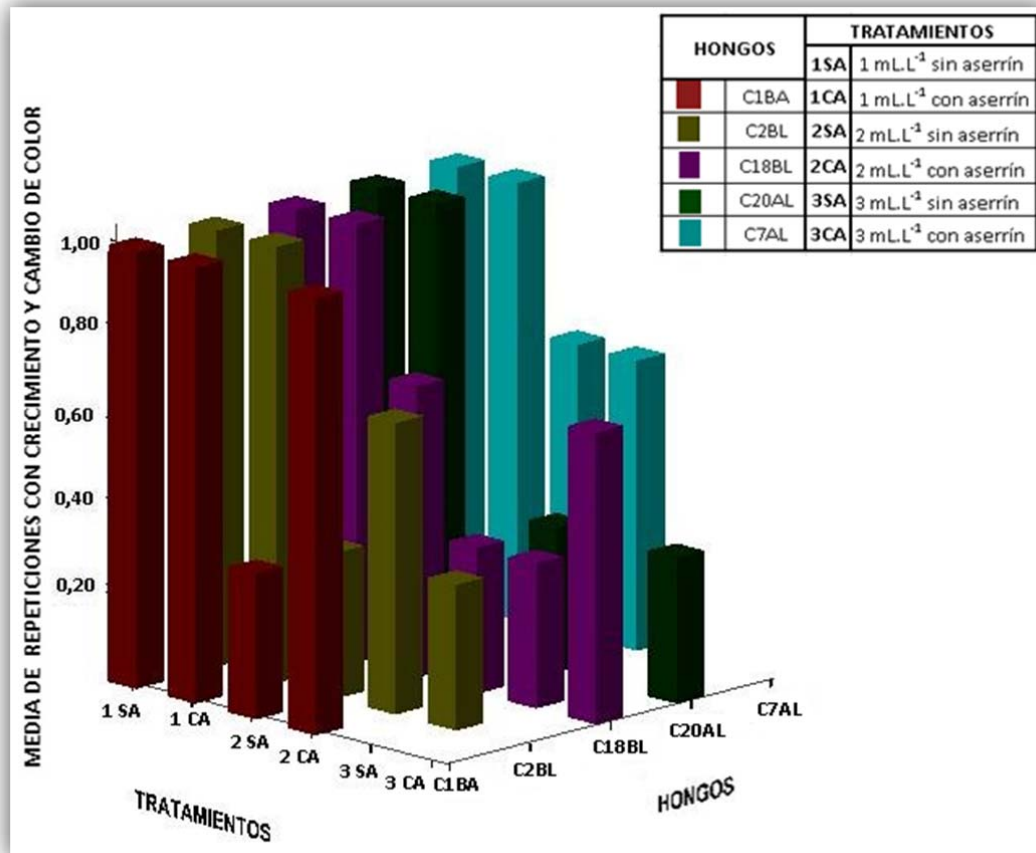


Figura 3.5 Gráfico interactivo de medias de las repeticiones que presentaron crecimiento y cambio de color del medio con guaiacol de los cinco hongos degradadores de colorantes, por tratamiento.

3.3 Actividad celulolítica en agar carboximetilcelulosa.

La actividad celulolítica fue determinada mediante la medición del diámetro de halos de hidrólisis de los cinco hongos degradadores de colorantes. En la figura 3.6 se observa la formación de halos de hidrólisis de los cinco hongos.

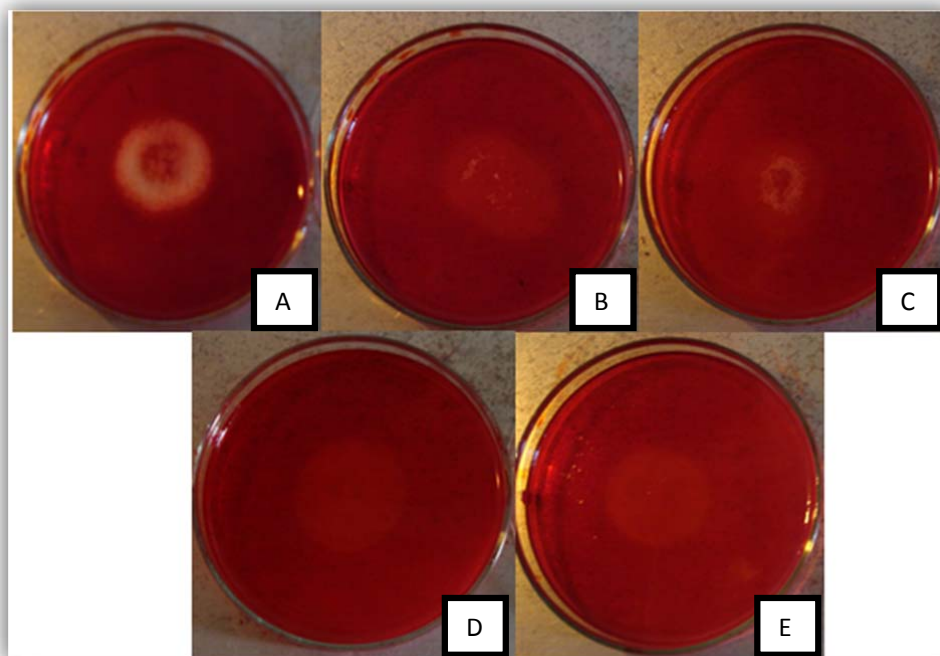


Figura 3.6 Resultados positivos de actividad enzimática celulolítica de: A) C1BA; B) C18BL; C) C2BL; D) C7AL; E) C20AL.

La tabla 3.5 presenta los resultados de la prueba de ANOVA realizada para los diámetros de los halos de hidrólisis de celulosa en dependencia de los hongos.

Tabla 3.5 Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,536	4	0,884	4,295	0,004
Intra-grupos	11,320	55	0,206		
Total	14,856	59			

El valor de $p < 0,05$ ($p=0,004$) demuestra que al menos un hongo presenta una media de diámetro de halo de hidrólisis significativamente diferente. Debido a esta diferencia significativa encontrada, se realizó una prueba de análisis de subconjuntos de Tukey y Duncan. Para el análisis se escogió Tukey por mayor formación de subconjuntos. En la tabla 3.6, se describen los subconjuntos formados para la variable diámetro de halo de hidrólisis, según el hongo.

Tabla 3.6 Subconjuntos homogéneos para la variable diámetro de halo de hidrólisis de celulosa según el hongo.

	Hongo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			2	3	1
HSD de Tukey(a)	C1BA	12	2,6583		
	C20AL	12	2,6750	2,6750	
	C2BL	12	2,8583	2,8583	2,8583
	C7AL	12		3,1833	3,1833
	C18BL	12			3,2250
	Sig.		0,816	0,060	0,289
Duncan(a)	C1BA	12	2,6583		
	C20AL	12	2,6750		
	C2BL	12	2,8583	2,8583	
	C7AL	12		3,1833	
	C18BL	12		3,2250	
	Sig.		0,315	0,066	

En la tabla 3.6, los subconjuntos ponen en evidencia que todos los hongos presentaron halo de hidrólisis de celulosa, indicador positivo para la actividad celulolítica. Se revelan 3 subconjuntos homogéneos, formados por el grado de similitud existente entre las medias de sus diámetros de halo. En el subconjunto 1 con el mayor valor de media de halo de hidrólisis de 3,22 cm se encuentra el hongo C18BL, mientras que en el subconjunto 2, con el valor inferior de media de 2,65 cm se encuentra el hongo C1BA.

Se observa que los hongos C7AL, C2BL y C20AL se encuentran en dos o tres grupos ya que estadísticamente no existe diferencia significativa en las medias de los tamaños de los halos de hidrólisis y pueden ser considerados en uno u otro grupo.

A continuación, en la figura 3.7, se presenta el valor de las medias del diámetro de los halos de hidrólisis de los cinco hongos degradadores de colorantes.

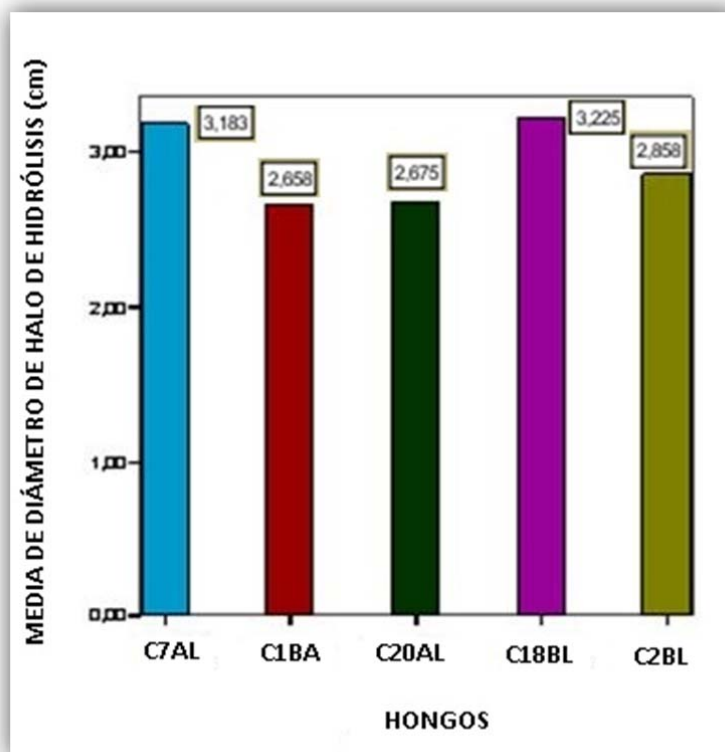


Figura 3.7 Media de diámetro del halo de hidrólisis de los cinco hongos degradadores de colorantes.

