



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“DEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES POR
MEDIO DE ENZIMAS LACASA GENERADAS POR
LOS HONGOS *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr.), Y
Psilocybe zapotecorum (Heim emend. Guzmán)”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

TANIA MARÍA OLIVAREZ GONZÁLEZ

Director de Tesis:

DR. MARCO ANTONIO MARÍN CASTRO

Codirector de Tesis:

**DRA. MA. DE LOS ÁNGELES VELAZCO
HERNÁNDEZ**

Puebla, Pue. Febrero 2020

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	15
HIPÓTESIS.....	16
CAPITULO I: ANTECEDENTES	17
1.1 Colorantes	17
1.1.1 Colorantes azoicos	18
1.2 Impacto ambiental	19
1.3 Tratamiento de aguas residuales de origen textil.....	20
1.3.1 Tratamientos fisicoquímicos.	20
1.3.2 Tratamientos biológicos.....	20
1.3.3 Biodegradación.....	21
1.3.4 Degradación de xenobióticos.....	22
1.3.5 Aplicación de hongos de la pudrición blanca (pb) en xenobióticos. ..	22
1.4 Enzimas	23
1.4.1 Enzimas lacasas.....	23
1.4.2 Purificación de enzimas.....	24
1.4.2.1 Separaciones cromatográficas	24
1.4.2.2 Separaciones electroforéticas.....	25
1.5 Los hongos.....	25
1.5.1 <i>Ganoderma lucidum</i>	27
1.5.1.2 Morfología de <i>Ganoderma lucidum</i>	27
1.5.1.3 Importancia de <i>Ganoderma</i>	28
1.5.2 <i>Psilocybe zapotecorum</i>	28
CAPITULO II: METODOLOGÍA.....	30

2.1 Aislamiento y purificación del micelio en medio sólido.....	32
2.2 Pruebas cualitativas de la decoloración enzimática.....	32
2.2.1 Preparación del medio PDA con los colorantes textiles.....	32
2.2.2 Evaluación de degradación de los colorantes en medio sólido.....	33
2.3 Pruebas cuantitativas.....	33
2.3.1 Preparación del medio mineral líquido.....	33
2.3.2 Generación de enzimas en medio líquido.....	34
2.3.2.1 Condiciones de crecimiento de los hongos en medio mineral....	34
2.3.3 Determinación de la actividad enzimática de enzima lacasa.....	34
2.3.4 Purificación de la enzima lacasa por cultivo líquido.....	34
2.3.5 Evaluación de la biodegradación de los colorantes en solución por medio de fotometría.....	35
2.3.5.1 Preparación del agua artificialmente contaminada.....	35
2.3.5.2 Cultivo en el agua artificialmente coloreada con los tintes textiles	35
2.3.5.3 Purificación de la enzima lacasa obtenida del residual de la degradación de los colorantes.....	35
2.3.6 Comprobación en la degradación enzima purificada en los colorantes.....	36
2.3.6.1 Actividad enzimática en las fracciones obtenidas en la cromatografía.....	36
2.3.6.2 Preparación de los colorantes textiles a 1ppm y 2ppm.....	36
2.3.6.3 Reacción de la enzima lacasa purificada sobre los colorantes experimentales.....	37
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1 Aislamiento y purificación del micelio en medio sólido.....	38
3.2 Pruebas cualitativas de la decoloración enzimática.....	38
3.2.1 Evaluación de degradación de los colorantes en medio sólido.....	38
3.3 Pruebas cuantitativas.....	39

3.3.1 Condiciones de crecimiento de los hongos en medio mineral.....	39
3.3.2 Determinación de la actividad enzimática de la enzima lacasa.....	40
3.3.3 Purificación del extracto enzimático por columna de cromatografía..	42
3.3.3.1 Actividad enzimática en las fracciones obtenidas en la cromatografía.....	43
3.3.3.2 Comprobación de la degradación enzima purificada en los colorantes.....	44
3.3.5 Evaluación de la biodegradación de los colorantes en solución por medio de fotometría.....	46
3.3.5.1 Preparación del agua artificialmente contaminada.....	46
3.3.5.2 Biodegradación de los tintes textiles en agua artificialmente coloreada	47
3.3.5.2.1 <i>Ganoderma lucidum</i>	47
3.3.5.2.2 <i>Psilocybe Zapotecorum</i>	52
3.3.6 Purificación de la enzima lacasa obtenida del residual de la degradación de los colorantes.....	57
3.3.7 Actividad enzimática en las fracciones obtenidas del residual por medio de cromatografía.....	59
3.3.8 Comprobación en la degradación enzima purificada en los colorantes	62
CONCLUSIÓN.....	66
Anexo “A”.....	67
Anexo “B”.....	68
Anexo “C”	70
Anexo “D”	71
BIBLIOGRAFÍA.....	73

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Concentración de los colorantes	32
Tabla 2. Composición para el medio del cultivo líquido.	33
Tabla 3. Diluciones para preparar de 10 a 1 ppm	36
Tabla 4. Incubación del micelio experimental en el medio con colorante	39
Tabla 5. Valores de Actividad enzimática de <i>P. zapotecorum</i> $\mu\text{molL} * \text{min}$	41
Tabla 6. Valores de actividad enzimática de <i>G. lucidum</i> $\mu\text{molL} * \text{min}$	41
Tabla 7. Actividad enzimática de <i>P. zapotecorum</i> $\mu\text{molL} * \text{min}$	43
Tabla 8. Actividad enzimática de <i>G. lucidum</i> $\mu\text{molL} * \text{min}$	44
Tabla 9. Concentración y % de biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de <i>G. lucidum</i>	45
Tabla 10. Concentración y % de biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de <i>G. lucidum</i>	45
Tabla 11. Concentración y % de biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de <i>P. zapotecoum</i>	45
Tabla 12. Concentración y % de biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de <i>P. zapotecoum</i>	46
Tabla 13. Determinación de absorbancia y pH de las aguas artificialmente contaminadas.	47
Tabla 14. Concentración obtenida del colorante violeta 51 a 100 ppm de <i>G. lucidum</i>	48
Tabla 15. Concentración obtenida de colorante azul 86 a 100 ppm de <i>G. lucidum</i>	48
Tabla 16. Concentración obtenida de colorante violeta 51 a 30 ppm de <i>G. lucidum</i>	50
Tabla 17. Concentración obtenida de colorante azul 86 a 30 ppm de <i>G. lucidum</i>	50

Tabla 18. Concentración obtenida de colorante violeta a 100 ppm de <i>P. zapotecorum</i>	52
Tabla 19. Concentración obtenida de colorante azul 86 a 100 ppm de <i>P. zapotecorum</i>	54
Tabla 20. Concentración obtenida de colorante violeta 51 a 30 ppm de <i>P. zapotecorum</i>	55
Tabla 21. Concentración obtenida de colorante azul 86 a 30 ppm de <i>P. zapotecorum</i>	56
Tabla 22. Fracciones obtenidas del residual de <i>G. lucidum</i> a 30ppm	58
Tabla 23. Fracciones obtenidas del residual a 30ppm de <i>P. zapotecorum</i>	58
Tabla 24. Actividad enzimática de <i>P. zapotecorum</i> $\mu\text{molL} * \text{min}_2$	59
Tabla 25. Actividad enzimática de <i>P. zapotecorum</i> $\mu\text{molL} * \text{min}$	60
Tabla 26. Actividad enzimática de <i>G. lucidum</i> $\mu\text{molL} * \text{min}$	61
Tabla 27. Actividad enzimática de <i>G. lucidum</i> $\mu\text{molL} * \text{min}$	61
Tabla 28. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de <i>G. lucidum</i>	63
Tabla 29. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de <i>G. lucidum</i>	63
Tabla 30. Concentración y el % y biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de <i>G. lucidum</i>	63
Tabla 31. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de <i>G. lucidum</i>	64
Tabla 32. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de <i>P. zapotecorum</i>	64
Tabla 33. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de <i>P. zapotecorum</i>	64
Tabla 34. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de <i>P. zapotecorum</i>	65

Tabla 35. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de <i>P. zapotecorum</i>	65
Tabla 36. Curva de calibración de azul 86 de 10-100ppm	68
Tabla 37. Curva de calibración de violeta 51 de 10 a 100ppm.....	68
Tabla 38. Curva de calibración de azul 86 de 1 a 10ppm	69
Tabla 39. Curva de calibración de violeta 51 de 1 a 10ppm.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que representa los tipos de compuestos capaces de ser degradados, así como los microorganismos involucrados.	22
Figura 2. Estructura química representativa de la lignina	26
Figura 3. Cuerpo fructífero sin esporular de <i>Ganoderma lucidum</i>	27
Figura 4. El hongo <i>Psilocybe zapotecorum</i> , común en la región oaxaqueña, conocido como derrumbe o corona de cristo.....	29
Figura 5. (a) Crecimiento del hongo <i>Ganoderma lucidum</i> . (b) Crecimiento de <i>Psilocybe zapotecorum</i>	38
Figura 6. Cajas Petri con medio coloreado.....	38
Figura 7. Crecimiento total de las cepas en medio mineral (a) <i>Ganoderma lucidum</i> . (b) <i>Psilocybe zapotecorum</i>	40
Figura 8. Oxidación del ABTS por la acción de la enzima.	40
Figura 9. Comparación de la actividad enzimática de <i>Psilocybe zapotecorum</i> y <i>Ganoderma lucidum</i>	42
Figura 10. Columna de cromatografía con el intercambiador DEAC y extracto enzimático de (a) <i>G. lucidum</i> . (b) <i>P. zapotecrum</i>	43
Figura 11. Comparación de la actividad enzimática de <i>Psilocybe zapotecorum</i> y <i>Ganoderma lucidum</i>	44
Figura 12. (a) colorante azul 86 a 30ppm. (b) colorante violeta 51 a 30ppm. (c) colorante azul 86 a 100ppm (d) colorante violeta 51 a 100ppm.	47
Figura 13. Biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51 a 100ppm...49	
Figura 14. Biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51 a 30ppm.....52	
Figura 15. Biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51 a 100ppm...55	
Figura 16. Biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51 a 30ppm.....57	
Figura 17. Columna cromatografía con el intercambiador DEAC y extracto enzimático residual a 30 ppm inicial (a) intercambiador teñido con azul 86. (b) intercambiador teñido con violeta 51.....	58

Figura 18. Comparación de la actividad enzimática de las fracciones obtenidas de los matraces color azul 86.	59
Figura 19. Comparación de la actividad enzimática de las fracciones obtenidas de los matraces color violeta 51.....	60
Figura 20. Comparación de la actividad enzimática de las fracciones obtenidas de los matraces color violeta 51.....	61
Figura 21. Comparación de la actividad enzimática de las fracciones obtenidas de los matraces color azul 86.	62
Figura 22. Aspecto del agua contamina con violeta 51 a 30 ppm con <i>P. zapotecorum</i> (a) R1 después de la biodegradación (b) R2 después de la biodegradación (c) R3 después de la biodegradación (d) Antes de la biodegradación.	71
Figura 23. Aspecto del agua contaminada con azul 86 a 30 ppm con <i>P. zapotecorum</i> (a) R3 después de la biodegradación (b) R1 después de la biodegradación (c) R2 después de la biodegradación (d) Antes de la biodegradación.	71
Figura 24. Aspecto del agua contaminada con violeta 51 a 30 ppm con <i>G.ganoderma</i> (a) R1 después de la biodegradación (b) Antes de la biodegradación (c) R3 después de la biodegradación.....	72
Figura 25. Aspecto del agua contaminada con azul 86 a 30 ppm con <i>G.ganoderma</i> (a) R1 después de la biodegradación (b) Antes de la biodegradación (c) R2 después de la biodegradación.....	72

ABREVIATURAS Y UNIDADES

Gl: *Ganoderma lucidum*

Pz: *Psilocybe zapotecorum*

PDA: Agar papa dextrosa

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico)

UV-vis: Ultravioleta visible

R1: Repetición 1

μm: Micromolar

μl: Microlitro

ppm: Parte por millón

UI: Unidades internacionales en función del volumen

INTRODUCCIÓN

La industria textil es una de las más importantes de nuestro país. Sin embargo, es una de las industrias con mayor consumo de agua y generadora de aguas residuales ya que contienen un gran número de contaminantes de diferente naturaleza. Entre los contaminantes se destacan los colorantes, estos compuestos se diseñan para ser altamente resistentes, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento convencional.

Las aguas residuales textiles provenientes de la maquila de mezclilla se caracterizan por extremas fluctuaciones en parámetros como la demanda química y bioquímica de oxígeno, el pH, salinidad y color. Este último es de los que más controversia causan, no solo por la contaminación visual que produce sino por los efectos negativos de los colorantes al ambiente y la salud pública ya que se sabe son tóxicos o mutagénicos para la vida, además sin tratamiento adecuados, estos tintes se estabilizan y pueden permanecer en el ambiente durante mucho tiempo; por ejemplo, la vida del reactivo hidrolizado blue 19, utilizado en la mezclilla es cercana a los 46 años (Koch, Naranjo , & Páez , 2001).

Los tratamientos generalmente utilizados para la remoción de las fuentes con colorantes textiles han sido de tipo físico, químico y los biológicos son alternativos. En los tratamientos biológicos es factible utilizar hongos, principalmente los degradadores de la madera denominados ligninolíticos, también denominados hongos de la producción blanca que tienen la capacidad enzimática de eliminar lignina y polímeros de alta concentración de anillos aromáticos y estas estructuras son similares a los colorantes textiles. (Koch, Naranjo , & Páez , 2001).

En estos casos la enzima lacasa adquiere gran importancia porque es la que oxida los componentes fenólicos de la madera y por lo tanto también puede actuar sobre las estructuras fenólicas y anillos aromáticos de colorantes que se relacionan estructuralmente con la lignina por su similitud en su estructura (Moreno & Ospina, 2010).

Los principales hongos que presentan la propiedad de degradar la lignina son los géneros: *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Bjerkandera*, etc., También denominados hongos de la producción blanca son organismos de interés para la producción de lacasa, que por sus propiedades pueden ser aplicadas en diversos procesos biotecnológicos, entre ellos, la biorremediación. (Martinez, y otros, 2005).

Este trabajo pretende investigar algunos hongos que produzcan la enzima lacasa obtenida a partir del género *Ganoderma Lucidum* y *Psilocybe Zapotecorum* para evaluar la degradación de los colorantes azoicos en soluciones artificialmente contaminadas o coloreadas como una alternativa que se pueda aplicar en el tratamiento de aguas residuales de la industria textil.

JUSTIFICACIÓN

El acelerado crecimiento demográfico y el desarrollo de industrias textiles, que pretenden mejorar la comodidad y calidad de vida de las personas generan paralelamente un agotamiento constante de los recursos naturales, necesarios como materias primas en los procesos de la producción.

El vertido de sustancias tóxicas contamina grandes masas de agua que no pueden volver a utilizarse. Actualmente se producen más de 7×10^5 toneladas de colorante al año y, por tal motivo desde el año 1989 la industria textil fue catalogada entre las diez principales actividades generadoras de desechos líquidos tóxicos (EPA, 2014).

El colorante utilizado en el proceso de tinción que es liberado en los efluentes representan un serio problema ambiental y una preocupación para salud pública, ya que actualmente el mayor volumen de descarga de aguas residuales de la industria textil en el país es mayor a $64,196 \text{ m}^3/\text{día}$ (SEMARNAT-CNA, 2004).

Aunque existen industrias textiles que cuentan con plantas de tratamiento de aguas residuales, no se logra nulificar los efectos agresivos de algunos contaminantes empleados en el proceso, sin embargo, la descarga final, continua con una alta concertación de colorantes que son vertidos, en los efluentes ocasionando un gran impacto ambiental negativo principalmente las aguas de riego en la agricultura.

Una alternativa que se ha investigado es la degradación de colorantes textiles mediante la utilización de enzimas. Siendo las enzima lacasa, biomoléculas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos (Ramírez Ramírez & Ayala Aceves, 2014) y que poseen la propiedad de oxidar derivados de compuestos ligninofenólicos así como colorantes textiles de naturaleza azoica contaminantes ambientales altamente recalcitrantes, por lo que resulta útil en el tratamiento de agua de la industria textil (Toca Herrera & Rodriguez, 2006) El hongo *Pleurotus*

spp., es con el que mayormente se ha experimentado la generación de esta enzima.

Debido a esta problemática se propone comprobar que los hongos *Ganoderma Lucidum* y *Psilocybe Zapotecorum* generan enzima lacasa con propiedades de degradar colorantes azoicos en soluciones de laboratorio.

OBJETIVOS

GENERAL

- Comprobar la efectividad de los hongos experimentales en la generación de enzimas lacasa, para su obtención, purificación y evaluación de la degradación de colorantes textiles.

