

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESÍS

Cuantificación de la actividad enzimática celulolítica total (f_{psa}) de cinco basidiomicetos cultivados *in vitro*, procedentes del Santuario Nacional del Ampay

Presentado por:

Bach. Marcia Bedia Cruz

Para Optar el Título de Ingeniero Agroindustrial

Abancay, Perú

2021



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



“TESIS”

“CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA TOTAL
(FPAsa) DE CINCO BASIDIOMICETOS CULTIVADOS *IN VITRO*, PROCEDENTES
DEL SANTUARIO NACIONAL DEL AMPAY”

Presentado por **Marcia Bedia Cruz**, para optar el Título de:
Ingeniero Agroindustrial

Sustentado y aprobado el 14 de julio del 2020, ante el jurado evaluador:

Presidente:

Mg. Juan Silver Barreto Carbajal

Primer Miembro:

Mg. Gladys Marilú Castro Pérez

Segundo Miembro:

Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz

Asesor:

Mg. Victor Hugo Sarmiento Casavilca

Agradecimiento

A Dios, por guiarme en el transcurso de mis estudios. A mis padres Marcial y Juana, por su incondicional apoyo, por ellos soy lo que soy.

Al Mg. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca, impulsor del proyecto de tesis, por compartir sus conocimientos, dedicación y apoyo técnico. A Ud. maestro.

A todas esas personas, instituciones que sumaron con un granito de arena en el transcurso de este proyecto, por sus concejos, enseñanzas, sugerencias, mi gratitud infinita.

Dedicatoria

A Eiren Regina. Por su constante apoyo espiritual, a quien nunca he podido profesar mi amor, cariño y afecto completo por su pronta partida al cielo. Tu ausencia ha marcado mi ser, siempre estarás en mi mente y mi corazón.

A Lauren Naela, mi razón de existir.



“Cuantificación de la actividad enzimática celulolítica total (FPAsa) de cinco basidiomicetos cultivados in vitro, procedentes del Santuario Nacional del Ampay

Caracterización, desarrollo de procesos e innovación en las agroindustrias

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
CAPÍTULO I	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1 Descripción del problema.....	5
1.2 Enunciado.....	6
1.2.1 Problema general	6
1.2.2 Problemas específico	6
1.2.3 Justificación	6
CAPÍTULO II	9
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	9
2.1 Objetivos	9
2.1.1 Objetivo general.....	9
2.1.2 Objetivos específicos	9
2.2 Hipótesis de la investigación.....	9
2.2.1 Hipótesis general	9
2.2.2 Hipótesis específicas.....	9
2.3 Operacionalización de variable	10
CAPÍTULO III	11
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	11
2.1 Antecedentes	11
3.2 Marco teórico	14
3.2.1 Diversidad biológica de un bosque primario	14
3.2.2 Características de la celulosa	15
3.2.3 Celulasas totales y su mecanismo de acción.....	16
3.2.4 Los basidiomicetos	22
3.2.5 Cultivo de hongos celulolíticos	28
3.2.6 Sistemas de fermentación	29



3.2.7	Aplicaciones industriales del hidrolisis de la celulasa y sus productos.....	35
2.1	Marco conceptual	37
CAPÍTULO IV		39
DISEÑO METODOLÓGICO		39
4.1	Tipo de la investigación.....	39
4.2	Diseño de la investigación.....	39
4.3	Población y muestra.....	39
4.3.1	Población	39
4.5	Procedimiento de la investigación	40
4.5.1	Etapas de experimentación	42
4.5.2	Flujo del procesamiento.....	46
4.6	Material e instrumentos de la investigación	46
4.6.1	Materiales	46
4.6.2	Equipos	47
4.6.3	Insumos.....	48
4.7	Materia prima.....	49
4.8	Lugar de ejecución.....	49
CAPÍTULO V		50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		50
5.1	Descripción de resultados.....	50
5.1.1	Resultados para biomasa.....	50
5.1.2	Resultados para actividad enzimática.....	52
5.1.3	Resultados para productividad.....	55
5.2	Contrastación de resultados	56
5.2.1	Hipótesis general	56
5.2.2	Hipótesis específicas.....	56
5.2.3	Estadística.....	57
5.2.4	Nivel de significancia.	57
5.2.5	Región crítica o decisión.	57
5.3	Discusión de resultados	57
5.3.1	Discusiones para biomasa.....	57
5.3.2	Discusiones para actividad enzimática.....	58
5.3.3	Discusiones para productividad.....	59



CAPÍTULO VI	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
6.1 Conclusiones	60
6.2 Recomendaciones	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	72



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 — Operacionalización de variables.....	10
Tabla 2 — Bacterias con alta actividad específica de celulasas.....	18
Tabla 3 — Hongos con alta actividad específica de celulasas.....	18
Tabla 4 — Esquema de experimentación de las etapas y operaciones de las cinco cepas en estudio.....	41
Tabla 5 — Biomasa producida de las cinco cepas de basidiomicetos.	50
Tabla 6 — Anova de biomasa generada de las cinco cepas de basidiomicetos.....	51
Tabla 7 — Anova de actividad enzimática para las cinco cepas de basidiomicetos.....	53
Tabla 8 — Pruebas múltiples de rangos para productividad enzimática por cepa	56
Tabla 9 — Diseño factorial	74
Tabla 10 — Anova para biomasa g/L por cepa de hongo.....	75
Tabla 11 — Pruebas de múltiples rangos para biomasa g/L por cepa de hongo.....	75
Tabla 12 — Contraste biomasa g/L por cepa de hongo.....	76
Tabla 13 — Análisis de varianza para actividad enzimática - suma de cuadrados tipo III	77
Tabla 14 — Pruebas de múltiples rangos para actividad enzimática por hongo.....	78
Tabla 15 — Contraste para actividad enzimática por hongo.	78
Tabla 16 — Pruebas de múltiples rangos para actividad enzimática por pH	79
Tabla 17 — Contraste actividad enzimática por pH	79
Tabla 18 — Pruebas de múltiples rangos para actividad enzimática por temperatura	80
Tabla 19 — Contraste para actividad enzimática por temperatura	80
Tabla 20 — ANOVA para Actividad Enzimática por hongo	82
Tabla 21 — Pruebas de múltiples rangos para actividad enzimática por hongo.....	82
Tabla 22 — Contraste para actividad enzimática por hongo	82
Tabla 23 — Análisis de varianza para productividad - suma de cuadrados tipo III.....	84
Tabla 24 — Pruebas de múltiples rangos para productividad por hongo.....	85
Tabla 25 — Contraste para productividad por hongo	85
Tabla 26 — Tablas múltiples de resultado a mayor productividad	86
Tabla 27 — Contraste de resultado a mayor productividad.....	86
Tabla 28 — Pruebas de múltiples rangos para productividad por b. temperatura.....	87
Tabla 29 — Contraste para productividad por b. temperatura	87



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 — Caracterización enzimática	16
Figura 2 — Acción coordinada de las celulasas sobre la celulosa amorfa y cristalina.	19
Figura 3 — Estructura del carpóforo de un basidiomiceto, basidias y basidiosporas	22
Figura 4 — Esquematación de las partes basidiomiceto.	23
Figura 5 — Ciclo biológico general de un hongo basidiomiceto	25
Figura 6 — Fases del crecimiento de un basidiomiceto.	28
Figura 7 — Microfotografía del proceso de formación de la biopelícula con <i>A. Niger</i>	33
Figura 8 — Proceso de adhesión de hongos filamentosos a superficie	34
Figura 9 — Diagram de flujo	46
Figura 10 — Biomasa generada de las cinco cepas de basidiomicetos.	51
Figura 11 — Actividad enzimática FPAsa de las cinco cepas de basidiomicetos.	53
Figura 12 — Gráfico multivariable para actividad enzimática de las cinco cepas a dos temperaturas de trabajo y dos pH.	54
Figura 13 — Productividad enzimática de los cinco basidiomicetos.	55
Figura 14 — Protocolo de formación de biopelículas	73
Figura 15 — Medias al 95.0 % tukey de biomasa g/L por cepa de hongo (g/L)	76
Figura 16 — Medias al 95.0 % tukey HSD de cepas de hongos y actividad enzimática (UL/ml)	78
Figura 17 — Grafica al 95.0 % de pH y actividad enzimática (UL/ml)	79
Figura 18 — Medias al 95 % tukey HSD entre temperatura °C y actividad enzimática (UL/ml)	80
Figura 19 — Análisis multivariable de hongo y actividad enzimática (UL/ml)	81
Figura 20 — Análisis multivariable de las dos temperaturas y actividad enzimática (UL/ml)	81
Figura 21 — Medias al 95 % tukey HSD de hongo y actividad enzimática (UL/ml)	83
Figura 22 — Medias al 95 % tukey HSD de hongo y productividad	86
Figura 23 — Medias al 95 % tukey HSD de temperatura y productividad	87
Figura 24 — Análisis multivariable temperatura y productividad	88
Figura 25 — Análisis multivariable temperatura y productividad	88
Figura 26 — Análisis multivariable de hongo y productividad	89
Figura 27 — Descripción de basidiomicetos y cepas	90



INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes desafíos y obligaciones que tienen los seres humanos en el siglo XXI, es el convertir los procesos industriales, Biotecnológicos y medioambientales, en procesos limpios y puros, renovables, degradables y eficientes para generar energía. Por eso, se tiene que tener la capacidad tecnológica para enfrentar estas situaciones. La Biotecnología tiene un papel importante en esta transformación. Esta se deberá orientar en la utilizar nuevas herramientas en varios campos para el control y prevención de procesos como también la remediación de las contaminaciones ambientales (Dávila *et al.*, 2006).

Por otro lado, un sustrato interesante a explotar son los residuos vegetales productos de sus transformaciones por la industria alimentaria y la agroindustria, de esta manera el uso de metabolitos producidos por células vegetales, animales o microbianas se convierten en una opción importante para hacer más rápido la degradación de dichos residuos, minimizando de esta forma el impacto ambiental que se genera como resultado del manejo inadecuado de estas materias primas.

Los microorganismos se encargan de la producción de enzimas celulasas y por ende la degradación de la celulosa de manera que no son toxicas al llegar al medio ambiente, diferente a los procesos químicos. La celulosa es el primer componente principal de la pared celular en las plantas. Los microorganismos productores de esta enzima destacan las bacterias, hongos y algunos actinomicetos, los cuales poseen un sistema enzimático necesario para lograr dicho fin (Aubert, J., 1988). La función principal de los hongos es su rápida colonización de sustratos, la secreción de las enzimas al medio, su eficaz distribución de productos de hidrólisis y su variedad de sistemas celulolíticos; sobre los hongos se realizaron diversas investigaciones para entender su complejidad de su proceso de hidrólisis enzimática de celulosa y usarlo en fines industriales. Los hongos de mayor producción de celulasas se encuentran *T. reesei*, varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* cuya actividad enzimática fue evaluado en distintos sustratos como desechos de bagazo de caña y trigo, (Guevara y Zambrano, 2006).

En este sentido contribuyendo con el conocimiento de los recursos del ecosistema del Santuario Nacional del Ampay, la utilización de los laboratorios de la Escuela Académico Profesional de



Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, contando con la autorización del SERNANP para uso de recursos naturales del Santuario Nacional del Ampay (SNA) de la provincia de Abancay y considerando el alto costo de enzimas comerciales, se tomó la iniciativa de analizar cinco cepas de hongos basidiomicetos y cuantificar la actividad enzimática celulolítica total de este tipo de organismos existentes en el Santuario.

Por lo expuesto, el objetivo de esta investigación es cuantificar la actividad celulolítica total (FPAsa) de basidiomicetos cultivados in vitro, procedentes del Santuario Nacional del Ampay. Con el fin de escoger aquellas cepas de los hongos que presenten mayor actividad enzimática medida en unidades celulolíticas, para ser usados en la producción de enzimas comerciales posteriormente.



RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Agroindustrial de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. En esta investigación se utilizaron cepas de basidiomicetos del Santuario Nacional Ampay de la región Apurímac, con la debida autorización de la autoridad competente (SERNAMP), estas cepas estudiadas correspondientes a los géneros *Hygrophorus*, *Geastrum* y *Cantharellus*. Para la producción de enzimas se utilizó la técnica de cultivo de adherencia a superficies (biopelículas), utilizando tejido de poliéster como matriz de sujeción de dimensiones indicadas en la metodología de estudio, el tiempo de producción de enzimas y biomasa superior a 10 días, por lo que requirió 4 días para la producción de micelios, 3 días para la producción de inóculo y 03 días para la formación del biofilm; luego se midió la cuantificación de la actividad enzimática utilizando el método de ensayo de papel de filtro (FPA).

Obteniéndose como resultado que la cepa BSNA-LB-004 es la que produce más biomasa con un valor de 3.8 g / L, correspondiente al hongo de género *Geastrum*; y la cepa BSNA-LB-001 es la que mayor productividad enzimática presenta con un valor de 0.3704 UI / g, correspondiente al hongo del género *Higrophorus*. De esta manera se ha demostrado el potencial industrial para la producción de enzimas de basidiomicetos del Santuario Nacional de Ampay.

Palabras clave: *Ampay, basidiomicetos, actividad enzimática celulolítica*



ABSTRACT

This research work was developed in the Agroindustrial Biotechnology laboratory of the Professional Academic School of Agroindustrial Engineering of the Micaela Bastidas National University of Apurímac. In this investigation, strains of basidiomycetes from the Ampay National Sanctuary of the Apurímac region were used, with the proper authorization of the competent authority (SERNAMP), these studied strains corresponding to the genera *Hygrophorus*, *Geastrum* and *Cantharellus*. technique of cultivation of adherence to surfaces (biofilms), using polyester tissue as a holding matrix of dimensions indicated in the study methodology, the time of production of enzymes and biomass exceeding 10 days, therefore it required 4 days for production of mycelia, 3 days for the production of inoculum and 03 days for the formation of the biofilm; then the quantification of enzyme activity was measured using the filter paper assay (FPA) method.

Obtaining as a result that the strain BSNA-LB-004 is the one that produces the most biomass with a value of 3.8 g / L, corresponding to the fungus of the genus *Geastrum*; and the strain BSNA-LB-001 is the one with the highest enzymatic productivity with a value of 0.3704 IU / g, corresponding to the fungus of the genus *Higrophorus*. In this way, the industrial potential for the production of enzymes from basidiomycetes from the Ampay National Sanctuary has been demonstrated.

Keywords: *Ampay, Basidiomycetes, Cellulosic enzymatic activity.*



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

Perú está considerado un país mega biodiverso, todas sus regiones poseen potencialidades de recursos naturales que debieran explotarse sosteniblemente; en este contexto Apurímac posee una gran diversidad de recursos naturales en sus pisos ecológicos, entre estos recursos se encuentran los basidiomicetos, que son hongos macroscópicos, estos hongos en el país y más aún en la región no son aprovechados pese a tener gran potencial como organismo productor de enzimas.

Es destacar los desechos vegetales de las plantas es un potencial renovable que abunda en la tierra, y está compuesto mayoritariamente de tres tipos de polímeros: la celulosa es el principal biopolímero de la pared de la célula de las plantas y por consiguiente el principal y más abundante de la naturaleza (Lynd, 2004).

la celulosa se debe a la acción sinérgica de hidrolisis de los componentes de enzimas los cuales constituyen un complejo enzimático denominado celulasas, Así, debe entenderse que la celulosa constituye una gran reserva de fuente de carbono para los microorganismos que descomponen el material vegetal orgánico del suelo (Zhang y Lynd, 2004b; Jarvis, 2003; Lynd et al, 2000; Bhat, 2000; Schlesinger, 1991). al menos tres diferentes tipos de enzimas actúan sobre la celulosa; estos son la endoglucanasa, la exoglucanasa y la β -glucosidasa; (Yi et al, 1999; Bhat, 1997; Wood, 1989).

Por otro lado, actualmente es muy evidente que se está atravesando una crisis energética global, y esta se va a incrementar con el pasar de los años debido en gran parte por el desgaste de las reservas naturales de petróleo en todo el mundo, la alternativa es aprovechar la biomasa de la descomposición vegetal que dispone nuestra región al contar con una reserva ecológica como el Santuario Nacional del Ampay, el cual posee un bosque de Intimpa (*Podocarpus glomeratus*) que puede considerarse como un bosque primario por su intangibilidad, es donde proliferan muchas cepas de distintos



basidiomicetos, estos hongos que generan enzimas (celulasas) pueden permitir el aprovechamiento de esta biomasa, pese a ser tendencia mundial este concepto, aun no son suficientes los conocimientos para solucionar este inconveniente.

De esta manera se requiere realizar estudios en el Santuario Nacional del Ampay, para identificar las potencialidades en cuanto a sus recursos naturales los mismos que pueden solucionar problemas medioambientales, para esto es necesario el uso de herramientas biotecnológicas.

1.2 Enunciado

1.2.1 Problema general

¿Presentaran las cepas seleccionadas de basidiomicetos procedentes del Santuario Nacional del Ampay, elevada capacidad enzimática celulolítica total (FPAsa)?

1.2.2 Problemas específico

- ¿Sera posible cuantificar la biomasa generada de cinco cepas seleccionadas de basidiomicetos, procedentes del Santuario Nacional del Ampay, en un sistema de cultivo por adhesión de superficies (Biopelícula)?
- ¿Será posible cuantificar la actividad enzimática celulolítica total (FPAsa) de las cinco cepas seleccionadas procedentes del Santuario Nacional del Ampay?
- ¿Se podrá seleccionar la cepa con mayor productividad enzimática de las variedades de basidiomicetos cultivada en laboratorio, procedente del Santuario Nacional del Ampay, de acuerdo a su productividad enzimática?

1.2.3 Justificación

Los microorganismos celulolíticos son capaces de hidrolizar celulosa y tienen la función importante del proceso de la degradación de biomasa vegetal constituido principalmente por la celulosa, hemicelulosa y lignina (Lynd, et al, 2002). Existe

organismos entre bacterias, actinomicetos y hongos con capacidades distintas, unos producen enzimas celulolíticas necesarias para degradar celulosa y hemicelulosa. Los organismos mayormente descritos en la bibliografía con distintas capacidades de la descomposición de celulosa están dentro del grupo de basidiomicetos causantes de la pudrición blanca (Peláez. F, Martínez. MJ y Martínez. AT, 1999). Estos hongos, los basidiomicetos, rompen las uniones 1-4 β glucosídicos, dentro del polímero celulosa, descomponiendo moléculas más pequeñas como la glucosa (Kirt y Farrell, 1987).

Respecto a la Justificación Científica; La humanidad tiene un gran desafío para el siglo XXI, y este es transformar los procesos de extracción en procesos energéticos limpios con visión sostenible, llamado ahora en la actualidad química verde. Para esto se requiere la tecnología exacta para cerrar los sitios dañados utilizando fuentes del medio ambiente, un papel importante en esta transformación tecnológica tiene la biotecnología moderna ya que las investigaciones de sus áreas están enfocadas al manejo de nuevas herramientas para prevenir, controlar y remediar el medio la contaminación del medio ambiente (Dávila, Vázquez y Duhalt, 2006). Los sistemas celulolíticos demostraron ser muy versátiles para estudios ambientales por su capacidad degradativo como son plaguicidas, hidrocarburos de petróleo, explosivos, colorantes sintéticos y componentes tóxicos para la naturaleza y el hombre (Solís, 2005).

Respecto a la justificación económica; debe mencionarse la eficiencia de los procesos de degradación para los compuestos responsables de la contaminación y los métodos propuestos en la actualidad para su degradación se basan en tratamientos químicos o físicos, que resultan ser muy caros (Dávila, et al, 2006). La Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac mediante sus escuelas Académico Profesionales y específicamente la Escuela de Ingeniería Agroindustrial tienen la responsabilidad de generar tecnología para producir recursos económicos dentro de la Región, esto se logra al optimizar el uso de recursos naturales de manera sostenible y que se sean útiles para dar solución a la generación de recursos económicos.

-+

Respecto a la justificación ambiental; Los ambientes naturales son hábitats



únicos donde es posible que existan especies de microorganismos con recursos renovables novedosos adaptados a condiciones particulares. Dichas especies constituyen una fuente de generación de metabolitos y enzimas con capacidades metabólicas diversas y podrían funcionar en distintos rangos de temperatura y pH, siendo posible aprovechar los procesos biotecnológicos (Herbert, 1992). Por ende, es posible que, en los suelos del Santuario Nacional del Ampay, en la superficie de bosque primario existan microorganismos con capacidad metabólicas, útiles en amplia gama de procesos ambientales o industriales y que es necesario describir e investigar.

Respecto a la justificación tecnológica; la Biotecnología ofrece múltiples alternativas de aprovechar la energía al menor costo ambiental, una de ellas es utilizar la energía solar que por medio de la fotosíntesis genera biomasa vegetal, la cual está represente en el cultivo de materiales celulolíticos de las plantas que generan energía (Sánchez y Cardona, 2005). Lo que se busca es aprovechar esta energía guardada en la biomasa vegetal de los ambientes naturales, para poder generar bienes y servicios.

Respecto Justificación social; En este sentido con el apoyo de asesoramiento técnico, la utilización del laboratorio de Biotecnología Agroindustrial de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, y la autorización resolutive del Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado, para la exploración de especies del Santuario Nacional del Ampay, con resolución N° 003-2016- SERNANP-J. Se tomó la iniciativa en investigación estudiar la producción de enzimas de este ambiente natural endémicos de sus pisos y habidad en general, debido al alto costo de enzimas comerciales, de esta manera se estaría abriendo una oportunidad importante para los pobladores de la región, ya que puede escalar la producción a un nivel comercial, siempre y cuando el estudio demuestren que las cepas de basidiomicetos procedentes del Santuario Nacional del Ampay produzcan actividad enzimática celulolítica total (FPAsa) y sean significativas.



CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

Cuantificar el potencial de producción de enzimas celulolíticas de cepas seleccionadas de basidiomicetos procedentes del Santuario Nacional del Ampay

2.1.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la biomasa generada de cinco cepas seleccionadas de basidiomicetos, procedentes del Santuario Nacional del Ampay, en un sistema de cultivo por adhesión de superficies (Biopelícula).
- Cuantificar la actividad enzimática celulolítica total (FPAsa) de cinco cepas seleccionadas procedentes del Santuario Nacional del Ampay.
- Determinar la mayor productividad enzimática celulolítica de las cinco cepas de basidiomicetos, procedentes del Santuario Nacional del Ampay, en condiciones de laboratorio.

2.2 Hipótesis de la investigación

2.2.1 Hipótesis general

Es posible cuantificar el potencial de producción de enzimas celulolíticas de cinco basidiomicetos procedentes del Santuario Nacional del Ampay

2.2.2 Hipótesis específicas

- Un cálculo de diferencia de pesos permitirá cuantificar la biomasa generada de basidiomicetos, procedentes del Santuario Nacional del Ampay, en un sistema de cultivo por adhesión de superficies (biopelícula).



- Haciendo un análisis cuantitativo será posible determinar la actividad enzimática celulolítica total de las cinco cepas seleccionadas provenientes del Santuario Nacional del Ampay
- Con la comparación final de los datos de productividad enzimática celulolítica de las cinco cepas de basidiomicetos estudiados en condiciones de laboratorio, se podrá determinar la mejor cepa productora de enzima.