3.4 Presencia de la enzima lacasa en un medio con ABTS.

Como se señaló en la sección 2.5.4 la presencia de la enzima lacasa se determinó cualitativamente por el cambio de color en el medio con ABTS.

En la figura 3.8 es posible observar el cambio de coloración del medio para los cinco hongos degradadores de colorantes.

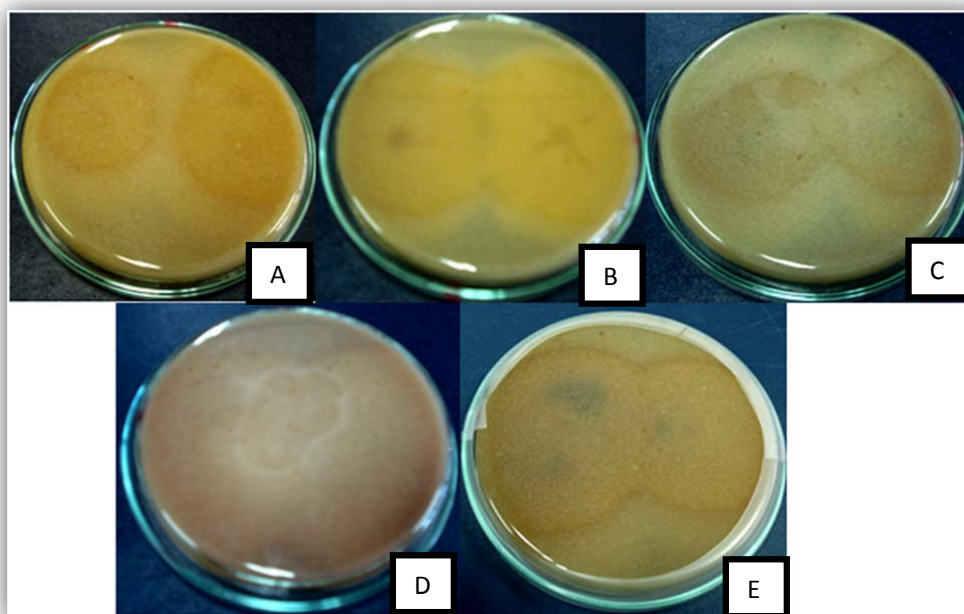


Figura 3.8 Resultados positivos de la presencia de enzima lacasa en medio con ABTS de: A) C1BA; B) C18BL; C) C2BL; D) C7AL; E) C20AL.

En la tabla 3.7 se presentan los resultados de ANOVA realizados para la presencia de la enzima lacasa en el medio con ABTS, expresados por el cambio de coloración del medio en dependencia de los hongos.

Tabla 3.7 Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,667	4	0,167	0,625	0,655
Intra-grupos	2,667	10	0,267		
Total	3,333	14			

El valor de $p > 0,05$ ($p=0,655$) indica que ningún hongo es significativamente diferente en cuanto al cambio de coloración del medio. Lo señalado es posible de ratificar con el análisis de subconjuntos de Tukey y Duncan, donde se observa que la media de las repeticiones que presentaron cambio de coloración del medio se encuentran en un mismo subconjunto. En la tabla 3.8, se describen los valores de esta prueba tomando en cuenta como variable el cambio de coloración del medio con ABTS, según el hongo.

Tabla 3.8 Subconjuntos homogéneos para la variable cambio de coloración del medio con ABTS según el hongo.

	Hongo	N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
HSD de Tukey(a)	C7AL	3	0,3333
	C20AL	3	0,6667
	C18BL	3	0,6667
	C2BL	3	0,6667
	C1BA	3	1,0000
	Sig.		0,539
Duncan(a)	C7AL	3	0,3333
	C20AL	3	0,6667
	C18BL	3	0,6667
	C2BL	3	0,6667
	C1BA	3	1,0000
	Sig.		0,176

En la tabla 3.8, se observa que todos los hongos presentaron cambio de color del medio con ABTS. Sin embargo ninguno fue significativamente diferente a los demás, es por ello que existe únicamente un subconjunto de agrupación tanto para la prueba de Tukey como para la prueba de Duncan.

En el subconjunto con el valor de 1,00 valor más alto de la media de las repeticiones que presentaron cambio de coloración del medio con ABTS se encuentra el hongo C1BA y con el valor más bajo de 0,33 se encuentra el hongo C7AL.

A continuación, en la figura 3.9, se indican las medias de las repeticiones que presentaron cambio de coloración en el medio con ABTS de los cinco hongos degradadores de colorantes.

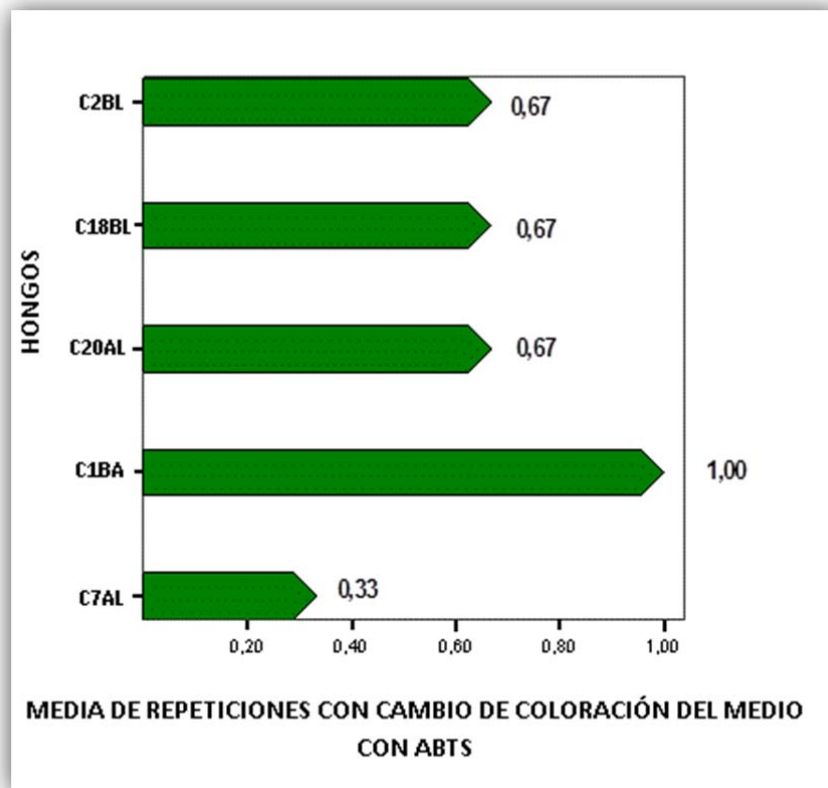


Figura 3.9 Media de las repeticiones con cambio de coloración del medio con ABTS de los cinco hongos degradadores de colorantes.

3.5 Cuantificación de la enzima lacasa con dos sustratos ABTS y O-toluidina.

Tal como se describe en la sección 2.5.6 la actividad enzimática de lacasas se cuantificó utilizando dos sustratos ABTS y O-toluidina. En ambos casos se midió la actividad enzimática a lo largo de 40 días de ensayo enzimático, con mediciones cada 4 días.

Para evaluar el mejor tratamiento, de la interacción sustrato, hongo y medio, en dependencia de la actividad enzimática de lacasas se realizó un análisis de varianza ANOVA diario y mediante una tabla de cotejo se escogió el mejor tratamiento a lo largo de los días. En la tabla 3.9 se observa la tabla de cotejo que presenta los 30 tratamientos impuestos en el diseño, los análisis de ANOVA diarios se encuentran en el Anexo C.

Tabla 3.9 Tabla de cotejo de mejor actividad enzimática de lacasa por tratamiento (sustrato.hongo.medio natural de producción de enzimas) a lo largo de 40 días.

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASAS (U.L ⁻¹ enz)									
	DÍA									
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
ABTS.C7AL.M1										
ABTS.C7AL.M2										
ABTS.C7AL.M3									117,28	
ABTS.C1BA.M1										
ABTS.C1BA.M2										
ABTS.C1BA.M3	274,69		271,6	308,64			179,01			61,72
ABTS.C18BL.M1										
ABTS.C18BL.M2										
ABTS.C18BL.M3								123,45		
ABTS.C20AL.M1										
ABTS.C20AL.M2										
ABTS.C20AL.M3		512,34			179,01					
ABTS.C2BL.M1										
ABTS.C2BL.M2										
ABTS.C2BL.M3						129,62				
O-TOL.C7AL.M1										
O-TOL.C7AL.M2										
O-TOL.C7AL.M3										
O-TOL.C1BA.M1										
O-TOL.C1BA.M2										
O-TOL.C1BA.M3										
O-TOL.C18BL.M1										
O-TOL.C18BL.M2										
O-TOL.C18BL.M3										
O-TOL.C20AL.M1										
O-TOL.C20AL.M2										
O-TOL.C20AL.M3										
O-TOL.C2BL.M1										
O-TOL.C2BL.M2										
O-TOL.C2BL.M3										

En la tabla de cotejo es posible observar que el mejor tratamiento a lo largo de las mediciones de actividad enzimática durante 40 días, es el que utiliza como sustrato ABTS, el hongo C1BA y el medio natural de producción de enzimas M3 (ABTS.C1BA.M3) y en día que presentó mayor actividad fue el día 16. La tabla 3.10 presenta los resultados obtenidos del análisis de ANOVA realizado para la actividad enzimática de lacasas en dependencia del tratamiento, en el día 16.