ESPECIFICOS

- Aislar y purificar el micelio de los hongos experimentales.
- Determinar la presencia de enzima lacasa en las especies utilizadas en medios de cultivo sólido y líquido.
- Determinar el porcentaje de degradación de los colorantes azoicos directos Azul 86 y violeta 51 en cultivo líquido.
- Obtener la enzima lacasa por medio de cromatografía en columna, a partir de extractos líquidos de los hongos experimentales.
- Comprobar la degradación de los colorantes azoicos Azul 86 y violeta 51 por medio de las enzimas extraídas con la columna cromatográfica.

HIPÓTESIS

Los hongos *Ganoderma lucidum* y *Psilocybe zapotecorum* tienen la propiedad de generar lacasa que degradan los colorantes textiles Azul 86 y violeta 51.

CAPITULO I: ANTECEDENTES

El sector textil es uno de los principales generadores de contaminantes que se vierten al agua. Esta industria utiliza una gran variedad de sustancias químicas que contaminan el agua, generando agua residual donde los contaminantes son extremadamente diversos y varían de acuerdo con el tipo de fibra, hilo o tela, proceso o productos químicos usados.

La industria textil mexicana se caracteriza por el alto volumen de agua que usa en sus procesos, la cual es contaminada durante la producción de hilos o telas. En el 2003 cerca de 2,500 establecimientos textiles existentes generaron 0.7 m³/s de aguas residuales y produjeron 14 mil toneladas de DBO (Yonni & Fasoli, 2008).

La industria de colorantes está muy relacionada con la industria textil de manera que un incremento en la producción de fibras requerirá mayor producción de colorantes, aunque no en la misma proporción (Yonni & Fasoli, 2008). Hay alrededor de 100,000 colorantes, y se producen 700000 toneladas al año en todo el mundo. La principal fuente de contaminación en los efluentes textiles está constituida por la presencia de colorantes azoicos que son difíciles de degradar en sistemas de tratamiento convencional. Cada tipo de colorante presenta características físicas, químicas y biológicas diferentes, que les atribuyen propiedades recalcitrantes y efectos tóxicos para el ambiente.

La presencia de colorantes en el agua residual de la industria textil se debe principalmente a que, durante el proceso de acabado de telas e hilos, particularmente durante el teñido, el colorante no es fijado completamente y queda un residuo que varía del 12 al 30% dependiendo del proceso usado para su fijación. Este colorante residual es el que, incorporado a las aguas superficiales, da un aspecto no estético que demerita la transparencia del agua.

1.1 Colorantes

Los colorantes utilizados actualmente pueden ser productos naturales, extraídos de plantas y animales, o bien de síntesis industrial, es decir fabricados por una reacción química a gran escala.

Los colorantes dan color a los materiales, por que retienen radiaciones de longitudes de onda dentro de la región visible del espectro de absorción (400-800 nm), que inciden en la superficie del material y que son reflejados en la longitud de onda de un color visible. Aunque todos los compuestos orgánicos absorben radiación, solo los llamados cromóforos (nitro, nitroso, azo o quinonoides entre otros) tienen bandas de absorción dentro del rango de radiación al cual es sensible el ojo humano (Tomasini & Moelle, 2010).

1.1.1 Colorantes azoicos

Aproximadamente 1000 diferentes colorantes y pigmentos son utilizados industrialmente y cerca de 0.7 millones de toneladas son producidas anualmente, de las cuales un 70% corresponde a colorantes tipo azo (Ramesh, 2012). Estas sustancias son muy persistentes en industria textil principalmente porque son muy solubles en agua y por la resistencia a la degradación, la cual está determinada por la complejidad en la estructura del mismo cromóforo que está representado por $-N=N-$.

Los colorantes son compuestos aromáticos que absorben energía electromagnética en el rango visible (350-700 nm). Presentan en su estructura grupos cromóforos, que se caracterizan por un sistema de electrones deslocalizados, con dobles enlaces conjugados y auxocromos, cuyos grupos funcionales se caracterizan por la capacidad de donar electrones. Los grupos cromóforos más comunes son: azo ($-N=N-$), carbonilo ($-C=O$), nitro ($-NO_2$), y quinona ($O=C-C=O$). Los auxocromos más importantes son los grupos amino ($-NH_2$), carboxilo ($-COOH$), sulfonato ($-SO_3H$), e hidroxilo ($-OH$) (van der Zee, 2002).

El grupo funcional monoazo, diazo y triazo cada uno de ellos existe con diferentes propiedades. Así encontramos los colorantes azo: ácidos, básicos, reactivos, directos, dispersos y pigmentos, siendo los colorantes monoazo dispersos los que mayor consumo tienen debido a que se usan para teñir fibras e hilos de poliéster, acetato, nylon y acrílico. Los colorantes pueden clasificarse con base en el color, la estructura química, y el método para la aplicación del color.

Los colorantes se catalogan en 15 clases distintas: ácidos, reactivos, complejos metálicos, directos, básicos, mordientes, dispersos, solventes, fluorescentes, sulfurados, aniónicos, a la tina, pigmentos, entre otros (Tomasini & Moelle, 2010).

Los colorantes azo son muy reactivos y forman enlace covalente con grupos hidroxilo, aminas o sulfanatos en las fibras. Estos colorantes no pueden ser degradados eficientemente en sistemas biológicos aerobios convencionales. Lo anterior, es debido a que existen múltiples grupos funcionales altamente oxidados en su estructura, que compiten con el oxígeno por los electrones disponibles en los biorreactores aerobios. Sin embargo, bajo condiciones anaerobias, estos compuestos pueden ser reducidos a aminas aromáticas, las cuales no son biodegradadas normalmente en reactores anaerobios, pero sí en sistemas aerobios.

1.2 Impacto ambiental

Las aguas residuales que se producen en la industria textil se caracterizan por una variabilidad de caudal, composición, carga contaminante y color. Este último está asociado a presencia de compuestos tóxicos o polímeros de alto peso molecular, provocando reducción de la transparencia y disminución del oxígeno disuelto, lo que dificulta la función fotosintética de las plantas. Los compuestos químicos xenobióticos, es decir colorantes sintetizados, poseen una complejidad estructural y no son degradados en plantas de tratamiento aeróbico convencional (Garzón , 2017)

Se estima que en la industria textil del 10 al 20 % de los colorantes que se usan se vierten en las aguas de desecho durante el proceso de teñido. Más de la mitad de los colorantes contienen enlaces azoicos, este acoplamiento químico en combinación con los grandes grupos aromáticos, proporciona el color a la molécula. Los enlaces azoicos se pueden romper bajo condiciones reductoras para formar aminas, se ha demostrado que algunas de estas aminas aromáticas son cancerígenas y 22 de ellas están recogidas en la Directiva 2002/61/CE de la Unión Europea (IPPC, 2014), además de ser agentes oxidantes resistentes a la luz, no se descomponen en sistemas de tratamiento con lodos activados en los procesos anaerobios convencionales, y estos además son persistentes a la degradación, una vez descargados al medio ambiente (López Díaz, 2009). Los colorantes han sido relacionados con la dermatitis por contacto (Orvos, 2010). Se sabe que el problema se produce con colorantes dispersos, ácidos y reactivos. Está especialmente asociada a los colorantes dispersos, ya que éstos no se

adhieren químicamente a las fibras por lo que hay mayor probabilidad de que entren en contacto directo con la piel.

En la actualidad existe un mercado interés para desarrollar procesos para la biodegradación completa de efluentes textiles contaminadas por colorantes azo, debido a que algunos productos de la reducción anaerobia son considerados potencialmente carcinogénicos o mutagénicos para los humanos y tóxicos para los organismos acuáticos.

1.3 Tratamiento de aguas residuales de origen textil

Los colorantes son sustancias muy persistentes en las aguas residuales, presentando un problema muy grave de contaminación, por no disminuir aun después de un tratamiento convencional y su uso es muy variado y depende del proceso de teñido o estampado, en general, son difíciles de degradar; los del tipo azo por consecuencia presentan esta dificultad y para su remoción en los efluentes de agua se han planteado diversas técnicas las cuales abarcan desde tratamientos fisicoquímicos y biológicos (Miranda, 2012).

Es importante tratar el agua residual desde el momento que se origina, de lo contrario se puede permitir que se combinen con otras, (ya sea dentro de un mismo proceso u otra fuente de agua residual) y esto causará que su tratamiento se complique significativamente.

1.3.1 Tratamientos fisicoquímicos.

Los procesos fisicoquímicos comúnmente empleados a nivel industrial en el tratamiento de efluentes de la industria textil son la coagulación y precipitación, ósmosis inversa y ultrafiltración, así como el tratamiento por electrólisis, tratamiento con ozono, tratamiento por adsorción y tratamiento con cloro (Miranda, 2012). Su uso está restringido por su elevado costo, el empleo de materiales de importación o el impacto que generan al ambiente.

1.3.2 Tratamientos biológicos.

Debido a las desventajas que presentan los tratamientos fisicoquímicos, se ha generado un gran interés por otros procesos y condiciones de operación por

medio de los cuales es posible la remoción de los colorantes azo, por medio de métodos biológicos, bajo diferentes condiciones de oxígeno.

Los colorantes azoicos normalmente son resistentes a la biodegradación, debido a sus complejas estructuras; bacterias y hongos degradadores han sido probados en un intento de identificar una solución para la decoloración de los colorantes azoicos que puedan llevarse a cabo dentro de un período de tiempo de minutos a horas. La degradación de colorantes azoicos, por las bacterias se obtiene las enzimas bacterianas azoreductasa, seguida por la degradación anaeróbica principalmente generando aminas aromáticas. Esta secuencia es la reducción anaeróbica, que es un proceso lento se ha acelerado mediante el uso de catalizadores tales como quinonas. La adición de quinonas inmovilizada de hasta 8 veces la tasa de decoloración.

Otro enfoque biológico que se está observando sobre una base a gran escala es el uso de enzimas de hongos de pudrición blanca, las enzimas extracelulares de estos hongos, son capaces de degradar varios tintes. Con este proceso la decoloración se produce por degradación aeróbica.

1.3.3 Biodegradación

Es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (su capacidad de biodegradación) para limpiar terrenos o aguas contaminadas (Golob & Ojstrsek, 2005). También se puede definir como un grupo de tratamientos contra la contaminación de un medio, que aplica sistemas biológicos para catalizar la destrucción o transformación de compuestos químicos en otros menos tóxicos. Estos microorganismos utilizan su potencial enzimático para mineralizar los compuestos contaminantes o degradarlos hasta productos intermedios, en un ambiente aerobio o anaerobio. Existen factores limitantes como son: nutrientes esenciales (nitrógeno y/o fósforo), aceptores adecuados de electrones, condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial redox, humedad), inexistencias de poblaciones microbianas con potencial enzimático.

Esta biodegradación puede ser tanto de compuesto naturales como compuestos sintéticos. Puede darse de diversas formas y también por diferentes organismos. En el siguiente esquema se simplificar lo antes explicado.

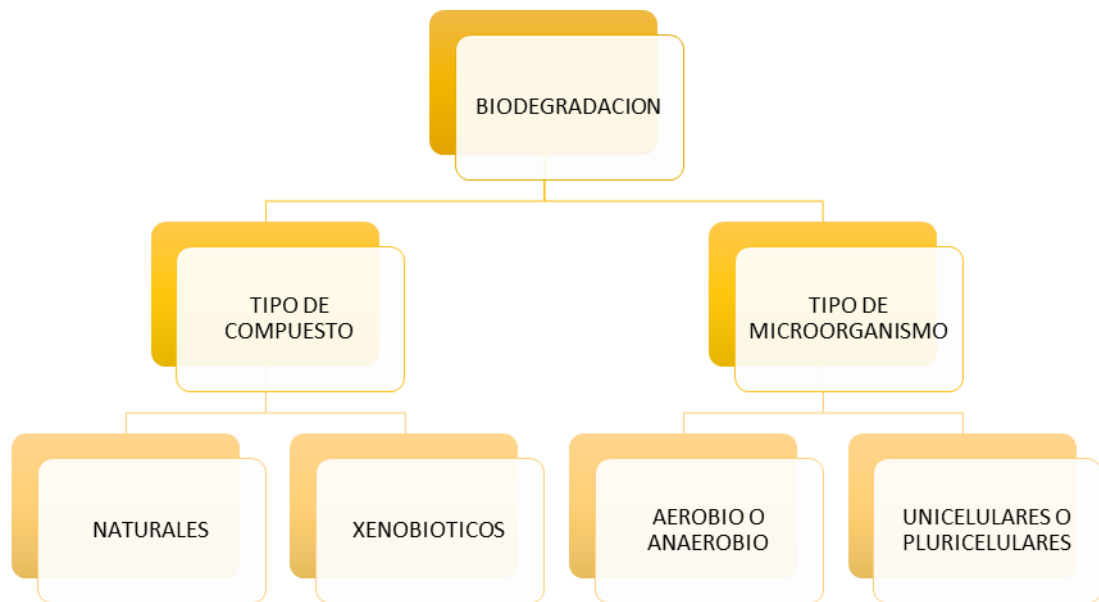


Figura 1. Esquema que representa los tipos de compuestos capaces de ser degradados, así como los microorganismos involucrados.

Dependiendo del compuesto será el tipo de organismo capaz de degradarlo o biotransformarlo, así como los productos de la degradación.

Es de vital importancia la biodegradación de compuestos xenobióticos pues estos se producen en grandes cantidades debidos a las actividades humanas.

1.3.4 Degradación de xenobióticos.

La degradación de los compuestos xenobios por organismos vivos principalmente, las plantas, hongos y bacterias están basados en una serie de rutas óxidativas, reductivas o hidrolíticas que modifican químicamente el compuesto, y con ello afectando alguna propiedad de interés, principalmente toxicidad.

Dado que la mayoría de los compuestos xenobióticos son aromáticos o provienen de ellos, estructuras similares se han identificado en la naturaleza, por ejemplo, el caso de la lignina que cuenta con múltiples grupos aromáticos, este compuesto natural es degradado en la naturaleza principalmente por hongos que la emplean como fuente en su alimentación. Es por esta razón que se ha considerado que los hongos podrían biotransformar compuestos aromáticos que son altamente resistentes y presentan una problemática ambiental.

1.3.5 Aplicación de hongos de la pudrición blanca (pb) en xenobióticos.

Se conoce del poder que cuentan los hongos para biotransformar compuestos naturales, además existe una variedad amplia variedad de ellos; la degradación de compuestos xenobióticos por hongos generalmente se sostiene que dicha

actividad se basa en su capacidad para metabolizar sustratos vegetales. Esto se aplica principalmente a los basidiomicetos, agentes causantes de la pudrición blanca, que son los más eficientes degradadores de lignina.

Los hongos responsables de la pudrición blanca podrían ser de especial interés para la remediación de la contaminación originada por los compuesto xenobióticos, debido a su gran capacidad de degradar la compleja molécula de la lignina y por la afinidad de las estructuras químicas de los contaminantes aromáticos.

La degradación de compuesto lignocelulósicos por hongos se puede atribuir a la generación de enzima extracelulares, algunas de estas enzimas son:

Peroxidasas: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, y peroxidadas con un amplio espectro acción. Adicional a las enzimas de degradación de lignina, estos hongos cuentan con hidrolasas que rompen la pectina, hemicelulosa y celulosa.

1.4 Enzimas

Las enzimas son conocidas como catalizadores biológicos ya que aceleren la velocidad de las reacciones en forma específica sin presentar en su molécula cambios significativos.

En general las enzimas poseen algunas ventajas sobre los catalizadores químicos convencionales, como son: su alta especificidad que elimina casi totalmente la presencia de productos no deseables (son selectivas para un solo tipo de reacción) que aumenta en consecuencia la eficiencia de cualquier transformación en que son utilizadas.

Son catalizadores más eficaces conocidos, ya que pueden acelerar una reacción a una velocidad extremadamente rápida con cantidades muy pequeñas, también son capaces de cambiar de un estado de baja actividad a uno de alta actividad (micro-morales) (Gutiérrez Salinas & Hernández Rodríguez, 2011).

1.4.1 Enzimas lacasas

Cuando los hongos ligninolíticos son cultivados en condiciones apropiadas, secretan una oxidasa extracelular denominada lacasa (Mora & Martinez, 2007).

El centro activo de la lacasa está formado por 4 átomos de cobre, también es una glicoproteína extracelular que presenta una masa molecular de entre 60 y 80 kiloDalton (kDa). Contiene 4 iones de cobre por molécula, conserva su actividad

en un intervalo de pH de 3 a 10 y de temperatura de 5 a 55°C, esta se puede inactivar por la pérdida de átomos de cobre o por condiciones de proteólisis o desnaturalización, entre otras (Desai & Nityanad, 2011). Tienen la capacidad de reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de agua simultáneamente y además cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos (Madhavia & Lele, 2009). Las lacasas oxidan estos sustratos naturales e industriales mediante la reducción de los átomos de cobre de su sitio activo y la transferencia de electrones de conversiones del O₂ a H₂O.

Se ha demostrado que la lacasa puede oxidar compuestos modelo de la lignina, produciendo reordenamientos en su estructura al provocar rupturas en los enlaces alquil-aril, también logra oxidar alcoholes bencílicos y romper anillos aromáticos generados una gran variedad de compuestos fenólicos oxidados (Bourbannais & Paice, 2016).