2.3 Operacionalización de variable

Tabla 1 — Operacionalización de variables

Tipo de variables	Denominación	Definición conceptual	Indicadores	Índices
Variables independientes	Basidiomicetos del Santuario Nacional del Ampay	Hongos macroscópicos, fuente de metabolitos secundarios capaces de degradar la celulosa.	Código asignado de basidiomicetos	BSNA-LB- 001 BSNA-LB- 002 BSNA-LB- 003 BSNA-LB- 004 BSNA-LB- 005
	Condiciones experimentales de reacción enzimática	Factores experimentales en la reacción enzimática	Temperatura pH	50 y 60° C 4.8 y 8.4
Variables dependientes	Actividad celulolítica Total (FPAsa)	Cantidad de moles formados a partir del sustrato por acción de una enzima.	Unidades internacionales de (FPAsa)	UI/mL
	Biomasa	Cantidad de biomasa formada en el cultivo por adhesión a Superficies	Gramos	g de biomasa/L
	Productividad enzimática	Resultado de la actividad enzimática sobre la biomasa producida, indica el mejor rendimiento (productividad) del sistema de fermentación empleado	Productividad enzimática	UI <hr/> g de biomasa

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

2.1 Antecedentes

- a) Los investigadores Villena G. y Gutiérrez-Correa M. (2003), estudiaron la formación biopelículas con *Aspergillus niger* procesadas en (tela de poliéster como matriz de sujeción), cultivadas a 28°C por 120 horas con 175 rpm de agitación, donde controlaron la relación de producción de celulosa y la generación de biomasa en relación a la fisiología de la enzima. Los investigadores utilizaron la técnica de corrida (ZEM) utilizando microfotografías de microscopía para obtener la estructura de la biopelícula a partir del momento de la inoculación, adsorción de esporas esperando las 120 horas de crecimiento de la biopelícula. En sus resultados obtenidos mostraron tres fases de cómo se da la formación de biopelícula que son: la adhesión, la fase de crecimiento inicial de desarrollo y finalmente la fase de maduración de la biopelícula; también, evaluaron la actividad enzimática en celulosa de las biopelículas, viéndose un resultado de 40% mayor distinto a los cultivos sin soporte de crecimiento, obteniendo por la técnica del sistema de adhesión a superficies un aumento del 55% en la productividad que al utilizar un sistema sumergido o libre.

- b) De la misma manera, Morales (2006), realizó un estudio sobre aislamiento, selección y evaluación de actividad celulolítica de cuatro cepas de hongos nativos de Costa Rica. En su estudio muestra herramientas y procedimientos que utilizan pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar la actividad de las enzimas celulolíticas de hongos originarios. Sus resultados indicaron una tendencia decreciente actividad enzimática relativa (U/mg) durante seis días en medio líquido con celulosa microcristalina como de carbono. Los resultados dieron 1,024 U/mg en actividad enzimática total (FPAasa) para estos hongos nativos que son sumamente interesantes, justificando la necesidad de estudios posteriores a la investigación de optimización, condiciones de cultivo, fuentes de carbono, cultivos de crecimiento para aporte de su región



- c) Así mismo Gaitán y Pérez (2007), aislaron y evaluaron organismos que degradan vegetales frescos y en descomposición de la celulosa de crisantemo. Los organismos aislados de residuos de crisantemo que presentaron actividad enzimática fueron 08 cepas de mesófilos. Las cepas fueron evaluadas cualitativamente observando el revelado de los halos de hidrolisis utilizando una técnica colorimétrica (revelado de rojo Congo), utilizando 1% p/v de carboximetilcelulosa. Para definir la actividad celulolítica se utilizó la técnica de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), obteniéndose una sola cepa para estudios posteriores con otros de hongos. Los microorganismos aislados en consorcios son *Bacillus sp.* y *Streptomyces sp.*, para los azúcares reductores se utilizó la técnica de (DNS). De los resultados mostraron que el vegetal de crisantemo se degrada cuando los consorcios de microorganismos tienen una acción sinérgica entre sus enzimas. Así en medio SV se dio la mayor liberación de azúcares reductores con un valor de 1.665 g/L y una actividad enzimática de 0.1056 UC.
- d) Montoya (2008), en su trabajo: para determinar la actividad enzimática de gradación de residuos orgánicos y determinación de biomasa generada del macromiceto *Grifola frondosa*, desarrollada en el país de Colombia, tuvo como objetivo el cuantificar la actividad enzimática del hongo macromiceto *Grifola frondosa*, teniendo como resultado que la endoglucanasa y la exoglucanasa son las enzimas más activas, y la β -glucosidasa menor actividad presente en condiciones de cultivo, viéndose también que el aserrín de roble presenta mayor actividad para sustratos manejados. Finalmente, expresó que el hongo macromiceto *Grifola frondosa* no se desarrolló en sustrato con borra de café.
- e) Izarra *et al.* (2010), evaluaron la producción de celulasas y xilanasas con *Aspergillus niger* en cultivo sumergido analizando la concentración del inóculo, se usó en la investigación como fuente de carbono 10 g/L de lactosa para medio de crecimiento, matraces de 40 mL y 250 mL inoculados con medio al 3% (v/v) 10^4 y 10^8 esporas por mililitro de suspensión de esporas, luego se incubó a 28°C y 175 rpm durante 120 horas. por cada ensayo determinaron lactosa residual, la proteína extracelular soluble, la cantidad de biomasa, xilanasas y actividad de celulasa total (FPAasa) durante 24 horas. Notaron que el diámetro de color de pellet, pero no cambios en la morfología de los hongos, las productividades volumétricas de celulasa (8.2 y 8.0 UI*L⁻¹*H⁻¹ para 10^4 y 10^8 esporas *mL⁻¹, respectivamente) fueron iguales para ambos al inocularlos.

- f) Moya (2011), en su investigación, utilizó como sustratos: celulosa microcristalina y tusa de palma de aceite (*Eleaéis guinensis jacq*). para determinar la capacidad celulolítica in vitro de una sociedad de hongos procedentes del bosque y alto andino de Colombia. Los hongos de género *Penicillium*, Sp (B7, B11, B11M, B19) reportaron mayor actividad enzimática, en sustratos artificiales. Para determinar la actividad celulolítica cualitativamente y cuantitativamente sobre tusa de palma en descomposición se utilizó cepas aisladas (TA1 y TA2). También evaluó la actividad hidrolítica de tusa y celulosa de los hongos producidos por las cepas individualmente, determinándose la actividad enzimática celulósica de consorcios de hongos co-cultivados a 60 y 300 horas de incubación, 28°C, 150 rpm de agitación, se obtuvo curvas de proteínas totales y actividad endogluconasa, exogluconasa y β -glucosidasa. Utilizando un diseño factorial de fuente de carbono (celulosa y tusa) como factor principal y (seis) cepas como factor secundario. (ANOVA) de 0.05 de significancia y ayuda de un programa estadístico SAS. Viéndose que la cepa B19 de género *Penicillium sp.* la que tuvo la mayor actividad endogluconasa y exogluconasa y la celulosa microcristalina el sustrato que provocó la mayor actividad enzimática, el hidrolisis de la tusa fue favorecido por los consorcios de hongos de B11-B19, B11M-B19 y TA1-B19, los cuales alcanzaron aumentos de la hidrolisis de más del 400%, 53% y 86% diferente de cultivos con hongos sin consorcio.
- g) Por otro lado, Sandoval, Manjarrés y Piñeros (2011), desarrollaron un estudio en fase sólida sobre residuos de palma como sustrato, utilizando *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp* en cultivo individual. para evaluar el complejo enzimático de estos hongos. Teniendo como objetivo de investigación mejorar el procesamiento de la palma de aceite en Colombia, para el uso en la industria, los mismos que son ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, los residuos de palma fueron inoculados biológicamente con *Pleurotus ostreatus*. En un tiempo de 20 días para deslignificarlos en favor de la producción de celulasas. las actividades celulosas total (FPAsa), endogluconasa (CMCasa) y β -glucosidasa (celobiosa) se evaluó durante 16 días de cultivo a temperatura de 30°C. el mayor resultado tuvo la cepa de *Aspergillus sp.*, rcon un valor de 0.149 UI.ML-1 de FPAsa, 0.329 UI.ML-1 de CMCasa y 0.148 UI.ML-1 de celobiohidrolasa individualmente. No obstante, en los primeros 9 días y posteriormente de sembrar en co-cultivo con *Aspergillus sp.* resulto ser benéfico al evitar el decrecimiento de la actividad enzimática después de alcanzar su máximo nivel. *Trichoderma sp*, obteniendo valores 0.112 UI.ML de FPAsa, 0.140 UI.ML de



celobiohidrolasa y 0.311 UI.ML-1 de CMCasa

- h) De igual manera Camacho (2015), en una investigación titulada identificación y caracterización morfológica de basidiomicetos procedentes del Santuario Nacional del Ampay con potencial Agroindustrial, tomo como metodología la recolección de muestras in situ, mediante una comparación morfológica de basidiomicetos ya identificados. Se recolectaron 50 g de muestra de cada variedad del Santuario Nacional del Ampay de una manera aleatoria, se transportó los hongos en cooler en bolsas siploc, los cuales pasaron cada uno por un lavado, desinfección, corte y acondicionamiento. Finalmente, de las 20 cepas identificadas y caracterizadas 11 fueron codificados y debidamente conservados, con la finalidad de utilizar cepas para posteriores estudios de interés de los estudiantes e investigadores en general.

3.2 Marco teórico

3.2.1 Diversidad biológica de un bosque primario

La diversidad biológica abarca la variedad de formas de vida existentes en los pisos ecológicos y la diversidad genética y los roles que desempeñan, la diversidad permite que las especies evolucionen en los bosques primarios y se adapten de una manera dinámica a los fuertes cambios ambientales, aun así- sigue el reproduciéndose muchas veces para beneficio del ser humano y las necesidades de servicio (FAO, 1989).

El 52% del territorio nacional en el Perú ocupan los bosques naturales primarios, son llamados de esta manera por que mantienen intacta su naturaleza y ecosistema por no sufrir alteraciones producto del ser humano. Sin embargo, en algunos estudios los científicos señalan la no existencia de bosques primarios, porque ya todos han sido alterados de alguna forma, pero que mantendrían buena conservación.

Actualmente el Santuario Nacional de Ampay (SNA), conforma el sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (SINANPE) fue nombrado decreto supremo N° 042-87-AG, con fecha 23 de julio de mil novecientos ochenta y siete, administrado por el INRENA y el SERNAMP. Ubicado en el

departamento de Apurímac la provincia de Abancay, distrito de Tamburco. Con una altitudinal que va desde los 2,900 a los 5,235 m.s.n.m y su extensión es de 3,635.50 hectáreas, conformando una “isla biológica”. Además, forma parte del unir los picos de los andes del sur y la Cordillera de Vilcabamba. Dentro de su vegetación la Intimpa (*Podocarpus glomeratus*), forma bosques inmensos de manchales , formando hermosos parajes, también se encuentran los gigantes (*Lupinus sp.*) llamados chochos de flores azules y los (*Calceolaria sp.*) conocidos como zapitos de flores amarillas, orquídeas, hongos de diversas variedades, formas y colores

3.2.2 Características de la celulosa

La molécula más abundante de la naturaleza y es la celulosa es y constituyente principal la pared celular de la biomasa vegetativa, que provee fuerza mecánica, flexibilidad y resistencia a la descomposición biológica y química. A pesar de las diferencias en la estructura de la anatómica y composición de las plantas, el contenido de celulosa del peso seco en general presenta un rango de 35% a 50% (Lynd et al. 2002); sin embargo, en algunos está presente en estado puro (fibra de algodón).

Una fuente renovable abundante en la enzima celulosa es el carbono renovable. este carbono esta limitado y no es fácilmente accesible en los microorganismos que hidrolizan las enzimas, formado parte del sistema denominado celololítico o sistema celulasas. (Chiang, 2007; Zhang y Lynd, 2004).

La celulosa tiene estructura física helicoidal en forma de cadena y, los enlaces de puentes de hidrógeno ayudan a mantener la conformación plana y lineal (Huber, Iborra y Corma, 2006; Lima, 2005). desde 100 a 15 000 unidades de D- glucosa forman la celulosa unidos y ordenados linealmente por enlaces del tipo β -1,4 glucosídico, (Lehninger, Nelson y Cox 2008). La celulosa también de caracteriza por qué presenta regiones cristalinas como también, una pequeña parte de las cadenas se encuentra poco organizada formando una parte sin forma dispuesta a la degradación enzimática (Fan y col, 1987; Cowlingy, 1976).

Aproximadamente 30 moléculas propias de celulosa en la naturaleza de la celulosa se organizada en unidades denominadas protofibrillas, ensambladas a su vez en fibras de celulosa (Lynd et al., 2002).



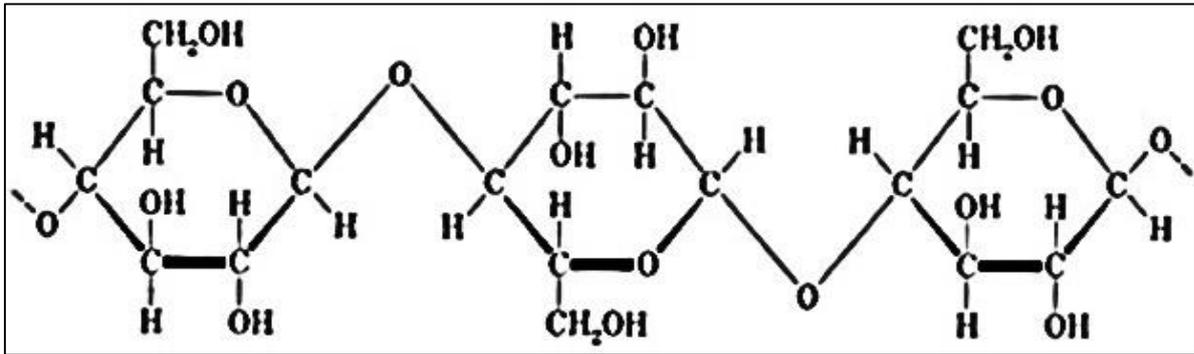


Figura 1 — Caracterización enzimática

Nota. Extraído desde (Fan, *et al*, 1987).

Los puentes de hidrogeno son una unión de las cadenas de celulosa, estas moléculas de celulosa tienen orientación antiparalela. Las interacciones de van der Waals se mantienen gracias a un elevado número de puentes de hidrógeno, varias microfibrillas se agrupan en fibrillas haciendo a la vez una unión muy fuerte a la fibra de celulosa insoluble y muy fuerte a cualquier ataque químico. (Lutzen et al., 1983).

Según (Cowling y Kirk, 1976; Fan y col., 1987). Se desconoce aún la estructura de la fibra de la celulosa, pero hay modelos estudiados que señalan la existencia de cristales por regiones, los cuales se alteran con regiones amorfas al tener alto grado de orden y estas se hacen menos ordenadas. La variabilidad del orden en que aparecen depende de la celulosa y el tipo de tratamiento al que se someta.

3.2.3 Celulasas totales y su mecanismo de acción

La celulasa es una enzima extracelular producida por algunos microorganismos, que poseen acción catalítica de forma específica para algunos sustratos, es un complejo de enzimas inducibles que son sintetizadas por muchos microorganismos durante su crecimiento en materiales celulósicos. La complejidad de las enzimas celulasa se debe a la degradación de la celulosa que esta denomina como glicosil hidrolasas o glicohidrolasas. Estas a su vez hidrolizan polisacáridos y oligosacáridos de moléculas de azúcar. Esta molécula que es la glucosa cumple dos funciones: una rompe los enlaces de hidrogeno libres de la cadena de glucosa para realizar otahidrolisis, y la otra cumple el papel de hidrolizar estas cadenas para formar glucosa y celobiosa (Cortez, 2015).

El sistema de celulasas está conformado por tres enzimas; las Endogluconasas: que tiene la función reducir la polimerización rompiendo la cadena de la celulosa por cortes al azar, dándose la producción de disacáridos, trisacáridos, las exogluconasas: principalmente producen cortes secuenciales en la molécula partiendo de los extremos de la cadena generando celobiohidrolasas exocelobiohidrolasas (Ángelo, 2004) y las β -glucosídicas que son de cadena corta que formando celobiosa y otros β -1,4- oligoglucosídicos produciendo una acción degradativa final de la hidrólisis que es la glucosa. (Moore, 1998).

3.2.3.1 Microorganismos celulolíticos

La transformación biológica para la formación de biomasa celulósica ocurre a través de la hidrólisis, química. y está por enzimas, celulasas, producidas por microorganismos que desempeñan un papel importante del reciclaje (Yang, 2011). Dentro de los microorganismos se encuentran bacterias, actinomicetos y hongos, tanto aerobios como anaerobios, mesófilos y termófilos. Cada grupo de microorganismos de acuerdo con sus características fisiológicas se adapta a algunos materiales en particular y es necesario determinar, de acuerdo con las características de la biomasa, las especies más adecuadas para su manejo.

Los microorganismos degradadores de celulosa incluyen hongos y bacterias, aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos que ocupan una variedad de hábitats, (Aubert, 1988). Entre los hongos celulolíticos se destacan: *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma koningii*, *Sporotrix Sp.*, *Alternaria Sp.*, *Geotrichum Sp.*, *Rhizoctonia Sp.*, *Trametes Sp.*, *Paecilomyces Sp.*, *Mucor Sp.*, *Cladosporium Sp.*, *Bulgaria Sp.*, *Chaetomiun Sp.*, *Helotium Sp.*, *Aspergullus Sp.*

Las bacterias celulolíticas más abundantes y conocidas son las aerobias entre las cuales se pueden citar: *Cellilomonas Sp.*, *Microbispora bispora*, *Thermomonospora Sp.*, *Cytoplagae Sp.*, *Corynebacteriumsp.*, *Vibrio Sp.*, *Bacillus Sp.*, *Pseudonomas Sp.*, *Thermobifidia Sp.*

Además, se encuentran algunos anaerobios como: *Acetivibrio cellulolitycus*, *Butivibrio Sp.*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides siccinogenes*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus Sp.* *Ruminococcus flavefaciens* (Lynd et al, 2002). Entre los actinomicetes destacan: *Streptomyces drozdowiczii*, *Streptomyces cellulololytis* (Semedo et al, 2004; Grigoresvki, et al, 2005; Li 1997), *Thermospora curvata*, *Thermospora chromogena*, *Thermospora alba* y *Thermomobifidia fusca* (Ramirez y Cocha, 2003).

Tabla 2 — Bacterias con alta actividad específica de celulasas.

Microorganismos	Actividad específica (Umol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	pH óptimo
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium</i>	514	5-7
<i>Thermocellum</i> <i>Strptomycetes</i>	428	7
<i>murinus</i> <i>Bacillus macerans</i>	6.7	6
<i>Bacillus sp.</i>	5030	6
	369.6	6

Nota. (Howard et al, 2003)

Tabla 3 — Hongos con alta actividad específica de celulasas.

Microorganismo	Actividad específica (Umol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	pH óptimo
<i>Sclerotium rolfii</i>	475	
<i>Aspergillus niger</i>	194	3.3
<i>Achlya bisexulis</i>	7840	5
<i>Orppinomyces sp.</i>	3659	6
<i>Rizhopus chinensis</i>	4800	5.8
<i>Penicillum</i>	405	ND 4.2
<i>Brefeldianum</i>		

Nota. (Howard et al., 2003)

3.2.3.2 Mecanismo de conversión biológica de la celulosa a glucosa

El mecanismo de acción de las celulasas se muestra en la Figura 2.

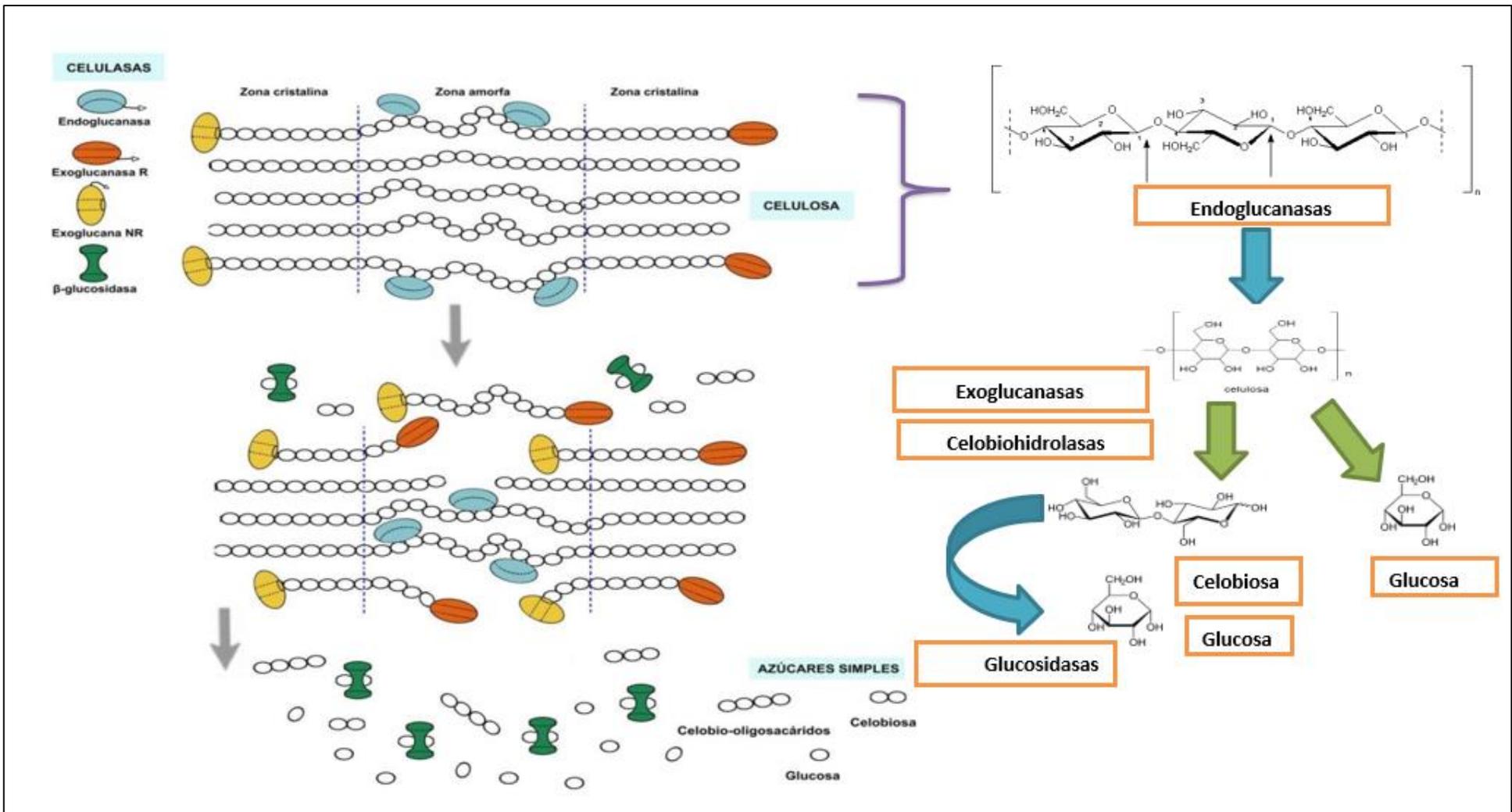


Figura 2 — Acción coordinada de las celulasas sobre la celulosa amorfa y cristalina.

Fuente: (Tamariz, 2014).

3.2.3.3 Determinaciones de la actividad enzimática

La importancia de determinar la actividad enzimática celulolítica es que permite ver la eficiencia y el rendimiento específicamente. Los ensayos para cuantificar la actividad enzimática desde su complejidad de las celulasas se dan de dos maneras: una es para separar individualmente la actividad enzimática de cada enzima, es decir; la actividad enzimática endoglucanasas, la actividad enzimática exoglucanasas y la actividad enzimática β -glucosidasas. Y la otra que mide la actividad celulasa total con denominación (FPAsa), se hace mención también para determinar la actividad enzimática de las endoglucanasas se utiliza la carboximetilcelulosa (CMC) y esta se mide con frecuencia en la celulasa soluble de alto grado de polimerización. (Zhang, et al., 2006). En acción de las endoglucanasas sobre este sustrato celulósico se da la disminución de la viscosidad o el incremento de los extremos reductores determinado -por el ensayo de azúcares reductores.

El papel filtro Whatman (FPAsa) es otro sustrato insoluble para evaluar la actividad de las celulasas total, por otro lado, está la celulosa microcristalina seguido del método analítico del Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Ghose, 1987; Miller, 1959). que cuantifica azúcares reductores producto de la hidrólisis de la celulasa

También existen métodos semicuantitativos siendo la base (la celulosa y el CMC). la actividad endoglucanasa también se puede detectar cómodamente en placas de agar de polisacáridos residuales con diversos tintes de colores, que son adsorbidos por largas cadenas de polisacáridos (Fülöp y Ponyi, 1997).