Tabla 3.10 Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	799716,959	29	27576,447	3,644	0,000
Intra-grupos	454103,872	60	7568,398		
Total	1253820,831	89			

El valor de $p < 0,05$ ($p=0,000$) hace evidencia que al menos un tratamiento es significativamente diferente. Considerando que existe una diferencia significativa, se realizó una prueba de análisis de subconjuntos de Duncan. Se escogió Duncan por mayor sensibilidad, es decir mayor formación de subconjuntos de agrupación. En la tabla 3.11, se muestran los subconjuntos formados para la actividad enzimática de lacasas, según el tratamiento.

La tabla 3.11, nos indica que según la similitud existente entre los valores de actividad enzimática de lacasas se han formado cuatro subconjuntos de agrupación. En el grupo 1 se encuentran dos tratamientos, el tratamiento ABTS.C1BA.M3 es el que mayor actividad enzimática presenta con un valor de 308,64 U.L⁻¹enz, mientras que en el grupo 2 se encuentran quince tratamientos con los niveles más bajos de actividad enzimática, entre ellos el tratamiento O-TOL.C2BL.M3 con un valor de 0,006 U.L⁻¹enz.

Tabla 3.11 Subconjuntos homogéneos para la variable actividad enzimática de lacasas según el tratamiento.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		2	3	4	1
O-TOL.C2BL.M3	3	0,00601			
O-TOL.C1BA.M2	3	0,01201			
O-TOL.C18BL.M1	3	0,01201			
O-TOL.C18BL.M2	3	0,01201			
O-TOL.C2BL.M1	3	0,01201			
O-TOL.C2BL.M2	3	0,01201			
O-TOL.C7AL.M2	3	0,01802			
O-TOL.C20AL.M2	3	0,01802			
O-TOL.C7AL.M1	3	0,03003			
O-TOL.C1BA.M1	3	0,04805			
O-TOL.C7AL.M3	3	0,05405			
O-TOL.C1BA.M3	3	0,05405			
O-TOL.C18BL.M3	3	0,11411			
O-TOL.C20AL.M1	3	0,13814			
O-TOL.C20AL.M3	3	0,16216			
ABTS.C20AL.M1	3	40,12346	40,12346		
ABTS.C7AL.M2	3	52,46914	52,46914		
ABTS.C20AL.M2	3	64,81481	64,81481	64,81481	
ABTS.C18BL.M2	3	67,90123	67,90123	67,90123	
ABTS.C1BA.M2	3	70,98765	70,98765	70,98765	
ABTS.C2BL.M1	3	74,07407	74,07407	74,07407	
ABTS.C7AL.M1	3	83,33333	83,33333	83,33333	
ABTS.C1BA.M1	3	129,62963	129,62963	129,62963	
ABTS.C18BL.M1	3	157,40741	157,40741	157,40741	157,40741
ABTS.C20AL.M3	3		182,09877	182,09877	182,09877
ABTS.C18BL.M3	3		191,35802	191,35802	191,35802
ABTS.C7AL.M3	3		206,79012	206,79012	206,79012
ABTS.C2BL.M3	3			228,39506	228,39506
ABTS.C2BL.M2	3				299,38272
ABTS.C1BA.M3	3				308,64198
Sig.		0,078	0,054	0,057	0,069

En la figura 3.10 se presenta el blanco y la mezcla de reacción del tratamiento ABTS.C1BA.M3 al día 40 del ensayo enzimático.

Se muestra además que trece tratamientos se encuentran en dos, tres o incluso cuatro grupos subconjuntos de agrupación ya que estadísticamente no existe diferencia significativa en las medias de los valores de actividad enzimática y pueden ser considerados en uno u otro grupo.

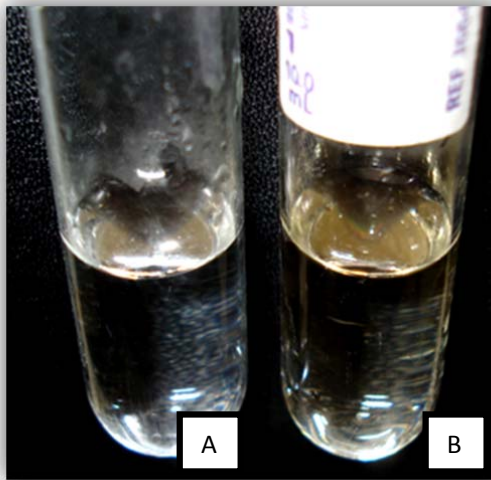


Figura 3.10 Actividad enzimática de lacasas del tratamiento ABTS.C1BA.M3 al día 40 de ensayo enzimático. A) blanco B) mezcla de reacción.

A continuación, en la figura 3.11 se expone la actividad enzimática de lacasas del mejor tratamiento ABTS.C1BA.M3, durante 40 días de ensayo enzimático.

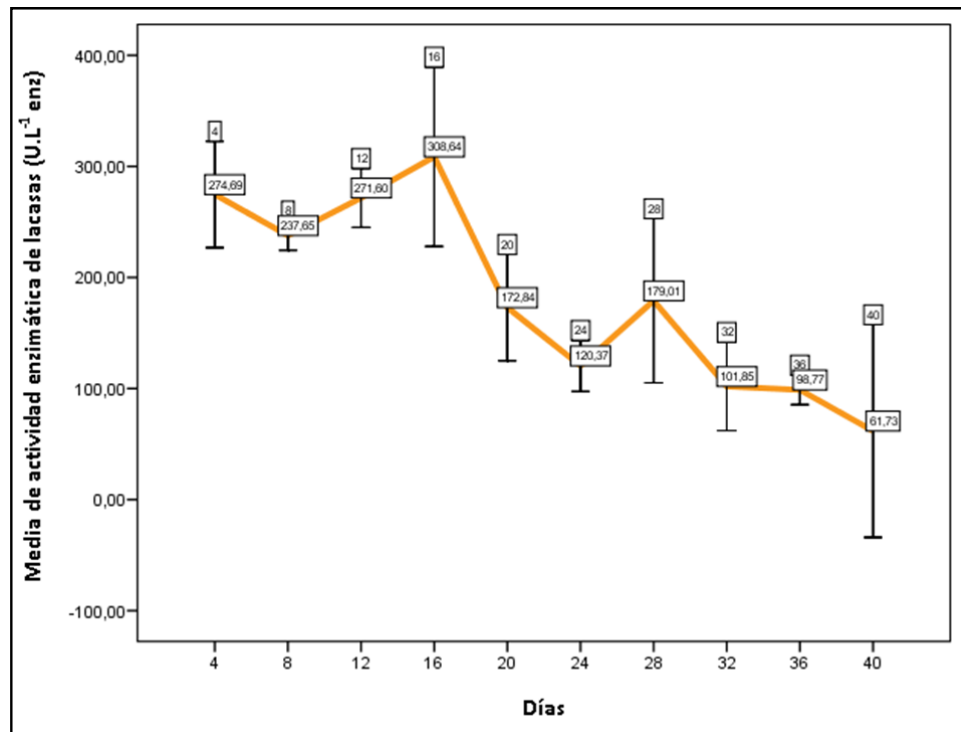


Figura 3.11 Actividad enzimática de lacasas del tratamiento ABTS.C1BA.M3 a durante 40 días.

En la figura 3.11 es posible observar que todos los días hay actividad enzimática de lacasas para el mejor tratamiento ABTS.C1BA.M3. El día 16 presenta el mayor valor de actividad enzimática, 308,64 U.L⁻¹enz, y a partir de éste día la actividad enzimática decae, terminando al día 40 con 61,73 U.L⁻¹enz.

3.6 Cuantificación de la enzima lignina peroxidasa utilizando como sustrato ABTS.

En la sección 2.5.7 se presenta la medición de la actividad enzimática de lignina peroxidasa utilizando como sustrato ABTS. Para el análisis se cuantificó la actividad enzimática durante 40 días, con mediciones cada 4 días.

Con el fin de evaluar la mejor interacción sustrato, hongo y medio, es decir el mejor tratamiento se realizó un análisis de ANOVA diario y mediante una tabla de cotejo se escogió el mejor tratamiento a lo largo de los días. En la tabla 3.12 se presenta la tabla de cotejo con los 15 tratamientos impuestos en el diseño, los datos de los análisis de ANOVA diarios se encuentran en el Anexo D.

Tabla 3.12 Tabla de cotejo de mejor actividad enzimática de lignina peroxidasas por tratamiento (sustrato.hongo.medio natural de producción de enzimas) durante 40 días.