Dentro de los factores que influyen en la producción de esta enzima se encuentran a la temperatura, el pH, la agitación, cantidad de inóculo, concentración de sales minerales, composición del medio de cultivo.

1.4.2 Purificación de enzimas

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento. En una serie de etapas independientes, se aprovechan las diversas propiedades fisicoquímicas de las proteínas que interesan para separarlas progresivamente de otras proteínas y/o de las demás sustancias. Las características de las proteínas que se emplean en los diversos procedimientos de separación son: solubilidad, carga iónica, tamaño molecular, propiedades de absorción y capacidad de unión a otras moléculas.

1.4.2.1 Separaciones cromatográficas

La fase móvil de una cromatografía consiste en una mezcla de sustancias que se van a fraccionar disueltas en un líquido, que se hace fluir a través de una columna de una matriz porosa, que constituye la fase estacionaria. Las interacciones de los solutos individuales con la fase estacionaria determinan que cada componente migre con velocidades diferentes y que la mezcla se separe en bandas de sustancias puras. Los diversos métodos cromatográficos surgen de la interacción

dominante entre la fase estacionaria y las sustancias que están siendo separadas son: cromatografía de intercambio iónico, de adsorción, de exclusión molecular, de interacción hidrofóbica o de afinidad (Llorente, 2010).

1.4.2.2 Separaciones electroforéticas.

La electroforesis es un método analítico de alto poder resolutivo que permite la separación de moléculas biológicas cargadas por la combinación de su migración en un campo eléctrico y el efecto de tamizado molecular a través de un gel de corrida. Las proteínas, al ser moléculas anfotéricas polivalentes, migran en un campo eléctrico de acuerdo con su carga neta, que a su vez depende de la carga macromolecular, del tamaño y de la forma, como así también de las propiedades fisicoquímicas del medio electroforético.

En este proceso la incorporación del detergente SDS a la solución proteica permite separar todos los tipos de proteínas, incluyendo las insolubles en agua. El SDS se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas haciendo que se desplieguen las cadenas polipeptídicas, liberándolas de sus asociaciones con otras moléculas proteicas o lipídicas. En estas condiciones la electroforesis separa los polipéptidos en función de su tamaño, lo que proporciona información sobre su peso molecular. Además, el agregado de un agente reductor como el β -mercaptoetanol reduce los enlaces disulfuro que pudieran existir en las proteínas, de modo que se pueden visualizar todos los polipéptidos constitutivos de las moléculas poliméricas (Llorente, 2010).

1.5 Los hongos

El reino de los hongos está conformado por organismos eucariotas, heterótrofos que poseen diversidad de estructuras, funciones, formas de crecimiento y estilos de vida; sus más de 1.5 millones de miembros impactan de forma positiva o negativa a todas las formas de vida existentes y, por lo tanto, a todos los ecosistemas (Cuevas Moreno, 2016)

Son organismos que carecen de cloroplastos y estructuras vasculares, no realiza fotosíntesis, su unidad funcional y estructural es la hifa que conforma la masa micelar, la cual puede derivar en una estructura macroscópica conformada

por un talo o estípite y un sombrero o píleo. Su pared celular está constituida por quitina y microfibras de celulosa.

La lignina (figura 2) es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono, en el caso de la composición de la madera la lignina es de 15-25% (Chávez Sifontes & Domine, 2013).

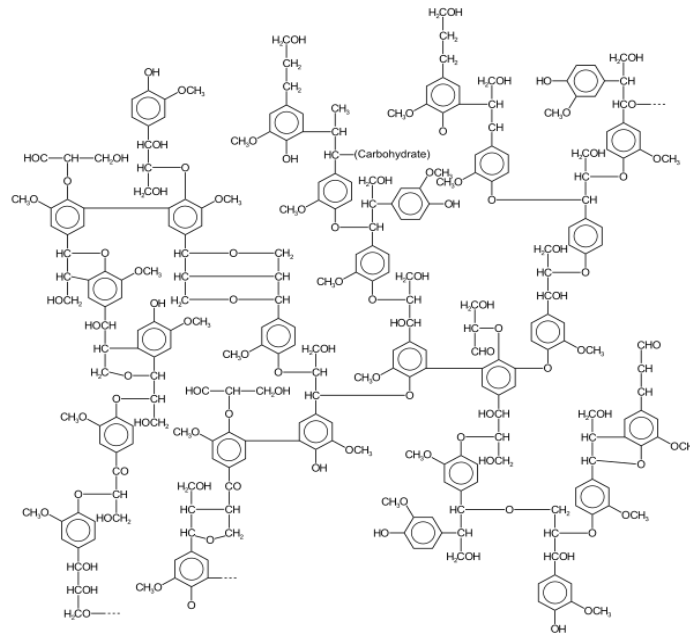


Figura 2. Estructura química representativa de la lignina

Existen diversos organismos que tiene la capacidad de degradar parcialmente la lignina. Sin embargo, los únicos organismos capaces de degradar hasta su mineralización completa y producción de dióxido de carbono y agua, son los hongos basidiomicetos.

Normalmente los hongos ligninolíticos atacan simultáneamente celulosa y lignina, convirtiendo esta última hasta un 70% en CO₂ y H₂O. Tras la degradación de la lignina, se acumulan celulosa que son las responsables del color blanquecino característicos que aparece durante la degradación de la madera por estos hongos (Murrieta Hernández , 2016).

De todos los hongos basidiomicetos, solo un grupo reducido ha sido estudiado para la producción de lacasa como:

Agaricus sp, *Antrodia sp*, *Curvularia sp*, *Penicillium sp*, *Pleurotus sp*, *Podosporas sp*, *Thermoascus sp*, *Trametes sp*, etc.

1.5.1 *Ganoderma lucidum*

Este hongo también conocido como Reishi, pertenece al género *Ganoderma* caracterizado por tener un sistema hifal dimítico lo que le confiere dureza estructural, unas inusuales esporas de color café con una doble pared y causa putrefacción blanca en la madera (degradan la lignina).

Crece libremente en bosques de casi todas las latitudes cálidas del planeta, tanto asiáticas como americanas y amazónicas, más en los climas subtropicales que en los templados. Su crecimiento natural se desarrolla anualmente en el tronco de los árboles dañados o muertos, sobre todo roble, arce, olmo, sauce, magnolia, algarrobo y ciruelo (Niño Arias, 2010).

1.5.1.2 Morfología de *Ganoderma lucidum*



Figura 3. Cuerpo fructífero sin esporular de *Ganoderma lucidum*.

Carpóforo: 2-20 cm de largo; al principio irregularmente nudoso, pero a través de madurez más o menos adquiere una estructura definida (oreja ó riñón); con una superficie a menudo lisa a rugosa con una apariencia brillante barnizada, cuando madura presenta un color castaño rojizo con zonas amarillo brillante y blanco hacia el margen; algunas veces presenta tintes azulados. Alcanza hasta 5 cm de espesor al final de su crecimiento. Himenio: Tubos de 2 cm de profundidad, la superficie del poro es blanca, llegando a ser castaño oscuro a medida que envejece; de 4-7 poros por mm (diminutos a simple vista). Estípites: A veces ausente, pero comúnmente presente; 3-14 cm de longitud; a 3 cm espesor; del mismo color del carpóforo; por lo general crece en forma lateral. Rasgos

microscópicos: Esporas más o menos elípticas, a veces con un extremo truncado; a amplificaciones más grandes pueden parecer de forma áspera (Niño Arias, 2010).

1.5.1.3 Importancia de *Ganoderma*

Los hongos que pertenecen al género *Ganoderma* se encuentran en la cima de la medicina oriental desde hace muchos años, y es uno de los grupos más importantes de productos naturales en Asia y Norte América. *Ganoderma* es un basidiomycete polyporal, perteneciente a la familia Ganodermataceae, de características lignocelulolíticas, conocido como “Ling zhi” en China y “Reishi” en Japón. *Ganoderma* ha sido utilizado ancestralmente por las culturas orientales por sus bondades medicinales, en el tratamiento de migraña, hipertensión, artritis, bronquitis, asma, diabetes, hipercolesterolemia y problemas cardiovasculares. También se afirma que tiene propiedades anticancerígenas y antimicrobianas. Dentro de los metabolitos bioactivos se destacan polisacáridos y terpenoides especialmente triterpenos (Niño Arias, 2010).

1.5.2 *Psilocybe zapotecorum*

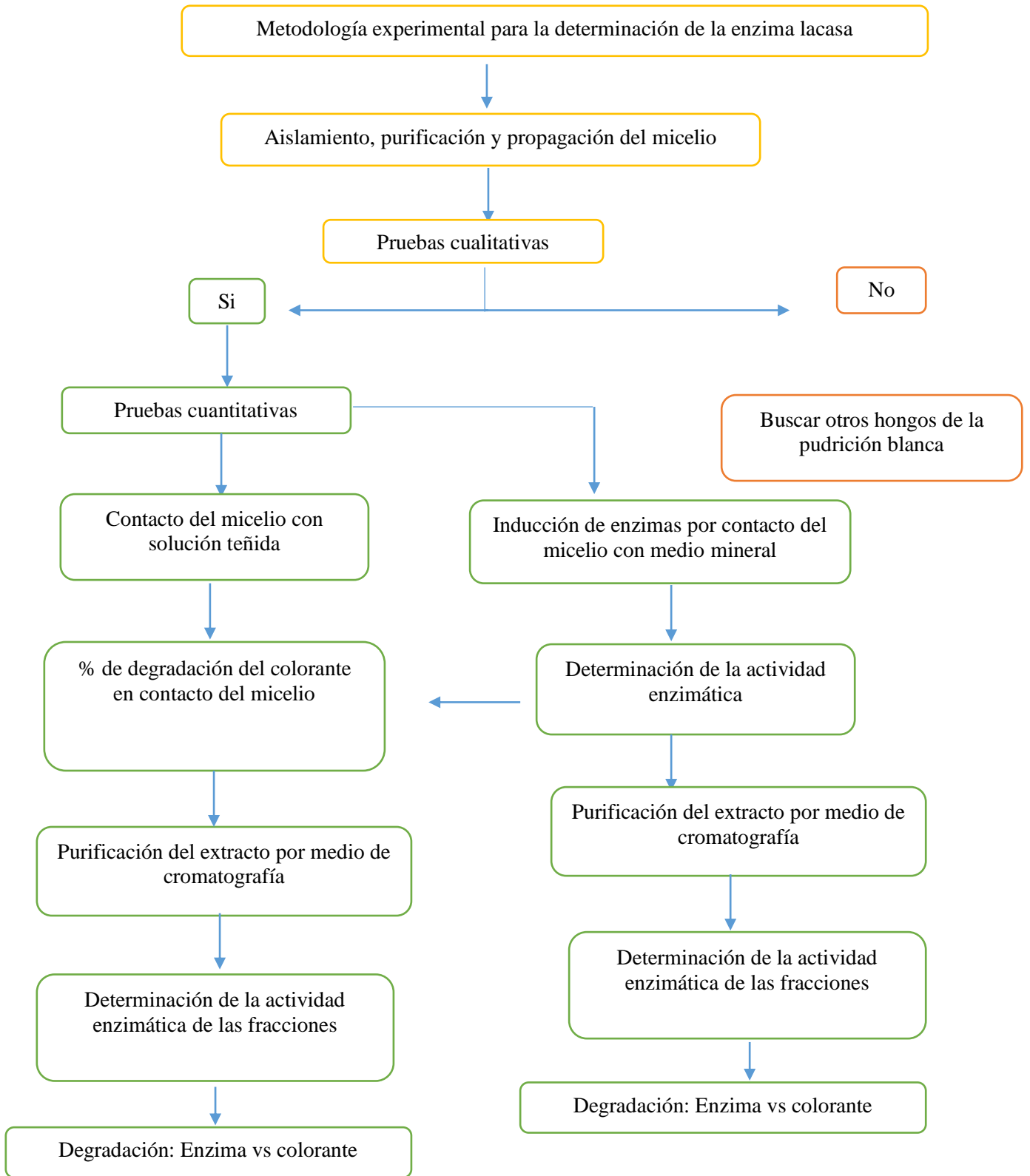
Es un hongo que crece en las sierras del estado de Oaxaca, Puebla, Veracruz, Morelos, Michoacán y Jalisco, no es tan común, sin embargo, es de los más utilizados en la región oaxaqueña por sus efectos psicoactivos, crece en zonas templadas de la sierra sobre la hojarasca, en los meses de agosto a octubre, es común encontrar brotes que incluyen hasta 20 fructificaciones, también es común encontrarlos sobre zonas de musgo y ramas podridas. Para su identificación es necesario verificar que el sombrero sea color amarillo muy claro y tenga forma acampanada o mamelonada con láminas de color negro, su pie es de color blanco, con algunas formaciones totalmente blancas sobre él (Gastón Guzmán, 2015).



Figura 4. El hongo *Psilocybe zapotecorum*, común en la región oaxaqueña, conocido como derrumbe o corona de cristo.

CAPITULO II: METODOLOGÍA

En este capítulo se describen el sistema experimental con el que se realizar el trabajo, que compense 6 etapas, así como su operación y la descripción del programa y técnicas que se emplearan del mismo.



2.1 Aislamiento y purificación del micelio en medio sólido.

Etapa I: Los hongos seleccionados para su estudio fueron *Ganoderma Lucidum* y *Psilocybe zapotecorum*, obtenidos por el Departamento de Investigación en Ciencias Agrícolas (ICUAP).

Para su aislamiento en medio sólido se pesaron 39 g/l de medio de cultivo PDA marca MCD-LAB^R, fueron transvasados a un matraz Erlenmeyer de 500 ml de capacidad, con 1000 ml de agua destilada el cual se esterilizó de presión por 15 minutos en el autoclave, posteriormente se colocaron alícuotas de 20 ml en cajas Petri de 15x 100 mm con tres divisiones, se sometieron a prueba de esterilidad por 48 horas y se procedió a inocular el medio de los hongos experimentales para su propagación, purificación, y desarrollo.

2.2 Pruebas cualitativas de la decoloración enzimática.

Para comprobar cualitativamente la generación de las enzimas lacasa por el micelio de los hongos seleccionados, se preparó medio de cultivo sólido PDA teñido con los colorantes textiles azul 81, violeta 51 y café 6

2.2.1 Preparación del medio PDA con los colorantes textiles

Preparación de los colorantes (Azul 86, violeta 51 y café 6) a 100 ppm mediante el siguiente cálculo, para obtener la concentración de 30 ppm que se utilizó para el experimento.

100 mg. —————> 0.100 gr. —————> 100 ppm —————> 1 litro.

Tabla 1. Concentración de los colorantes

Violeta 51	100 ppm	100 mg	0.100 gr
Azul 81	100 ppm	100 mg	0.100 gr
Café 6	100 ppm	100 mg	0.100 gr

Una vez que se calculó la concentración de los colorantes para preparar la solución madre de 100 ppm, se procedió a pesarlos en la balanza analítica, se vertieron en tres matraces donde se aforaron con 1000 ml de agua destilada. En

seguida se prepararon concentraciones o disoluciones de cada colorante a 30 ppm utilizando la fórmula: $C_1 V_1 = C_2 V_2$.

39 g/l de medio de cultivo PDA fueron colocados en dos matraces con los colorantes como diluyentes del medio, para esterilizarlos y verterlos posteriormente en cajas petri con tres divisiones de 100 x 15 cm en cada división se colocó un colorante, después de 48 horas se procedió a sembrar en cada caja 3 inóculos de micelio purificado, generado en el apartado 2.1.

2.2.2 Evaluación de degradación de los colorantes en medio sólido

Etapa II: Una vez que se observó crecimiento del micelio transcurridas 48 horas, se inició la evaluación cualitativa de decoloración en el medio sólido, la evaluación se realizó cualitativamente con signos positivos (+) o negativos (-) según fuera el caso el procedimiento se realizó durante 20 días y se llevó el registro en una bitácora.

2.3 Pruebas cuantitativas

Las pruebas cuantitativas se realizaron de la siguiente manera:

- Se cultivó la biomasa de los hongos experimentales en medio líquido para generar las enzimas lacasa y poder cuantificar su actividad enzimática.
- Se evaluó porcentaje de degradación del colorante en solución líquida.
- Se determinó la degradación de los colorantes con la enzima purificada.

2.3.1 Preparación del medio mineral líquido

Se preparó con la siguiente composición para 1000 ml de medio.

Tabla 2. Composición para el medio del cultivo líquido.

Reactivo	Cantidad
KHPO ₄	2.0139 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.49938 g
Tiamina hidroclicorada	0.001 g
CaCl ₂	0.0748 g

Glucosa	10 g
Tartrato de amonio	0.20412
Elementos Traza	10ml

* Ajustar el pH a 6.4

2.3.2 Generación de enzimas en medio líquido

2.3.2.1 Condiciones de crecimiento de los hongos en medio mineral

Etapa III: En diez matraces Erlenmeyer se agregaron 100 ml de medio mineral para generar 5 repeticiones para cada cultivo, se esterilizaron a 121°C/15 lb de presión por 15 minutos se dejaron reposar por 48 horas en la campana de flujo laminar, para prueba de esterilidad, posteriormente se adicionaron en cada uno 3 unidades de 1 cm² de micelio generado en el apartado 2.2.2 se incubaron a 24°C. El monitoreo de la actividad enzimática de lacasa se realizó al quinto día durante 20 días, tomando alícuotas de 1 ml del medio líquido de cada matraz.