Los investigadores Teather y Wood (1982), reportaron que el rojo Congo y lo establecieron como método colorimétrico, ya que este podía ser usado en los ensayos evidenciando de esta manera la hidrólisis de polisacáridos ya que este colorante rojo Congo forma complejos con las moléculas aún no hidrolizadas, se observara así aclaramiento alrededor de las colonias, facilitando la diferenciar los microorganismos celulolíticos y no celulolíticos



3.2.3.4 Ensayo de actividad de papel filtro (FPAsa) para celulasas

Este ensayo esta propuesto por la (IUPAC) Unión Internacional de Química Pura y Aplicada Básicamente, este método mide la capacidad de la celulasa para hidrolizar las regiones cristalina y amorfa de la celulosa. Por lo tanto, generalmente se cree que el ensayo de FPAsa es la mejor medida de las actividades tanto del tipo endo y exo en una celulasa, utilizando una tira de (papel de filtro Whatman # 1, 50 mg, 1 X 6 cm) durante 1 hora de reacción en la temperatura dada.

3.2.3.5 Determinación de azúcares reductores por la técnica DNS

Para la determinación de azúcares reductores frecuentemente se utiliza el método del (ácido 3,5 dinitrosalicílico) con las siglas DNS o también se puede utilizar el método de detección de azúcares reductores con poca inferencia a la celulasa pero con alto grado de detección de azúcares, método llamado Nelson Somogy (Percival et al., 2006),

Además, se utiliza glucosa para las reacciones de la inferencia de la celulasa y esta va determinar la obtención de la curva patrón de la calibración del método. por otro lado, la reacción catalítica se dará con el (DNS) ácido dinitrosalicílico (Cortez, 2015).

cualquier método colorimétrico consiste en obtener curvas completas mediante el control directo y continuo de la reacción, primero es necesario realizar una curva patrón que sirva de apoyo en la determinación de la concentración deseada, la curva se elabora con una disolución cuya concentración es conocida (Solís, 2015).

Miller en 1959, cita que técnica del DNS se ve la reducción de azúcares reductores con la presencia de un grupo carbonilo libre(C=O), oxidando la glucosa como grupo funcional de los azúcares (Miller, 1959).

De esta manera el 3,5-dinitrosalicílico que inicialmente es de color amarillo, cambia a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico presentando un color rojo ladrillo producto de la reacción y oxidación, la coloración cambia por la concentración de azúcares reductores presentes, y esta se determina con un espectrofotómetro mediante una lectura de la absorbancia por



densidad óptica. Aplicando la ley de Lambert-Beer Miller, 1959).

Existen condiciones para la utilización de la lectura del DNS que a la vez influyen en la prueba, como el tiempo de reacción, temperatura del agua de calentamiento, transferencia de calor, tiempo de preparación del reactivo, la proporción de glucosa presente los cuales son ignorados al elabora una prueba (Tamariz, 2014).

3.2.4 Los basidiomicetos

El conjunto de hongos generalmente está caracterizado por la diversidad de producción de esporas sexuales, es de allí que su estructura es conocida como basidios, los cuales al madurar tienden a expulsar basidiosporas al medio ambiente en el cual se encuentran.

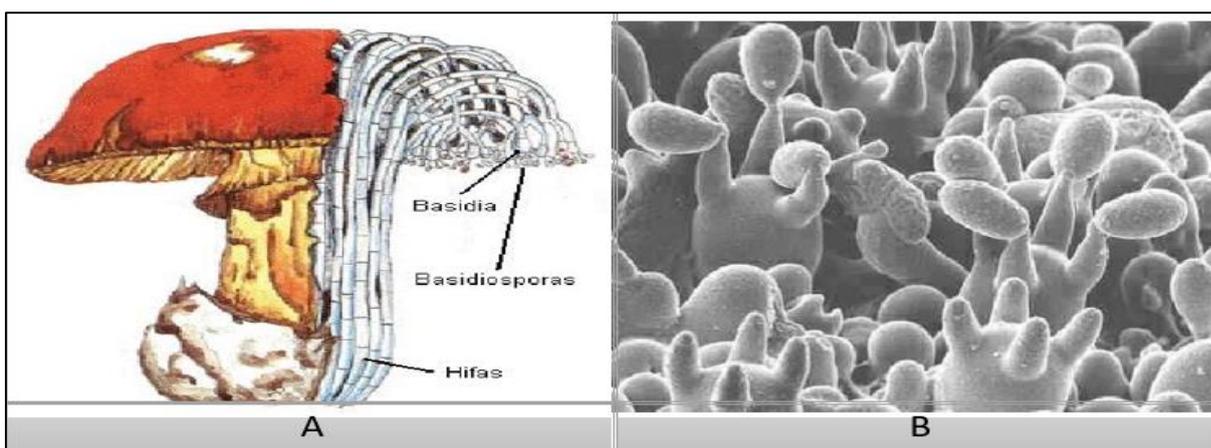


Figura 3 — Estructura del carpóforo de un basidiomiceto, basidias y basidiosporas

Nota. A (Kobold, 2000), B) (Deacon, 2005).

El micelio es producido por el hongo a pesar que estén en condiciones desfavorables, estos buscan acondicionarse al medio, de manera que su alimentación a base de madera u otro tipo de nutrientes. Usualmente estos hongos tienen una forma de abanico, y se presenta de en su mayoría de un color amarillento, blanco o naranja. (Sánchez y Royse, 2002).

Estos micelios pueden formar tejidos en la etapa sexual, así dando lugar a nuevos cuerpos fructíferos de diferentes tamaños, formas, colores y características distintas a cada una de ellas donde algunos pueden ser carnosos, gelatinosos,

corcho, suaves etc.

Estos basidiocarpios pueden mostrar sus basidios desde un principio y pueden estar abiertos o cerrados durante su etapa, de la misma forma estas especies son liberados cuando existe una abertura que seda a través de la desintegración. Estos contienen carbones y royas que son dañinas para los cultivos. Así mismo encontramos algunas especies de hongos que son comestibles y que también sirven para descomponer o desintegran maderas forestales (Sánchez y Royse; 2002).

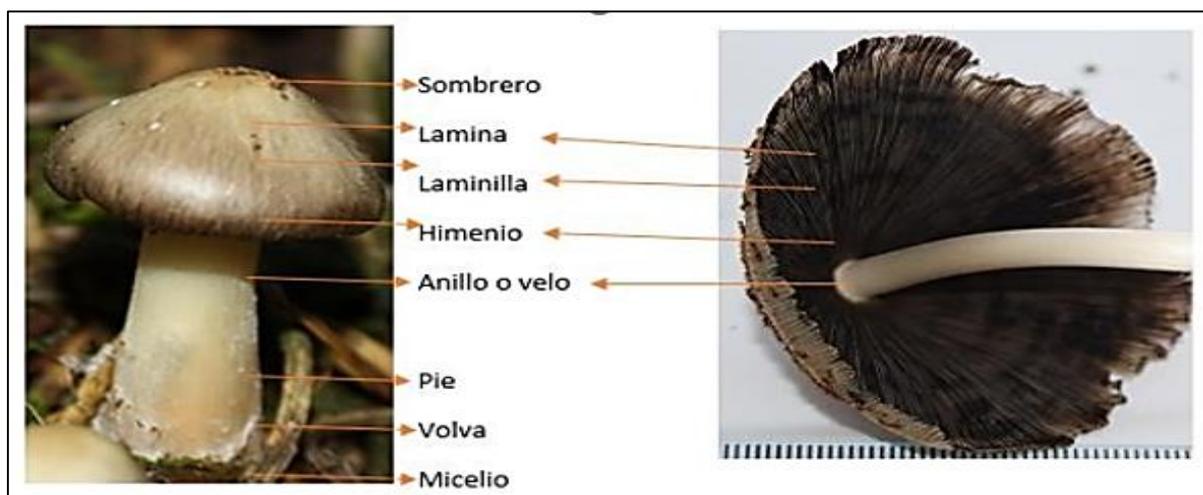


Figura 4 — Esquematización de las partes basidiomiceto.

Nota. (Sánchez y Royse, 2002).

3.2.4.1 Reproducción y ciclo de vida

La reproducción es la continuidad propia de las especies y con características de la misma, y en este caso de las setas existe dos tipos de reproducción según su especie, ya puede ser sexual y el otro es asexual, donde este último que es de tipo asexual no contiene fusión nuclear y se le llama también como vegetativa.

Para dar luz a nuevas cepas puede ser cuando existe una ruptura del micelio poniéndole en una temperatura y humedad que estén en buenas condiciones o también a través del sustrato esto se realiza en los laboratorios para aumentar la reproducción manteniendo las mismas características de los hongos que son comestibles y cultivables.

El hongo que cumple la función de la reproducción de esporas son aquellos que tienen células madres sin embargo los basidiomicetos contienen las mismas que también se le conoce con el nombre de basidios. Este tipo de hongo su forma de reproducción lo realiza cuando las esporas de sus células madres son lanzadas hacia afuera para la multiplicación del mismo. Pero cuando el lugar es favorable y es donde fue depositado las esporas entonces dará luz al micelio

Este se desarrollará bajo tierra, y se mezclará con diferentes esporas del micelio y a si dar lugar a un nuevo micelio secundario, luego se desarrollara, será diferente hasta tener el fructificación. Pero para que exista este tipo de fructificación es necesario que exista una fusión de dos micelios homocarióticos y que sean de la misma especie para que cuando estas dos se separen del punto de contacto puedan construir compartimientos hifales de citoplasma.

Este tipo de micelio heterocarión se desarrolla y multiplica de forma independiente, especialmente en los laboratorios manteniendo las mismas características de producción y con la misma calidad de estos hongos comestibles, para luego ser comercializados a los productores de este tipo de hongos.

Es por ello que existe una diversidad de laboratorios que apuestan, debido a la excesiva demanda que exige el mercado nacional, e internacional, apostando así por el consumo, de este producto. (Sánchez y Royse, 2002)

El suelo que tenga las condiciones del medio favorable donde la humedad es adecuada para el desarrollo de las setas y es por seguro que mostrara a su expulsión de sus esporas hacia afuera dando lugar al origen un nuevo ciclo de vida biológica del hongo. Incluso cuando, si existe cambios en los factores que intervienen para el crecimiento del basidiocarpos como la temperatura del suelo, la humedad etc. (Mendívil, 1996).

En ese sentido claramente se puede apreciar que existe factores

determinantes para que el hongo se desarrolle, dichas condiciones están referidas a la húmedas, el suelo, el clima, el calor entre otros factores que son la razón de dar origen al hongo.

La Figura 5 ilustra el ciclo biológico general de un hongo basidiomiceto.

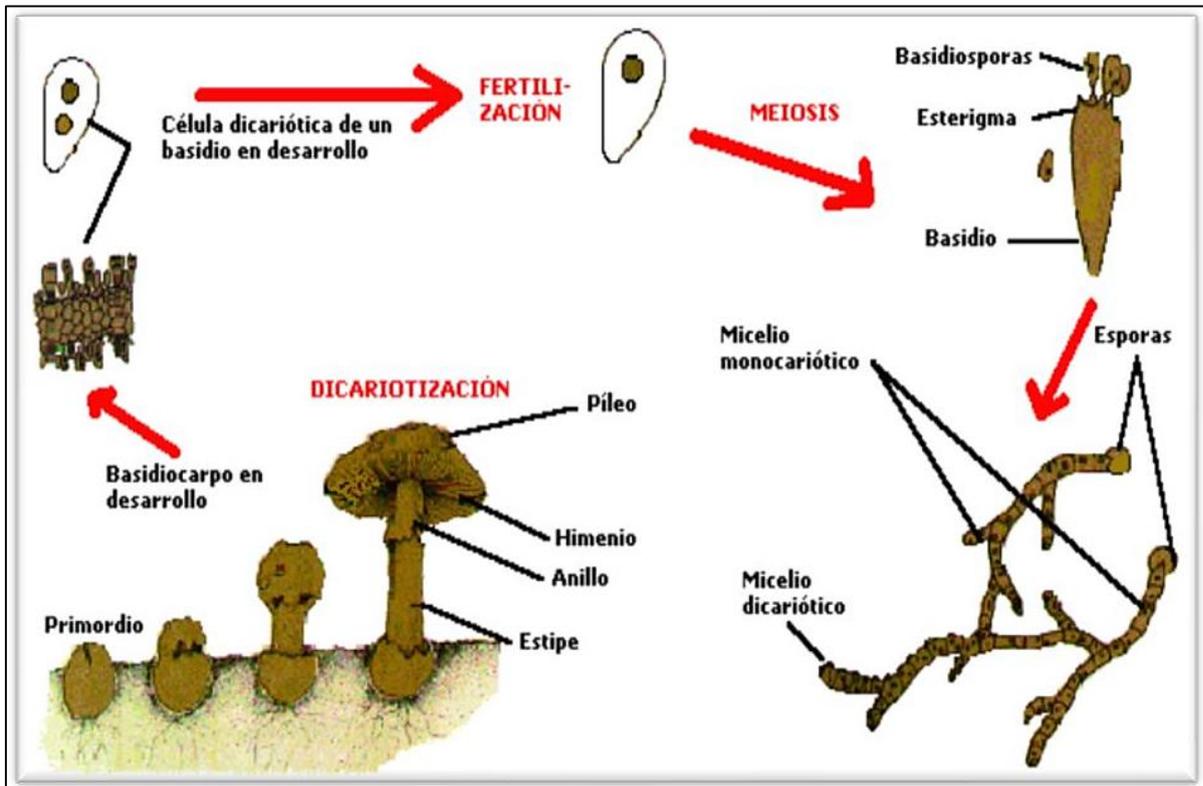


Figura 5 — Ciclo biológico general de un hongo basidiomiceto

Nota. (Mendívil, 1996).

3.2.4.2 Fases de crecimiento

El crecimiento depende de las condiciones para su mayor desarrollo, del micelio puede ser un medio sólido o un medio líquido. Donde si el medio es continuamente agitado podrá alcanzar su máximo volumen de desarrollo sin embargo del medio líquido su desarrollo es de forma típica y solamente surge en la superficie y es parecido a los otros hongos que tienen como fases: Latencia, exponencial, declive, estacionaria y fallecimiento.

La transformación podemos mostrar gráficamente las etapas del ciclo de vida del hongo en una curva que se ilustra en la Figura 5. Cuando se

da el surgimiento de un hongo en sus distintas fases hasta llegar a una etapa de fructificación (Márquez, 1999). Por tanto, esta fase de crecimiento, es muy importante considerar la importancia del cultivo de hongo, de tal forma que teniendo en cuenta que el hongo, si le das una adecuada condición pues este tiende a desarrollarse sin mostrar problema.

a) Fase de latencia

La fase de la latencia se da después que el hongo haya sido introducido en la tierra para su crecimiento y surgimiento durante su desarrollo. Pero si el hongo fue dañado en el momento de introducir a la tierra entonces sus paredes celulares se prepararán para dar nuevas germinaciones para su mejor desarrollo. El tiempo de esta fase varia y también depende mucho de la condición medio ambiental como la humedad, composición de nutrientes del terreno y otras características para el normal surgimiento de estos hongos también tiene que ver mucho el tipo y estado en que se encuentre el hongo y sino resulta esta fase entonces se podría a volver a sembrar para tener mejores resultados. (Sánchez y Royse, 2002).

Por tanto, ciertamente la fase de latencia comprende a la inoculación del hongo, que a pesar que el hongo presente daños pues de este es capaz de crear su pared celular de manera que, lograra adecuarse para poder mostrar puntos que conlleven a su crecimiento. Entonces, en esta fase el cultivo de hongo exige tomar en cuenta el estado fisiológico del hongo y además la composición, ph y la temperatura adecuada o mejor dicho óptimo para su crecimiento.

b) Fase exponencial

En cuanto a la fase exponencial el hongo alcanza a su máximo desarrollo de crecimiento de acuerdo a las condiciones en que este se encuentre como el medio de cultivo. Los hongos tienen una variación en el crecimiento y sirven para realizar algunas

anticipaciones cuando se desarrollan en distintos sustratos y a si tener mejores resultados en el cultivo de los hongos. (Sánchez y Royse, 2002). Esta fase claramente nos indica que el cultivo de hongo muestra una celeridad en su producción, pero, es de consideración tener en cuenta el medio líquido que si es acertado el hongo se adaptara con mucha facilidad, de tal forma que el hongo aproveche, su máximo desarrollo.

c) Fase de declinación

La fase de la declinación se da cuando las condiciones de los nutrientes no son suficientes dentro del cultivo, de los hongos para su normal crecimiento y desarrollo continuo de la misma, donde estos se pueden observar cuando el hongo no alcanza su máximo crecimiento requerido y si se siguen cultivando en estas condiciones es más probable que exista una extinción paulatinamente de la cepa. (Sánchez y Royse, 2002). Pues tener en cuenta la importancia de nutrir al cultivo de los hongos, pues se evita la escasa producción, o disminución, de manera que los prejuicios pueden conllevar hasta la pérdida total de las mismas.

d) Fase estacionaria y muerte

Esta fase es la etapa final del crecimiento del hongo, sin embargo, si el hongo es resembrado nuevamente y en condiciones favorables optimas entonces si puede llegar a crecer, pero el tiempo crecimiento será mucho más largo y también se corre el riesgo de que mueran antes de terminar su desarrollo porque en esta etapa estacionaria existen enzimas que producen la muerte de los hongos (Sánchez y Royse, 2002). Como todo ser vivo los hongos también cumplen con un ciclo de vida, de manera que teniendo los factores favorables para su desarrollo también es importante tener en cuenta las estaciones, de tal manera que en algunas estaciones estos pueden ser claramente condiciones desfavorables para su desarrollo y logrando así su extinción.

En la figura, para medir el crecimiento existe dos métodos alternativos: uno tomando en cuenta el incremento de la biomasa fúngica y el segundo midiendo la variación de la concentración de algún componente celular (la producción del CO₂, etc.). Para la presente investigación del cultivo de hongos tiene un interés de forma particular sobre la rapidez de las germinaciones dentro del sustrato, porque se realiza en forma continua el análisis micelial de la colonia. Para lo cual esto nos ayuda a conocer la temperatura, el pH del terreno de cultivo sin embargo se ha determinado que existe baja utilidad para realizar las predicciones en cuanto la producción de los cuerpos fructíferos y también sobre el cultivo de los hongos. (Sánchez y Royse, 2002).

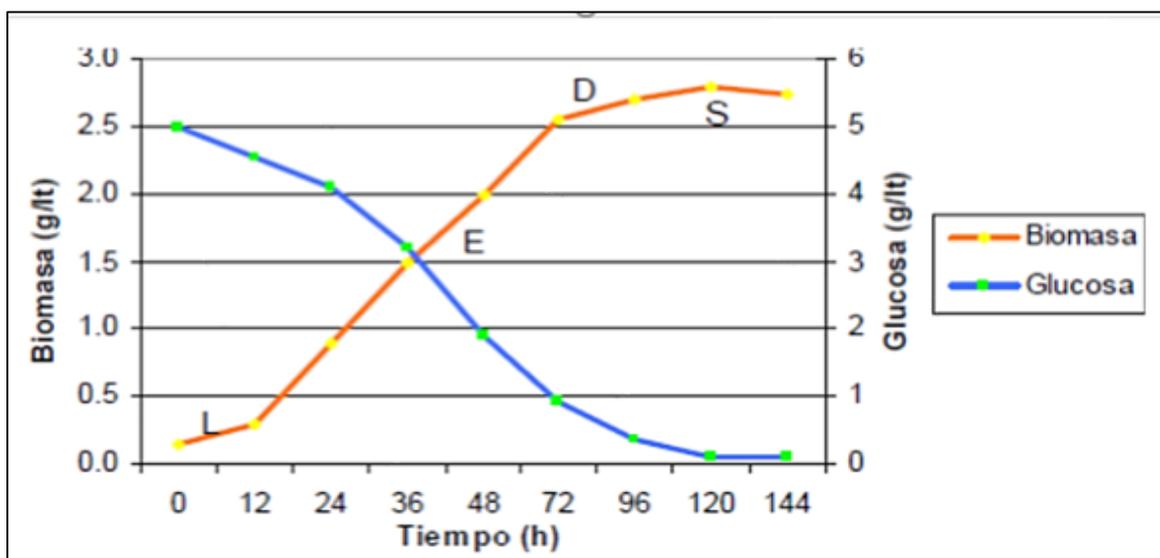


Figura 6 — Fases del crecimiento de un basidiomiceto.

Nota. (Márquez, 1999).

3.2.5 Cultivo de hongos celulolíticos

Desde el punto de vista con Stolovia, Gargova y krastonov, (2005), “el cultivo de microorganismos puede aumentar la producción de ácido acético, el contenido de vitaminas en alimentos fermentados, y la producción de enzimas. Estos autores han reportado que, dependiendo de las condiciones de cultivo utilizado, el cultivo de *Thermoascus aurantiacus* y *A. niger* se encuentra en la actividad lacasa, celulosa, α -amilasa y glucosamilasa en comparación con las concentraciones obtenidas individualmente por cada especie”. En esa misma línea, Gutiérrez y Tengerdy (1997), definen que la importancia de biomasa

celular no está relacionada con las enzimas, aunque estos interactúan. En tal sentido, hacer cultivos de monocultivo genera la buena producción, su adaptación y la utilización del sustrato. En ese sentido los microorganismos son los que transforman los sustratos, pero para ello se requieren grandes poblaciones de estos (Taniguchi y Tanaka, 2004). Por tanto, para la “degradación de la celulosa, los tres componentes enzimáticos, endoglucanasas (EG), celobiohidrolasas (CBH) y β -glucosidasas tienen que estar presentes en grandes concentraciones. Ninguna de las cepas, incluyendo los mejores mutantes, es capaz de producir altas concentraciones de los tres tipos de enzimas al mismo tiempo. Por ejemplo, *T. reesei* produce CBHs y EGs en altas cantidades, pero la actividad β -glucosidasa es baja a diferencia de *A. niger* que produce más β -glucosidasa, pero la EG es limitada” (Dashtban *et al.*, 2009).

3.2.6 Sistemas de fermentación

Un sistema del proceso de la fermentación se puede hacer en forma natural o artificial o también puede existir una clasificación de acuerdo al sustrato que se vaya a utilizar de la misma manera este tipo de fermentación se realiza a través de la utilización de la descomposición orgánica ya que estos microorganismos producen enzimas (Sánchez, 2017).

Para estos sistemas de producción de enzimas lo primero que se realiza es la clasificación de acuerdo a los componentes biológicos que tienen las células y luego pasar a la fermentación donde también existen tres tipos de fermentación como son: “fermentación sumergida” (FS), fermentación por adhesión a superficies (FAS) y fermentación con células inmovilizadas (FCI). A continuación, desarrollaremos cada sistema de fermentación

3.2.6.1 Sistema sumergido (FS)

La fermentación sumergida se da en las industrias, el cual consiste en la producción de microorganismos de estas mismas dándole la suspensión a los nutrientes que están en una forma de partículas sólidas. (Frost y Moss, 1987) Además, de la observación más comunes de los microorganismos que se ocupan del crecimiento puro como la vida unicelular que posteriormente al ser diluido se pueden realizar estudios dentro de un cultivo líquido este tipo de surgimiento está predominado



en un estudio fisiológico microbiana, la patogénesis y los usos en los laboratorios. “Sin embargo, este tipo de fermentación dio lugar después a la producción de la penicilina industrial en la década de 1940 hasta la ingeniería biológica y de los enormes avances en todos los campos de la tecnología de fermentación sumergida” Gutiérrez y Villena 2010 citado por (Cortes, 2015, p. 11)

3.2.6.2 Fermentaciones por adhesión a superficies (FAS)

Este tipo de fermentación es donde los microorganismos crecen dentro de un soporte natural o sintético. Del mismo modo Gutiérrez y Villena (2003), quien inicio con su propuesta de la fermentación por adhesión que explica que los hongos tienen su desarrollo y surgimiento en superficies solidos que pueden ser naturales o sintéticos donde se producen algunos cambios fenotípicos que le ayudan estar juntos constituyendo una biopelícula. En este tipo de proceso, las esporas de los hongos se adhieren a un soporte solido que puede ser de forma natural o también sintético, esto se da gracias sus alimentos como las proteínas que tienen como nombre hidrofobinas que son originadas por los ascomicetos, también los basidiomicetos y por ultimo por algunas zigomicetos. Las hidrofobias compactan la incorporación de las esporas para empezar su desarrollo o crecimiento sobre el soporte constituido en una biopelícula la cual estará inmovilizada lo cual esto ayudará a la recuperación del micelio y así utilizar en otros ciclos de nuevas fermentaciones.