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LIGNINA PEROXIDASAS (U.L ⁻¹ enz)									
	DÍA									
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
ABTS.C7AL.M1										
ABTS.C7AL.M2										
ABTS.C7AL.M3										
ABTS.C1BA.M1			294,31							
ABTS.C1BA.M2										
ABTS.C1BA.M3	197,31			210,53	175,26			131,17		110,22
ABTS.C18BL.M1										
ABTS.C18BL.M2										
ABTS.C18BL.M3		128,12				175,26	176,36			
ABTS.C20AL.M1										
ABTS.C20AL.M2									127,86	
ABTS.C20AL.M3										
ABTS.C2BL.M1										
ABTS.C2BL.M2										
ABTS.C2BL.M3										

La tabla de cotejo demuestra que el mejor tratamiento durante 40 días es el ABTS.C1BA.M3 y el día 16 presentó mayor actividad. En la tabla 3.13 se visualiza los resultados obtenidos del análisis de ANOVA realizado para la actividad enzimática lignino peroxidásica en dependencia del tratamiento, durante el día 16.

Tabla 3.13 Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	34849,073	14	2489,220	20,446	0,000
Intra-grupos	3652,438	30	121,748		
Total	38501,512	44			

El valor de $\rho < 0,05$ ($\rho=0,000$) indica que al menos un tratamiento es significativamente diferente a los demás. Debido a esta diferencia significativa, se realizó una prueba de análisis de subconjuntos de Duncan. Para el análisis se escogió Duncan por mayor sensibilidad, es decir mayor formación de subconjuntos de agrupación. En la tabla 3.14, se muestran los subconjuntos formados para la actividad enzimática lignino peroxidásica, según el tratamiento.

Tabla 3.14 Subconjuntos homogéneos para la variable actividad enzimática lignino peroxidásica según el tratamiento.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		2	3	4	5	6	1
ABTS.C18BL.M2	3	102,513					
ABTS.C20AL.M1	3	102,513					
ABTS.C7AL.M2	3	105,820	105,820				
ABTS.C2BL.M1	3	119,047	119,047	119,047			
ABTS.C20AL.M3	3	121,252	121,252	121,252	121,252		
ABTS.C2BL.M2	3		123,456	123,456	123,456		
ABTS.C7AL.M1	3		124,559	124,559	124,559		
ABTS.C18BL.M1	3			132,275	132,275		
ABTS.C2BL.M3	3			134,479	134,479		
ABTS.C20AL.M2	3			136,684	136,684		
ABTS.C18BL.M3	3			139,991	139,991		
ABTS.C7AL.M3	3				141,093		
ABTS.C1BA.M2	3					167,548	
ABTS.C1BA.M1	3					168,650	
ABTS.C1BA.M3	3						210,537
Sig.		0,071	0,071	0,052	0,066	0,903	1,000

En la tabla 3.14, se observa que según la similitud existente entre los valores de actividad enzimática lignino peroxidásica se han formado seis subconjuntos de agrupación. En el grupo 1 se encuentra un tratamiento, el ABTS.C1BA.M3 con la mayor actividad enzimática y un valor de 210,53 U.L⁻¹enz, mientras que en el grupo 2 se encuentran dos tratamientos ABTS.C18BL.M2 y ABTS.C20AL.M1 con los valores de actividad enzimática de 102,51 U.L⁻¹enz, siendo estos los niveles más bajos de actividad enzimática peroxidásica presentada. Se muestra además que dos tratamientos están en el grupo 6 con valores altos de actividad enzimática, y un tratamiento en el grupo 5 con un valor alto de actividad enzimática; y, 9 tratamientos se ubican en dos, tres o incluso cuatro grupos subconjuntos de agrupación, por lo que estadísticamente no

existe diferencia significativa en las medias de los valores de actividad enzimática y pueden ser considerados en uno u otro grupo.

A continuación, en la figura 3.12 se presentan fotografías de las mediciones de actividad enzimática peroxidásica del día 8 del ensayo enzimático y en la figura 3.13 se expone la cuantificación enzimática de lignino peroxidásica del mejor tratamiento ABTS.C1BA.M3 durante 40 días de ensayo.



Figura 3.12 Actividad enzimática lignino peroxidásica del día 8 de ensayo enzimático.

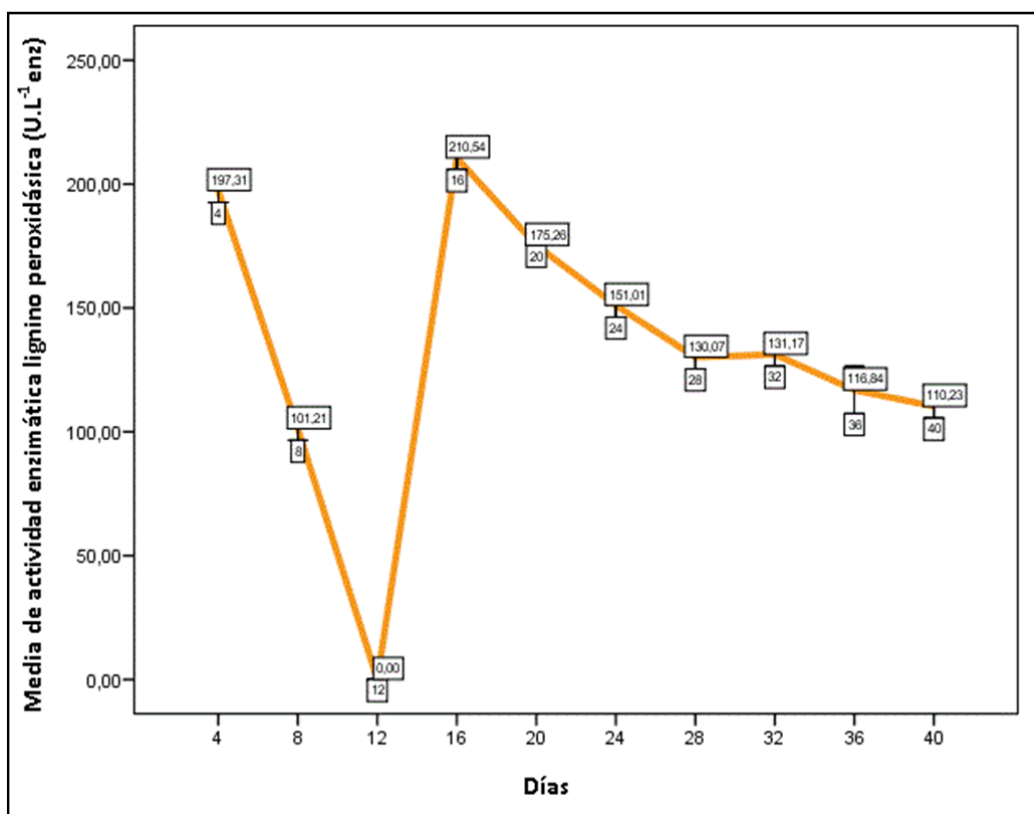


Figura 3.13 Actividad enzimática lignino peroxidásica del tratamiento ABTS.C1BA.M3 durante 40 días de ensayo enzimático.

En la figura 3.13 se observa que en el día 12 la actividad enzimática del tratamiento ABTS.C1BA.M3 decae a un valor de 0,00 U.L⁻¹enz y aumenta inmediatamente con un valor más alto de 210,54 U.L⁻¹enz durante el día 16, a partir de este día la actividad enzimática decae progresivamente llegando a finalizar al día 40 con un valor de 110,23 U.L⁻¹enz.

3.7 Efectividad de tres diferentes medios naturales para la producción de enzimas.

Para evaluar la efectividad de tres diferentes medios naturales para la producción de enzimas, se realizó el análisis de ANOVA diario tomando en cuenta como variable la actividad enzimática en dependencia del medio, el análisis se realiza independientemente del sustrato y del hongo. Se evaluó la efectividad de los medios tanto para la producción de lacasas como de lignina peroxidasas. En la figura 3.13 se presenta una fotografía de los medios naturales para la producción de enzimas en el día 8 de ensayo enzimático.



Figura 3.14 Medios naturales para la producción de enzimas en el día 8 de ensayo enzimático.

3.7.1 Efectividad de tres diferentes medios para la producción de lacasas.

Como se mencionó anteriormente en la sección 3.7 se realizó un análisis de ANOVA diario de la variable actividad enzimática de lacasas en dependencia del medio de producción de enzimas y mediante una tabla de cotejo se valoró y escogió el mejor medio durante los 40 días del ensayo enzimático. En la tabla 3.15 se presenta la tabla de cotejo con los 3 medios a evaluarse, los análisis de ANOVA diarios se encuentran en el Anexo E.

Tabla 3.15 Tabla de cotejo de efectividad de tres medios para la producción de enzimas durante 40 días de ensayo enzimático de lacasas.

		ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASAS (U.L ⁻¹ enz)								
MEDIO	DÍA									
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
M1										
M2										
M3	119,45	156,80	114,85	111,76	83,97	60,22	69,79	54,15	52,47	8,95

En la tabla de cotejo se visualiza que el mejor medio para la producción de enzimas durante los 40 días de ensayo enzimático de lacasas es el medio M3. En la tabla 3.16 se presenta el análisis de ANOVA para la evaluación de la efectividad del medio de producción de enzimas del mejor tratamiento de la actividad enzimática de lacasas ABTS.C1BA.M3.

Tabla 3.16 Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	304643,938	2	152321,969	38,006	0,000
Intra-grupos	348679,955	87	4007,816		
Total	653323,893	89			

El valor de $\rho < 0,05$ ($\rho=0,000$), expresa que al menos un medio es significativamente diferente a los demás. Debido a esta diferencia significativa, se realizó una prueba de análisis de subconjuntos de Tukey y Duncan. En la tabla 3.17, se muestran los subconjuntos formados para la actividad enzimática de lacasas, según el medio natural para la producción de enzimas.