2.3.3 Determinación de la actividad enzimática de enzima lacasa

En una celda de policarbonato de 1 ml de capacidad para espectrofotómetro, se agregaron 0.8 ml de extracto, 0.1 ml de ABTS y .01 ml de amortiguador de citratos 50 mM pH5.3, fue colocada en la cámara de un espectrofotómetro de absorción ultravioleta visible (UV-vis) marca Jenway 6320D a una longitud de onda (λ) de 420 nm, durante 3 minutos.

La actividad enzimática se expresó como unidades internacionales en función del volumen (U/L), utilizando un coeficiente de extinción (ϵ) para los productos de reacción del ABTS a 420nm de 36000 M⁻¹ cm⁻¹ (Revollo, Serna, & Hernández, 2012).

2.3.4 Purificación de la enzima lacasa por cultivo líquido.

Una vez transcurrido los 20 días de cultivo líquido el extracto generado en el apartado 2.3.2.1 se decantó de los matraces para su obtención y purificación de la enzima lacasa por medio de la columna de cromatografía el procedimiento que se utilizó se describe mediante el anexo "A".

2.3.5 Evaluación de la biodegradación de los colorantes en solución por medio de fotometría.

Para la evaluación de la biodegradación

- Se prepararon 16 matraces para cada hongo experimental y se dejó crecer el micelio en medio de cultivo líquido mineral hasta el día que tuvo mayor actividad enzimática,
- Posteriormente el micelio generado en cada matraz fue inoculado en matraces con los colorantes para determinar el porcentaje de biodegradación.

2.3.5.1 Preparación del agua artificialmente contaminada

Se preparó una solución de medio mineral coloreada con azul 86 en 9 matraces y violeta 51 en 9 matraces, dentro de estos 9 tendrán concentración de 100 ppm y 89 con 30 ppm.

Los matraces con las soluciones se esterilizaron en autoclave a 121°C/15 lb de presión por 15 minutos y se dejará reposar por 48 horas para comprobar que no exista contaminación.

Al agua teñida se le determinó el pH y absorbancia antes y después de la esterilización.

2.3.5.2 Cultivo en el agua artificialmente coloreada con los tintes textiles

Etapa IV: El micelio generado en el apartado en el apartado 2.3.5 se inoculo en los matraces coloreados, y cada 24 horas se tomó una alícuota de 1 ml y se midió su absorbancia en el equipo de espectrofotometría para poder saber su porcentaje de degradación enzimática durante 15 días de cultivo.

Para evaluar la decoloración de los procesos anteriores fue necesario construir una curva de calibración de cada colorante a concentraciones conocidas estas curvas se observan en el anexo "B"

2.3.5.3 Purificación de la enzima lacasa obtenida del residual de la degradación de los colorantes

Etapa V: Una vez transcurrido los 15 días el cultivo líquido teñido generado en el apartado 2.3.5.2 se decantó de los matraces para su obtención y purificación de la enzima lacasa por medio de la columna de cromatografía el procedimiento utilizado se describe en el anexo "A".

2.3.6 Comprobación en la degradación enzima purificada en los colorantes

Se propuso a averiguar si aún se encontraba activa la enzima lacasa en el medio líquido coloreado, para ello se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

- Medición de la actividad enzimática en las fracciones de la enzima lacasa, purificadas por cromatografía en la sección 2.3.5.3 y 2.3.4.
- Comprobación de la reacción enzima-colorante en soluciones con concentraciones de 1 y 2 ppm de los tintes experimentales.

2.3.6.1 Actividad enzimática en las fracciones obtenidas en la cromatografía

Se determinó la actividad lacasa de cada proceso de purificación en las etapas III y V utilizando ABTS. El procedimiento que se ocupó para determinar la actividad se explica en el punto 2.3.3.

También se determinó el pH de la enzima purificada

2.3.6.2 Preparación de los colorantes textiles a 1ppm y 2ppm

Se preparó una solución madre de 10 ppm y se procedió a diluir hasta 1 ppm en un matraz de aforación.

Tabla 3. Diluciones para preparar de 10 a 1 ppm

Colorante	Agua destila	ppm
1 ml	9 ml	1ppm
2 ml	8 ml	2 ppm
3 ml	7 ml	3 ppm
4 ml	6 ml	4 ppm
5 ml	5 ml	5 ppm
6 ml	4 ml	6 ppm
7 ml	3 ml	7 ppm
8 ml	2 ml	8 ppm

9 ml	1 ml	9 ppm
------	------	-------

2.3.6.3 Reacción de la enzima lacasa purificada sobre los colorantes experimentales

Etapa VI: Se evaluó la degradación de las enzimas purificadas de las etapas III y IV en los colorantes experimentales a 1ppm y 2 ppm.

En una celda de policarbonato de 1 ml de capacidad para espectrofotómetro, se agregaron 0.8 ml del colorante azul 86 a 1 ppm, 0.2 ml de la enzima purifica, fue colocada en la cámara de un espectrofotómetro de absorción ultravioleta visible (UV-vis) marca Jenway 6320D a una longitud de onda (λ) de 420 nm, durante 3 minutos registrando la decoloración observada.

Se repitió el procedimiento para el colorante azul 86 a 2 ppm y violeta 51 a 1ppm y 2 ppm de acuerdo a la longitud de onda de cada colorante.

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento y purificación del micelio en medio sólido.

Etapa I: Para su aislamiento y purificación se realizaron resiembras en el medio de cultivo y al doceavo día se presentó el crecimiento necesario para ser utilizado en el experimento, como se observa en la figura 5.

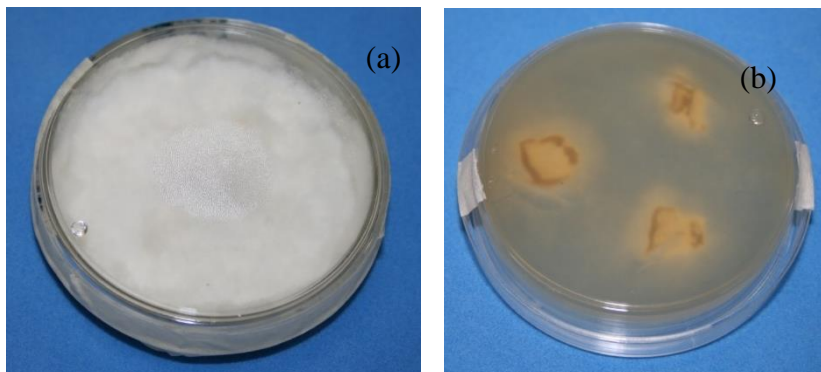


Figura 5. (a) Crecimiento del hongo *Ganoderma lucidum*. (b) Crecimiento de *Psilocybe zapotecorum*

3.2 Pruebas cualitativas de la decoloración enzimática

3.2.1 Evaluación de degradación de los colorantes en medio sólido



Figura 6. Cajas Petri con medio coloreado

Etapa II: Durante los primeros 7 días se observó un crecimiento muy lento y una degradación poco favorable de los colorantes como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4 Incubación del micelio experimental en el medio con colorante

CEPA	TIEMPO DE INCUBACIÓN	DEGRADACIÓN DE COLORANTE		
		VIOLETA 51	CAFÉ 6	AZUL 86
Gl	5 días/120 hrs	+	-	-
Pz	5 días/120 hrs	+	-	+
Gl	10 días/ 240 hrs	+	+	+
Pz	10 días/ 240 hrs	++	+	++
Gl	15 días/360 hrs	++	+	++
Pz	15 días/360 hrs	+++	+	+++
Gl	20 días/480 hrs	+++	+	++
Pz	20 días/480 hrs	+++	+	+++

* - = No hay cambios, + = Cambio mínimo, ++= Cambio medio, +++=Cambio máximo

En la segunda semana las cepas aumentaron su crecimiento y los cambios efectuados fueron bastante favorables en ambos hongos, para los colores violeta 51, azul 86 y para el color café 6 fueron mínimos.

3.3 Pruebas cuantitativas

3.3.1 Condiciones de crecimiento de los hongos en medio mineral

Etapa III: El crecimiento óptimo en los matraces para *P. zapotecorum* se registró al día 7 y para *G. lucidum* al día 12, las condiciones para el crecimiento se mantuvieron constantes hasta el día 20.

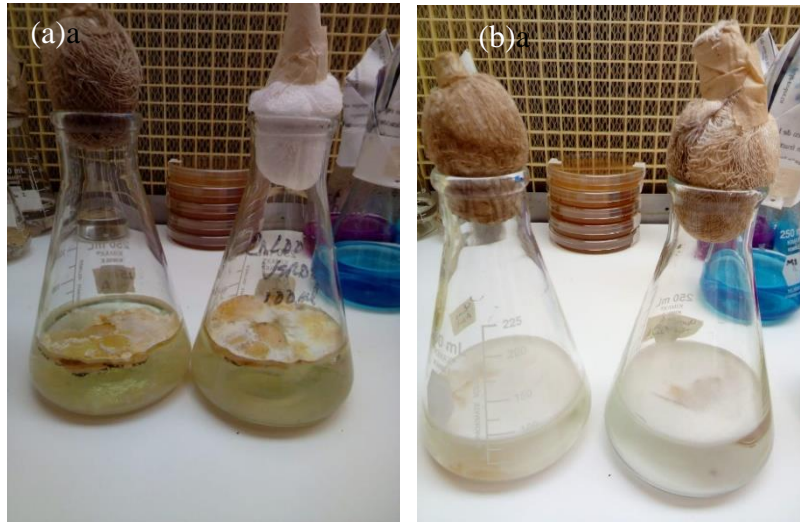


Figura 7. Crecimiento óptimo de las cepas en medio mineral (a) *Ganoderma lucidum*. (b) *Psilocybe zapotecorum*

3.3.2 Determinación de la actividad enzimática de la enzima lacasa

Se tomó una alícuota de cada matraz y se realizó el ensayo de actividad enzimática. La oxidación del ABTS es debido a la acción de las enzimas lacasa provocando un cambio de color durante la reacción, presentando diferentes tonalidades de azul.



Figura 8. Oxidación del ABTS por la acción de la enzima.

Para el cálculo de la actividad lacasa se utilizó la ecuación:

$$A = \frac{(V)(A_2 - A_1)}{(\epsilon)(d)(v)(t_2 - t_1)}$$

V= Volumen total del ensayo (cm³)

$A_2 - A_1 =$ Diferencia de absorbancia con respecto al tiempo $t_2 - t_1$, el tiempo en minutos

$\epsilon =$ Coeficiente de extinción molar para los productos de oxidación del ABTS a 420 nm ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

$d =$ paso de la luz = 1 cm

$v =$ volumen de la muestra (cm^3)

En el anexo "C" se desarrolla el procedimiento para el cálculo de la R1 de la muestra *P. zapotecorum*.

En el tiempo de incubación para la generación de extracto enzimático se obtuvieron valores diferentes de actividad enzimática en los hongos experimentales como se observan en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Valores de Actividad enzimática de *P. zapotecorum* ($\frac{\mu\text{mol}}{L \cdot \text{min}}$)

<i>Psilocybe zapotecorum</i>						
Días	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
5	1.2847	0.6944	0.243	0.3125	0.1736	0.54164
10	0.9027	0.4513	2.1527	3.755	1.597	1.77174
15	5.0694	0.8333	13.2291	9.4791	0.9375	5.90968
20	0.395	0.381	0.573	0.486	0.06	0.379

Tabla 6. Valores de actividad enzimática de *G. lucidum* ($\frac{\mu\text{mol}}{L \cdot \text{min}}$)

<i>Ganoderma lucidum</i>						
Días	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
5	1.1111	0.0347	0.5555	3.3685	0.3819	1.09034
10	2.4305	1.4583	0.1041	3.9583	1.0069	1.79162
15	0.4166	2.2048	3.993	1.2847	6.0416	2.78814
20	0.3125	0.6076	1.5277	5.6597	1.8755	1.9966

En las tablas se observa que la mayor actividad enzimática se presentó a los 15 días en ambos hongos, como se describe en la figura 9.

La medición de esta actividad se mantuvo hasta los 20 días, en relación a reportes de otros hongos de la pudrición blanca de la madera como *Pleurotus ostreatus*.

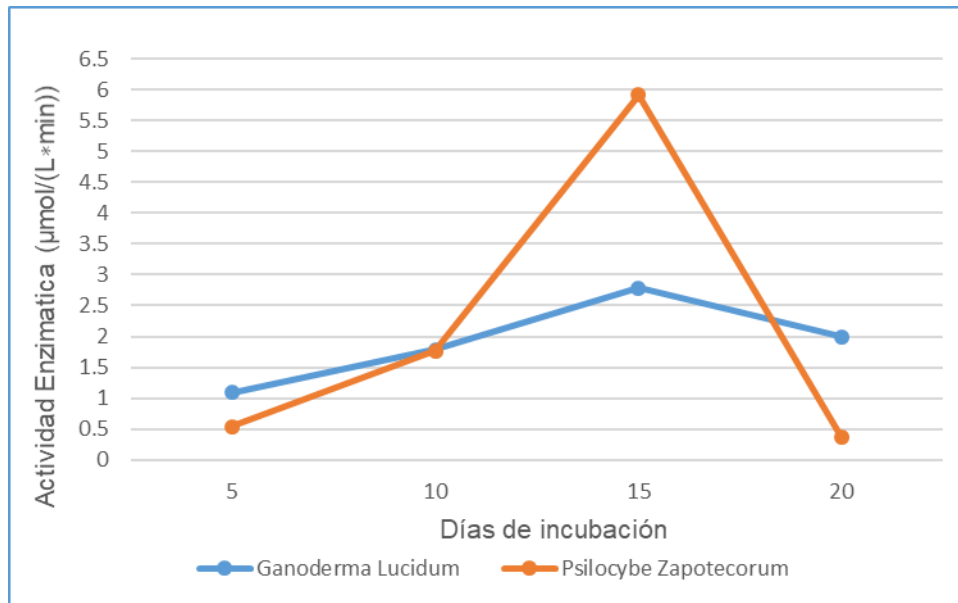


Figura 9. Comparación de la actividad enzimática de *Psilocybe zapotecorum* y *Ganoderma lucidum*.

3.3.3 Purificación del extracto enzimático por columna de cromatografía.

Al momento de agregar las muestras de proteínas en las columnas de cromatografía con el intercambiador “DEAC - Cellulose”, se observó la formación de fracciones en la parte superior de color café. Figura 10.

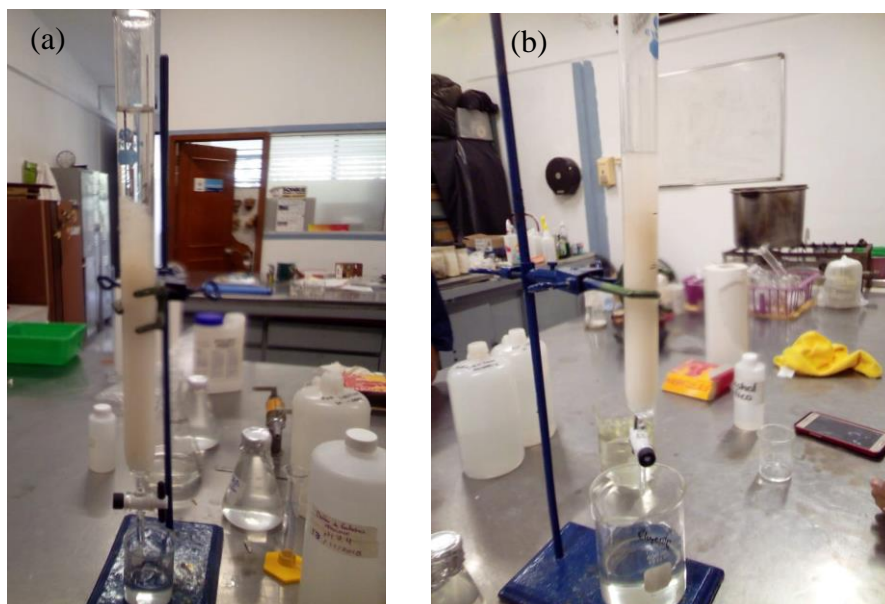


Figura 10. Columna de cromatografía con el intercambiador DEAC y extracto enzimático de (a) *G. lucidum*. (b) *P. zapotecorum*.

Una vez formadas las franjas y agregando el eluyente se obtuvieron 3 fracciones para *Psilocybe zapotecorum* y 5 de *Ganoderma lucidum*.