3.2.6.3 Fermentaciones en sustrato solido (FSS)

La fermentación en sustrato solido es producida por microorganismos que generalmente usados para elaboración de nutrientes que son fermentados, en lugares sólidos y con pocas cantidades de agua de la misma forma también tiene que tener mayores cantidades de porosidades esto le ayudara a contraer más agua y mantenerle con una humedad de 30 a 80%, para luego ser alimentos tradicionales de los animales, energizantes, y posteriormente se aumentó su producción o elaboración enzimas, productos farmacéuticos e insecticidas. “Actualmente se adapta a nuevos propósitos, a partir de la cual se han

generado nuevas propuestas para áreas específicas como la Microbiología, la Farmacéutica y la Bioquímica” (Fernández, 2006). Las ventajas de la FFS incluyen la simplicidad, menores costos de producción y alta producción de enzimas (Da costa *et al.*, 2012)

3.2.6.4 Fermentaciones por biopelículas

Este tipo de fermentaciones de las bacterias que posteriormente tienen un desarrollo en forma de biopelículas, se puede indicar que las integraciones de diferentes genes darán origen a nuevos fenotipos de organismos. Aunque las biopelículas bacterianas se realizaron estudios profundos en distintos niveles mientras que a las biomoléculas fúngicas se les dieron menos importancia, de la misma forma dentro de la naturaleza existe una adaptación normal del surgimiento o desarrollo de los hongos filamentosos que se dan en la superficie y es muy diferente el comportamiento fisiológico en cuanto al cultivo sumergido, mientras los hongos adheridos van aumentando de la producción y secreción de enzimas con una diferencia de características que no existen en cultivos sumergidos, sino que se encontraron en cultivos de estado sólido. (Villena *et al.*, 2001)

a) ¿Qué es una biopelícula?

La biopelícula son un conjunto de células de microorganismos que son ligados a la superficie gracias a la expulsión de una sustancia llamada exopolímero donde se caracteriza independientemente por la asistencia de canales internos enseñando un parecido con el surgimiento en las fermentaciones en sustratos sólidos mientras que son notoriamente distintos a la morfología de pellet, característica de la fermentación sumergida (Villena, 2006).

En la actualidad los microbios no pueden sobrevivir de forma solitaria en la naturaleza más por el contrario estos crecen como biopelículas y sus características no son alteradas significativamente sin embargo estos individuos forman un conjunto estructural mostrando algunas características similares de los tipos de células biopelículas, haciendo una similitud con las contrapartes de estos organismos que aumenta el incremento

notable de la tolerancia a agentes físicos como también químicos, y los agentes biológicos. “Uno de los rasgos más llamativos y sistemáticamente presente en las poblaciones microbianas de crecimiento como las biopelículas en su aumento a la resistencia intrínseca a los agentes antimicrobianos” (Harding *et al.*, 2011)

b) Formación de una biopelícula

La formación de la biopelícula se da en tres fases: donde la fase inicial es la adsorción que es favorecida para las esporas a través de la hidrofobicidad, seguidamente es la fase del desarrollo inicial del crecimiento como es la germinación que tiene una duración de 4 y 10 horas para llegar a la superficie y poder observarse la completa colonización luego llegar a su fase de su maduración la cual tiene su incremento en su tamaño, peso de su biomasa desde los 48 horas hasta las 120 horas así aumentándose en un 55% en la producción.

Donde la mayoría de los hongos filamentosos se dan sus crecimientos en la superficie y esto necesita estar siempre cerca del sustrato ya que son sus alimentos de nutrición heterotrófica, secreción de enzimas donde ayudan a descomponer los alimentos que consume el cuerpo humano. (Villena *et al.*, 2001)

“Muchas especies además condicionan su supervivencia a una adecuada adhesión de estructuras de dispersión, principalmente esporas, para una posterior colonización del sustrato” (Jones, 1994)

El consentimiento de las esporas de los hongos tiene que ver mucho con la superficie que son arrugadas y estar en formas líquidas que forman una almohadilla con esporas y con el soporte. (Truong *et al* 2004 y Verma *et al*, 2010), para lo cual estos están bajo los factores medio ambientales, físicos y también químicos, los microorganismos como también las superficies tienen fuerzas negativas que generan repulsión electrostática ya que se puede disminuir con la fuerza de inclinación temporal tipo van der Waals



sin embargo, no está completamente definido para el caso de hongos, el mecanismo exacto de adhesión (Jones, (1994.

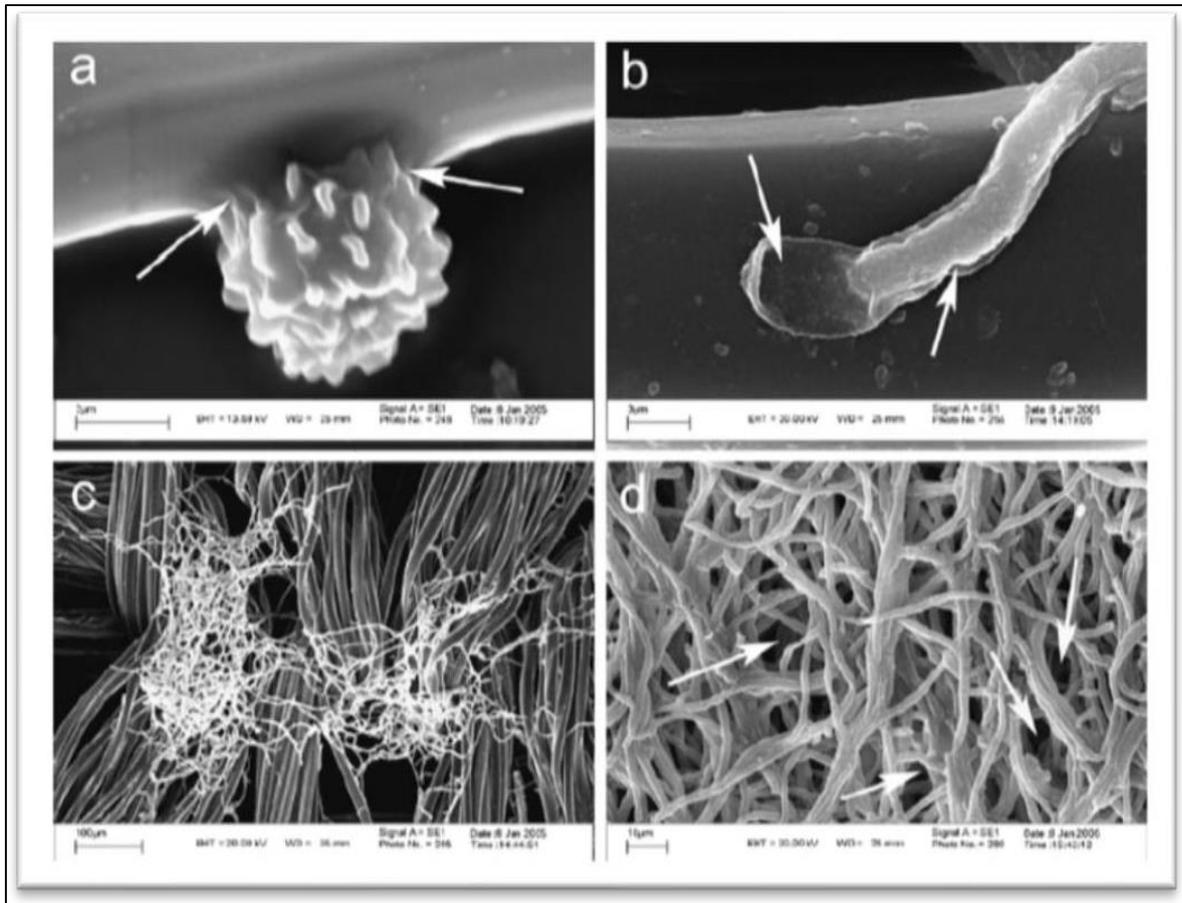


Figura 7 — Microfotografía del proceso de formación de la biopelícula con *A. Niger*.

Nota. (Villena *et al.*, 2001)

En la figura 7, el proceso de formación de biopelículas en *A. Níger* implica:

- Adhesión inicial de esporas a una superficie mediada por sustancias adhesivas (adhesivo pad).
- Generación de esporas y elongación de hifas con producción de matriz extracelular
- Colonización de la superficie y Desarrollo de la biopelícula madura con presencia de canales.

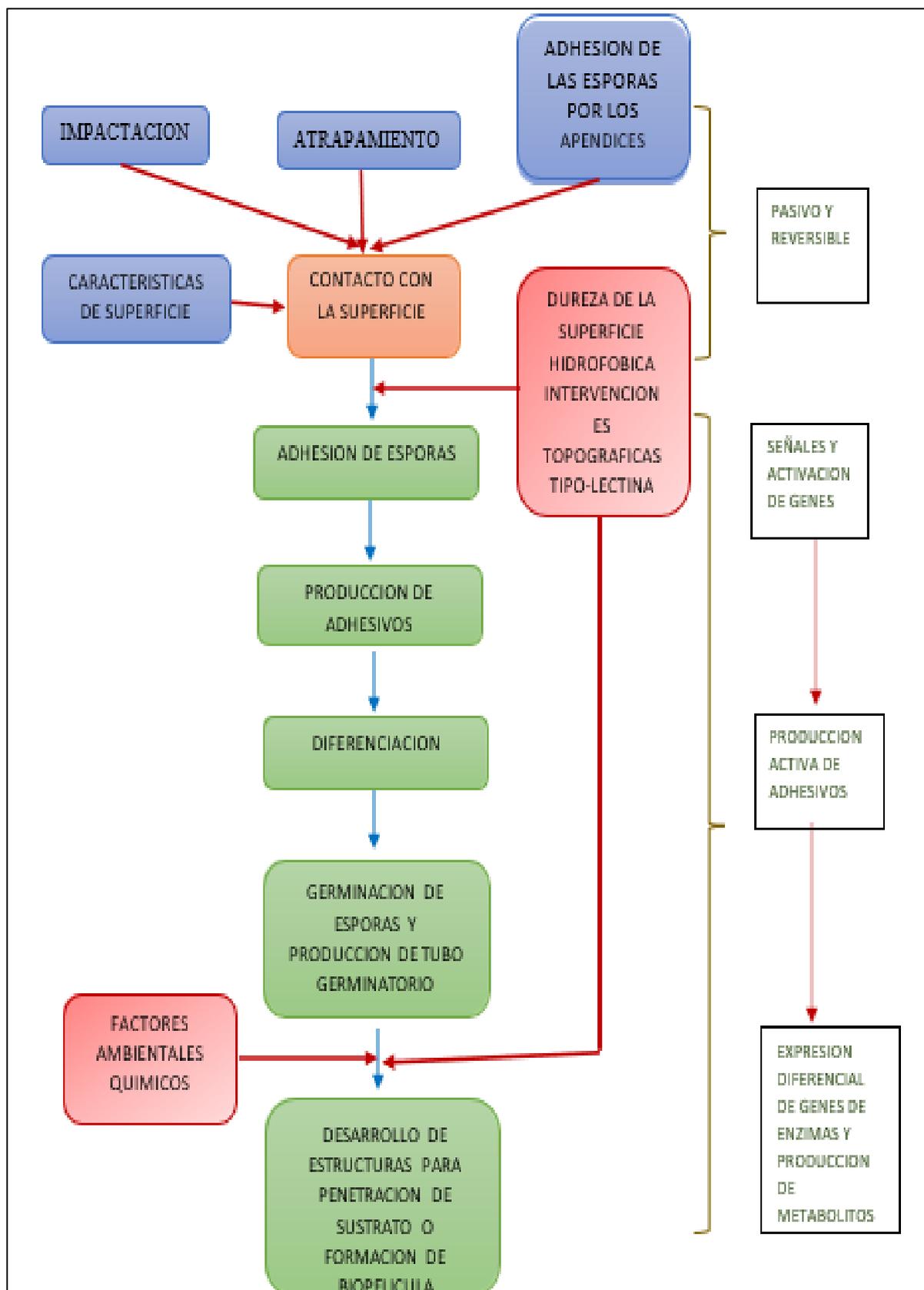


Figura 8 — Proceso de adhesión de hongos filamentosos a superficie

Nota. Proceso de adhesión de hongos filamentosos a superficie.

3.2.7 Aplicaciones industriales del hidrolisis de la celulosa y sus productos

Los estudios realizados en los años setenta sobre la hidrolisis enzimática de celulosa, en estos tiempos encontraron varios estudios que detectaron falencias en la parte técnica y también económica que tiene que ver mucho con el proceso. Un estudio realizado por Mandels y Andreotti quien quiso averiguar sobre la existencia que hay de las limitaciones y las falencias que existe durante el proceso de la fermentación de la producción en cantidades grandes de las celulosas, para lo cual se pudo detectar que existe pocas cantidades que estén disponibles de los sustratos que serían apropiados y también los tratamientos son muy costosos de misma forma también son muy costosa la adquisición de las enzimas. (Mandels y Andreotti, 1978). quien menciona que durante las tres décadas transcurridos se llegaron a superar esas dos limitaciones que existieron.

Para seguir elaborando la producción de enzimas sus costos siguen siendo una limitante y esto afecta mucho en en las industrias que se encargan de producir los azúcares solubles. De la misma manera existen otras dificultades para la producción de hongos de género *Trichoderma* debido a que su sistema de celulosas es deficiente en celobiosa. La acumulación del disacárido celobiosa, que crea fuerza para impedir de las enzimas que son producidos en el producto final y la consecuencia de limitancia sobre la síntesis actividad de las enzimas. (Zaldívar *et al*, 2001).

Para poder hacer la elaboración de glucosa a partir de celulosa que se produce a través de un conjunto de enzimas también conocidos como hidrolasas, que exista una viabilidad del proceso financieramente y se dieron más importancia a los estudios de investigación y acción. Para el aumento y mejoramiento de la actividad enzimática tuvo que ver mucho con la contribución de diferentes factores y a si tener un crecimiento de cinco a quince del estado actual.

Para lograr el propósito se propone:

- Perfeccionar la sustancia para aguantar los cambios de la organización química ya sea por desintegración del complejo enzimático; a una temperatura elevada que se da un incremento exponencial de la actividad enzimática ya que este proceso ayuda a mejorar el proceso.



- Reducir el emparejamiento de las enzimas-sustratos no productiva para esquivar la densidad hacer toda de las enzimas se observa la reducción de la interrelación, por lo cual no sucede con la hidrólisis celulosa.
- Incrementar la constante catalítica de la celulosa, a través una mejor cooperación entre los elementos más complicados celulolítica.
- Para impedir y disminuir la retroalimentación, lo que permita la mayor comprensión en el diseño de procesos y así conseguir materias primas de menor costo para la producción de celulosa.

En cuanto al proceso de producción de las enzimas son influenciados por las variables para la disminución de los costos, el tipo de materia prima, la tasa de expresión de la proteína y el tiempo de fermentación (Hettenhaus, Glassner; 1997).

Los hidrólisis de celulosa se producen azúcares a través de las fermentaciones donde estos son aprovechados en diferentes tipos de usos debido a los precios altos de la gasolina, estos son derivados de la fermentación de los carbohidratos y luego se producen el etanol y darle su utilidad como combustible. En el siglo IX utilizaron los tiramientos con ácidos fuertes en los desechos de madera, también se podía tener mezclas de azúcares fermentable. En el 1990 también se descubrió que la dextrosa es convertida a través de la aplicación del ácido sulfúrico en las maderas. “Desde entonces varios procesos han producido rendimiento de 16 a 40 galones de etanol al 100% por tonelada de madera seca” (Johannensen, 1991).

Los crecimientos de los microorganismos se dan cuando están dentro de la mezcla de los azúcares, y las levaduras fermentan a los azúcares de cinco carbonos de la misma forma la producción de las glucosas son generalmente fermentadas por la levadura, y la bacteria *Xymomonas mobilis* este tipo de bacterias son más usadas por las industrias que se encargan en la producción de gaseosas o bebidas que contienen alcohólicas. Las fases de fermentación se dan en forma desunida por lo que tienen dificultades para su aprovechamiento de

todos los materiales biomásicos ya que la celulosa es el origen de los azúcares de menor costo, la cantidad de uso de este material influye de manera significativa a los costos de producción de etanol. (Johannesen, 1991)

La producción del etanol se consigue mediante el uso de enzimas a la hidrólisis del material lignocelulósico, esto se hace solo para reemplazarlo la fase de la hidrólisis ácida. Esto se conoce como hidrólisis y fermentaciones separadas (HFS). Una transformación importante al proceso de hidrólisis enzimática de biomasa fue la introducción de la sacarificación y fermentación simultánea (SFS), sin embargo, fue mejorando recientemente para incluirlo en la cofermentación de diferentes azúcares. En el proceso SFS se mezcla la celulosa y los microbios fermentadores; al momento de elaborarse los azúcares simples lo cambian a etanol (Johannesen, 1991).

2.1 Marco conceptual

- a) **Biomasa.** La biomasa es una energía que son producidos a través de la vida biológica de los vegetales, animales y también de los desechos que son de origen orgánico. Donde todas estas energías son aprovechados como nutrientes y también pueden ser utilizados como combustible.
- b) **Hidrólisis de la celulosa.** Es el proceso catalizado, producto de las enzimas que se denominadas celulasas, cuya finalidad es la desintegración de la celulosa. (Gómez, 2008).
- c) **Enzimas.** Son proteínas dificultosas que tienden a realizar cambios químicos, cuya función es catalizar las reacciones que realizan los seres vivos. También son altamente selectivas para la reacción que catalizan. Estas se unen a un sustrato y lo biotransforman. Específicamente, hidrolizan y sintetizan un compuesto en particular. En algunos casos, su acción está limitada a ligaciones específicas dentro de los compuestos con los cuales ejercen reacción. (Vargas, 2006)
- d) **Enzimas celulolíticas.** Las enzimas celulolíticas son compuestos de los seres biológicos de naturaleza proteica que se especializan en el desdoblamiento de la



celulosa en partículas de glucosa, al reaccionar específicamente en el enlace 4,1 β glucosídico (Pelczary, 1984) que corresponden a preparados celulolíticos desde los microorganismos como hongos aeróbicos o también podría ser como termófilas.

- e) **FPAsa.** Se denomina de esta manera a la metodología para determinar la actividad enzimática total celulolítica de una muestra, las siglas corresponden al nombre en inglés (filter paper assay), y fue estandarizada y aceptada por la International Unión of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (Ghose, 1987).

- f) **Azúcares reductores.** Los azúcares reductores son aquellos que provocan desorden de las proteínas mediante una reacción de Maillard. Estos reductores poseen un conjunto de carbonillo y también a través del mismo reacciona como oxidantes, donde estas características que posee ayuda a conocer la gran cantidad de azúcares que tiene mediante una disolución para medir la cantidad del oxidante que es disminuido, así como sucede en de conocer la cantidad de glucosa en la metodología del reactivo DNS, (Lehninger, 1988).



CAPÍTULO IV DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de la investigación

Según su finalidad, el tipo de investigación es básica, puesto que se pretende incrementar el conocimiento existente sobre los basidiomicetos procedentes del Santuario Nacional del Ampay y su potencial como productores de celulasas.

Según a los factores de estudio, el tipo de investigación es de tipo Experimental ya que se va a ver cómo actúan las variables independientes (basidiomicetos, condiciones experimentales) sobre la variable dependiente (actividad enzimática celulolítica total, consumo de fuente de carbono y la productividad volumétrica (Causa- efecto).

4.2 Diseño de la investigación

Para la presente investigación se utilizó el método científico experimental, basado en un diseño factorial, el cual se expresa de la siguiente manera: 2X2X5 (se ha manipulado dos pH, dos temperaturas y cinco códigos de basidiomicetos), haciendo un total de veinte tratamientos experimentales, cada tratamiento se realizó por triplicado, para poder trabajar la parte estadística de la experimentación 1(véase anexo 2-2.1).

Los pHs alcalino y ácido son referencia que determinaran en que condición (ácida o básica) se puede trabajar la aplicación de las enzimas. Para el cual se manipulo equipos e instrumentos del Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

4.3 Población y muestra

4.3.1 Población

La población de trabajo para la investigación de cuantificación de la actividad enzimática celulolítica total (FPAsa) fueron cepas de basidiomicetos tomadas del laboratorio de biotecnología agroindustrial de la escuela académica



profesional de ingeniería agroindustrial.

4.3.1.1 Tamaño de la muestra

Se trabajó con cinco cepas de basidiomicetos seleccionadas con una técnica de barrido (screening) cualitativo. Cultivándose a 48 h en agar celulosa. la actividad celulolítica se evidenció utilizando reactivo Rojo Congo siguiendo la metodología propuesta por Teather y Wood en 1982.

4.5 Procedimiento de la investigación

La presente investigación comprende de ciertas etapas, así como se puede apreciar en la tabla a continuación:



Tabla 4 — Esquema de experimentación de las etapas y operaciones de las cinco cepas en estudio.

ETAPAS	ETAPA I				ETAPA II		
Operaciones	Acondicionamiento	Inoculación	Cultivo	Cosecha	Análisis	A. E	
Cepas de hongos basidiomicetos							
Parámetros	*Limpieza	*Concentración de inóculo 10^6 esporas/mL * 3% de inóculo	*Biopelícula *Tiempo= 72hr *Temperatura=28°C *pH; 5.5 *Velocidad de agitación=175rpm	*Filtración: papel filtro de paso rápido *Refrigeración:4° C	T°=50°C T°=60°C pH=4.8 pH=8.4	Congelación -20°C	
Control	*Esporulación *Forma *Color	*Temperatura (T°) *pH	*Contaminación	*Biomasa * pH	*Productividad volumétrica *Actividad enzimática (FPasa)		

4.5.1 Etapas de experimentación

4.5.1.1 Etapa I

a) Conservación de los basidiomicetos

Los cuerpos fructíferos de basidiomicetos colectados anteriormente para diversos tipos de estudios en el laboratorio de Biotecnología Agroindustrial de la Escuela Profesional de Ingeniera Agroindustrial, fueron conservados a -18°C en placas y en tubos inclinados en un medio de mantenimiento cuya composición fue la siguiente: extracto de malta (20 g/L), benomil (0,004 g/L), tetraciclina (0,4 g/L), y agar nutritivo (15 g/L), y que cada 20 días son repicados para evitar la deshidratación del medio.

b) Acondicionamiento

A los basidiomicetos conservados en el laboratorio se les realizó pruebas preliminares, o pruebas de barrido (screening), esta prueba es de tipo cualitativa y se basa en la decoloración del colorante rojo congo el cual evidencia una actividad enzimática, esto se realizó para seleccionar cinco cepas que mejor respuesta cualitativa brindaron en cuanto a producción de celulasas en forma cualitativa. Para este procedimiento se siguió el siguiente procedimiento; se contaron con placas que contenían los hongos según el procedimiento descrito, a estas placas se les saco un disco de 5 mm de diámetro con ayuda de un saca bocado de las placas con basidiomicetos. Este disco se coloca en el centro de una placa que contiene medio celulosa (Celulosa Alimentaria 10 g/L, peptona 2,5 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L, Cloruro de calcio 0,5 g/L, Fosfato dibásico de potasio 0,1 g/L, Fosfato monobásico de potasio 0,1 g/L, Sulfato de Amonio 0,5 g/L, Agar 15g/L). Las placas se incubaron a 28°C , y fueron evaluados cada 24 h para evaluar halos de inhibición que indicaron presencia de celulasas, las placas se sembraron por triplicado para cada hongo. Esto ayudo a seleccionar las cinco cepas más productoras cualitativamente de celulasas.