Tabla 3.17 Subconjuntos homogéneos para la variable actividad enzimática de lacasas según el medio natural de producción de enzimas.

MEDIO DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS		N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3	1
HSD de Tukey(a)	M2	30	40,4321		
	M1	30		104,5988	
	M3	30			182,7160
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Duncan(a)	M2	30	40,4321		
	M1	30		104,5988	
	M3	30			182,7160
	Sig.		1,000	1,000	1,000

En la tabla 3.17, se observa que según la similitud existente entre los valores de actividad enzimática de lacasas se han formado tres subconjuntos de agrupación. En el grupo 1 se encuentra el medio M3, presentando la mayor actividad enzimática con un valor de 182,71 U.L⁻¹enz, en el grupo 3 se encuentra el medio M1 con un valor de actividad enzimática de 104,59 U.L⁻¹enz y finalmente en el grupo 2 se encuentra el medio M2 con el valor de actividad enzimática de 40,43U.L⁻¹enz, siendo este el medio que presenta el valor más bajo de actividad enzimática de lacasas.

A continuación, en la figura 3.15 se presenta la actividad enzimática de lacasas de los tres medios utilizados para la interacción sustrato ABTS y hongo C1BA.

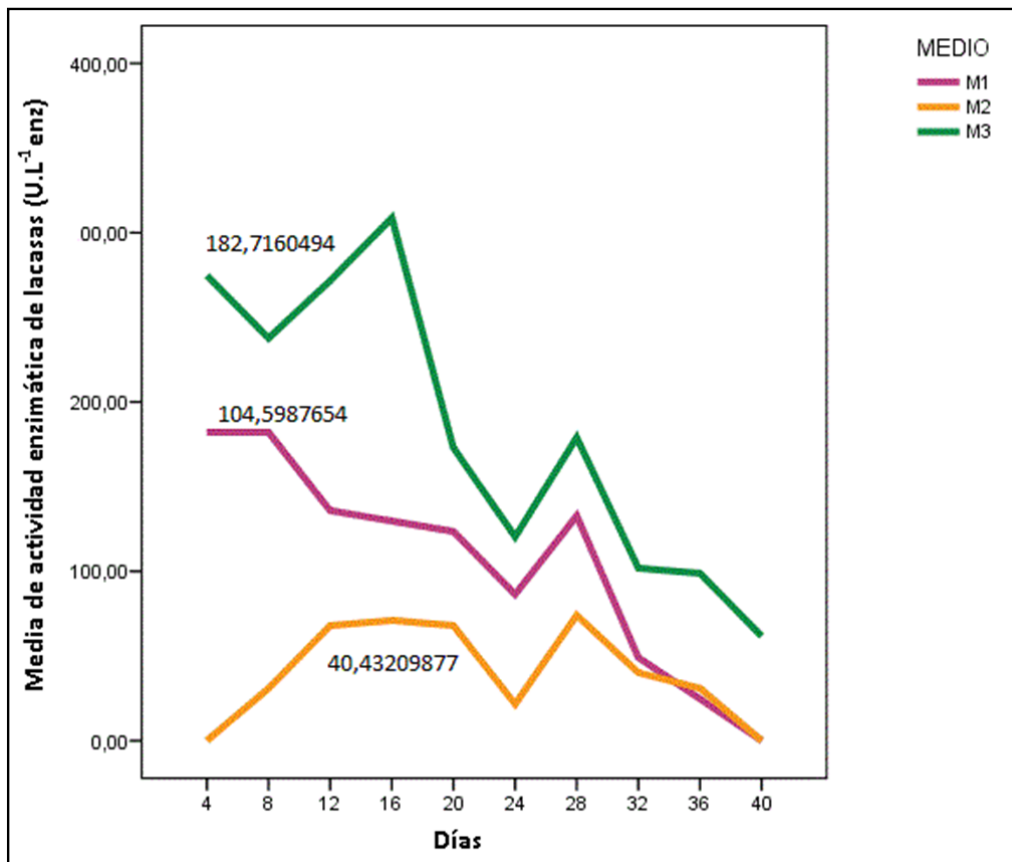


Figura 3.15 Actividad enzimática de lacasas de la interacción sustrato ABTS y hongo C1BA utilizando los tres medio naturales para la producción de enzimas.

En la figura 3.15 se observa que durante los 40 días de ensayo enzimático el hongo C1BA con el sustrato ABTS presenta actividad enzimática en los tres medios naturales de producción de enzimas, sin embargo el mejor medio es el M3 con un valor de 182,71 U.L⁻¹enz. El análisis permite comprobar que el mejor tratamiento es el ABTS.C1BA.M3.

3.7.2 Efectividad de tres diferentes medios para la producción de lignina peroxidasas.

De igual manera que en la sección 3.7.1, se evaluó la efectividad mediante un análisis de ANOVA diario de la variable actividad enzimática de lignina peroxidasas en dependencia del medio de producción de enzimas y mediante una tabla de cotejo se valoró y escogió el mejor medio durante los 40 días del ensayo enzimático. En la tabla 3.18 se presenta la tabla de cotejo con los 3 medios naturales a evaluarse, los análisis de ANOVA diarios se encuentran en el Anexo F.

Tabla 3.18 Tabla de cotejo de efectividad de tres medios para la producción de enzimas durante los 40 días de ensayo enzimático de lignina peroxidasas.

MEDIO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINO PEROXIDASICA (U.L ⁻¹ enz)									
	DÍA									
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
M1			150,57							
M2										
M3	76,71	92,37		149,47	137,78	135,58	125,88	121,25	114,85	22,04

La tabla de cotejo nos permite determinar el mejor medio para la producción de enzimas durante 40 días de ensayo enzimático de lignina peroxidasas y para este caso es el medio M3.

En la tabla 3.19 se presenta el análisis de ANOVA para evaluar la efectividad del medio de producción de enzimas del mejor tratamiento de la actividad enzimática de lignina peroxidasas ABTS.C1BA.M3.

Tabla 3.19 Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13249,082	2	6624,541	1,508	0,227
Intra-grupos	382086,587	87	4391,800		
Total	395335,669	89			

El valor de $p > 0,05$ ($p=0,227$) determina que no existe diferencia significativa entre los tres medios de producción de enzimas. Para comprobar este resultado, se realizó una prueba de análisis de subconjuntos de Tukey y Duncan. En la tabla 3.20, se muestra que únicamente existe un subconjunto formado para la actividad enzimática de lignina peroxidasas, según el medio natural para la producción de enzimas.

Tabla 3.20 Subconjuntos homogéneos para la variable actividad enzimática de lignina peroxidasas según el medio natural de producción de enzimas.

	MEDIO DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
HSD de Tukey(a)	M2	30	102,9541
	M1	30	121,3624
	M3	30	132,3649
	Sig.		0,204
Duncan(a)	M2	30	102,9541
	M1	30	121,3624
	M3	30	132,3649
	Sig.		0,108

En la tabla 3.20, se observa que según la similitud existente entre los valores de actividad enzimática de lignina peroxidasas se ha formado un subconjunto de agrupación. El medio M3, presenta mayor actividad enzimática con un valor de 132,36 U.L⁻¹enz, mientras que el medio M2 presenta el valor más bajo de actividad enzimática con un valor de 102,95 U.L⁻¹enz. Con la formación de únicamente un subconjunto de agrupación comprobamos que no existe diferencia significativa entre los valores de actividad enzimática de lignina peroxidasas en dependencia del medio.

En la figura 3.16 se expone actividad enzimática de lignina peroxidasas de los tres medios utilizados para la interacción sustrato ABTS y hongo C1BA.

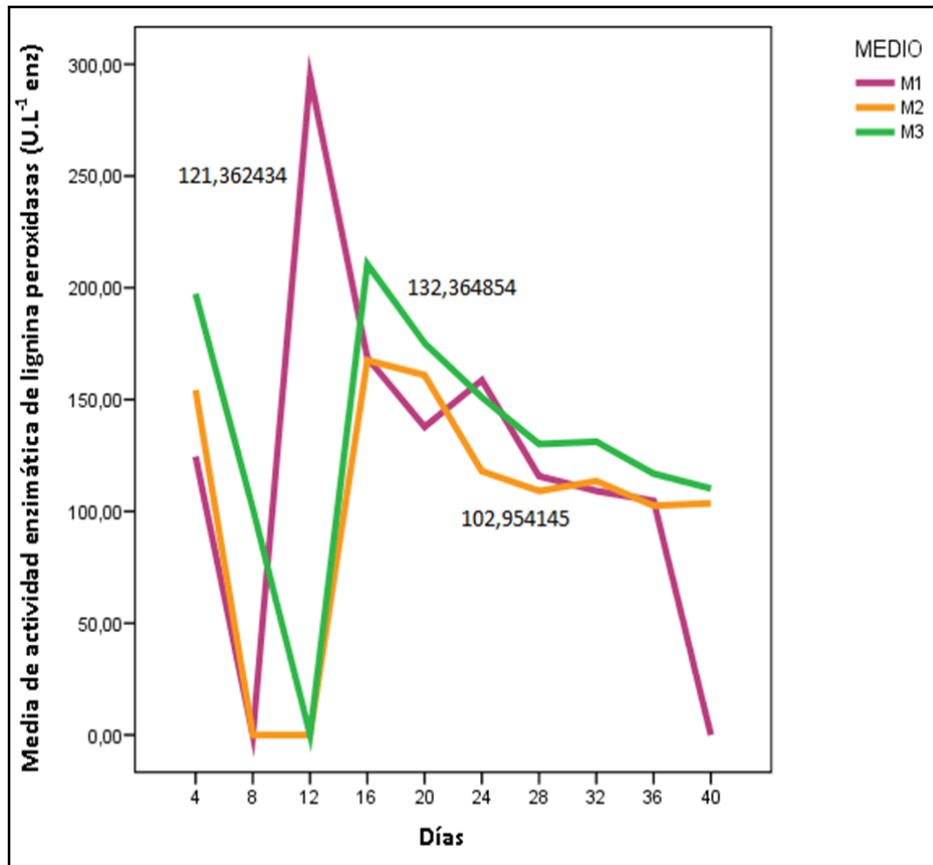


Figura 3.16 Actividad enzimática de lignina peroxidasas de la interacción sustrato ABTS y hongo C1BA utilizando los tres medio naturales para la producción de enzimas.