3.3.3.1 Actividad enzimática en las fracciones obtenidas en la cromatografía.

Se midió la actividad enzimática de cada fracción que se obtuvo de las purificaciones en la columna de cromatografía con la siguiente ecuación:

$$A = \frac{(V)(A_2 - A_1)}{(\epsilon)(d)(v)(t_2 - t_1)}$$

Se obtuvieron valores diferentes de actividad enzimática de cada fracción obtenida en el apartado 3.3.4 cómo se observan en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Actividad enzimática de *P. zapotecorum* ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}}$)

<i>Psilocybe zapotecorum</i>			
Número de fracciones	1°	2°	3°
Actividad enzimática	0.243	0.1736	0.3125

Tabla 8. Actividad enzimática de *G. lucidum* ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}}$)

<i>Ganoderma lucidum</i>					
Número de fracciones	1°	2°	3°	4°	5°
Actividad enzimática	2.2916	0.0694	0.048	0.5555	0.1041

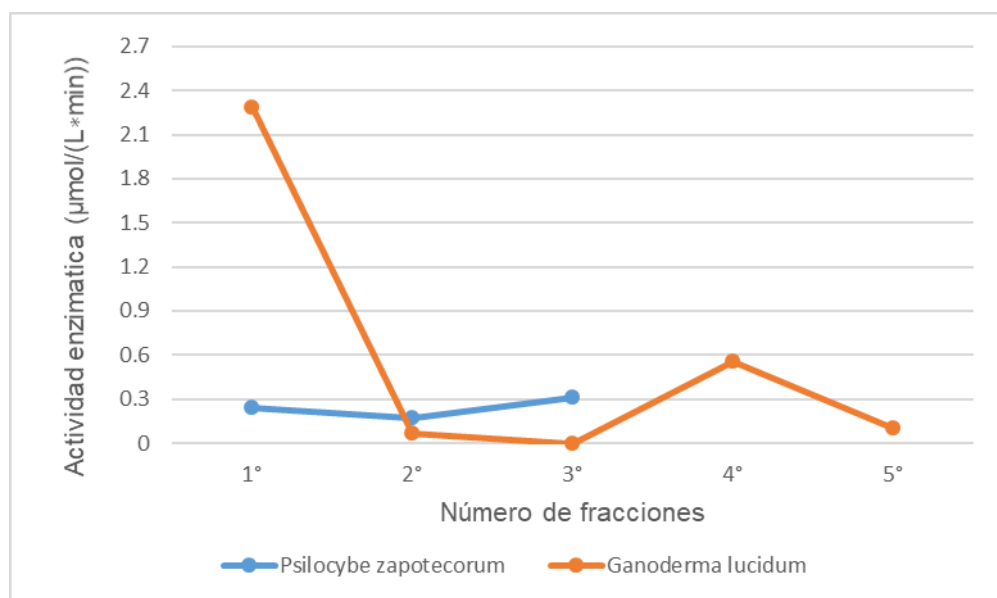


Figura 11. Comparación de la actividad enzimática de *Psilocybe zapotecorum* y *Ganoderma lucidum*.

De acuerdo a los datos de la figura 11 la fracción que tuvo mayor actividad enzimática fue la 1° con un valor de $2.2916 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}}\right)$, que corresponde a *Ganoderma lucidum* mientras que para *Psilocybe zapotecorum* fue 3° con $0.3125 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}}\right)$.

3.3.3.2 Comprobación de la degradación enzima purificada en los colorantes.

Se evaluó la degradación de las enzimas purificadas en los colorantes experimentales a 1pmm y 2 ppm solo se aplicó en aquellas que obtuvieron mayor actividad enzimática.

En la tabla 9, 10, 11 y 12 se observa la concentración de colorante en contacto con la enzima purificada *G. lucidum* y *P. zapotecoum*.

Tabla 9. Concentración y % de biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de *G. lucidum*.

<i>Ganoderma lucidum enzima de la fracción 1</i>					
Colorante	1 min	2 min	3 min	30 min	% de degradación
azul 86	ppm				
1ppm	0.980	0.784	0.686	0.588	40
2ppm	1.372	1.274	0.980	0.882	71.42

Tabla 10. Concentración y % de biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de *G. lucidum*.

<i>Ganoderma lucidum enzima de la fracción 1</i>					
Colorante	1 min	2 min	3 min	30 min	% de degradación
Violeta 51	ppm				
1ppm	0.937	0.833	0.833	0.625	44.29
2ppm	1.836	1.770	1.770	1.041	48.97

Tabla 11. Concentración y % de biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de *P. zapotecoum*.

<i>Psilocybe zapotecoum enzima de la fracción 3</i>					
Colorante	1 min	2 min	3 min	30 min	% de degradación
azul 86	ppm				
1ppm	0.980	0.784	0.686	0.686	30
2ppm	1.764	1.372	1.176	1.0784	47.61

Tabla 12. Concentración y % de biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de *P. zapotecoum*.

<i>Psilocybe zapotecoum</i> enzima de la fracción 3					
Colorante	1 min	2 min	3 min	30 min	
Violeta 51	ppm				% de degradación
1ppm	0.937	0.937	0.937	0.625	44.29
2ppm	1.938	1.875	1.875	1.770	13.23

Se puede apreciar que la enzima obtenida de *G. lucidum* tuvo un mayor efecto en biodegradar los colorantes azul y violeta.

3.3.5 Evaluación de la biodegradación de los colorantes en solución por medio de fotometría.

3.3.5.1 Preparación del agua artificialmente contaminada.

Con los colorantes utilizados en este trabajo se prepararon soluciones a diferentes concentraciones como se muestra en la figura 12, para valorar su % de biodegradación en aguas artificialmente contaminadas. Los colorantes fueron seleccionados de acuerdo a los resultados de las pruebas cualitativas y también debido a que estos son utilizados principalmente en la industria textil.

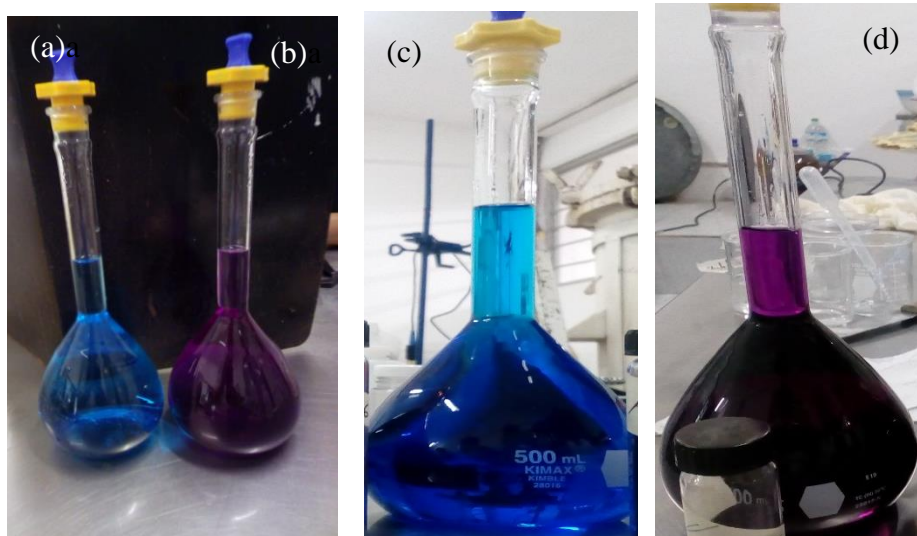


Figura 12. (a) colorante azul 86 a 30ppm. (b) colorante violeta 51 a 30ppm. (c) colorante azul 86 a 100ppm (d) colorante violeta 51 a 100ppm.

A las soluciones experimentales se les determinó el pH y su absorbancia, antes y después de esterilizarlos.

Tabla 13. Determinación de absorbancia y pH de las aguas artificialmente contaminadas.

Colorante	Inicial			Final		
	ABS		pH	ABS		pH
	100 ppm	30 ppm		100 ppm	30 ppm	
Azul 86	0.969	0.313	6.1	0.910	0.309	5.64
Violeta 51	1.007	0.306	6.3	0.990	0.306	4.9

3.3.5.2 Biodegradación de los tintes textiles en agua artificialmente coloreada

3.3.5.2.1 *Ganoderma lucidum*

Etapa IV: En la tabla 14 y 15 se observa la concentración de los colorantes a 100ppm durante el contacto con el micelio del hongo *G. lucidum*. En la figura 13 se representa la comparación de biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51.

Tabla 14. Concentración obtenida del colorante violeta 51 a 100 ppm de *G. lucidum*.

<i>Ganoderma lucidum</i>				
Tiempo	R1 (ppm)	R2 (ppm)	R3 (ppm)	Promedio (ppm)
0	100.7	100.7	100.7	100.7
1	85.6	81.2	83.6	83.466
2	55.2	72.4	69.5	65.7
3	47.1	54.7	52.9	51.566
4	45.7	31.8	30	35.833
5	36.3	30.3	33.6	33.4
6	29.5	25.6	20.5	25.2
7	29.2	21.5	21.6	24.1
8	28.5	20.5	18.69	22.563
9	20.6	23.6	18.69	20.963
10	20.5	15.6	17.9	18
11	20.4	19.1	18.6	19.366
12	20.5	12.3	15.9	16.233
13	20.5	12.3	15.6	16.133
14	20.5	12.1	14.9	15.833
15	20.5	10.2	15.4	15.366

Con los resultados se puede apreciar que la biodegradación del color violeta 51 alcanzo el 84.6 % al día 14 de contacto con el micelio.

Tabla 15. Concentración obtenida de colorante azul 86 a 100 ppm de *G. lucidum*.

<i>Ganoderma lucidum</i>				
Tiempo	R1 (ppm)	R2 (ppm)	R3 (ppm)	Promedio (ppm)
0	98.877	98.877	98.877	98.877
1	89.591	90	85.6	88.397
2	61.020	72.4	80.6	71.340

3	40.816	70.5	70.3	60.538
4	46.632	61.3	68.5	58.810
5	43.469	49.8	60.1	51.123
6	38.571	37.8	53	43.123
7	29.795	37.9	48.6	38.765
8	30.408	21.3	48.6	33.436
9	25.102	24.6	40.9	30.200
10	19.693	18.9	40.3	26.297
11	14.795	17.9	38.6	23.765
12	15.204	16.9	30.7	20.934
13	12.040	15.9	20.9	16.280
14	11.734	15.9	20.5	16.044
15	10.510	15.9	20.8	15.736

Se puede apreciar que la biodegradación del color azul 86 alcanzó el 84.2 % al día 15 de contacto con el micelio.

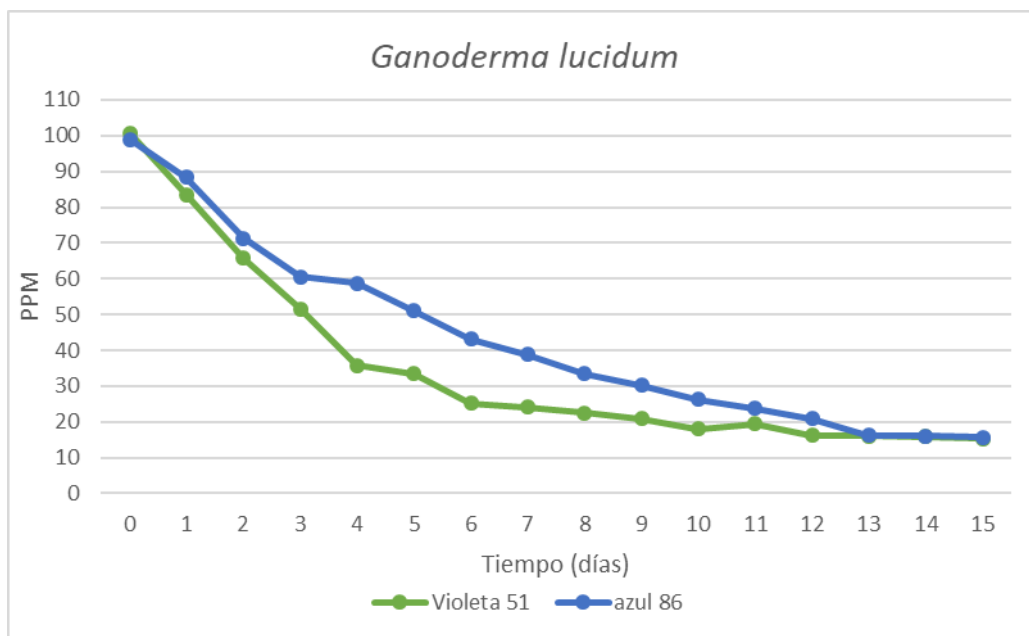


Figura 13. Biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51 a 100ppm.

En la tabla 16 y 17 se observa la concentración de los colorantes a 30 ppm. En la figura 14 se representa la comparación de su biodegradación

Tabla 16. Concentración obtenida de colorante violeta 51 a 30 ppm de *G. lucidum*.

<i>Ganoderma lucidum</i>				
Tiempo	R1 (ppm)	R2 (ppm)	R2 (ppm)	Promedio (ppm)
0	30.6	30.6	30.6	30.6
1	25.4	27.6	28.5	27.166
2	24.3	24.3	25.3	24.633
3	21.4	21.3	21.3	21.333
4	20	21.3	21	20.766
5	19.6	20.8	20.6	20.333
6	18.5	11.6	18.4	16.166
7	18	11.6	15.9	15.166
8	13.7	14.3	14	14
9	19.6	21.2	15.9	18.9
10	2.6	2.7	10.9	5.4
11	3.5	3.7	10.9	6.033
12	1.9	3	8.6	4.5
13	3.1	3.2	5.9	4.06666667
14	3.1	0.3	4.4	3.15
15	3.1	3.2	3.15	3.15

Se puede apreciar que la biodegradación del color violeta 51 alcanzo el 89.7 % al día 14 de contacto con el micelio.

Tabla 17. Concentración obtenida de colorante azul 86 a 30 ppm de *G. lucidum*.

<i>Ganoderma lucidum</i>				

Tiempo	R1 (ppm)	R2 (ppm)	R3 (ppm)	Promedio (ppm)
0	31.938	31.938	31.938	31.938
1	30.612	30.612	28.5	29.908
2	29.693	30.408	25.9	28.667
3	27.857	28.367	18.4	24.874
4	21.836	25	15.6	20.812
5	20.408	27.040	15.3	20.916
6	19.387	23.877	15.6	19.621
7	29.081	20.408	15.1	21.529
8	16.632	16.530	12.9	15.354
9	25.204	24.387	15.3	21.630
10	5.612	3.775	10.6	6.662
11	3.265	3.673	8.6	5.179
12	3.673	4.183	6.9	4.919
13	4.0816	4.795	5.4	4.759
14	4.387	4.081	4	4.156
15	4.387	4.081	4.6	4.356

Se puede apreciar que la biodegradación del color azul 86 alcanzo el 83.99 % al día 12 de contacto con el micelio.

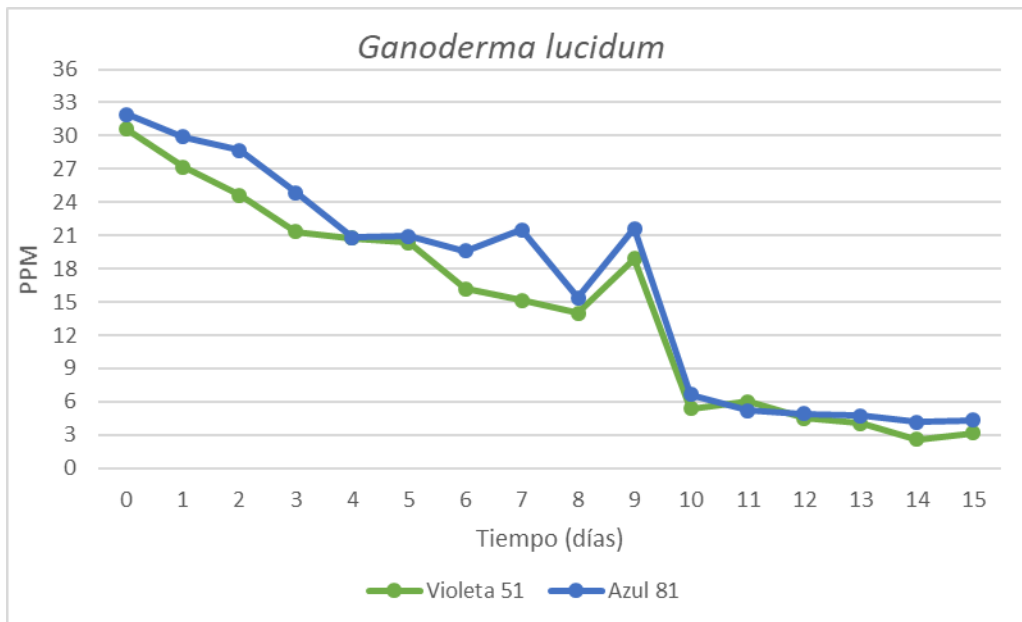


Figura 14. Biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51 a 30ppm.

3.3.5.2.2 *Psilocybe Zapotecorum*

En la tabla 18 y 19 se observa la concentración de los colorantes a 100ppm. En la figura 15 se representa la comparación de biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51.