Luego a estas cinco cepas preseleccionadas, se les cultivo en un agar selectivo el cual contiene (extracto de malta (20 g/L), benomil (0,004 g/L), tetraciclina (0,4 g/L), y agar nutritivo (15 g/L)), para obtener hifas nuevas y biomasa, así poder preparar el inóculo correspondiente.

c) **Formación de biopelícula**

Para la formación de biopelículas de las cepas seleccionadas, se siguió el procedimiento descrito por Villena y Gutiérrez-Correa (2006) con algunas modificaciones, que incluyen que los propágulos miceliales fueron desarrollados mediante la inoculación de tres discos de agar (5 mm en diámetro) perforado a partir de una placa de agar de 96 horas, en cada matraz de 250 mL que contienen 30 mL de medio de crecimiento. Con la siguiente composición (g/L): glucosa, levadura, y extracto de malta, y el pH se ajustó a 5.5. Además, cada matraz contenía seis esferas de vidrio (12 mm en diámetro). Los matraces se incubaron con agitación a 28 ° C y 175 rpm durante 72 h. Luego. Este procedimiento dio una suspensión homogénea que se utilizó como inóculo para todos los experimentos de biopelícula. Se utilizó como soporte para la formación de biopelículas tela de poliéster en cuadrados de 3.1 × 3.1 cm para 50 mL de medio líquido (Glucosa, Sulfato de zn, Sulfato de Fe, Pectona, Fosfato acido de potasio; Urea). Cada matraz de 250 mL contiene 50 mL de medio de crecimiento y una pieza de soporte la cual fue inoculada con 2.5 mL de suspensión de inóculo preparado anteriormente e incubado a 28 ° C y 175 rpm durante 72 h (Villena y Gutiérrez-Correa 2006).

d) **Cosecha**

Trascurrido las 72 horas de cultivo, las enzimas extracelulares producidas contenidas en el medio de cultivo se recuperaron directamente por filtración en vacío, utilizando papel filtro de paso rápido, donde se quedó retenida la biomasa producida. El extracto



crudo se colectó en frascos estériles y se conservó a una temperatura de -5°C . para su posterior análisis de actividad enzimática.

La biomasa retenida en el papel filtro se cuantificó, para tal fin se llevó a una estufa a 80°C por 24 horas y por diferencia de pesos se obtuvo los datos.

4.5.1.2 Etapa II

a) **Determinación de actividad enzimática:**

La actividad enzimática celulolítica del sistema celulasa fue determinada utilizando la metodología del FPAsa, Este método cuantifica colorimétricamente con la ayuda del reactivo ácido di nitro salicílico (DNS) la cantidad de azúcares reductores liberados como producto de la acción enzimática sobre un sustrato que en este caso es el papel filtro.

El procedimiento estándar para el ensayo de papel de filtro que se siguió fue el siguiente:

- Se agregó 1 mL de solución tampón a dos pH (4.8 y 8.4) a un tubo de ensayo con una tapa.
- Se agregó 0.5mL de enzima diluida en el buffer. Se trabajó con dos diluciones de cada muestra de enzima investigada. Una dilución debería liberar un poco menos de 2 mg de glucosa en las condiciones de reacción.
- Se agregó una tira de papel de filtro en el tubo de ensayo.
- Se Incubó a 50°C y 60°C (de acuerdo a cada experimentación) durante 1 hora.
- Trascurrido el tiempo se agrega 3 mL de reactivo ácido dinitro salicílico (DNS) y esa mezcla se llevó a ebullición por 5 min.

- Al terminar el tiempo se retira de la ebullición y se agregó 5 mL de agua destilada fría, para mezclarlo agitando vigorosamente con ayuda de un vortex.
- Se leyó la muestra en un espectrofotómetro visible a 540 nm de longitud de onda y se obtuvo la absorbancia de la muestra.
- Referencia: 1,5 mL de tampón, 3 mL de DNS, 5 min de ebullición, 5 mL de agua

b) Cálculo de la Actividad Enzimática:

- i. Se construyo una curva patrón o curva estándar de glucosa usando concentraciones conocidas de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1 mg de glucosa /mL de solución.
- ii. A estas muestras se les adiciono 3 mL de DNS, se les llevo a ebullición por 5 minutos, luego se les añadió 5 mL de agua destilada fría, y se leyó sus absorbancias con ayuda del espectrofotómetro, también a 540 nm de longitud de onda
- iii. Ploteando los datos se obtiene la ecuación de la recta en la curva patrón y con ello se calcula las concentraciones de glucosa en las muestras.
- iv. Se calculó la unidad de FPAsa (FPU) usando la siguiente ecuación:

$$FPU = [\text{glucosa}] * 0.38 * FD$$

Las unidades de FPU se basan en la Unidad Internacional (UI) 1 IU = 1 micromol min⁻¹ de sustrato convertido



4.5.2 Flujo del procesamiento

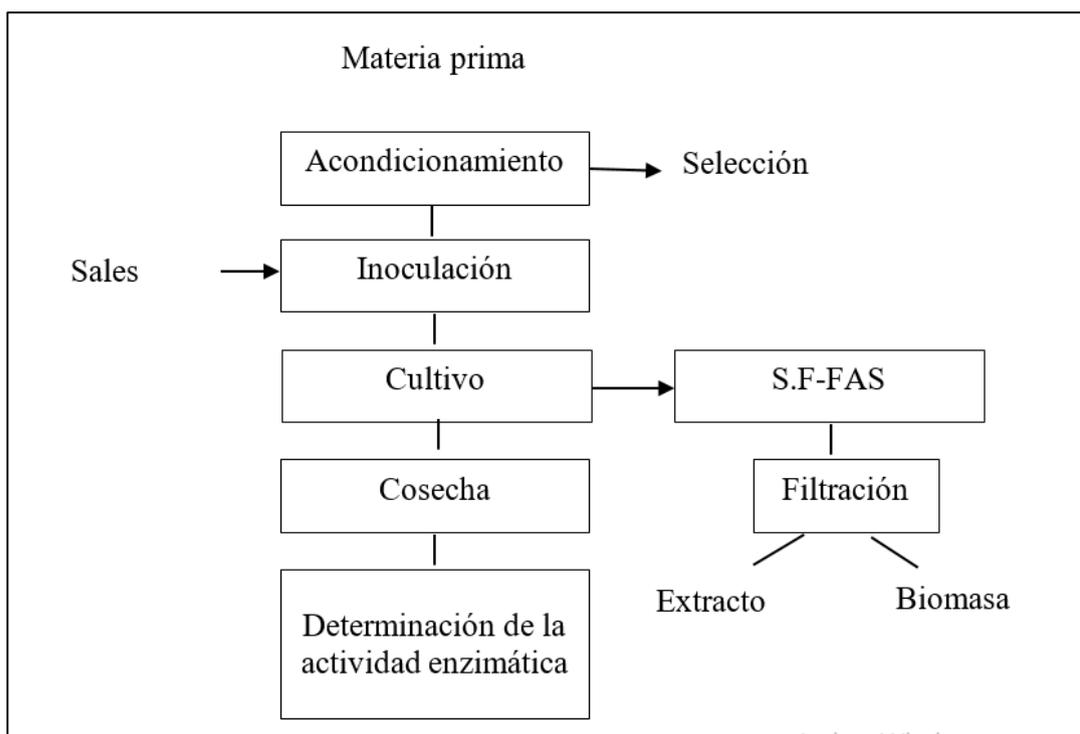


Figura 9 — Diagram de flujo

Nota. Diagrama de flujo de determinación de la actividad enzimática de cinco basidiomicetos del Santuario Nacional del Ampay.

4.6 Material e instrumentos de la investigación

4.6.1 Materiales

- Asa de kolle
- Embudo
- Erlenmeyer de 25, 200, 250, 500 MI
- Mecheros de alcohol 3 unid
- Baker de 500MI
- Papel filtro Whatman N° 1
- Pipetas de 0.5, 1,2,5,10 MI
- Pipeteador 1 unid
- Pinzas 2 unid

- Tela poliéster 3.1 x 3.1
- Tubos de ensayo con tapa rosca 50 unid
- Placas Petri 50 unid
- Porta y cubre objetos
- Probetas de 50, 200, 500mL

4.6.2 Equipos

- Autoclave FAMAREL – FV 3035: Acero inoxidable (304), Potencia 1.6 KW, Voltaje 220 VAC 60H
- Estufa MEMMERT: Rango de temperatura: 5 a 80°C Volumen interior: 20 litros Humedad: 40 a 90 % H.R
- Balanza TRAVELER de OHAUS – TA302: Lectura mínima 0.1 g, margen de error 0.01g.
- Microscopio NITLAB: de 100x de aumento, planos cromáticos Platina deslizable x-y con micas y macrofocalización y filtros de luz, Lámpara halógena de 6V, Energía:220-230 VAC 60 HZ
- Potenciómetro
- Refrigeradora MABE: De dos puertas, con sistema antitrust Volumen: 450 litros Peso: 73 kg, Humedad óptima: 70%
- Vortex NITLAB: Capacidad: 5-300 rpm Energía: 220-230 VAC 60HZ, Adaptador de goma para tubos de vidrio y control mecánico
- Microondas SAMSUNG: Volumen: 5 L, Medidas: 27.2x47x38 cm, Pantalla controlador táctil y LED
- Espectrofotómetro UV: I.C.T: MODELO 6405: Rango de longitud de onda:

320 a 1100 nm (modelo Visible 6400) 190 a 1100 nm (modelo UV-Visible 6405), Resolución 0,1 nm., Stray light (luz difusa): menor de 0,05% T a 340 nm y 220 nm el modelo UV-Visible, Precisión fotométrica + 1nm, Rangos de medida: -0,3 a 3A / 0 a 199,9%T / -300 a 9999 C, Factor de 0 a 9999, Ruido fotométrico: 1%.

- Baño maría MEMMERT: Rango de temperatura de trabajo en °C: Al menos 5 por encima de la temperatura ambiente hasta +95 con nivel de cocción adicional (100). Resolución del indicador/precisión de ajuste: 0.1 °C hasta +99.9 °C / 1°C a partir de +100°C. Vol. 14 L.

4.6.3 Insumos

- Ácido dinitro salicílico (DNS) 50g
- Hidróxido de sodio 100 g
- Búfer fosfato pH 4.8
- Phenol de cristales 100g
- Agar 100 g
- Glucosa 50 g
- Hidróxido de sodio 50 g
- Sales minerales (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- Solución de metales traza.
- Peptona 10 g.
- Agar extracto de levadura g.
- Agar celulosa g.
- Tetraciclina g.
- Levadura

- Benomil
- Extracto de malta
- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Sulfato de fierro $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$
- Fosfato acido de potasio (K_2HPO_4)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Sulfato de magnesio $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$
- Urea.
- Tinte rojo congo

4.7 Materia prima

La materia prima con la que se trabajó fueron cinco cepas de hongos (basidiomicetos) que presentaron mayor actividad enzimática celulolítica cualitativa en medio de agar con rojo congo, los cinco hongos son procedentes del Santuario Nacional del Ampay

4.8 Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, en las instalaciones de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac (UNAMBA).

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Descripción de resultados

5.1.1 Resultados para biomasa

Para los resultados de biomasa se siguió los procedimientos descritos en formación de biopelícula, el proceso consta de tres pasos y toma en total un tiempo de 10 días (4 para el crecimiento miceliar, 3 para la formación de inoculo y 3 para la formación de la biopelícula) y los resultados se muestran a continuación:

Tabla 5 — Biomasa producida de las cinco cepas de basidiomicetos.

Cepas	Biomasa promedio g/L	SD
BSNA-LB-001	1.696	0.116
BSNA-LB-002	2.902	0.203
BSNA-LB-003	1.934	0.216
BSNA-LB-004	3.769	0.443
BSNA-LB-005	2.644	0.297

Nota. Biomasa producida de las cinco cepas de basidiomicetos

En la tabla 6, se puede observar que el basidiomiceto con código BSNA-LB-004 que pertenece al género *Geastrum* con más biomasa generada con la cantidad de $(3.769 \pm 0.443 \text{ g/L})$, mientras que el basidiomiceto con código BSNA-LB-001 que es del género *Hygrophorus* es el que menos biomasa ha generado con una cantidad $(1.696 \pm 0.116 \text{ g/L})$. representado por la siguiente figura.

En la figura 10, se observa la producción de biomas de las cinco cepas de basidiomicetos, al evaluarlas de acuerdo a un análisis estadístico según la prueba de Tukey (ver Tabla 4 del anexo 3), se evidencia que se han formado tres grupos, la cepa BSNA-LB-001 con la BSNA-LB-003 forman el primer grupo, luego el segundo grupo conformado por las cepas BSNA-LB-005, y BSNA-LB-002, y finalmente el tercer grupo la cepa BSNA-LB-004, este ultimo de acuerdo al análisis

estadístico aplicado indica que es la cepa de hongo que mayor biomasa.

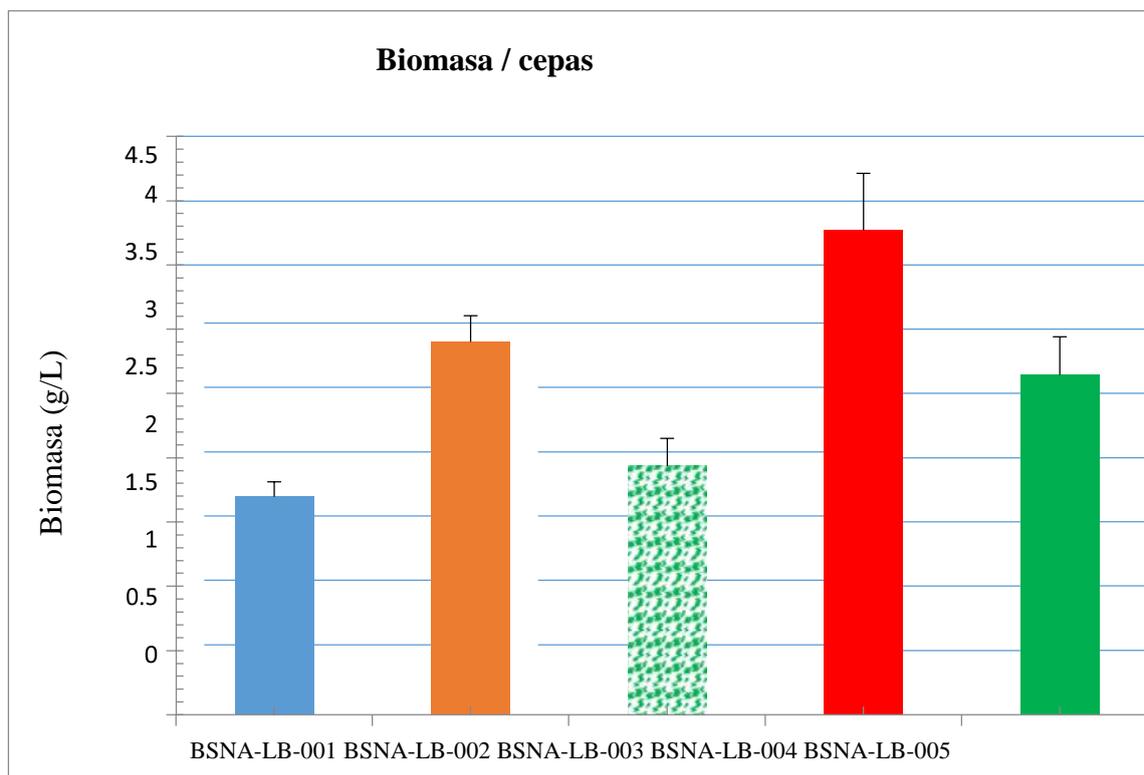


Figura 10 — Biomasa generada de las cinco cepas de basidiomicetos

Nota. Biomasa generada de las cinco cepas de basidiomicetos a una temperatura de 28°C y 72 horas de cultivo y 175 rpm de agitación.

De la misma manera se aplicó un análisis de varianza, para ver si entre las cepas de hongos hay diferencia estadística significativa en cuanto a la producción de biomasa.

Tabla 6 — Anova de biomasa generada de las cinco cepas de basidiomicetos.

Fuente	Suma de Cuadrados	g/L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.16134	4	2.04033	52.83	0.0000
Intra grupos	0.386215	10	0.0386215		
Total (Corridas)	8.54755	14			

Nota. Datos obtenidos desde el procesamiento

Del análisis de varianza efectuado para evaluar la producción de biomasa entre las cepas estudiadas se ha encontrado que las cepas de hongos son estadísticamente diferentes entre sí, con un valor de PValue 0.0000; seguido de esto a los datos se le ha efectuado una prueba de ranking Tukey, (ver tabla 4 del anexo 3).

5.1.2 Resultados para actividad enzimática

Con el fin de determinar la capacidad de producción de enzimas celulolíticas de las cinco cepas seleccionadas, se realizaron cultivos según la metodología planteada.

Para evaluarse las actividades enzimáticas (celulasa total) se trabajó a dos pH un ácido y uno alcalino (4,8) y (8,4) y las reacciones de la enzima se trabajaron a dos temperaturas de trabajo (50°C y 60°C), se logó estas temperaturas poniendo las muestras de enzima con el sustrato en baño maría, se observó que todas las cepas fueron capaces de producir actividades enzimáticas.

La actividad celulasa total se evaluó mediante el ensayo de actividad papel filtro (FPA); los resultados revelan que la mayor actividad enzimática se produjo en la cepa BSNA-LB-005 con un valor de 1.536 UI/mL como promedio de sus cuatro experimentaciones.

Además es de destacar que cuando se trabaja a 50°C la respuesta de actividad enzimática es más alta, del mismo análisis se ha identificado que la cepa BSNA-LB-004 es la cepa que menor actividad presenta con un valor de 0.161 UI/mL., aunque fue destacable que esta cepa presentó una particularidad que su mejor temperatura de trabajo es de 60°C a diferencia de las otras cuatro cepas, quiere decir que es una cepa más termo tolerante y se le puede trabajar en aquellos procesos que necesiten altas temperaturas, como en el procesamiento de papel.

Se observa también en la figura 11 el comportamiento de la actividad enzimática cuantificada donde los valores más altos se registran en los hongos a la temperatura de 50°C, y además la cepa BSNA-LB-001 es la cepa que presenta mayor actividad en promedio con un valor de 0.761 UI/mL a los 60°C de entre los cinco hongos, (ver gráfico 5 y 6 del anexo 3.2.4).



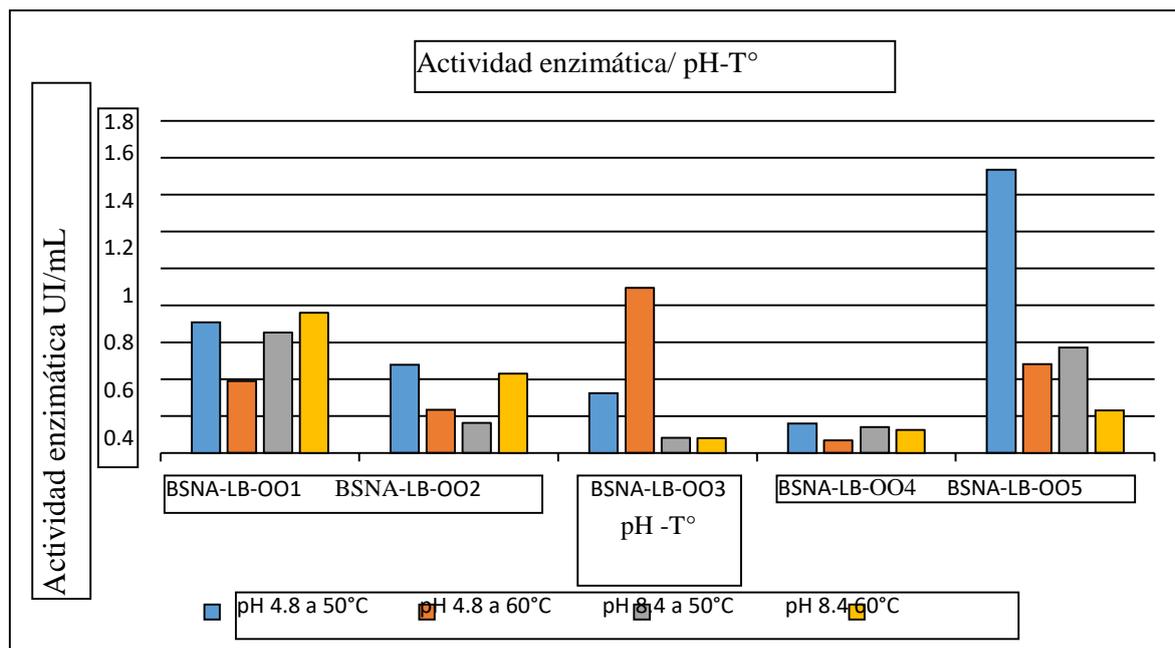


Figura 11 — Actividad enzimática FPAsa de las cinco cepas de basidiomicetos.

Nota. Datos obtenidos desde el procesamiento

Para las variables en estudio sobre la actividad enzimática se ha efectuado un análisis de varianza multifactorial, para ver la significancia que hay entre ello, encontrándose lo siguiente:

Tabla 7 — Anova de actividad enzimática para las cinco cepas de basidiomicetos

	Suma cuadrados	g/L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Hongo	2.68668	4	0.671671	9.15	0.0000
pH	0.219252	1	0.219252	2.99	0.0897
Temperatura	0.361771	1	0.361771	4.93	0.0307
Residuos	3.88982	53	0.0733928		
Total (corregido)	7.15752	59			

Nota. Datos obtenidos desde la ficha de observación

Del análisis de varianza multifactorial, se deduce que las variables, cepa de hongo y la Temperatura, son significativas estadísticamente para obtener mayor actividad enzimática, esto quiere decir que la actividad enzimática depende del tipo de hongo, se deduce también que la temperatura influye en esta actividad, así a una temperatura de 50°C es mayor la actividad enzimática en general para los cinco hongos.

Al análisis de varianza se ha realizado una prueba de ranking en este caso un análisis Tukey para poder determinar que cepa de las evaluadas produce mayor actividad enzimática, habiéndose hallado que la cepa BSNA-LB-005 es la que mayor actividad, incluso a ambas temperaturas de trabajo, esta prueba indica que la cepa BSNA-LB-004, es la que menos actividad enzimática celulósica ha generado.

La prueba de Tukey también encontró en cuanto al hongo que es una variable significativa, existen tres grupos dentro de los cinco individuos en estudio como se puede ver en la (tabla 6 del anexo 3), es así que el primer grupo las cepas BSNA-LB-005 y BSNA-LB-001, que producen más, luego viene el grupo BSNA-LB-003. BSNA-LB-002, BSNA-LB-001 que producen medianamente y finalmente el grupo BSNA-LB-004, BSNA-LB-002 y BSNA-LB-003 que producen menor actividad enzimática a los dos pH y temperaturas.

Se observa que para tener una mayor actividad enzimática el tipo de hongo es significativamente importante como la temperatura de reacción, finalmente de los resultados se tiene que la cepa BSNA-LB-005 y la cepa BSNA-LB-001 son las que mayor actividad producen en la figura multi variable con un $\alpha= 0.05$ de respuesta de actividad enzimática que a continuación se presenta.

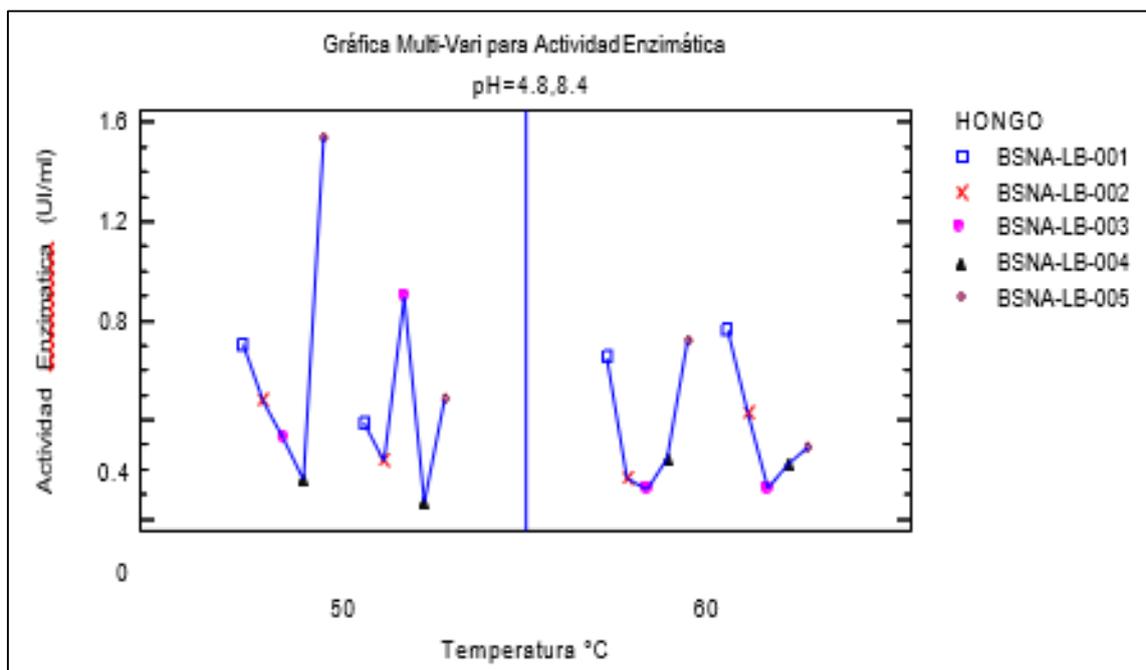


Figura 12 — Gráfico multivariable para actividad enzimática de las cinco cepas a dos temperaturas de trabajo y dos pH.