En la figura 3.16 se observa que en casi todos los días de los 40 días de ensayo enzimático el hongo C1BA con el sustrato ABTS presenta actividad enzimática en los tres medios naturales de producción de enzimas, sin embargo el mejor medio es el M3 con un valor de 132,36 U.L⁻¹enz. El análisis comprueba que el mejor tratamiento es el ABTS.C1BA.M3.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.

4.1 Características macroscópicas y microscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes.

La observación de las características macroscópicas y microscópicas de los cinco hongos degradadores de colorantes se realizó para descartar cualquier tipo de contaminación al momento de reactivarlos ya que los hongos seleccionados fueron conservados en refrigeración, igualmente facilitar la identificación de posibles hongos ligninolíticos. Las características macroscópicas identifican a posibles hongos del género *Fusarium*, las colonias de los distintos hongos *Fusarium* se caracterizan por tener diversos colores como blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo, especialmente en el reverso de la colonia, el micelio es algodonoso y en algunos casos es limoso (Seifert, 2001). Los cinco hongos seleccionados tienen características similares a las mencionadas en la bibliografía, presentando su singularidad en cuanto a color y textura del micelio.

La observación de las características microscópicas permitió descartar cualquier tipo de contaminación. Los hongos fueron analizados con la colaboración del Ing. Abraham Oleas, del laboratorio de nematología del IASA. Se utilizaron dos técnicas de observación:

La primera con hidróxido de potasio (KOH) 0,1 M, que disuelve rápidamente las células permitiendo digerir material proteico y mejora la observación de los elementos fúngicos con mayor nitidez. La segunda con azul de lactofenol, en donde el fenol mata al hongo, el ácido láctico es un agente aclarante que preserva su estructura y el azul colorea la quitina y celulosa presente en el mismo (Vallejos, 2007). La segunda técnica nos permite observar características que no se pueden ver con claridad en la primera técnica.

Fusarium se caracteriza por poseer tres tipos de esporas, las microconidias (esporas unicelulares sin septos, cilíndricas, curvadas), macroconidias (esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, septadas) y clamidosporas (esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y las conidias). Las conidias son

fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa (Lozano *et al.*, 2008). Los cinco hongos degradadores de colorantes al ser observados en el microscopio presentan estas esporas tal como se describe en la tabla 3.2.

Es importante considerar el requerimiento de identificar con más especificidad a los hongos, debido a que las características preliminares observadas macroscópica y microscópicamente no son suficientes para determinar la especie. La caracterización de los hongos permitirá una optimización en la producción de enzimas ligninolíticas.

4.2 Actividad ligninolítica en un medio con guaiacol.

El guaiacol o 2-metoxifenol se obtiene directamente del alquitrán de árboles de la familia *Fagaceae* y, es utilizado como sustrato para la determinación de enzimas ligninolíticas; proceso que se evidencia por el crecimiento del hongo y la formación de un halo coloreado en el medio sintético con la presencia de este alcohol (Rodríguez *et al.*, 2001). Las enzimas ligninolíticas oxidan el guaiacol a tetraguaiacol, lo que provoca un cambio de coloración en el medio, que puede verse claramente en medio sólido o espectrofotométricamente puede ser medido de 397 a 426 nm (Koduri & Ming, 2011). En este estudio el guaiacol fue utilizado como prueba cualitativa, se observó crecimiento del hongo en el medio y cambio de coloración del mismo en tres concentraciones diferentes. Se demuestra que los cinco hongos degradadores de colorantes seleccionados producen enzimas ligninolíticas por cuanto se observó oxidación del guaiacol generando un halo coloreado en el medio, este resultado coincide con el trabajo realizado por Ortiz & Vélez (2010), donde se observa que varios hongos del género *Penicillium*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, aislados en la vereda La Balsa (Puerto López) en Colombia, mostraron actividad ligninolítica por oxidación positiva de guaiacol debido a su crecimiento y cambio de coloración del medio.

La mitad de los tratamientos implementados en la prueba, además de poseer el guaiacol poseen el producto ligninocelulósico aserrín; el aserrín posee un porcentaje de lignina de 17,29% en su estructura estimulando la producción de enzimas y así la futura oxidación del guaiacol por las mismas (Usnayo, 2007). Esto se comprobó en las tres

concentraciones 1, 2 y 3 mL.L⁻¹ en las que se observó que el tratamiento que poseía guaiacol y aserrín crecía y formaba un halo de color en el medio más rápidamente.

4.3 Actividad celulolítica en agar carboximetilcelulosa.

A los cinco hongos degradadores de colorantes se les aplicó la prueba semi-cuantitativa de celulosa. Esta prueba, a pesar de no ser relevante en la producción de enzimas ligninolíticas proporciona información de los hongos que presentan mayor afinidad por la degradación de la celulosa, para su posterior comparación con la producción de las dos enzimas ligninolíticas estudiadas.

Esta prueba reveló que todos los hongos degradadores de colorantes presentan actividad celulolítica ya que produjeron hidrólisis de celulosa revelando halos de aclaramiento (Gaitán y Pérez, 2007; Valencia, 2009). En la investigación realizada por Valencia, Quevedo, Franco, Horteiga, Parra & Rodríguez (2011) se comprobó que varios hongos del género *Fusarium* presentaron capacidades celulolíticas mediante pruebas semi-cuantitativas en agar carboximetilcelulosa y mediante pruebas cuantitativas. Los halos de hidrólisis fueron analizados y se comprueba que este género exhibe actividad celulolítica.

El hongo que presentó mayor diámetro de halo de hidrólisis fue el C18BL, seguido del C7AL; mientras que el hongo con menor actividad celulolítica fue el C1BA.

4.4 Presencia de la enzima lacasa en un medio con ABTS.

Más de 100 mediadores o sustratos son utilizados para la determinación de enzimas ligninolíticas, pero el ABTS es el más empleado. El ABTS es un compuesto aromático sintético con sustituciones nitrogenadas (Bourbonnais & Paice, 1990). La enzima lacasa previamente oxidada por el oxígeno, oxida al ABTS a un catión estable ABTS⁺ y la concentración del catión que posee una coloración azul-verdosa, se correlaciona con la actividad enzimática (Kunamneni *et al.*, 2007).

En la prueba cualitativa de lacasas en medio con ABTS, todos los hongos dieron resultados positivos, gracias al cambio de coloración del medio. El hongo que mejor resultado presentó en cuanto al número de repeticiones que indicaron resultados positivos fue el C1BA y el de menor actividad el C7AL. Varias investigaciones como es el caso de Rubilar (2007), Usnayo (2007) y Córdoba (2009), han usado esta prueba como una técnica preliminar a la cuantificación de la enzima lacasa, asegurándose que las cepas a estudiarse poseen actividad o de lo contrario se descartan para métodos más específicos como el cuantitativo.

4.5 Cuantificación de la enzima lacasa con dos sustratos ABTS y O-toluidina.

Tal como en la prueba cualitativa, el ABTS es oxidado por la enzima lacasa a un catión estable $ABTS^+$, que debido a su coloración azul-verdosa hace posible medirla por espectrofotometría (Kunamneni *et al.*, 2007) a una longitud de onda de 414 a 420 nm, siempre tomando muy en cuenta el coeficiente de extinción molar para los cálculos de actividad enzimática posterior (Chaparro & Rosas; 2006).

Otro mediador o sustrato utilizado para la determinación de la actividad enzimática de lacasas es la o-toluidina, este sustrato es capaz de reaccionar por acción de esta enzima cambiando la coloración del compuesto, midiéndolo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 627 nm (Téllez *et al.*, 2010). La o-toluidina no ha sido tan estudiada como el ABTS para la cuantificación de lacasas por lo que su información en bibliografía es escasa.

Para evaluar la mejor producción de enzima lacasa, en el presente estudio, se realizó una cuantificación de actividad enzimática durante 40 días tomando en cuenta hongo, medio natural de producción de enzimas y sustrato como tratamientos implementados. El mejor tratamiento a lo largo del ensayo enzimático fue dado por el sustrato ABTS, el hongo C1BA y el medio natural de producción de enzimas M3 (ABTS.C1BA.M3), sin lugar a duda el sustrato ABTS presentó valores de actividad enzimática más altos que la o-toluidina. En la tabla de cotejos 3.9 se observan los mejores tratamientos a lo largo de los 40 días y en todos se presenta el ABTS como sustrato. A pesar de su menor valor en comparación con el ABTS, la o-toluidina si

presentó actividad enzimática, por lo que se podría optimizar en futuras investigaciones los valores de pH y temperatura para una mejor cuantificación de la enzima lacasa.