Tabla 18. Concentración obtenida de colorante violeta a 100 ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe zapotecorum</i>				
Tiempo	R1 (ppm)	R2 (ppm)	R3 (ppm)	Promedio (ppm)
0	100.7	100.7	100.7	100.7
1	78	80.6	83.6	80.733
2	75.6	73	70.4	73
3	72	65.1	64	67.033
4	65.5	69.1	60.9	65.166
5	61	67.8	54.2	61
6	59	51.3	54.2	54.833
7	60	49.6	50.6	53.4

8	59	43.7	48.4	50.366
9	54.6	31.6	30.7	38.966
10	46.3	31.6	32.4	36.766
11	42	31.6	24.6	32.733
12	40.3	26.4	20.6	29.1
13	21.6	16	18.1	18.566
14	15	15	18.5	16.166
15	10	16	18.2	14.733

Se puede apreciar que la biodegradación del color violeta 51 alcanzo el 85.2 % al día 15 de contacto con el micelio.

Tabla 19. Concentración obtenida de colorante azul 86 a 100 ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe zapotecorum</i>				
Tiempo	R1 (ppm)	R2 (ppm)	R3 (ppm)	Promedio (ppm)
0	98.877551	98.877551	98.877551	98.877551
1	82.9591837	80.5102041	88.6	84.0231293
2	80.9183673	76.122449	80.6	79.2136054
3	76.3265306	71.8367347	76.9	75.0210884
4	75.8163265	68.6734694	71.5	71.9965986
5	74.2857143	65.5102041	60.975	66.9236395
6	71.4285714	62.244898	56.8	63.4911565
7	55.7142857	52.4489796	51.2	53.1210884
8	53.4693878	48.5714286	51.2	51.0802721
9	50.3061224	42.0408163	48.1	46.8156463
10	42.6530612	38.3673469	45.7	42.2401361
11	38.3673469	34.8979592	30.9	34.7217687
12	35.3061224	21.8367347	32.8	29.9809524
13	21.8367347	14.7959184	26.4	21.0108844
14	15.9183673	11.4285714	20	15.7823129
15	11.4285714	11.4285714	19.4	14.0857143

Se

puede apreciar que la biodegradación del color azul 86 alcanzo el 85.95 % al día 15 de contacto con el micelio.

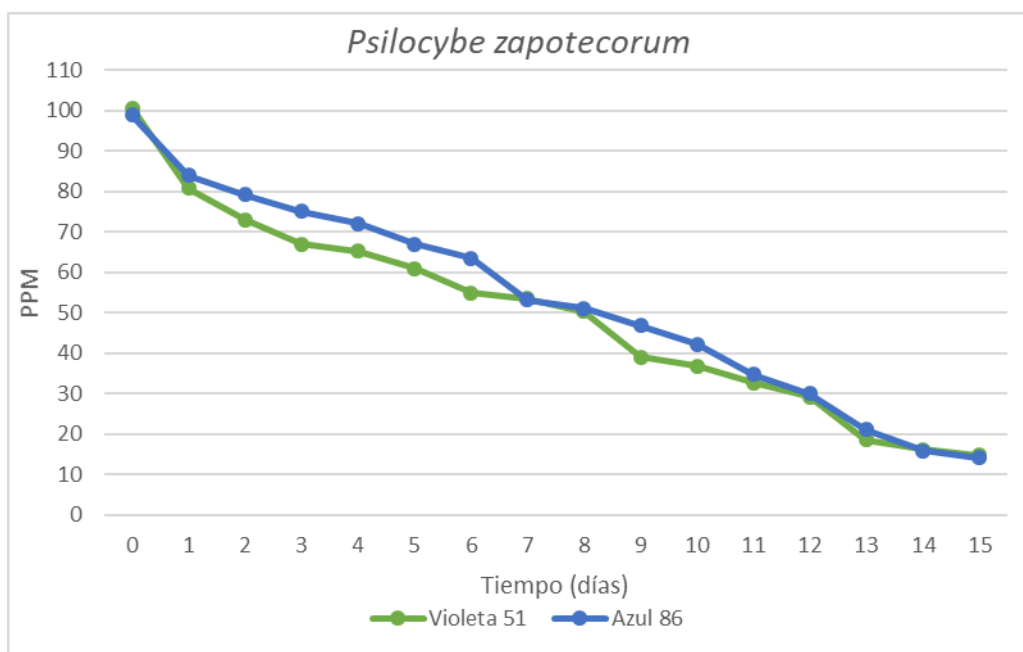


Figura 15. Biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51 a 100ppm

En la tabla 20 y 21 se observa la concentración de los colorantes a 30ppm durante el contacto con el micelio- En la figura 16 se representa la comparación de biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51.

Tabla 20. Concentración obtenida de colorante violeta 51 a 30 ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe zapotecorum</i>				
Tiempo	R1 (ppm)	R2 (ppm)	R3 (ppm)	Promedio (ppm)
0	30.6	30.6	30.6	30.6
1	28	20.9	27.6	25.5
2	15.5	19.1	20.7	18.433
3	16.6	16.9	18.6	17.366
4	14.7	14.3	16.4	15.133
5	13	13.6	15.9	14.166
6	8.6	10.7	16.7	12
7	8.4	10.4	10.7	9.833

8	7.3	9	7.2	7.833
9	6.7	8.3	7.2	7.4
10	6.3	7.7	7.2	7.066
11	3.5	7.7	5.6	5.6
12	2	7.3	3.4	4.233
13	1.6	3.5	3.6	2.9
14	1.6	3.4	3.2	2.733
15	1.6	3.4	3.3	2.766

Se puede apreciar que la biodegradación del color violeta 51 alcanzo el 91 % al día 13 de contacto con el micelio.

Tabla 21. Concentración obtenida de colorante azul 86 a 30 ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe zapotecorum</i>				
Tiempo %	R1 (ppm)	R2 (ppm)	R3 (ppm)	Promedio (ppm)
0	31.9387755	31.9387755	31.9387755	31.9387755
1	26.122449	28.3673469	24.6	26.3632653
2	22.4489796	20.4081633	20.7	21.1857143
3	18.9795918	17.0408163	18.34	18.1201361
4	15.3061224	14.7959184	15.2	15.1006803
5	14.4897959	11.7346939	12.7	12.9748299
6	14.0816327	10.2040816	10.7	11.6619048
7	9.89795918	8.57142857	4.5	7.65646259
8	6.63265306	6.12244898	6.7	6.48503401
9	4.59183673	14.3877551	5.7	8.22653061
10	7.95918367	3.67346939	4.785	5.47255102
11	4.59183673	5.91836735	3.456	4.65540136

12	7.34693878	5.51020408	4.786	5.88104762
13	7.34693878	5.20408163	3.24	5.26367347
14	4.3877551	5.10204082	3.56	4.34993197
15	2.75510204	2.24489796	3.78	2.92666667

Se puede apreciar que la biodegradación del color azul 86 alcanzó el 90 % al día 15 de contacto con el micelio.

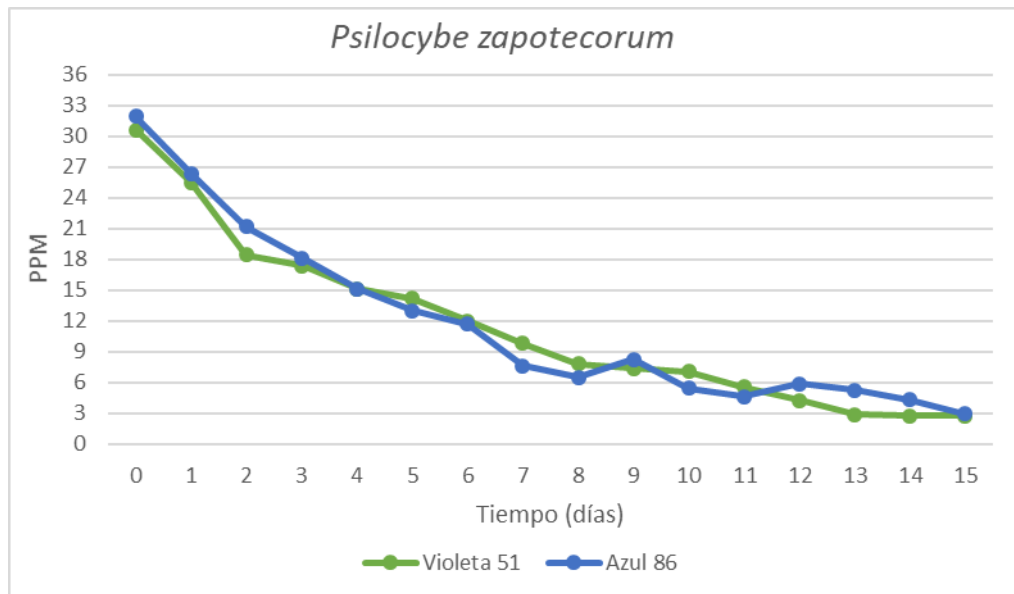


Figura 16. Biodegradación de los colorantes azul 86 y violeta 51 a 30ppm.

De acuerdo a los resultados anteriores el hongo que obtuvo la mayor biodegradación en ambos colorantes fue *Psilocybe zapotecorum*, también cabe mencionar que ambos hongos no degradaron completamente a los colorantes en las diferentes concentraciones.

Las imágenes de antes y después de la reacción enzimática se reportan en el anexo "D"

3.3.6 Purificación de la enzima lacasa obtenida del residual de la degradación de los colorantes.

De acuerdo a la propuesta en el apartado 2.3.6 se le hizo una purificación al contenido residual de los matraces con colorantes a 30 ppm inicial.

Etapa V: Al momento de la entrada de la muestra de proteínas con colorante a la columna de cromatografía se observó un teñido en la parte superior de la columna

de color azul o violeta dependiendo de la muestra, también se observó la formación de una fracción de color café con poca intensidad figura 17.

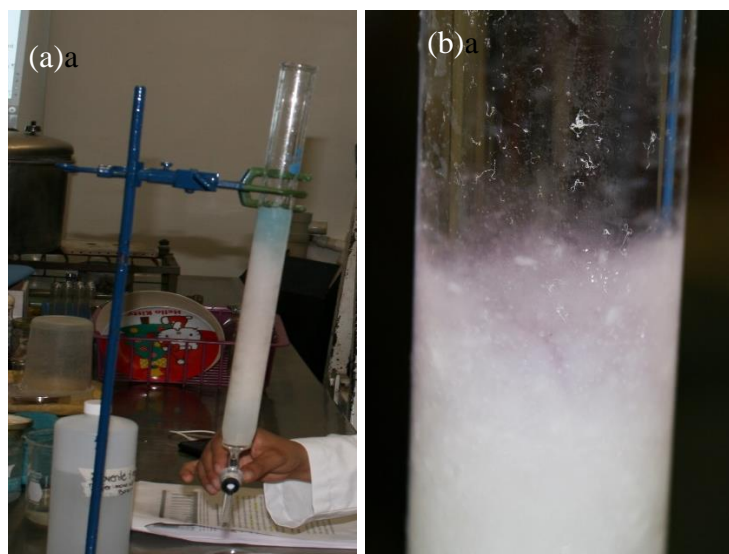


Figura 17. Columna de cromatografía con el intercambiador DEAC y extracto enzimático residual a 30 ppm inicial (a) intercambiador teñido con azul 86. (b) intercambiador teñido con violeta 51.

Una vez formadas las franjas y agregando el eluyente se obtuvieron las fracciones que se muestran en las tablas 22 y 23 .

Tabla 22. Fracciones obtenidas del residual de *G. lucidum* a 30ppm

<i>Ganoderma lucidum</i>			
Extracto residual teñido a 30 ppm	R1	R2	R3
con	Número de fracciones obtenidas		
Azul 81	4	1	2
Violeta 56	3	4	1

Tabla 23. Fracciones obtenidas del residual a 30ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe Zapotecorum</i>			
Extracto residual teñida a 30 ppm	R1	R2	R3
con	Número de fracciones obtenidas		
Azul 81	2	3	2
Violeta 56	4	1	1

3.3.7 Actividad enzimática en las fracciones obtenidas del residual por medio de cromatografía.

Se midió la actividad enzimática de cada fracción que se obtuvo de las purificaciones en la columna de cromatografía con la siguiente ecuación:

$$A = \frac{(V)(A_2 - A_1)}{(\epsilon)(d)(v)(t_2 - t_1)}$$

Los valores que se obtuvieron de la actividad enzimática de cada fracción de la purificación de los matraces coloreados a 30 ppm para *Psilocybe zapotecorum* se observan en las tablas 24 y 25.

Tabla 24. Actividad enzimática de *P. zapotecorum* ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}}$).

<i>Psilocybe zapotecorum</i>			
Número de matraz coloreados con azul 86	Numero de fracciones		
	1°	2°	3°
R1	0.243	0.243	
R2	0.625	0.208	0.034
R3	0.015	0.014	

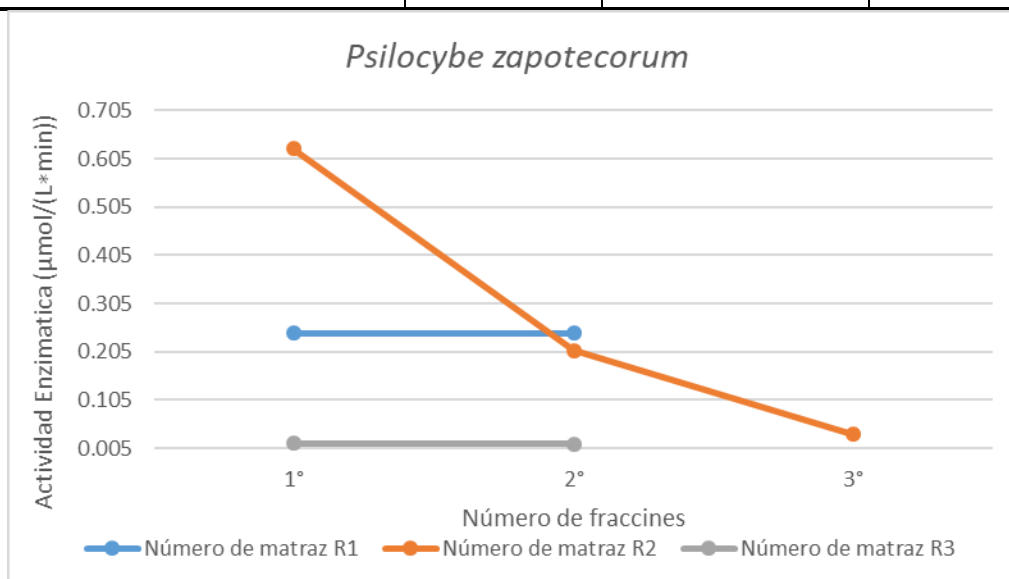


Figura 18. Comparación de la actividad enzimática de las fracciones obtenidas de los matraces color azul 86.

De acuerdo a los datos de la figura 18 la fracción que tuvo mayor actividad enzimática fue la 1° con un valor de $0.625 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}} \right)$, que corresponde al matraz R2.

Tabla 25. Actividad enzimática de *P. zapotecorum* $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}} \right)$

<i>Psilocybe zapotecorum</i>				
Número de matraz coloreados con violeta 51	Numero de fracciones			
	1°	2°	3°	4°
R1	14.027	5.555	14.201	1.388
R2	4.131			
R3	0.243			

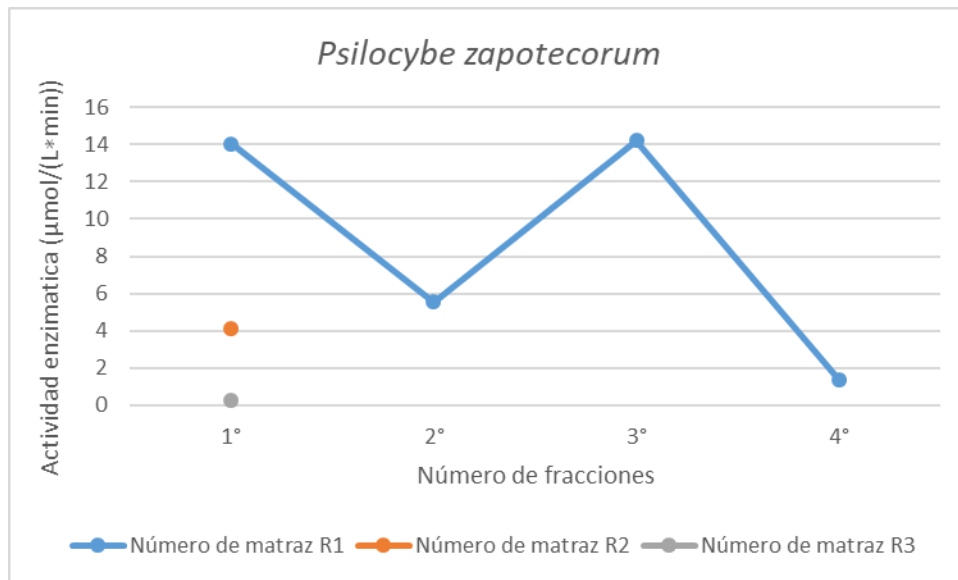


Figura 19. Comparación de la actividad enzimática de las fracciones obtenidas de los matraces color violeta 51.