Nota. Datos obtenidos desde la ficha de observación

5.1.3 Resultados para productividad.

Para evaluar la productividad enzimática que viene a ser la cantidad de actividad enzimática por unidad de biomasa que se genera. Parámetro que es importante pues si se desea realizar cultivos para producir enzima, se escoge aquel que tenga mayor actividad enzimática generada por una menor biomasa es decir aquella más productiva.

Para esto se ha efectuado los cálculos correspondientes y se muestran mediante un gráfico de barras.

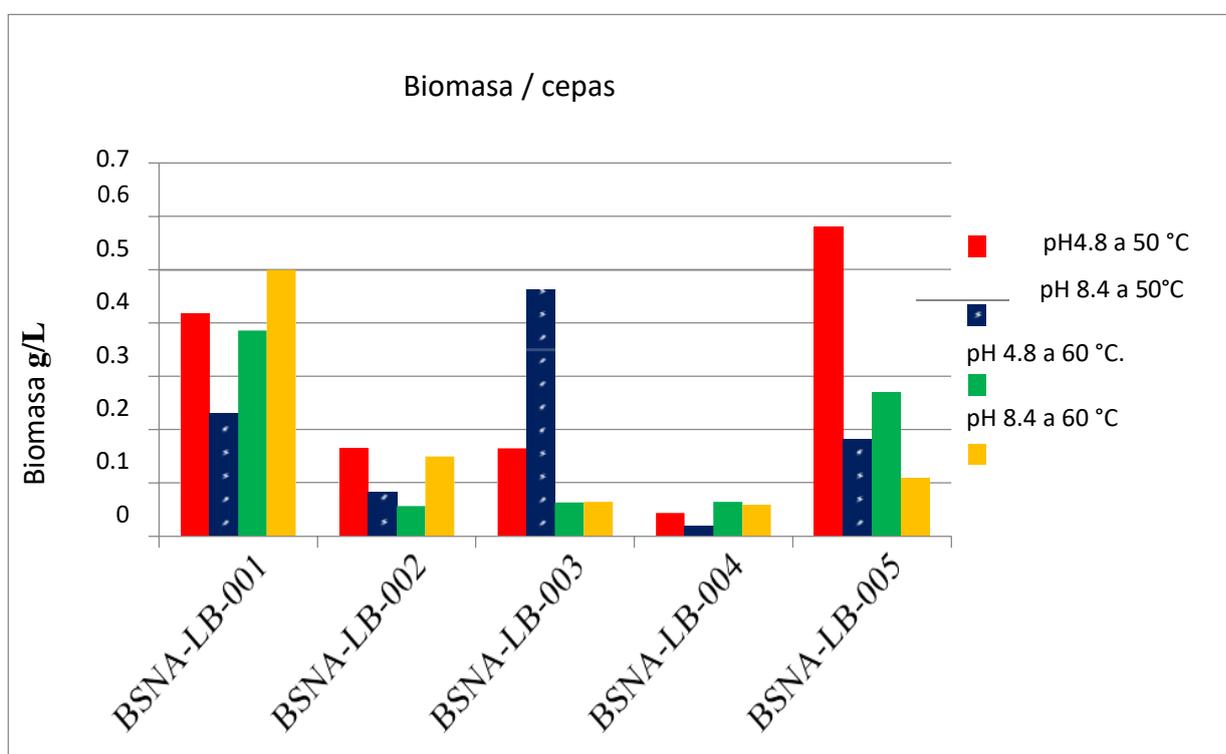


Figura 13 — Productividad enzimática de los cinco basidiomicetos.

Nota. Datos obtenidos desde la ficha de observación

Como se puede observar en la figura 13, la mayor productividad enzimática de los cinco basidiomicetos en estudio se logra a un pH de 4.8 y a 50°C de temperatura, la cepa BSNA-LB-005, presenta el mayor valor de productividad con un valor de 0.581 UI/gr de biomasa, también es destacable que la cepa BSNA-LB-003, presenta su mayor productividad a un pH de 8.4, esto es muy importante pues la mayoría de los casos de aplicaciones textiles y de tratamiento de papel se efectúan a pHs alcalinos; por otro lado se observa que la cepa BSNA-LB-001 es la que presenta valores homogéneos más altos para las cuatro condiciones de

experimentación siendo su valor global promedio de 0.3704 IU/gr de biomasa (ver tabla 12 del anexo 3), y la cepa BSNA-LB- 004, es la que menor productividad enzimática celulolítica global presenta con un valor de 0.045 IU/gr de biomasa.

Con el objetivo de validar estos datos, se procede a realizar un análisis de varianza y seguida de una prueba Tukey para tener un ranking de los cinco basidiomicetos en función de la productividad enzimática, es así que se obtuvo lo siguiente:

Tabla 8 — Pruebas múltiples de rangos para productividad enzimática por cepa

B. Hongo	Casos	Media Las	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
BSNA-LB-004	12	0.04583	0.0340989	X
BSNA-LB-002	12	0.1125	0.0340989	X
BSNA-LB-003	12	0.1890	0.0340989	X
BSNA-LB-005	12	0.2855	0.0340989	X
BSNA-LB-001	12	0.3704	0.0340989	X

Como se puede apreciar en la tabla 8, existen cuatro grupos, siendo estadísticamente más productoras las cepas BSNA-LB-001 y BSNA-LB-005, y las que menor productividad poseen son las cepas BSNA-LB-004 y BSNA-LB-002, con nivel de significancia de ($P < 0.05$).

5.2 Contrastación de resultados

5.2.1 Hipótesis general

Es posible cuantificar el potencial de producción de enzimas celulolíticas de cinco basidiomicetos procedentes del Santuario Nacional del Ampay

5.2.2 Hipótesis específicas

- Se podrá determinar y cuantificar la biomasa generada de basidiomicetos, procedentes del Santuario Nacional del Ampay, en un sistema de cultivo por adhesión de superficies (biopelícula).
- Haciendo un análisis cuantitativo es posible determinar la actividad enzimática celulolítica total de las cinco cepas seleccionadas provenientes del santuario Nacional del Ampay.

- Con una comparación de datos finales de la productividad enzimática celulolítica de las cinco cepas de basidiomicetos estudiados en condiciones de laboratorio, se podrá ver que cepa de basidiomiceto en estudio es la mejor para producir enzimas celulolíticas a condiciones de laboratorio.

5.2.3 Estadística.

Para el presente estudio se trabajó con pruebas de análisis de varianza multifactorial a un nivel de significancia de 0,05, lo que permitió observar la significancia estadística de las variables independientes (Hongo, Temperatura y pH) sobre la conducta de la variable respuesta (Actividad enzimática y productividad). Seguido del análisis de varianza multifactorial, se han efectuado pruebas de Tukey para establecer un ranking de los hongos en cuanto primero a producción de actividad enzimática y finalmente para productividad, así establecer estadísticamente que cepa de hongo es la más apropiada para la producción de enzimas celulíticas. Ambas pruebas se corrieron en el programa estadístico Stat Graphics V14©

5.2.4 Nivel de significancia.

Todas las pruebas estadísticas se han corrido a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

5.2.5 Región crítica o decisión.

No corresponde al modelo y tipo de investigación planteada.

5.3 Discusión de resultados

5.3.1 Discusiones para biomasa

Como se puede observar en el anexo (foto 5.4) la producción de biomasa de las cinco cepas de basidiomicetos se ve reflejada en la formación de un esponjoso pellet en la matriz de sujeción, a las 72 horas de cultivo, de acuerdo a Izarra *et al.*, (2010) y Sánchez (2017) el aumento de la biomasa inicia con la adhesión de las hifas del *Aspergillus niger* a la matriz de sujeción, seguido de una etapa de maduración de la biopelícula, donde se produce la enzima y continua con su reproducción llamada fase vegetativa. Este film parecido a una almohadilla se obtuvo en las cinco cepas estudiadas, siendo en unas más gruesas que en otras, por la misma producción de biomasa diferenciada que hay entre cepa y cepa.

En la investigación se ha encontrado que el valor de biomasa producida por los basidiomicetos en esta técnica de cultivo celular de adhesión a superficies (biopelícula) fluctúa entre 1.6 (g/L) de la cepa BSNA-LB-001 como valor más bajo y 3.8 (g/L) para la cepa BSNA-LB-004, valores similares se encontraron por Cerrón *et al.* (2015) Quienes en un estudio con cuatro tipos diferentes de basidiomicetos produce biopelículas con el objetivo de decolorar tintes azoicos, los autores mencionados encontraron valores de formación de biomasa de entre 0.9 (g/L) y 1.8 (g/L); otro autor Cortez (2015) evaluó la producción de biomasa de un hongo filamentosos como el *Aspergillus niger* (aislado de los suelos de Contamana) en 48 horas de fermentación fue de 2,2 g/L, mayor a lo encontrado en este trabajo para este tipo de fermentación., los resultados indican que la fermentación por biopelículas genera mayor producción de biomasa que otros tipos de fermentación como la sumergida, aunque Villena *et al.* (2001) y Villena y Gutiérrez (2006). Indican que para hongos filamentosos es contrario este resultado, pero debe destacarse que en este estudio se trabajaron con hongos basidiomicetos. Los resultados que difieren a la cantidad encontrada de biomasa, pueden estar relacionadas con la naturaleza del hongo, la fuente de carbono, el tiempo y temperatura de incubación.

5.3.2 Discusiones para actividad enzimática

Al analizar la actividad enzimática celulolítica obtenida por las cinco cepas de basidiomicetos, se ha observa que una cepa de basidiomiceto posee mayor capacidad de generar actividad enzimática que otra, por consiguiente un hongo con mayor actividad enzimática que otro, la producción de actividad enzimática evaluada se dio en medio ácido (pH 4.8) y en medio básico (pH 8.4) para poder determinar el mejor performance de las enzimas obtenidas, estas enzimas por ser de tipo extracelulares son producidas en la parte exterior de las membranas celulares de los microorganismos por lo que son de fácil recuperación para un proceso de purificación posterior, respecto a los valores encontrados la cepa BSNA-LB-005 es la que mayor valor presenta con un valor promedio de 1.536 UI/ml, seguida de la cepa BSNA-LB-001, cuyo valor es 0.708 UI/mL, para un pH de 4.8 y a una temperatura de 50°C, al respecto Sandoval et al, en el 2011 evaluaron la actividad de las enzimas celulolíticas, el primer estudio se realizó la actividad de enzimas celulolíticas mediante el cultivo individual y co- cultivo de *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp.* Los cuales son hongos filamentosos, ellos

reportaron valores de $1.49 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ de FPAsa, $0.329 \text{ UI}\cdot\text{ML}^{-1}$ de CMCasa y $0.148 \text{ UI}\cdot\text{ML}^{-1}$ de celobiosa, estando los valores muy próximos en cuanto a actividad celulósica total (FPAsa); los valores encontrados en general también coinciden con Chahal et al 1992, quienes trabajaron con un hongo *Trichoderma reesei*, que pertenecen a las familias de hongos filamentosos, ellos reportan valores de $1.42 \text{ UI}/\text{mL}$; es entonces meritorio destacar que los hongos basidiomicetos que fueron evaluados en esta investigación producen actividad enzimática similar a otros hongos filamentosos, convirtiéndolos estos resultados en un recurso valioso del Santuario Nacional del Ampay al cual se debe cuidar y preservar.

5.3.3 Discusiones para productividad

En la investigación se ha encontrado que la cepa BSNA-LB-001, es la más productiva a las cuatro condiciones de trabajo es decir a dos pHs y dos temperaturas, pues presenta valores más altos y homogéneos, teniendo 0.417 (pH 4.8 y 50°C), 0.232 (pH 4.8 y 60°C); 0.385 (pH 8.4 y 50°C) y 0.499 (pH 8.4 y 60°C) UI/g de biomasa.; estos datos pueden ser comparados con estudios de hongos filamentosos como por ejemplo Izarra et al. (2010) reportaron un valor superior de $1.6 \text{ UI}/\text{g}$ cuando utilizo un inóculo de 10^6 esporas por ml en una fermentación por biopelículas con un medio que contenía lactosa en polvo, así mismo Villena y Gutiérrez (2006), reportaron para una fermentación por biopelículas de 2.4 ± 40.08 con un inóculo de 10^6 esporas por ml. De acuerdo con los resultados de las fermentaciones la mayor productividad volumétrica de la actividad enzimática fue de la cepa BSNA-LB-001, a la cual se debe continuar nuevos estudios y optimizar su producción.

Es importante destacar y tener datos de productividad, pues este valor nos indica que cuanto menor sea los g de biomasa mejor será la producen de actividad enzimática



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Del siguiente análisis se puede concluir

- En cuanto a la generación de biomasa se ha encontrado diferencias de producción de la biomasa en las cinco cepas de basidiomicetos, donde el mayor productor de biomasa que obtuvo es la cepa BSNA-LB-004 correspondiente a un hongo de género *Geastrum*, con un valor de 3.8 (g/L), seguidamente de las cepas BSNA-LB-002 (*Geastrum*) y BSNA-LB-005 de género (*Cantharellus*) ambas con similares características de producción estadísticamente.
- Se encontró que la cepa con mayor actividad enzimática a 50 °C y con pH de 4.8 fue la cepa BSNA-LB-005 correspondiente a un hongo de género *Cantharellus* con valores 1.536 UI/mL seguida de la cepa BSNA-LB-001 de género (*Hygrophorus*) con un valor de 0.771 UI/mL a pH de 8,4.
- La productividad enzimática se reduce significativamente conforme aumenta su temperatura en las 4 cepas, y se encontró estadísticamente que la mejor cepa en cuanto a productividad es la BSNA-LB-001 correspondiente al hongo de género *Hygrophorus*, en general para los 2 pHs y 2 temperaturas de trabajo con un valor promedio de productividad enzimática de 0.3704 IU/gr de biomasa, es destacable que la cepa BSNA-LB-005 es la que tienen mayor productividad individual cuando se trabajó a un pH 4.8 y 50°C con un valor de 0.581 IU/g biomasa.

6.2 Recomendaciones

- Probar distintas técnicas de cultivo para verificar y validar la producción de biomasa de los basidiomicetos estudiados. (fermentación sumergida. adhesión a superficies en sustrato seco).



- optimizar medios de crecimiento para que esta actividad enzimática cuantificada crezca más y pueda tentarse un escalado de la producción para obtener enzimas comerciales.
- Probar otros sustratos que contengan celulosa de residuos agroindustriales.
- Realizar una identificación filogénica de los basidiomicetos estudiados a nivel de ADN, para tener la certeza exacta de sus variedades y así preservarlas en el Santuario Nacional del Ampay.
- Con la cepa encontrada con mayor productividad (hongo *Higrophorus*) realizar escalamiento industrial para obtener enzimas y caracterizarla para su uso industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELO, A. 2004. Enzimas hidrolíticas. En esposito & J, I Azevedo, fungos una introducao a Biología, Universidad de Caxias do Sul. Bioquímica y Biotecnología pp. 263-285.
- ARDON. L, CE. 2007. la producción de hongos comestibles, universidad de San Carlos de Guatemala. facultad de humanidades departamento de postgrado maestría en docencia universitaria con especialidad en evaluación educativa.
- AUBERT, J 1998. Biochemistry and Genetis of Cellulose degradation Academic press. USA, pp 11. BHAT, MK 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances, 18: 355-383.
- BHAT, MK; BHAT, S 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances, 15: 583-620.
- CAMACHO, B, I. 2015. Identificación y Caracterización Morfológica de basidiomicetos provenientes del Santuario Nacional del Ampay con Potencial Agroindustrial. Tesis para optar el grado de título en Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Apurímac, Perú.
- CERRÓN, L.; ROMERO-SUÁREZ, D.; VERA, N.; LUDEÑA, Y.; VILLENA, G.; GUTIÉRREZ-
- CORREA, M. 2015. Decolorization of Textile reactive dyes and Effluents by Biofilms of Trametes polyzona LMB-TM5 and Ceporia sp. LMB-TM1 isolated from the Peruvian Rainforest. Water air soil pollution. p. 226-235.
- COWLINGY, E.E; KRIT, T 1976. Propertis of cellulose and lignocellulosic materials as sustrate for enzymatic conversión processes. Biotechnol. Bioeng. Symp (6): 95-123.



- CORTEZ, C.B .2015. Aislamiento de microorganismos productores de celulasas alcalinas de aguas termales y suelos de bosques de Contamana. Trabajo de tesis para optar el título profesional de Biólogo. Iquitos, Perú.
- CHAHAL S.D.1992. Cellulase production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrates at various pH levels, Pages 67-137.
- CHIANG, V.L.2007. Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4 (3):143-146.
- DAVILA, V. G; VASQUES, R; DUHALT, R. 2006. Enzimas Ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Rev Universidad Nacional Autónoma de México*; (108): 1000-1011
- DASHTBAM, M; SCHARFT, H; QIN, W 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Review. Int. J. Biol. Sci.*: (6): 578-595.
- DA COSTA; KADOWAKI, M; MINOZZO, M; MARQUES de SOUZA, C; BOER, C; BRACHT, A; PERALTA, R. 2012. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus tamari*. *African Journal of Biotechnology*.11 (2):391-398.
- DEACON, J. 2005. The Microbial World: Basidiomycota: activities and lifestyle (in line). Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh. Edinburgh, Texas, USA. pp 12. Consultado 16 abr. 2007. Disponible en <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbesbasidio.htm>
- DONLAN, R; COSTERMON, J. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology*. (15):167-193.
- FAO 1989, Evaluación de los recursos forestales mundiales, Diversidad biológica de los bosques. FAN, L; GHARPURAY, M; LEE, Y.1987. Cellulose hydrolysis Biotechnology monographs. Springer, Berlin. pp 57.
- FERNANDEZ, J. 2006. Energías renovables para todos, editorial la revista pp. 2-4.



- FERNANDEZ, P. 2006. Obtención de Ácido Gálico a partir de polvo de tara (*Caesalpinia spinosa* L.) mediante fermentación en sustrato sólido usando cepas fúngicas de *Aspergillus* sp. Tesis para optar el grado de Mg. UNALM. Lima, Perú. pp. 1-150.
- FROST, F; MOSS, D. 1987. producción of enzymes by fermentation in Biotechnology. Vol 7. Rehm HJ and reed G7, pp 65-211.
- GAITAN, B; PEREZ, L. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*dendranthema grandifolia*).
- GOMEZ, F 2008. Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano. (Tesis Doctoral). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis de Potosí – México.
- GHOSE, T.K. 1987. Measurement of cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, (59): 257-268.
- GUEVARA, C; ZAMBRANO, M.M. 2006. Sugarcane cellulose utilization by defined microbial consortium. *FEMS Microbial lett* (255) 52-58
- GUTIÉRREZ-CORREA, M Y VILLENA, G. K. 2003. Biopelículas de *Aspergillus Níger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev. Perú biol.*, 10(1), Lima - Perú.
- GUTIÉRREZ-CORREA, M. Y VILLENA, G. K 2010. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus Níger* by confocal laser 3 scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresource Technology*, 101: 1920-1926
- GUTIERREZ, C.M; TENDERDRY, R.P. 1997. *Biotechnology Letters* 19: 65
- GUTIERREZ, C.M; TENDERDRY, R.P. 2012. *Biotechnology rev.* 11



- GUTIERREZ, M; VILLENA, G.K.2003. Surface adhesión fermentation: a new fermentation category. *Revista peruana bióloga* 10 (2), 113-124.
- GUTIERREZ, M; VILLENA, G.K.2010. In Pandey, A; Soccol, C; Larroche, C; Gnansounou, E; Nigam- Singh, P (Eds.). *Comprehensive Food Fermentation and Biotechnology*. New Delhi: Asiatech Publisher, Inc. (1):183–227.
- HARDING, M; MARQUES, L; HOWARD, R; OLSON, M. 2011. Can Filamentous Fungi Form Biofilms. *Trends in Microbiology*. (11): 17.
- HENDRICKS C. 1995. A new solid médium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2016-2019.
- HETTENHAUS, J; GLASSNER, D. 1997. Cellulase assessment for biomass hydrolysis. A report for the DOE Office of Energy Efficiency and Renewable Energy Ethanol Program.
- HERBERT, R.A. 1992. Department of Biological Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 4HN, Scotland
- HERR, D; LUCK, G.; DELLWED, H. 1978. Formation of cellulases and degradation of cellulose by several fungi. *Fermentation Biotechnology* 56(4).
- HOWARD, R; ABOTSI, E; RENSBURG, J; HOWARD, S (2003). Lignocellulose Biotechnology: issues of bioconversion and enzyme producction, *african journal of Biotechnology*. (2):602-619.7
- HUBER, G.W; IBORRA. S, CORMA. A. 2006,10694044-4, Rev June 27, <https://doi.org/10.1021/cr068360d>, Copyright © 2006 American Chemical Society.
- IZARRA, M. L; SANTAYANA, M. L; VILLENA, G. K; GUTIÉRREZ; CORREA.M. (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus Níger*. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, XIII (2).



- JARVIS, M. 2003. Cellulose stacks up. *Science*. 6:611–612. JONES, J. 1994. Fungal adhesion *Mycology. Res.* 98: 961–981.
- JOHANNENSEN, R. 1991. Energy Efficiency & Environmental News: Alcohol Production from biomass. Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida.
- JEYA, M; ZHANG. YW; LEE, J. (2009). Enhanced saccharification of alkali- treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis condition by RSM. *Bioresource Technology*, 100 5155-5161.
- KOBOLD, M. 2000. Setas de prados y bosques: Como identificarlas, respetarlas, recogerlas y cocinarlas. Susaeta Ediciones, S.A. Madrid, España. Pp.126
- KIRT T.K, FARRELL R.L. 1987. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol*; 41: 465-505.
- PAPINUTTI, L.V; DIORIO, L; FORCHIASSIN, F. (2004). Degradación de la madera de lamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Rev Iberoam Micol*; (2)0: 16-2
- LEHNINGER, A. L. (1988). Principios de bioquímica. Barcelona: «11». Omega. pp. 283-7.
- LEHNINGER, NELSON: COX .2008. Principles of Biochemistry Fifth Edition David L. chapter 19 Oxidative Phosphorylation
- LI, Y; HARDIN, I.R. (1997). Enzymatic Scouring of Cotton: Effects on Structure and Properties. *Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter*. 29 (8), 71-76.
- LLILIAM FRIONI.1999. Procesos Microbianos. Ed de la fundación nacional del Rio cuarto Argentina.; 11:723-736.
- LYND, L; WEINER, P; ZYL, H; PRETORIUS, L. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biothechnology. *Microbiology and Molecular Biology reviews* 16: 577-583.