4.6 Cuantificación de la enzima lignina peroxidasa utilizando como sustrato ABTS.

El ABTS también es utilizado para la determinación de la actividad lignino peroxidásica. El peróxido de hidrógeno presente en la solución oxida a la enzima lignina peroxidasa, la cual oxida al ABTS a catión estable $ABTS^+$, característico por su coloración azul-verdosa que es posible medirla por espectrofotometría a una absorbancia de 420 nm (Ruiz, 1998). En cuanto a información bibliográfica se observó que el ABTS es el mediador o sustrato más utilizado para la cuantificación de la enzima lacasa, mientras que el alcohol veratrílico es el mediador o sustrato más utilizado en cuantificación de actividad ligninoperoxidásica.

De igual forma que en la evaluación de la enzima lacasa, la mejor producción de actividad lignino peroxidásica fue evaluada, a través de una cuantificación enzimática durante 40 días tomando en cuenta hongo, medio natural de producción de enzimas y sustrato como tratamientos implementados. El mejor tratamiento a lo largo del ensayo enzimático fue aquel que utiliza como sustrato ABTS, el hongo C1BA y el medio natural de producción de enzimas M3 (ABTS.C1BA.M3). Este tratamiento resulta ser el mejor tanto para actividad enzimática de lacasas como de lignina peroxidases.

4.7 Efectividad de tres diferentes medios naturales para la producción de enzimas.

Los medios son importantes para la producción de enzimas ya que aportan con nutrientes a los hongos con el fin de que liberen estas enzimas y así obtengan su fuente de alimento y energía (Usnayo, 2007).

La presente investigación se utilizó tres medios para la producción de enzimas diferenciándose uno del otro por su composición de sales y de elementos ligninocelulósicos. Tanto como para la actividad enzimática de lacasas como de lignina peroxidases coincide que el mejor medio de expresión de enzimas es el medio M3.

Arenas, Soliveri & Arias (2010) en su investigación mencionan que las enzimas ligninolíticas se activan en presencia de Cu, Mn y Mg, y se inactivan en presencia de Ca, Fe y Zn. Los medios M1 y M2 en su composición poseen Ca y Fe mientras que el medio M3 no posee ninguno de los dos elementos, esto puede ser el factor atribuible a que este medio favorezca de mejor manera la producción de enzimas.

Para complementar este estudio, con una segunda investigación, sería valioso optimizar el medio de producción de enzimas con sales y producto ligninocelulósicos de afinidad para los hongos y de esta manera se podría obtener mayor producción de enzimas ligninolíticas.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.

- 5.1** Los hongos estudiados pertenecen al género *Fusarium*.
- 5.2** Los cinco hongos seleccionados presentaron actividad ligninolítica, identificados por el crecimiento y cambio de coloración del medio por oxidación del guaiacol.
- 5.3** Los hongos estudiados presentaron actividad celulolítica medida por el diámetro de halos de aclaramiento de hidrólisis de celulosa, el hongo C18BL presentó mayor actividad celulolítica, mientras que el hongo C1BA mostró la más baja.
- 5.4** Todos los hongos seleccionados poseen resultados positivos para la presencia de lacasas en medio con ABTS, ya que gracias a la oxidación del mismo se observó un cambio de coloración en el medio. El hongo C1BA presenta el mejor resultado en esta prueba y el menor resultado el hongo C7AL.
- 5.5** El mejor tratamiento de actividad enzimática de lacasas fue el ABTS.C1BA.M3 (sustrato ABTS, hongo C1BA y medio natural de producción de enzimas M3), con el valor más alto de actividad enzimática de 308,64 U.L-1enz al día 16.
- 5.6** El mejor tratamiento de actividad lignino peroxidásica fue el ABTS.C1BA.M3 (sustrato ABTS, hongo C1BA y medio natural de producción de enzimas M3, con el valor más alto de actividad enzimática de de 210,53 U.L-1enz al día 16.
- 5.7** La expresión enzimática de lacasas y de lignina peroxidasas alcanzó su valor óptimo al día 16 de 40 días de ensayo enzimático.
- 5.8** Los hongos que presentaron menor actividad celulolítica son aquellos que más actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas presentaron.
- 5.9** El medio natural de producción de enzimas M3 fue el más favorable para la producción de lacasas y lignina peroxidasas.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.

- 6.1** Caracterizar los cinco hongos estudiados por género y especie para optimizar condiciones de pH y temperatura que llevarían a una mejor producción de enzimas ligninolíticas.
- 6.2** Se podría complementar este estudio con la optimización del pH y la temperatura de los dos sustratos utilizados, para incrementar la producción de enzimas.
- 6.3** Optimizar el medio de producción de enzimas con sales y producto lignocelulósicos de afinidad para los hongos.
- 6.4** Extender este estudio con la determinación de la actividad enzimática de manganeso peroxidasas y ver si estos hongos pueden aplicar todo el complejo enzimático ligninolítico para procesos de biorremediación.
- 6.5** Aplicar a nivel de laboratorio el uso de enzimas ligninolíticas en la degradación de colorantes provenientes de la industria textil.
- 6.6** Diseñar un biorreactor, a escala semi-industrial o industrial, para aplicar las propiedades fúngicas encontradas para la degradación de colorantes de la industria textil.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.

- Aburto, J. & Quintero, R. (2001). En Prospectiva, Publicaciones. Biotecnología: IMP, Pp 135-147. [Versión Electrónica].
- Arena, M., Soliveri, J & Arias, M. (2010). “ Purificación y Caracterización de la lacasa producida por *Streptomyces cyaneus* CEC3335 en cultivo sumergido”. Universidad de Alcalá. Madrid-España. [Versión Electrónica].
- Ayala D. (2010). “Obtención de un inóculo bacteriano, proveniente de suelos contaminados por agua residual textil, capaz de degradar colorantes textiles reactivos en condiciones aerobias a escala de laboratorio”. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Superior Politécnica del Ejército. Sangolquí-Ecuador. [Versión Electrónica].
- Arana, A., Téllez, A., Gonzalez, T & Gonzalez, A. (2003). “Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas”. México. Bio Tecnología, 7, 40-55. [Versión Electrónica].
- Benedito, C. (2001). Contaminación de Agua y Suelo. São Paulo: Instituto de Investigaciones Tecnológicas de São Paulo – IPT. [Versión Electrónica].
- Bourbonnais, R. & Paice, M. (1990). Oxidative enzymes from the lignin degrading fungus *Pleurotus-Sajor-Caju*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society. Pp 195. [Versión Electrónica].
- Calle, H., Córdova, J., Gallegos, G., & Jiménez, P. (2010). Ecuador y la contaminación Textil. Ecuador Ambiental. Ecuador: ExpoAgro. [Versión Electrónica].
- Castillo, D. (2004). “Aislamiento de hongos degradadores de colorantes empleados en la industria textil”. Proyecto previo a la obtención del título de Maestro en Tecnología Avanzada. Centro de investigaciones en Biotecnología Aplicada. Tepetitla de Lardizabal Tlaxcala. Pp 4-10, 21 y 24. [Versión Electrónica].

- Chaparro, D. & Rosas, D. (2006). “Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de la madera en la reserva natural la Montaña del Ocaso, Quimbaya-Quindo”. Proyecto previo a la obtención del título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp 24, 27. [Versión Electrónica].
- Cardona, M. (2009). “Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos”. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. [Versión Electrónica].
- Constitución del Ecuador. (2011). Constitución del Ecuador. Asamblea Nacional. [Versión Electrónica].
- COOPSA. (2006). Coordinación control de obras y proyectos. México-D.F. <http://www.coobypsa.com.mx/>
- Córdoba, K. (2009). “Resistencia Natural de *Guadua angustifolia* Kunth. Al ataque de hongos ligninolíticos como alternativa hacia nuevas posibilidades de uso”. Proyecto previo a la obtención del título de Maestra en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp 41-43. [Versión Electrónica].
- Coronel, L., Mesina, O., Jonson, L & Sobrejuanite, E (1991). Cellulase and Xilonase production of *Aspergillus fumigatus*, a Thermophilic Fungus. Philippine Journal of Science, 120 (3), 283-291. [Versión Electrónica].
- Corporación de Gestión Tecnológica y Científica sobre el Ambiente. (1998). Prevención de la Contaminación en las Curtiembres del Ecuador. Ecuador: Revista Casos de Aplicaciones Tecnológicas Ambientales en el Ecuador. Pp 1-6.
- Dávila, G., & Vásquez, R. (2006). “Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales”. Mensaje Bioquímico 30. Pp 29-55. [Versión Electrónica].
- Dorado, G. (2005). “Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-Peroxidasa y Lacasa producidas

por *Tametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelería”. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Universitas Scientiarum, 2. Pp 37-45. [Versión Electrónica].