De acuerdo a los datos de la figura 19 la fracción que tuvo mayor actividad enzimática fue la 3° con un valor de $14.201 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}} \right)$, que corresponde al matraz R1.

Los valores que se obtuvieron de la actividad enzimática de cada fracción de la purificación de los matraces coloreados a 30 ppm para *Ganoderma lucidum* se observan en las tablas 26 y 27.

Tabla 26. Actividad enzimática de *G. lucidum* $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}}\right)$

<i>Ganoderma lucidum</i>				
Número de matraz coloreados con violeta 51	Numero de fracciones			
	1°	2°	3°	4°
R1	0.347	1.041	7.291	
R2	0.347	1.736	3.819	2.083
R3	0.347			

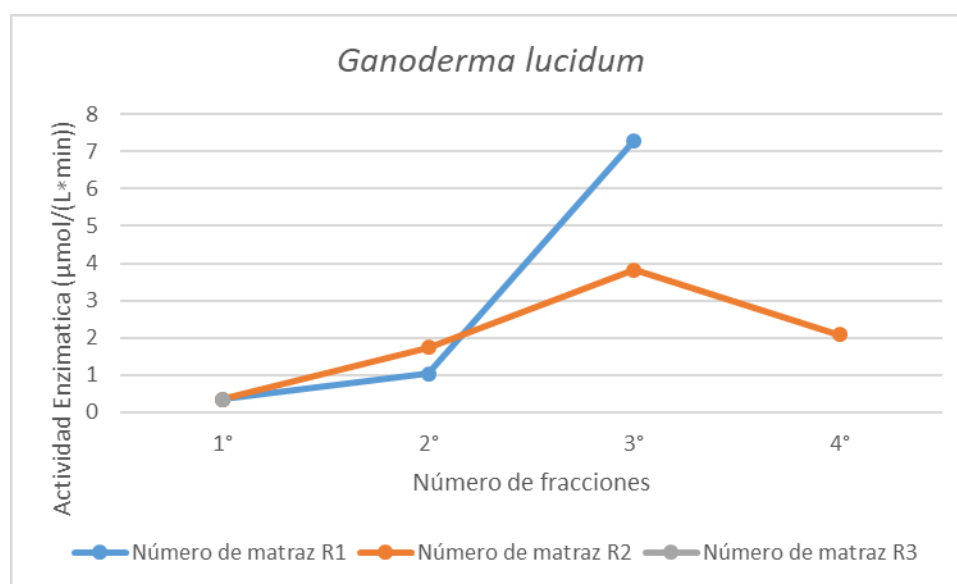


Figura 20. Comparación de la actividad enzimática de las fracciones obtenidas de los matraces color violeta 51.

De acuerdo a los datos de la figura 20 la fracción que tuvo mayor actividad enzimática fue la 3° con un valor de 7.291 $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}}\right)$, que corresponde al matraz R1.

Tabla 27. Actividad enzimática de *G. lucidum* $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}}\right)$

<i>Ganoderma lucidum</i>	
Número de matraz	Número de

coloreados con azul 86	fracciones			
	1°	2°	3°	4°
R1	3.09	2.708	0.069	3.09
R2	0.034			
R3	0.034	0.069		

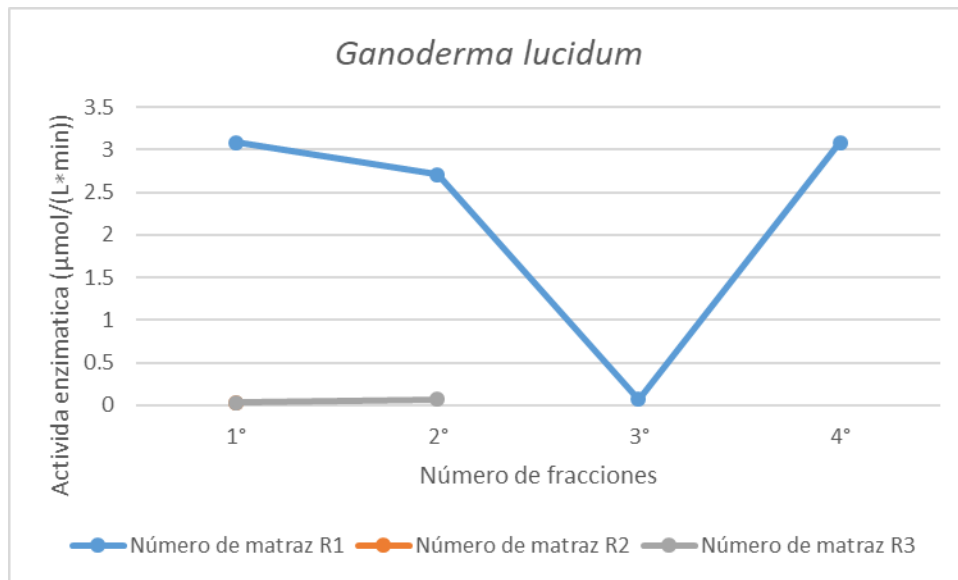


Figura 21. Comparación de la actividad enzimática de las fracciones obtenidas de los matraces color azul 86.

De acuerdo a los datos de la figura 21 la fracción que tuvo mayor actividad enzimática fue la 1° y 4° con un valor de $3.09 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{min}} \right)$, que corresponde a al matraz R1.

3.3.8 Comprobación en la degradación enzima purificada en los colorantes.

Etapa VI: Se evaluó la degradación de las enzimas purificadas en los colorantes experimentales a 1ppm y 2 ppm solo se aplicó en aquellas que obtuvieron mayor actividad enzimática.

En la tabla 28, 29, 30 y 31 se observa la concentración de colorante en contacto con la enzima purificada de *G. lucidum*. (R1 violeta, fracción 3) y (R1 azul, fracción 1).

Tabla 28. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de *G. lucidum*.

Ganoderma lucidum enzima de la fracción 3

Colorante violeta 51	1 min	2 min	3 min	30 min	% de degradación
	ppm				
1ppm	1	1	1	0.918	18.18
2ppm	2	1.938	1.938	1.428	30.39

Tabla 29. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de *G. lucidum*.

Ganoderma lucidum enzima de la fracción 3

Colorante Azul 86	1 min	2 min	3 min	30 min	% de degradación
	ppm				
1ppm	1	0.882	0.882	0.490	50
2ppm	1.862	1.764	1.666	1.274	38.09

Se puede apreciar que la enzima obtenida de *G. lucidum* tuvo un mayor efecto en biodegradar el color azul.

Tabla 30. Concentración y el % y biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de *G. lucidum*.

Ganoderma lucidum enzima de la fracción 1

Colorante violeta 51	1 min	2 min	3 min	30 min	% de degradación
	ppm				
1ppm	1	1.02	0.612	0	100
2ppm	2	1.938	1.938	1.428	30

Tabla 31. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de *G. lucidum*.

<i>Ganoderma lucidum</i> enzima de la fracción 1					
Colorante	1 min	2 min	3 min	30 min	
Azul 86	ppm				% de degradación
1ppm	0.588	0.490	0.392	0.490	50
2ppm	1.274	1.176	1.176	0.980	52.38

Se puede apreciar que la enzima obtenida de *G. ganoderma* tuvo un mayor efecto en biodegradar el colorante violeta.

En la tabla 32, 33, 34 y 35 se observa la concentración de colorante en contacto con la enzima purificada de *P. zapotecorum* (R2 violeta, fracción 1) y (R1 azul, fracción 3).

Tabla 32. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe zapotecorum</i> enzima de la fracción 1					
Colorante	1 min	2 min	3 min	30 min	
azul 86	ppm				% de degradación
1ppm	1	1	1	1	0
2ppm	1.078	1.078	1.078	0.980	52.38

Tabla 33. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe zapotecorum</i> enzima de la fracción 1					
Colorante	1 min	2 min	3 min	30 min	
Violeta 51	ppm				% de degradación
1ppm	0.729	0.729	0.625	0.208	81.46
2ppm	1.875	1.875	1.875	1.875	8.08

Se puede apreciar que la enzima obtenida de *P. zapotecorum* tuvo un mayor efecto en biodegradar el color violeta.

Tabla 34. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante azul 86 a 1 y 2 ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe zapotecorum</i> enzima de la fracción 3					
Colorante azul 86	1 min	2 min	3 min	30 min	% de degradación
	ppm				
1ppm	0.882	0.882	0.882	0	100
2ppm	1.274	1.274	1.274	0.980	52.38

Tabla 35. Concentración y el % biodegradación obtenidos del colorante violeta 51 a 1 y 2 ppm de *P. zapotecorum*.

<i>Psilocybe zapotecorum</i> enzima de la fracción 3					
Colorante Violeta 51	1 min	2 min	3 min	30 min	% de degradación
	ppm				
1ppm	0.937	0.729	0.729	0.312	72.192
2ppm	1.979	1.666	1.666	1.562	23.43

Se puede apreciar que la enzima obtenida de *P. zapotecorum* tuvo un mayor efecto en biodegradar el color azul.

De acuerdo a los resultados anteriores el hongo que obtuvo una mayor biodegradación en ambos colorantes fue *Psilocybe zapotecorum*, también cabe mencionar que no degradaron completamente a los colorantes en las diferentes concentraciones solo se dio en dos casos.

CONCLUSIÓN

1.- Se logró aislar y purificar el micelio de los hongos experimentales en los medios de cultivo tradicionales como PDA.

2.- Se logró determinar la presencia de la enzima lacasa en medio sólido por medio de la biodegradación de los tintes textiles en azul 86 y violeta 51 quien tuvo mayor degradación.

Así como en medio líquido se determinó que el día 15 de incubación obtuvo la mayor actividad enzimática para *Psilocybe zapotecorum* 5.90 UI y *Ganoderma lucidum* 2.78 UI.

3.- Se logró biodegradar en medio líquido los colorantes azoicos: violeta 51 y azul 86 hasta un 85.2 %, 85.9 % para 100 ppm y 91 % y 90% para 30 ppm respectivamente de la cepa *Psilocybe zapotecorum*

Con la cepa *Ganoderma lucidum* logro biodegradar a los colorantes azoicos: violeta 51 y azul 86 hasta un 84.6 %, 84.21% para 100 ppm y 89.7%, 83.9% para 30 ppm.

4.- Mediante la técnica de cromatografía por columna se permitió separar cada uno de los concentrados enzimáticos así obteniendo diferentes números en fracciones para cada extracto, el intercambiador que se utilizó presentó algunas fallas en el momento de separar las fracciones.

5. Se cuestionó si el residuo de los matraces coloreados a 30ppm se desechaban o se investigaba si aún se encontraba activa la enzima lacasa en ellos por lo tanto se propuso purificar el extracto y hacer las pruebas de ABTS, las cuales resulto positivo para cada una de las fracciones obtenida en la columna de cromatografía por lo anterior se concluyó hacer una prueba para degradar al colorante en concentraciones bajas con la enzima obtenida.

Se logró biodegradar el colorante azul y violeta pero no en altas concentraciones como se dio en los matraces coloreados, esto probablemente se debe a que se tiene que afinar el proceso de purificación de la enzima lacasa, los mejores resultados que se obtuvieron: *Psilocybe zapotecorum* (R2 violeta fracción 3) degradado 100% al colorante violeta y 72% para el azul.

Para la cepa *Ganoderma lucidum* (R1 violeta fracción 3) degradado 100% al colorante violeta y 50% para el azul.

Anexo “A”

Metodología para la purificación de enzima lacasa por medio de cromatografía.

1. Centrifugación.

El extracto fue centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos a 5°C, el sólido obtenido fue separado y nos quedamos con el sobrenadante.

2. Diálisis.

El sobre nadante fue colocado en membranas de celofán con poros de 10 mD la cual se activó antes de su uso, se coloca el concentrado que se desea dializar una vez sellada se introduce en un recipiente con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.4 en una relación de 1:6, durante 24 horas.

Para la separación enzimática y obtención de lacasa del extracto dializado se utilizó el método de columna de cromatografía.

3. Preparación de la columna.

Para la obtención del concentrado de proteínas con la actividad lacasa se preparó una columna de cromatografía con 5 gr del intercambiador o resina “DEAC - Cellulose” previamente hidratado y pasado por NaCl 1 M, se procede a empaquetar la resina agregando 200 ml de agua destilada y buffers de fosfatos.

4. Cromatografía de exclusión molecular.

Para continuar el proceso de purificación se adiciono el extracto dializado en la columna una vez esto se vierte el eluyente conformado por buffer de fosfatos y NaCl, se abre la llave para que el extracto fluya a través de la resina y de esa forma fracciones enzimáticas se separen.

Se coloca unos tubos de ensayo en una gradilla para recuperar la parte inicial, media y final de la extracción.

Anexo "B"

Obtención de la curva de calibración de los colorantes textiles experimentales. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS, cuya longitud de onda para cada colorante se estableció para violeta 51 a λ de 540nm, azul 86 a λ de 640nm. Las curvas se establecieron intervalos de 10 ppm hasta 100 ppm, y de intervalos 1ppm a 10ppm.