- LYND, 2004. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- LYND, L.R; WINER P. J; VAN W.H. ZYL; Y, L. S. 2002. Pretorius. *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol. And Molec, Biol.Rev.*66, N° 3 506-577.
- LYMAR, E; LI, B; RENGANATHAN, V. 1995. Purification and Characterization of a cellulose- binding β -glucosidase from cellulose degrading cultures of *Phanaerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*. 8: 2976-2980.
- LUTZEN, N. W; NIELSEN M.H; OXENBOELL K.M; SCHULEIN M, STENTEBJERG: OLESEN B.1983.Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. *Philos Trans R Soc B*, pp.300. 283-291
- MANDELS, M; ANDREOTTI, R.E. 1978. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Process Biochemistry* 13(5).
- MARTINEZ, J; MATA, M; AGUILAR, C; ILYINNA, ANNA. 2010. A Process to Produce Penicillin G Acylase by Surface-Adhesion Fermentation Using *Mucor griseocyanus* to Obtain 6- Aminopenicillanic Acid by Penicillin G Hydrolysis. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 160:2045–2053.
- MENDÍVIL, J. 1996. Basidiomicetes: setas y hongos de Aragón (en línea). Aragón, España, Aragonesasi. Consultado 5 mayo 2007. Disponible en <http://www.naturaleza.dearagon.com/hongos/index.php>
- MONTOYA, S. 2008. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del Macromiceto *Grifola frondosa* (doctoral dissertation, tesis de grado–maestría en ingeniería química, universidad nacional de Colombia, Manizales-Colombia).
- MORALES, H. 2006. Aislamiento, selección y evaluación de actividad celolítica de cuatro



cepas de hongos nativos de costa rica. Cartago – Costa Rica

- MOORE, D. 1998. Fungal Morphogenesis. New York, United States of America: Cambridge University Press.
- MOYA, A. 2011. Determinación de la capacidad celulolítica in vitro de consorcios de hongos provenientes de suelo del bosque alto andino y tusas de palma de aceite (*eleaeis guinensis jacq*) en descomposición sobre dos sustratos: tusa y celulosa Microcristalina.
- MILLER, G.1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3), pp. 426–428.
- PAPINUTTI, L. V; DIORIO L; FORCHIASSIN F. 2004. Degradación de la madera del álamo por + Fomes sclerodermeus: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. Rev Iberoam Micol; 20: 16-20.
- PELAEZ F, MARTINEZ MJ, MARTINEZ AT. 1999. Screening of 68 species of basidiomicetes for enzymes involved in res. lignin degradation. Mycol; 99: 37-42.
- PELZAR, M, J 1984. Elementos de microbiología. University of Maryland
- PERCIVAL, Z. Y; HIMMEL M. E; MIELENZ J. R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances, 24, 452–548.
- RAMIREZ, P; COHA, J. 2003. Degradación enzimática de celulosa por actimicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica, rev. Peru. Biol. 10: 67- 77.
- SÁNCHEZ, F. 2017. Producción de la enzima β -glucosidasa en cultivo fúngico sólido con follaje de flourensia cernua usando un diseño experimental box-behnken. Trabajo de Tesis para optar el título de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Saltillo, México.
- SÁNCHEZ, J; ROYSE, D. 2002. La biología y el cultivo de *Pleurotus sp*. Colegio de la Frontera



Sur (ECOSUR), Chiapas, México, D. F., MX, Editorial Limusa, S.A. 290 p.

SÁNCHEZ O; CARDONA A. 2005. Inter ciencia: Revista de ciencia y tecnología de América, ISSN 0378-1844, Vol. 30, N.º. 11, 2005, págs. 671-678.

SANDOVAL, E. R., MANJARRÉS, K; PIÑEROS, Y. 2011. Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de aspergillus sp. Y trichoderma sp. En fase sólida sobre residuos de palma. Bioagro, 23(1), 19-26.

SEMEDO, L; GOMES, C; LINDARES, A; DUARTE, G; NASCIMENTO, R; ROSADO, A; PINHERIO, M; MARGIS, R; SILVIA, K; ALVIANO, C; MANFIO, G; SOARES, M; LINDARES, L; COHELO, R.2004. *Streptomyces drozdowiczii* sp. Nov., a novel cellulolytic strptomycete from soil in Brazi. Journal Of Systematic and Evolutionary Micribiology.54:1323- 1328.

SOLÍS, S. 2005. Hongos que eliminan contaminantes. Rev Instituto Tecnológico de Mérida; 22: 10-11. SCHLESINGER, W. H. 1991. Soil respiration and changes in soil carbon stocks. In G.M. Woodwell and F.T. Mackenzie (eds.). Biotic Feedbacks in the Global Climate System, Oxford University Press, Oxford. pp. 159- 168.

STOILOVA, I.S; GARGOVA, S.A: KRASTANOV, A, I. 2005. Production of enzymes by mixed culture from micelial fungi in solid-fermentation. Biotechnol. & Biotechnol Eq. 19/1

TAMARIZ, A. C. 2014. Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del callejón de Huaylas. Trabajo de tesis para optar el grado académico de doctor en ciencias biológicas. Facultad de ciencias biológicas. Lima, Perú.

TEATHER, R; WOOD, P.1982. use of Congo red- polysaccharide interaction in enumeration and caracterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl environ. Microbiol; 43:777- 780.

TANIGUCHI, M; TANAKA, T. 2004. Clarification of Interactions among Microorganisms and Development of Co-culture System for Production of Useful Substances. Adv Biochem Engin/Biotechnol. 90 35– 62



- VARGAS, G. 2006. La magia de las enzimas. Rev énfasis en alimentación; 2: 75-82.
- VILLENA, G; MORENO, P; GUTIERREZ, M. 2001. Cellulase production by fungal biofilms on polyester cloth. Applied Microbiology. 43: 262-268.
- VILLENA, G. 2006. Fermentación por adhesión a superficies: Biopelículas de *Aspegillus Níger* para la producción de enzimas. Tesis Ph.D. UNALM. Lima, Perú.
- VILLENA, G; GUTIERREZ, M. 2003. Surface adhesion fermentación: a new fermentation category. Revista Peruana biología. 10(2): 113 – 124.
- WOSTEN, H; WILLEY, J. 2002. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. Microbiology. 146:767–773.
- WOOD, T, M. 1989. Biomass part A: cellulose and hemicellulose. Methods in enzymology (vol 160). Elsevier.
- YANG, B; DAI Z; S- DING; WYMAN C.E. 2011: «Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass.» Biofuels 2, nº 4, pp. 421–450.
- YI, J.C; SANDRA, J.C; JOHN, A.B: SHUTING, C. 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Vol. variella volvacea*, the edible straw mushroom. Applied Environmental of Microbiology. 65: 553-559.
- ZALDIVAR, M.; VELASQUEZ, J.C.; CONTRERAS, I.; PEREZ, L.M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Environmental Biotechnology (en línea). 4(3).
- ZABEL, R & MORREL 1992. Decay and its Prevention, San Diego, California: Academic Press.



ZHANG, Y; HIMMEL, M; MIELENZ, J. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology advances*.24: 452-481.

ZHANG, Y-H. P; LYND, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 88:797–824.



ANEXOS



Anexo 1. Protocolo de formación de biopelículas a partir de hongos filamentosos (basidiomicetos).

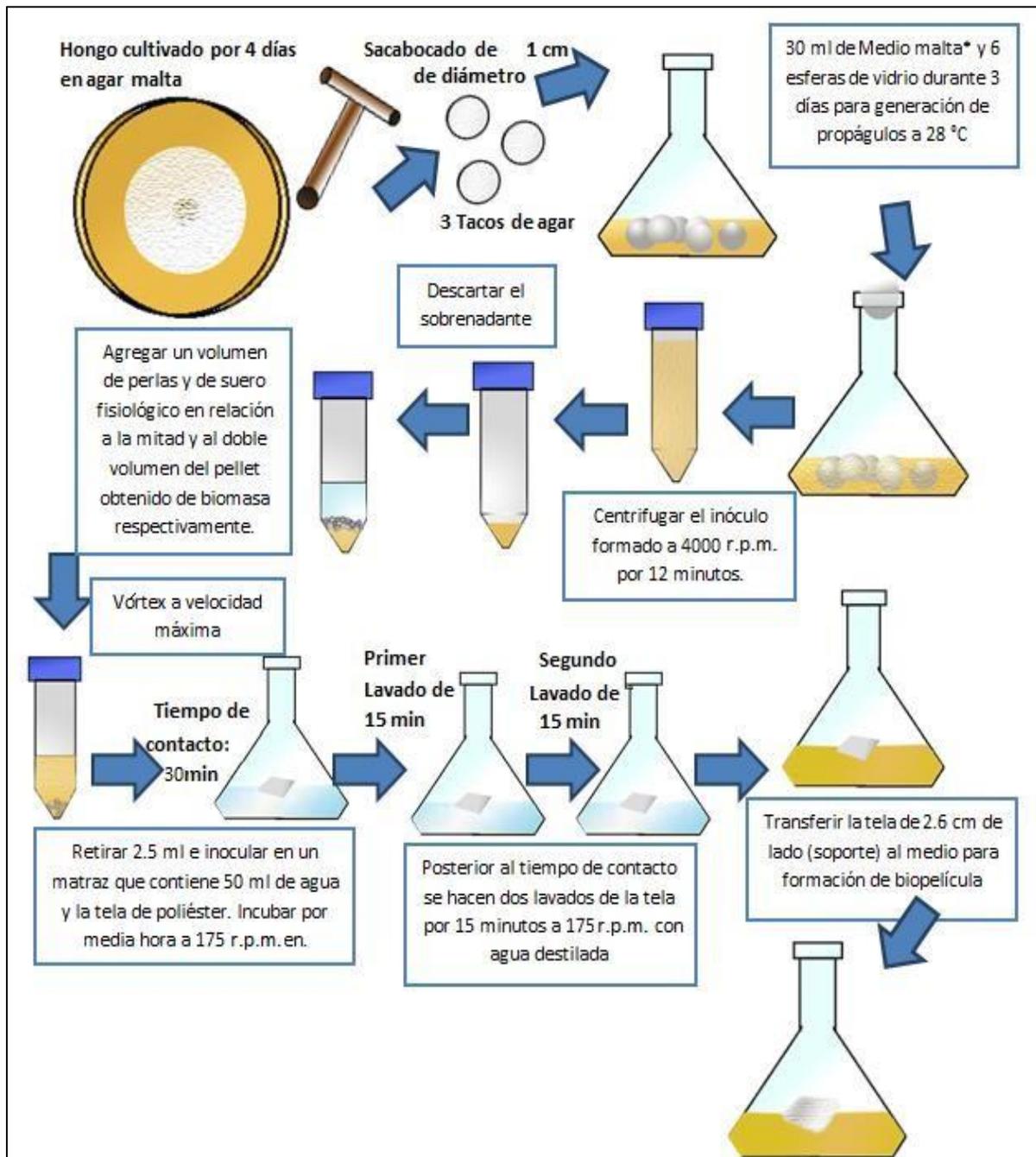


Figura 14 — Protocolo de formación de biopelículas

Nota. Convenio N° 110-FINCyT-FIDECOM-PIPEA-2012

Anexo 2. Diseño factorial

Tabla 9 — Diseño factorial

DISEÑO FACTORIAL										
N° de tratamientos 2X2X5=20	basidiomicetos					pH		Temperatura (T°)		N° de repeticiones
	A	B	C	D	E	4.8	8.4	50°C	60°C	
Tratamiento 1	A					4.8		50		3
Tratamiento 2	A					4.8		60		3
Tratamiento 3	A					8.4		50		3
Tratamiento 4	A					8.4		60		3
Tratamiento 5	B					4.8		50		3
Tratamiento 6	B					4.8		60		3
Tratamiento 7	B					8.4		50		3
Tratamiento 8	B					8.4		60		3
Tratamiento 9	C					4.8		50		3
Tratamiento 10	C					4.8		60		3
Tratamiento 11	C					8.4		50		3
Tratamiento 12	C					8.4		60		3
Tratamiento 13	D					4.8		50		3
Tratamiento 14	D					4.8		60		3
Tratamiento 15	D					8.4		50		3
Tratamiento 16	D					8.4		60		3
Tratamiento 17	E					4.8		50		3
Tratamiento 18	E					4.8		60		3
Tratamiento 19	E					8.4		50		3
Tratamiento 20	E					8.4		60		3
Total										60

Anexo 3. Análisis estadístico para biomasa

A continuación, se presenta los análisis estadísticos efectuados en a la presente investigación.

a) ANOVA simple - biomasa g/ L por cepa de hongo

- Variable dependiente: biomasa g/L
- Factor: cepa de hongo
- Número de observaciones: 15
- Número de niveles: 5

Tabla 10 — Anova para biomasa g/L por cepa de hongo

Fuente	Suma de Cuadrados	g/ L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.16134	4	2.04033	52.83	0.0000
Intra grupos	0.386215	10	0.0386215		
Total (Corr.)	8.54755	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de biomasa g/L en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 52.8289, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de biomasa g/L entre un nivel de cepa de hongo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.

Tabla 11 — Pruebas de múltiples rangos para biomasa g/L por cepa de hongo

Cepa De Hongo	Casos	Media	Grupos Homogéneos
BSNA-LB-001	3	1.696	X
BSNA-LB-003	3	1.934	X
BSNA-LB-005	3	2.644	X
BSNA-LB-002	3	2.90167	X
BSNA-LB-004	3	3.76933	X

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tabla 12 — Contraste biomasa g/L por cepa de hongo

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-002	*	-1.20567	0.528136
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-003		-0.238	0.528136
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-004	*	-2.07333	0.528136
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-005	*	-0.948	0.528136
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-003	*	0.967667	0.528136
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-004	*	-0.867667	0.528136
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-005		0.257667	0.528136
BSNA-LB-003 - BSNA-LB-004	*	-1.83533	0.528136
BSNA-LB-003 - BSNA-LB-005	*	-0.71	0.528136
BSNA-LB-004 - BSNA-LB-005	*	1.12533	0.528136

Indica una diferencia significativa.

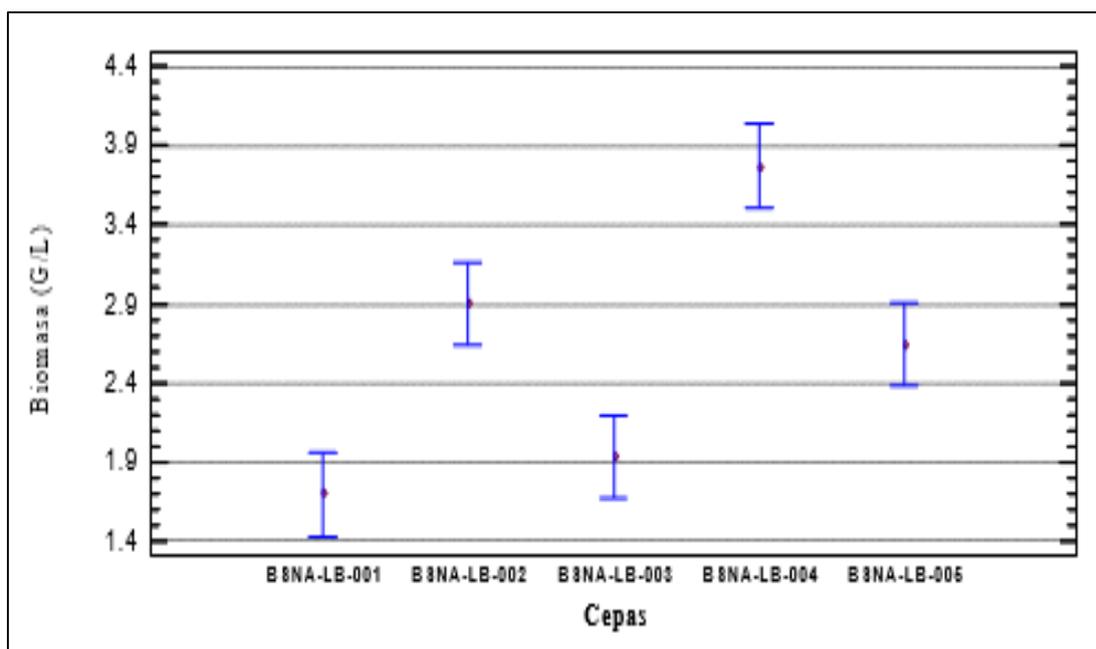


Figura 15 — Medias al 95.0 % tukey de biomasa g/L por cepa de hongo (g/L)

i) Conclusión estadística para biomasa:

Del análisis efectuado se concluye que las cinco cepas de basidiomicetos son diferentes estadísticamente en cuanto a la producción de biomasa, es decir cada basidiomiceto se diferencia de otro en la cantidad de producción de biomasa, siendo la cepa BSNA-LB-004 la que mayor biomasa produce.

Anexo 4. Análisis estadístico para actividad enzimática

A continuación, se presenta los análisis estadísticos para la actividad enzimática en función de la cepa de hongo, el pH de trabajo y la temperatura de reacción. Siendo tres factores independientes que se están analizando con una variable de respuesta que es la actividad enzimática, se ha efectuado un análisis de varianza multifactorial, que es el que se presenta a continuación.

a) Anova multifactorial - actividad enzimática

Variable dependiente: Actividad Enzimática Factores:

- Hongo pH
- Temperatura
- Número de casos completos: 60

Tabla 13 — Análisis de varianza para actividad enzimática - suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	gL	Cuadrado medio	Razón-f	Valor-p
Efectos Principales					
Hongo	2.68668	4	0.671671	9.15	0.0000
pH	0.219252	1	0.219252	2.99	0.0897
Temperatura	0.361771	1	0.361771	4.93	0.0307
Residuos	3.88982	53	0.0733928		
Total (Corregido)	7.15752	59			

Nota. Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Actividad Enzimática en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III, la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Actividad Enzimática con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla 14 — Pruebas de múltiples rangos para actividad enzimática por hongo.

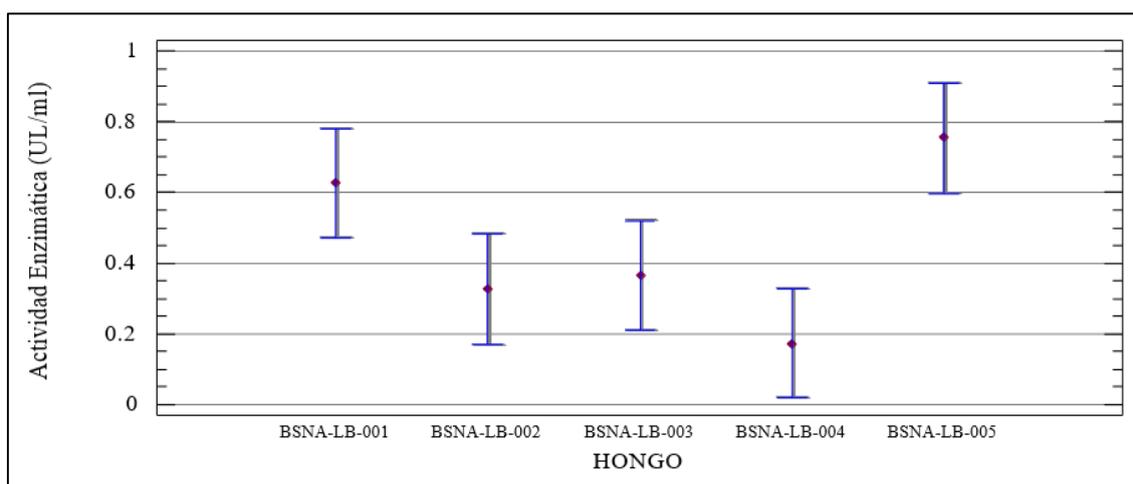
Hongo	Casos	Media Ls	Sigma Ls	Grupos Homogéneos
BSNA-LB-004	12	0.173083	0.0782053	X
BSNA-LB-002	12	0.326667	0.0782053	X
BSNA-LB-003	12	0.365833	0.0782053	X
BSNA-LB-001	12	0.628	0.0782053	X X
BSNA-LB-005	12	0.755333	0.0782053	X

Nota. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tabla 15 — Contraste para actividad enzimática por hongo.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-002		0.301333	0.312332
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-003		0.262167	0.312332
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-004	*	0.454917	0.312332
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-005		-0.127333	0.312332
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-003		-0.0391667	0.312332
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-004		0.153583	0.312332
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-005	*	-0.428667	0.312332
BSNA-LB-003 - BSNA-LB-004		0.19275	0.312332
BSNA-LB-003 - BSNA-LB-005	*	-0.3895	0.312332
BSNA-LB-004 - BSNA-LB-005	*	-0.58225	0.312332

Nota. Indica una diferencia significativa.

**Figura 16 — Medias al 95.0 % tukey HSD de cepas de hongos y actividad enzimática (UL/ml)**

i) **Conclusión del efecto de la cepa de hongo sobre la actividad enzimática:**

De los resultados, se indica que los hongos influyen estadísticamente en la actividad enzimática, es decir un hongo produce más o menos actividad enzimática que otro hongo, siendo la cepa BSNA-LB-001, la que mayor actividad enzimática produce.

Tabla 16 — Pruebas de múltiples rangos para actividad enzimática por pH

pH	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
8.4	30	0.389333	0.0494614	X
4.8	30	0.510233	0.0494614	X

Nota. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tabla 17 — Contraste actividad enzimática por pH

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
4.8 - 8.4		0.1209	0.1403

Nota. Indica una diferencia significativa.

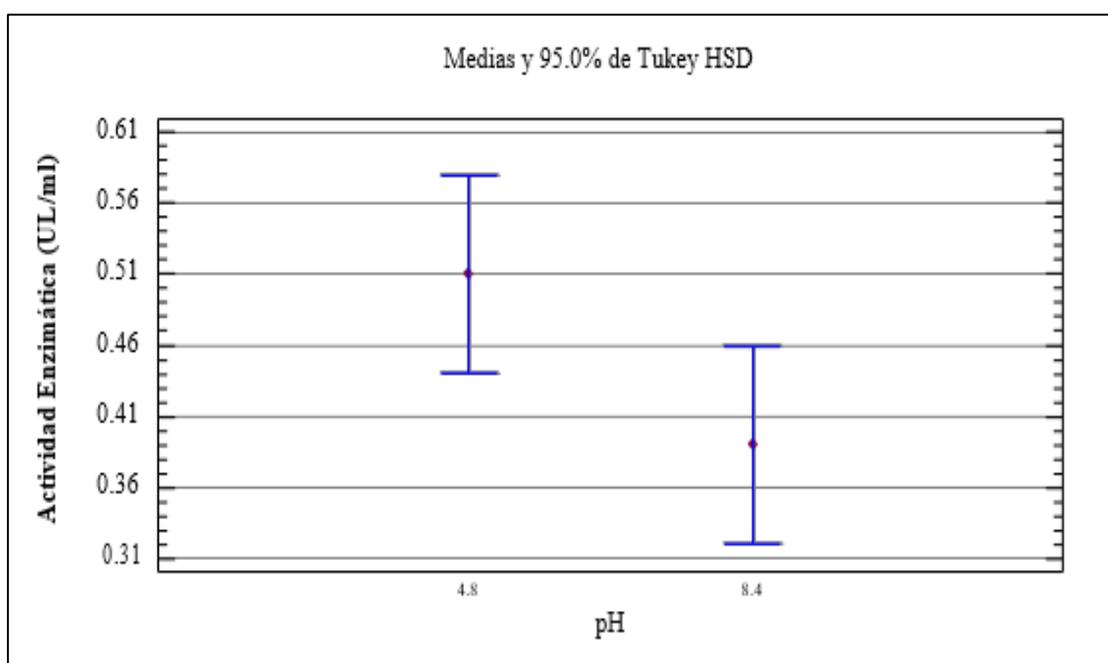


Figura 17 — Grafica al 95.0 % de pH y actividad enzimática (UL/ml)

ii) **Conclusión del efecto del pH sobre la actividad enzimática:**

De los resultados, se ha encontrado que la variable pH no influye estadísticamente en la actividad enzimática, ambos pH son iguales estadísticamente, es decir se puede trabajar a cualquier pH.

Tabla 18 — Pruebas de múltiples rangos para actividad enzimática por temperatura

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
60	30	0.372133	0.0494614	X
50	30	0.527433	0.0494614	X

Nota. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tabla 19 — Contraste para actividad enzimática por temperatura

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
50 - 60	*	0.1553	0.1403

Nota. Indica una diferencia significativa.