- Gaitán, D y Pérez L (2007). “Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)”. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. [Versión Electrónica].
- Garzón, R. (2009). “Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de *Agave tequilana* Webber var. Azul”. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp 37-41. [Versión Electrónica].
- Gold, M. & Alic, M. (1993). Molecular-biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiological Reviews, 57 (3), 605-622. [Versión Electrónica].
- González, G. (1985). Métodos estadísticos y principios de Diseño Experimental. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador. Segunda Edición, (Pp. 222-228).
- González, K. (2009). “Propiedades físico-químicas y cinéticas de la enzima lacasa inmovilizada de *Fusarium proliferatum*”. Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. Tenerife-España. Pp 2-5. [Versión Electrónica].
- Granda, F. (2009). “Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de cáscara de banano (*Cavendish valery*)”. Proyecto previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador. Pp 20-25. [Versión Electrónica].
- Greenpeace. (2010). “Campaña de tóxicos”. Madrid-España. <http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/other/el-tratamiento-de-textiles-y-s.pdf>

- Guerra, G., Domínguez, O., Ramos, M., Manzano, A., Sánchez, M., Hernández, I., Palacios, J & Arguelles, J. (2008). Production of laccase and manganese peroxidase by white-rot fungi from sugarcane bagasse in solid bed, use for dyes decolourisation. Sugar Tech, 10(3), 260-264. [Versión Electrónica].

- Gutiérrez, H y de la Vara, R (2008) “Análisis y diseño de experimentos”. Segunda edición. McGrawHill. México. Pp.59-98 y 128-164.

- Hatvani, N. & Mécs, I. (2002). “Effects of the nutrient composition on dye decoloration, and extracellular enzyme production by *Lentinula edodes* on solid medium”. *Enzymes and microbial technology*, 30. Pp. 381 – 386. [Versión Electrónica].

- Haug, W., Schmidt, A., Nörtemann, B., Hempel, D., Stolz, A & Knackmuss, H. (1991). Mineralization of sulfonated azo dye mordant yellow 3 by 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. Applied and environmental microbiology.57(11):3, 144-149. [Versión Electrónica].

- Herrera, J & Rosas, J (2003). Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes en la industria papelera. Bogotá-Colombia. [Versión Electrónica].

- Hughes, S & Cooper, D (1996). Biodegradation of Phenol Using the Self-Cycling Fermentation (SCF) Process. Biotechnology and Bioengineering, 51, 112-119. [Versión Electrónica].

- Ivester, A & Neefus, J. (2010). “Industria de Productos Textiles. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo”.
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo3/89.pdf>

- Kahraman, S & Gurdal, I. (2001). Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. Department of Science and Biology Inonu University. Malatya, Turkey. Bioresource Technology, 82, 215–217. [Versión Electrónica].

- Knapp, J., Newby, P & Reece, L. (1995). Decoloration of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. Enzyme and Microbial Technology, 664-668. [Versión Electrónica].

- Khushal, B., Anne, R & Praveen, V. (2010). Fungal Laccases: Production, Function and Applications in Food Processing. Bioprocessing Laboratory, Department of Grain and Science and Industry. Kansas-USA. Enzyme Research, 149748, 4-6. [Versión Electrónica].

- Koduri, R & Ming. T. (2011). Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase. USA: American Society for Biochemistry and Molecular Biology. The Journal of Biological Chemistry, 270, 22254-22258. [Versión Electrónica].

- Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F., Alcalde, M. (2007). “Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications”. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Pp 236-238.

- Lozano, M., Rozo, L., Ruiz, N., Quiroga, L & Sandoval, L. (2008). Manual de Manejo Preventivo de (*Fusarium sp*) en cultivos. Bogotá-Colombia. [Versión Electrónica].

- Makagreenbcn (2011). “Colores veneno de la industria textil”.
www.makagreenbcn.com/archives/1091

- Márquez, A (2004). Determinación de patrones de inducción de lacasas en el hongo *Trametes sp.* EUM1. México, D.F: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Martín, A. (2010). “Soluciones reguladoras de pH”. Química Analítica http://udea.edu.co/lms/moodle/file.php/463/Modulo_2/SOLUCIONES_20REGULADORAS_20DE_20pH.pdf
- Martínez, A., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M., Gutiérrez, A & Del Río, J. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int Microbiol, 8, 195-204. [Versión Electrónica].
- Martínez de Lejarza, J. (2004) “Análisis de varianza por un factor” <http://www.docstoc.com/3262706/ANOVA-ANOVA-ANC81LISIS-DE-LA-VARIANZA-POR-UN-FACTOR-JUAN>
- Mayer, A., & Staples, R. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. United States of America. Phytochemistry, 60 (6), 551-565. [Versión Electrónica].
- Moreira, S. (2006). Enzimas ligninolíticas producidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. São Paulo-Brazil: Dissertação (mestrado)-Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. [Versión Electrónica].
- Mouso, N & Diorio L. (2007). Acción de *Stereum hirsutum* (Wild) Pers. en la degradación de colorantes. Buenos Aires – Argentina: Universidad de Buenos Aires.
- Ortiz, M & Uribe, D. (2010). “Determinación de la actividad lignocelulolítica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabana de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical”. Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad de los Llanos. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Colombia. [Versión Electrónica].

- Pedroza, A., Quevedo, B. y Matiz, A. (2007). “Manual de laboratorio de procesos biotecnológicos”. Primera edición. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp.17-20,42 y 44-46.
- Quintero, J., Feijoo, G & Lemar, J. (2006). “Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivador sobre materiales lignocelulósicos”. Vitae, Vol 13, Num 2. Pp. 61-67. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=169813258008>
- Rhaghavacharya, C. (1997). Colour removal from industrial effluents-acomparative review of available technologies. Chem. Eng. World, 32, 53-54. [Versión Electrónica].
- Robinson, T., Chandran & Nigam, P. (2001). Studies of the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. Enzime and Microbial Technology, 575 – 579. [Versión Electrónica].
- Rodriguez, E., Pickard, M & Vazquez-Duhalt, R. (2006). Industrial dye decolorization by lacases from ligninolytic fungi. Curr Microbiol, 38, 27-32. [Versión Electrónica].
- Rodríguez, F. (2006). “Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavidobalba*: caracterización del gen y regulación por fenoles y metales”. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada. España. Pp 24-30. [Versión Electrónica].
- Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, M & Morris, H. (2001). Tratamiento de efluentes industriales coloreados por *Pleurotus spp.* Santiago de Cuba-Cuba. Revista Iberoamericana de Micología.
- Rubilar, O. (2007). “Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca”. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de Recursos Naturales. Universidad de la Frontera. Temunco. Chile. Pp 43-48.

- Ruiz, J. (1998). “Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica”. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. Pp 43-47. [Versión Electrónica].
- Sánchez, V., Hernández, F y Samuels, G. (2006). “Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. De diferentes ecosistemas en la región del Papaloapan”. [Versión Electrónica].
- Sandoval, N. & Ospina, X. (2008). “Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en Fique”. Proyecto previo a la obtención del título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp 50-54. [Versión Electrónica].
- Seifert, K. (2001). *Fusarium and anamorph generic concepts*. APS Press. St. Paul, Minnesota. Pp. 15 – 28. [Versión Electrónica].
- Selvam, K., Swaminathan, F & Keon-Sang C. (2003). Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora sp.* Bioresource Technology, 88, 115-119. [Versión Electrónica].
- Téllez, M., Sánchez, C., Loera, O., & Díaz, G. (2010). “Actividad Intra y extracelular de Lacasas en Cepas de *Pleurotus ostreatus*. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México DF. México. Pp 21-24.
- Tuor, U., Wariishi, H., Schoemaker, H & Gold, M. (1992). Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - oxidative cleavage of an alpha-carbonyl modelcompound. Biochemistry 3, 4986-4995. [Versión Electrónica].
- Usnayo, P. (2007) “Optimización de Medios de Cultivo, para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fúngicas aisladas del Altiplano Boliviano”. Trabajo de grado para optar al título de Lic. En Bioquímica. La Paz: Bolivia. [Versión Electrónica].

- Valencia, M. (2009). “Caracterización enzimática de cepas de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas”. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. Pp. 23,37,38,49,51 y 52.
- Valencia, M., Quevedo, B., Franco, M., Horteiga, H., Parra, C., Rodríguez, M. (2011). Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. Scientiarum, 16, (2), 147-159.
- Valenzuela, C (2011). “Selección de hongos eficientes en la biodegradación de materia orgánica y colorantes reactivos”. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Superior Politécnica del Ejército. Sangolquí-Ecuador.
- Valle, P. (1991). Toxicología de Alimentos. Metepec –México: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud - OMS. 2ª Edición.. Pp.124-125
- Vallejos, C. (2007). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humana. Perú: Lima [Versión Electrónica].
- Velasteguí, L. (2004). La Era de contaminación en Ecuador. Observatorio de la Economía Latinoamericana. Ecuador: Revista Académica de Economía.
- Villa, Y. (2007) “Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica en el sustrato a escala de laboratorio”. Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniera Química. Escuela Politécnica Nacional. Quito. Ecuador. Pp. 22-27 y 41-42.
- Wong, Y & Yu J., (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. Elsevier Science, 33 (16), 3512 – 3520. [Versión Electrónica].
- Yaovapa, T., Toru, J., Yoshimasa, M., Shigeharu, M., Savitr, T., Napavarn, N., Moriya, O & Toshiaki, K. (2005). “Symbiotico Fungi Produce Laccases Pontentially Involved in Phenol Degradation in Fungus Combs of Fungus-

Growing Termites in Thailand". Environmental Molecular Biology Laboratory
RIKEN, Saitama, Japan [Versión Electrónica].

- Young, L & Yu, J. (1997). Ligninase-catalized decolorization of synthetic dyes.
Water Res, 31, 1187. [Versión Electrónica].