Tabla 36. Curva de calibración de azul 86 de 10-100ppm

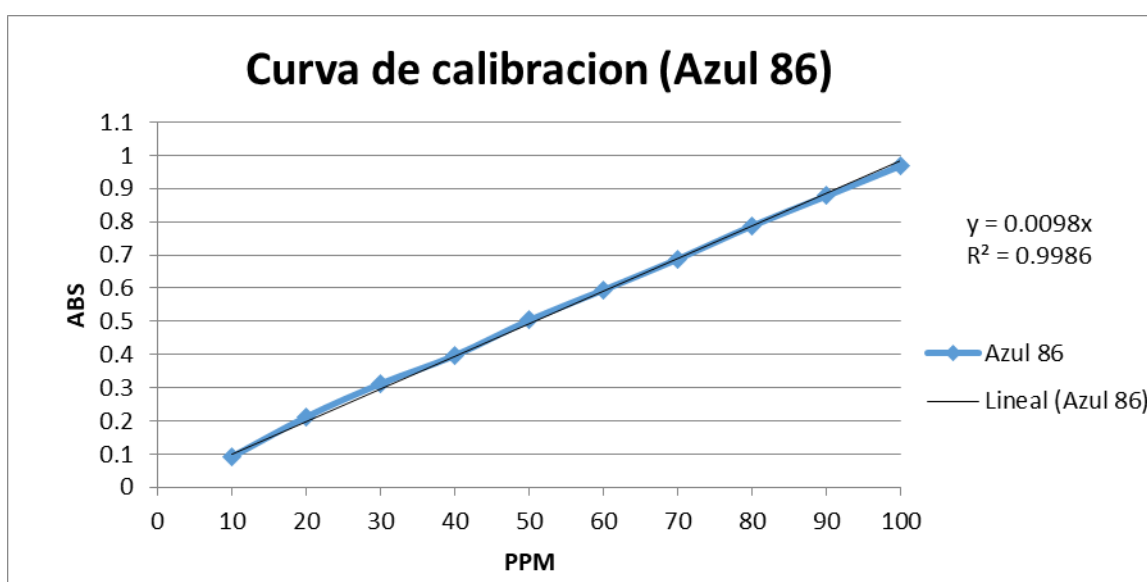


Tabla 37. Curva de calibración de violeta 51 de 10 a 100ppm

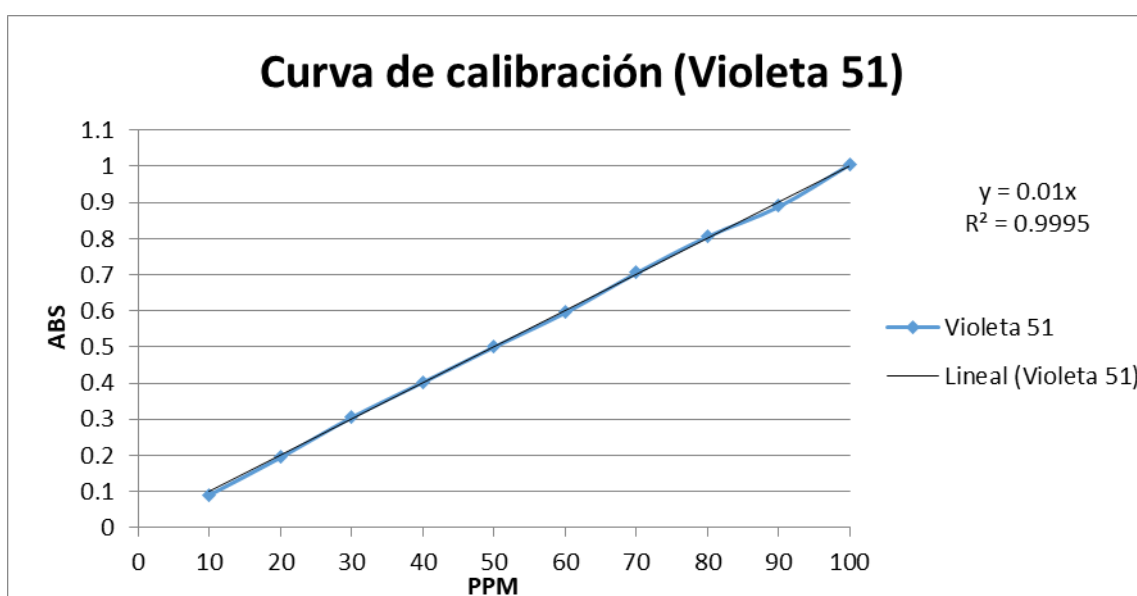


Tabla 38. Curva de calibración de azul 86 de 1 a 10ppm

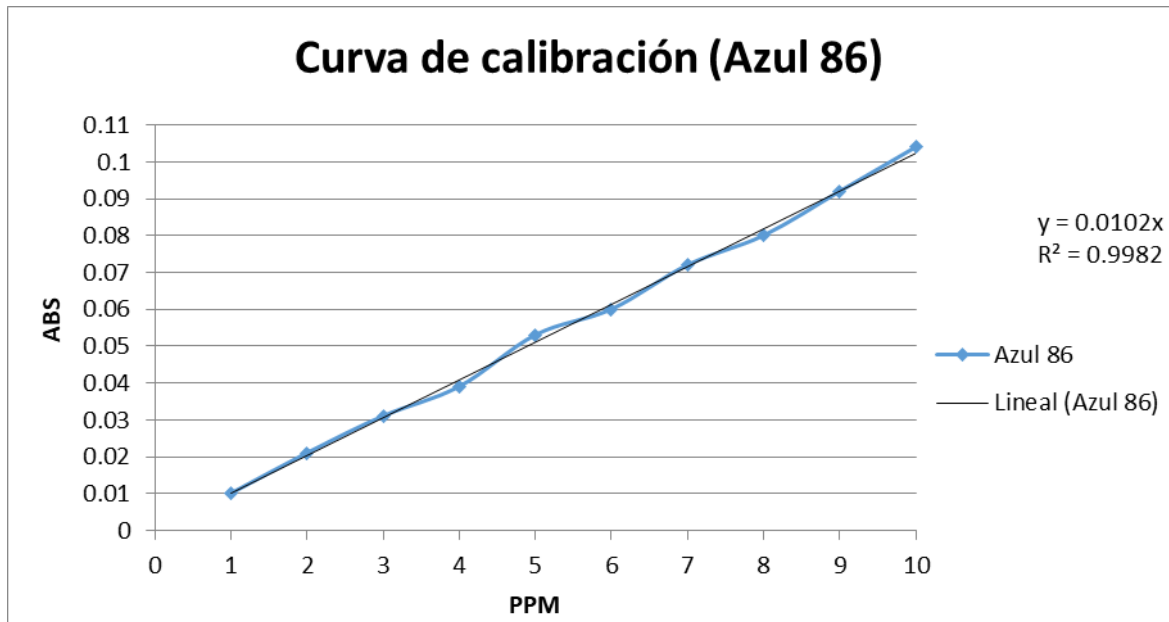
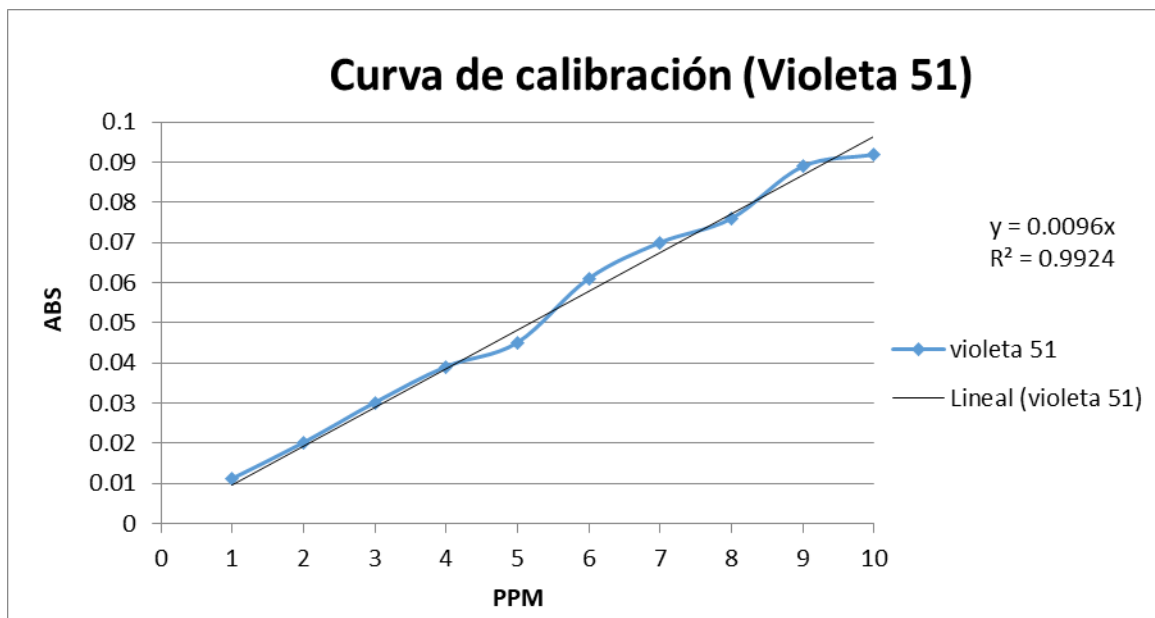


Tabla 39. Curva de calibración de violeta 51 de 1 a 10ppm



Anexo "C"

Utilizando los valores de absorción en el tiempo inicial y tiempo final se insertarán en la fórmula, se utilizaron los siguientes valores:

$$\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$V = 1 \text{ cm}^3$$

$$v = 0.8 \text{ cm}^3$$

$$A = \Delta = \text{Abs final} - \text{Abs inicial}$$

$$t = 1 \text{ min}$$

$$\frac{A}{t} = 0.037 \frac{A}{\text{min}}$$

$$\begin{aligned} \text{Actividad enzimática} &= \frac{\left(\frac{0.037 A}{\text{min}}\right)(1 \text{ cm}^3)}{(36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})(1 \text{ cm})(0.8 \text{ cm}^3)} \\ &= 0.000001284 \frac{\text{M}}{\text{min}} = \frac{\text{mol}}{\text{L} * \text{min}} \end{aligned}$$

Se multiplica por 1000000 para convertir los moles a micro-moles.

$$= 1.2847 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L} * \text{min}} = \text{UI}$$

Anexo "D"

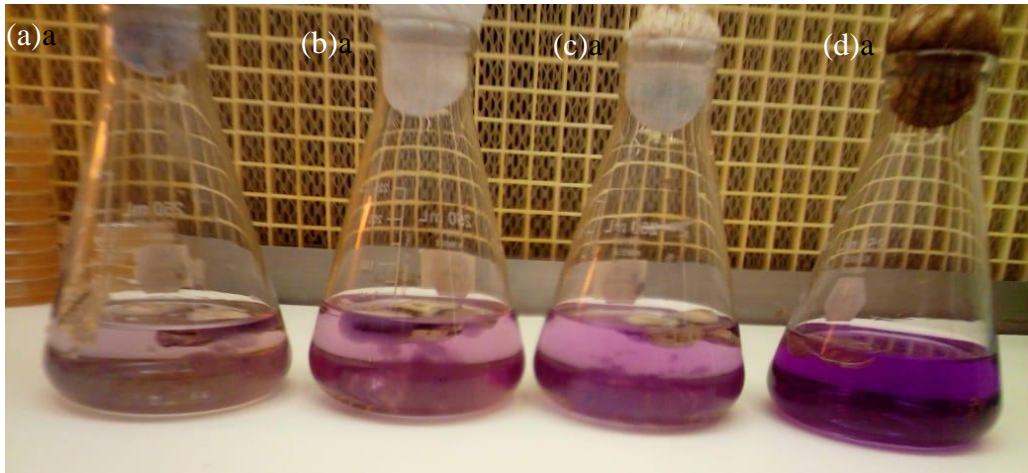


Figura 22. Aspecto del agua contaminada con violeta 51 a 30 ppm con *P. zapotecorum* (a) R1 después de la biodegradación (b) R2 después de la biodegradación (c) R3 después de la biodegradación (d) Antes de la biodegradación.



Figura 23. Aspecto del agua contaminada con azul 86 a 30 ppm con *P. zapotecorum* (a) R3 después de la biodegradación (b) R1 después de la biodegradación (c) R2 después de la biodegradación (d) Antes de la biodegradación.

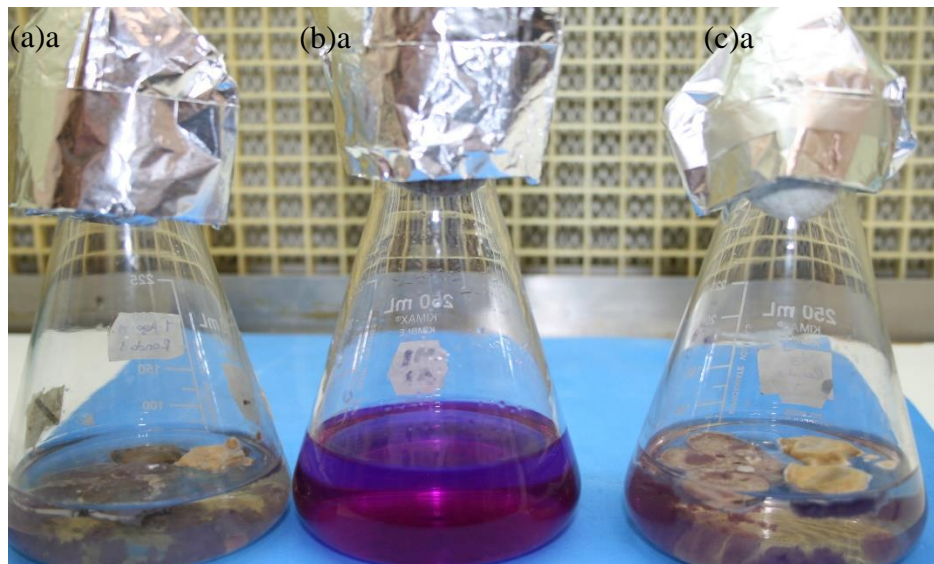


Figura 24. Aspecto del agua contaminada con violeta 51 a 30 ppm con *G.ganoderma* (a) R1 después de la biodegradación (b) Antes de la biodegradación (c) R3 después de la biodegradación.



Figura 25. Aspecto del agua contaminada con azul 86 a 30 ppm con *G.ganoderma* (a) R1 después de la biodegradación (b) Antes de la biodegradación (c) R2 después de la biodegradación.

BIBLIOGRAFÍA

- Niño Arias, F. (2010). *EVALUACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL HONGO Ganoderma lucidum CON ACTIVIDAD ANTIFUNGICA FRENTE A Fusarium spp. DE INTERES CLINICO*. Bogotá D.C.
- Arturo, J., & Castillo Tapia. (2001). Apertura comercial y recesión en a industria maquiladora. El caso de Tehuacán. En *Tesis para obtener el título de Lic. En relaciones Internacionales, UDLAP*.
- Bourbannais, R., & Paice, M. (2016). Demethylation and lignification of kraft pulp. *Treatment of versicolor laccase in the presence of 2,2'-azobis*, 823-827.
- Chávez Sifontes, M., & Domine, M. (2013). LIGNIN, STRUCTURE AND APPLICATIONS: DEPOLYMERIZATION METHODS FOR. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4-7.
- Cuevas Moreno, J. (2016). LOS HONGOS: HÉROES Y VILLANOS. *Revista digital uiveritaria UNAM*, 3-4.
- Desai, S., & Nityanad, C. (2011). Microbial laccases and their applications. *Asian Journal of Biotechnology*, 98-124.
- EPA. (2014). *Best management practices for pollution prevention in the textile industry U.S.* Environmental Protection Agency, Cincinnati, USA.
- Flores Torres, & Guadalupe, E. (2004). Evaluación de la contaminación generada por el vertido de aguas residuales provenientes de la industria textil en Zinapecuaro, Michoacán, Tesis de Maestría. En *Escuela Superior de Ingeniería Textil, IPN-México* (pág. 103).
- Garzón, R. (2017). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizadas sobre fibra de Agave. En *Trabajo de grado para obtener el título de Microbiólogo industrial*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

- Gastón Guzmán. (18 de Diciembre de 2015). *SOBRE LOS HONGOS ALUCINÓGENOS MEXICANOS*. Obtenido de Revista ciencia y cultura: <https://www.revistac2.com/sobre-los-hongos-alucinogenos-mexicanos/?print-posts=pdf>
- Golob, V., & Ojstrsek, A. (2005). Removal of vat and disperse dyes from residual pad liquors. En *Dye and Pigments* (págs. 57-61).
- Gomes Machado, K., & Matheus Dacido, R. (2013). Biodegradation of remazol brilliant blue r by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology* (2006) 37: 468-473, ISSN 1517-8382.
- Gutiérrez Salinas, J., & Hernández Rodríguez, S. (2011). Efectos del fluoruro de sodio sobre enzimas antioxidantes en el eritrocito humano.
- Horton , R., & Moral, L. (2008). *Principios de bioquímica (4ta Ed.)*. México: Pearson Education.
- IPPC. (2014). Reference document on best available techniques for the textiles industry (adopted July 2003). En (*Documento de referencia sobre las mejores técnicas disponibles para la industria textil*).
- Juárez, T. (2003). La industria maquiladora textil en el Municipio de Xoxtla, Puebla. (Tesina). En *Facultad de Economía de la BUAP. Puebla, México*.
- Koch, A., Naranjo , B., & Páez , M. (2001). *Departamento 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* . Departamento de ciencias de la vida. Escuela politécnica del ejercito.
- Kuhar, J. F. (2013). *Cultivo de Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst. y evaluación de su aplicación a la biorremediación*. Obtenido de (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.): Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5332_Kuhar

- Llorente, B. E. (2010). AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y. En *UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD CIENCIAS EXACTAS (Tesis de Doctorado)* (págs. 13-15).
- López Díaz, C. (2009). Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos en continuo. En *Tesis Doctorado: Universidad de Santiago de Compostela Departamento de Ingeniería Química*.
- Madhavia, V., & Lele, S. (2009). Properties and applications, *Bioresources. Lacasse*, 1694-1717.
- Martinez, A., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., & Martínez, M. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. En *International Microbiology* (págs. 1995-204).
- Miranda, E. (2012). Tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria textil utilizando peroxidas del frijol de soya. En *Examen de candidatura de Doctorado, Programa de Maestría y Doctorado en ingeniería de la facultad de ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Mora, N., & Martínez, L. (2007). Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas en México. En *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México* (págs. 7-26).
- Moreno, N., & Ospina, X. (2010). *Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando Pleurotus ostreatus inmovilizado en fique*. Fac. de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- Murrieta Hernández, M. (2016). *Cambios en la producción de lacasa por el hongo Pleurotus pulmonarius*. Veracruz.
- Nithya, R., & Raguathan, R. (2001). Decolorization of the dye Congo red by Pleurotus sajor caju silver nanoparticle. International Conference on Food Engineering and Biotechnology IPCBEE vol.9 (2011) © (2011) IACSIT Press. Singapore.

- Orvos, D. (2010). Aquatic Toxicity of Triclosan. (Toxicidad acuática del triclosan). En *Environmental Toxicology and Chemistry* (págs. 1338-1449).
- Peña, A., Arroyo, A., & Gómez, T. (2013). *Bioquímica (2 ed.)*. México D.F: Limusa.
- Ramesh, M. (2012). Experimental Methods in Biology. En *Fungi in Biosphere and Human Health* (págs. 71-89). Bangalore, India.
- Ramírez Ramírez, J., & Ayala Aceves, M. (2014). Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan? *Instituto de Biotecnología, UNAM*.
- Revollo, E., Serna, O., & Hernández, J. (2012). Actividad lacasa en *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. En *Revista Colombiana de Biotecnología* (págs. 70-80).
- Rodríguez Rosario, K. J. (2005). Tesis para el grado de Maestro en Ciencias en Biología. "Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados". En *Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez*. (pág. 83).
- Rodríguez, S. T. (2006). Industrial and Biotechnological Applications of Laccases: A Review, *Biotechnology Advances*.
- Saldoval, V., & Gordillo, M. (2009). Evaluación fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de la degradación ambiental del río Atoyac, México. En *INTERCIENCIA*, vol.34, n.12 (págs. 880-887).
- SEMARNAT-CNA. (2004). *Estadísticas del agua en México 2004*. Secretaría Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua. México.
- Stamets, P., & Chilton, J. (2015). A Practical Guide to Growing Mushrooms at home. En *The Mushroom Cultivator*.
- Toca Herrera, J. L., & Rodríguez, S. (2006). Laccases in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 117-122.

Tomasini, A., & Moelle, G. (2010). Tratamiento biológico con biomasa suspendida anaerobio/aerobio de un agua real textilera con colorante azo.

Yonni, P., & Fasoli, H. (2008). *Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad sobre colorantes textiles. Hig. Sanid. Amnient.* 331-334.