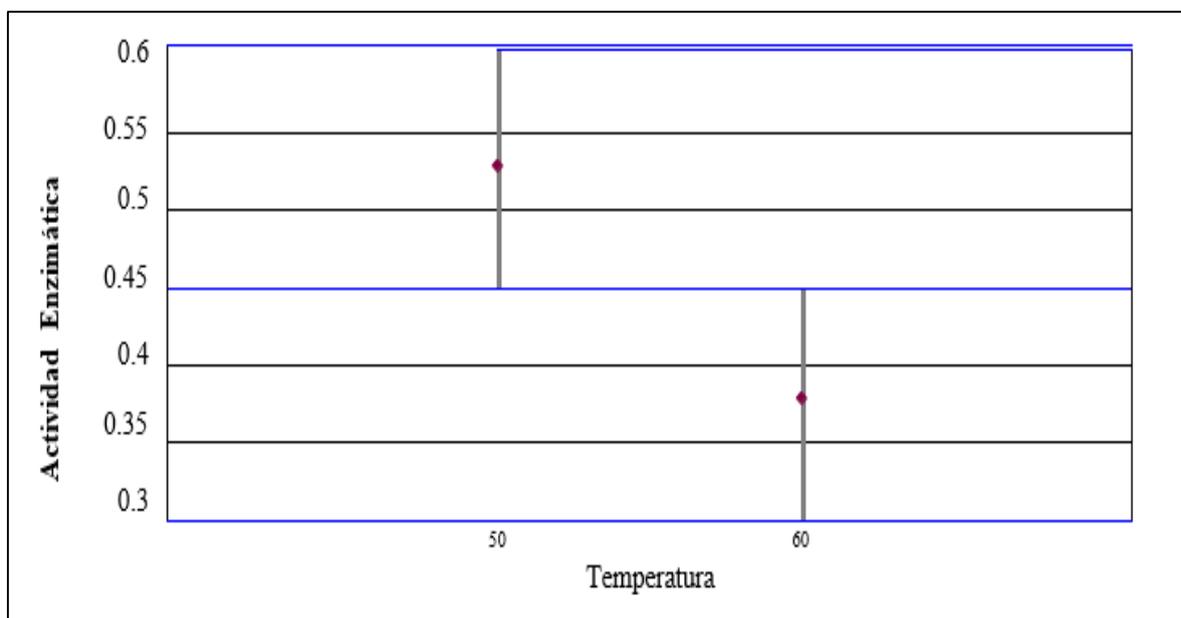


Figura 18 — Medias al 95 % tukey HSD entre temperatura| °C y actividad enzimática (UL/ml)

iii) Conclusión del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática:

De los resultados, se ha encontrado que la temperatura si influye estadísticamente en la actividad enzimática, siendo la temperatura de 50 °C la mejor para tener una mayor respuesta en cuanto a la actividad enzimática.

A fin de poder visualizar el comportamiento de la actividad enzimática se la realizó por el paquete estadístico utilizado un ploteo de la respuesta en función de las variables independientes, siendo los resultados los siguientes.

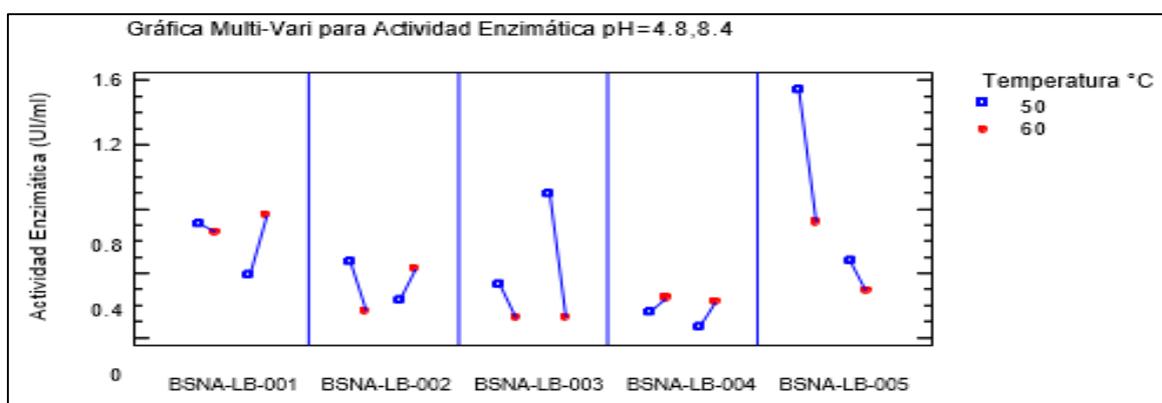


Figura 19 — Análisis multivariable de hongo y actividad enzimática (UL/ml)

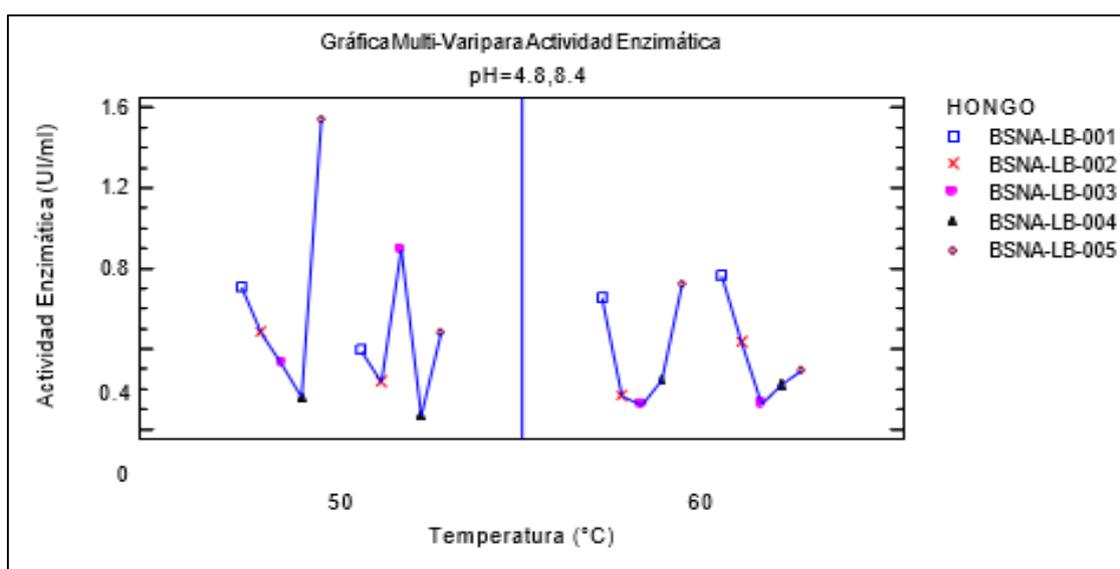


Figura 20 — Análisis multivariable de las dos temperaturas y actividad enzimática (U/mL)

Para efectos de contrastar los resultados del análisis de varianza multivariable, se ha corrido pruebas estadísticas de ANOVA simple, así confirmar los resultados que se habían obtenido, lo siguiente:

a) **Análisis de varianza simple, variable hongo:**

Tabla 20 — ANOVA para Actividad Enzimática por hongo

Fuente	Suma de Cuadrados	gL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.68668	4	0.671671	8.26	0.0000
Intra grupos	4.47084	55	0.081288		
Total (Corr.)	7.15752	59			

Nota. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tabla 21 — Pruebas de múltiples rangos para actividad enzimática por hongo

HONGO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
BSNA-LB-004	12	0.173083	X
BSNA-LB-002	12	0.326667	X
BSNA-LB-003	12	0.365833	XX
BSNA-LB-001	12	0.628	XX
BSNA-LB-005	12	0.755333	X

Tabla 22 — Contraste para actividad enzimática por hongo

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-002		0.301333	0.328284
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-003		0.262167	0.328284
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-004	*	0.454917	0.328284
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-005		-0.127333	0.328284
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-003		-0.0391667	0.328284
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-004		0.153583	0.328284
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-005	*	-0.428667	0.328284
BSNA-LB-003 - BSNA-LB-004		0.19275	0.328284
BSNA-LB-003 - BSNA-LB-005	*	-0.3895	0.328284
BSNA-LB-004 - BSNA-LB-005	*	-0.58225	0.328284

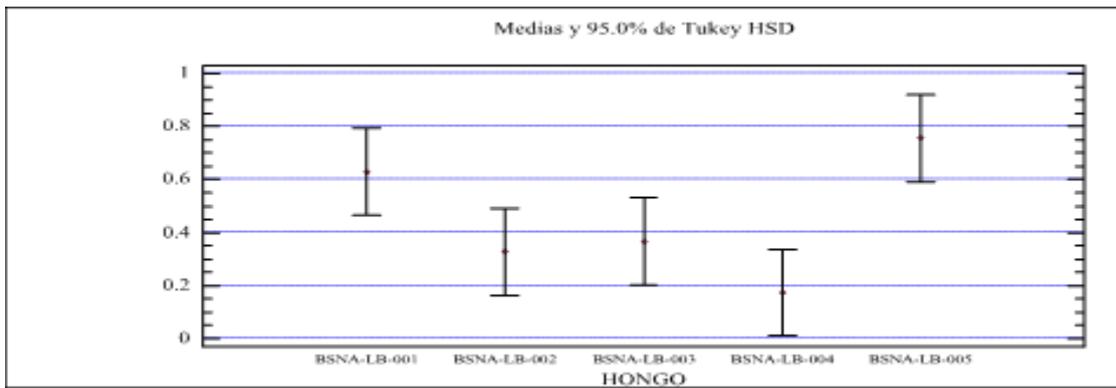


Figura 21— Medias al 95 % tukey HSD de hongo y actividad enzimática (UL/ml)

El ANOVA simple confirma los datos obtenidos, donde se indica que la variable cepa de hongo es estadísticamente significativa para la respuesta, es decir depende del tipo de hongo la mayor o menor cantidad de actividad enzimática encontrada, siendo la cepa 1 y 5 las que mejor actividad poseen.

Anexo 5. Análisis estadístico para productividad

Para efectos de analizar la variable productividad, se ha hecho pruebas estadísticas con los resultados obtenidos, y así poder seleccionar la mejor cepa, en cuanto a producción de enzima.

a) ANOVA multifactorial – productividad

Variable dependiente: productividad Factores:

B. Hongo

Bpd

Temperatura

Número de casos completos: 60

Tabla 23 — Análisis de varianza para productividad - suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	gL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
Hongo	0.814905	4	0.203726	14.60	0.0000
pH	0.025215	1	0.025215	1.81	0.1846
Temperatura	0.0686817	1	0.0686817	4.92	0.0308
Residuos	0.7395	53	0.0139528		
Total (Corregido)	1.6483	59			

Nota. Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de productividad en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III, la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores.

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre productividad con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla 24 — Pruebas de múltiples rangos para productividad por hongo

B. HONGO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
BSNA-LB-004	12	0.0458333	0.0340989	X
BSNA-LB-002	12	0.1125	0.0340989	XX
BSNA-LB-003	12	0.189	0.0340989	XX
BSNA-LB-005	12	0.285583	0.0340989	XX
BSNA-LB-001	12	0.370417	0.0340989	X

Nota. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tabla 25 — Contraste para productividad por hongo

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-002	*	0.257917	0.136182
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-003	*	0.181417	0.136182
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-004	*	0.324583	0.136182
BSNA-LB-001 - BSNA-LB-005		0.0848333	0.136182
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-003		-0.0765	0.136182
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-004		0.0666667	0.136182
BSNA-LB-002 - BSNA-LB-005	*	-0.173083	0.136182
BSNA-LB-003 - BSNA-LB-004	*	0.143167	0.136182
BSNA-LB-003 - BSNA-LB-005		-0.0965833	0.136182
BSNA-LB-004 - BSNA-LB-005	*	-0.23975	0.136182

Nota. Indica una diferencia significativa.

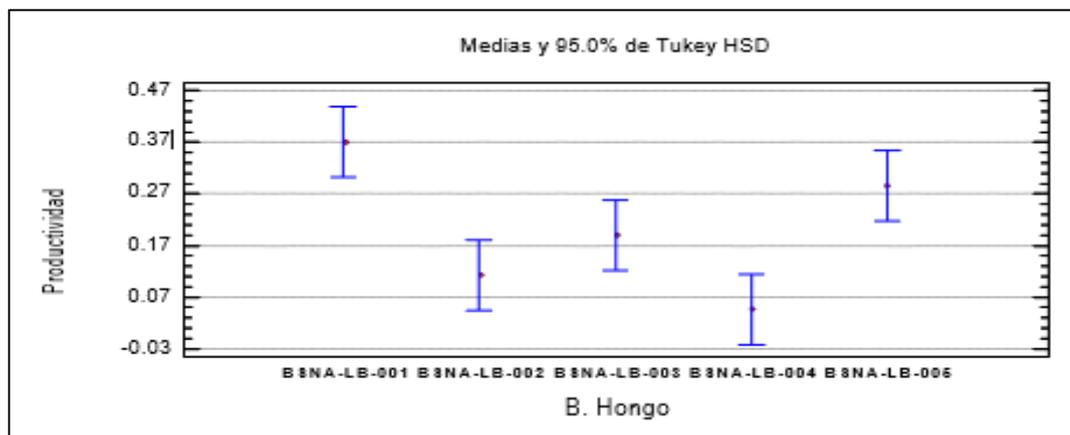


Figura 22 — Medias al 95 % tukey HSD de hongo y productividad

i) **Conclusión del efecto de la cepa de hongo sobre la productividad**

De los resultados, se indica que los hongos influyen estadísticamente en la productividad, es decir un hongo es más productivo que otro hongo, siendo la cepa BSNA-LB-001, la que mayor productividad en general.

Tabla 26 — Tablas múltiples de resultado a mayor productividad

Bpd	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
8.4	30	0.180167	0.021566	X
4.8	30	0.221167	0.021566	X

Nota. Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tabla 27 — Contraste de resultado a mayor productividad

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
4.8 - 8.4		0.041	0.0611734

Nota. indica una diferencia significativa.



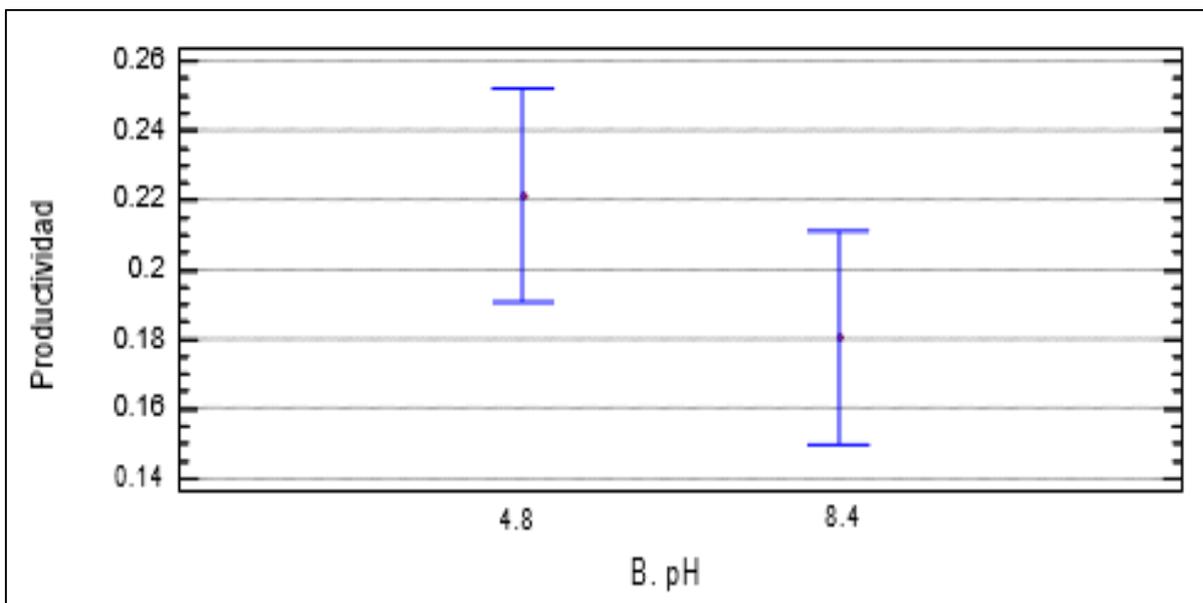


Figura 23 — Medias al 95 % tukey HSD de temperatura y productividad

ii) **Conclusión del efecto del pH sobre la productividad:**

De los resultados, se ha encontrado que la variable pH no influye estadísticamente en la productividad, ambos pH son iguales estadísticamente, es decir se puede trabajar a cualquier pH.

Tabla 28 — Pruebas de múltiples rangos para productividad por b. temperatura

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
60	30	0.166833	0.021566	X
50	30	0.2345	0.021566	X

Tabla 29 — Contraste para productividad por b. temperatura

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
50 - 60	*	0.0676667	0.0611734

Nota. Indica una diferencia significativa.



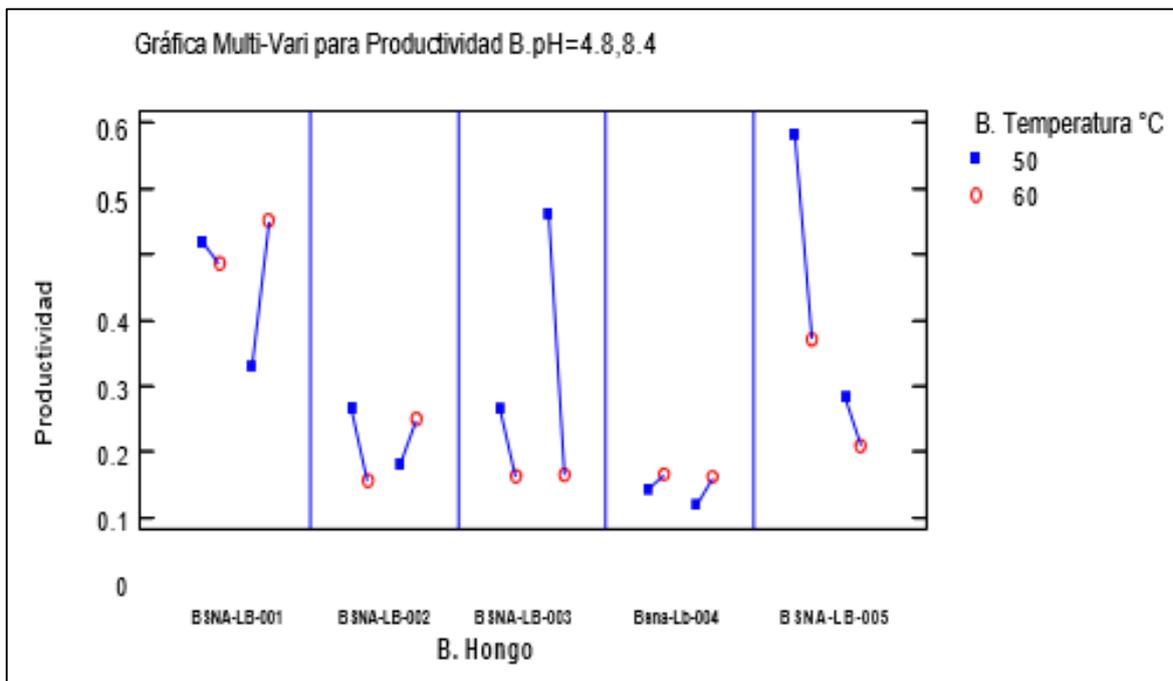


Figura 24 — Análisis multivariable temperatura y productividad

III) Conclusión del efecto de la temperatura sobre la productividad:

De los resultados, se ha encontrado que la variable temperatura si influye estadísticamente en la productividad, siendo la temperatura de 50 °C la que mayor respuesta otorga.

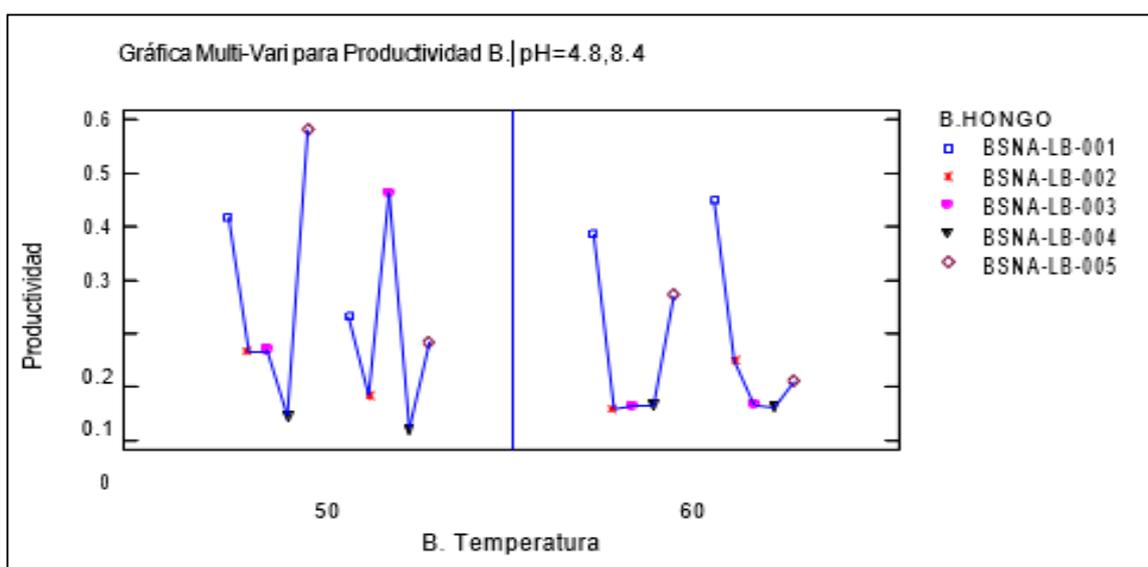


Figura 25 — Análisis multivariable temperatura y productividad

A fin de poder visualizar el comportamiento de la productividad se ha realizado un ploteo de la respuesta en función de las variables independientes, siendo los resultados los siguientes.

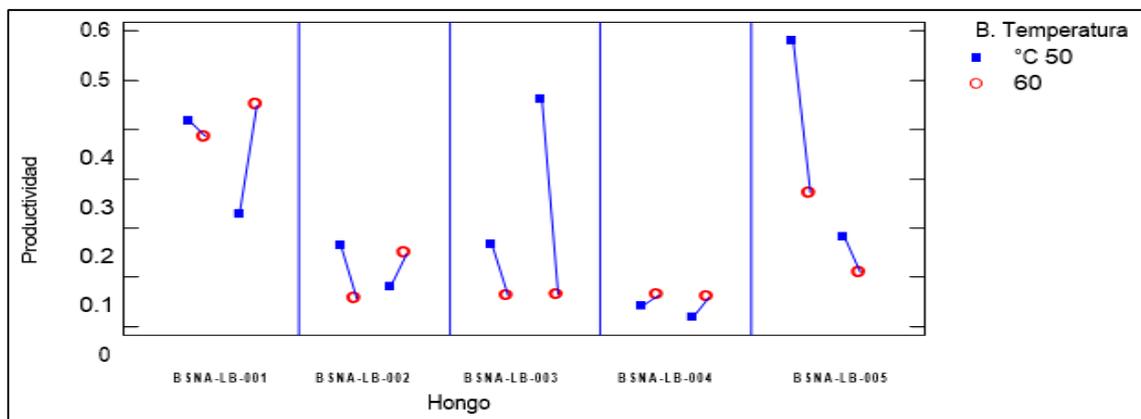


Figura 26 — Análisis multivariable de hongo y productividad

Hongo Codificado	Descripción	Basidiomiceto identificado	Cepa	Hifas microscópicas
BSNA-LB-001	Hongo carpóforo globoso de color blanco-crema, con un orificio en el ápice del hongo en el que se encontraban las esporas. En la base presento una capa de forma de estrella. Un tamaño de 2.5cm y diámetro de 3.5cm. sustrato: tierra. La cepa presento un color blanco de textura globosa y bastante compacta. Tuvo un crecimiento regular hacia arriba y no se extendió demasiado sobre el medio de cultivo. Microscópicamente el micelio muestra hifas rectas con septos poco ramificados.	<i>Geastrum</i>		
BSNA-LB-002	Hongos que crecen en grupo, con sombrerillos de 1 a 2 cm de diámetro. Con colores que variaban desde un color amarillo claro a marrón oscuro, con tallo delgado de color amarillo. Sustrato: madera vieja. La cepa fue de color poco algodonosa, con crecimiento regular distribuido sobre el medio de cultivo mas no hacia arriba. Microscópicamente las hifas fueron septadas y de paredes gruesas y poco ramificadas.	<i>Hygrophorus</i>		

<p>BSNA-LB- 003</p>	<p>Forma embudada con sombrero aproximadamente 3cm de diámetro con pie grueso de color amarillo claro a marrón, con pliegues que van desde la parte inferior del pie hasta el sombrero. La cepa obtenida fue desde, de textura poco</p>	<p><i>Cantharellus</i></p> 
<p>BSNA-LB- 005</p>	<p>algodonosa, y de crecimiento lento con mínima extensión sobre el medio de cultivo y así mismo poco crecimiento hacia arriba. Las hifas entremezcladas, septadas y ramificadas.</p>	

Figura 27 — Descripción de basidiomicetos y cepas

Fuente. (Agrada, 2018)



Foto 5.1. Visualización de los cinco hongos que presentaron actividad enzimática en pruebas preliminares

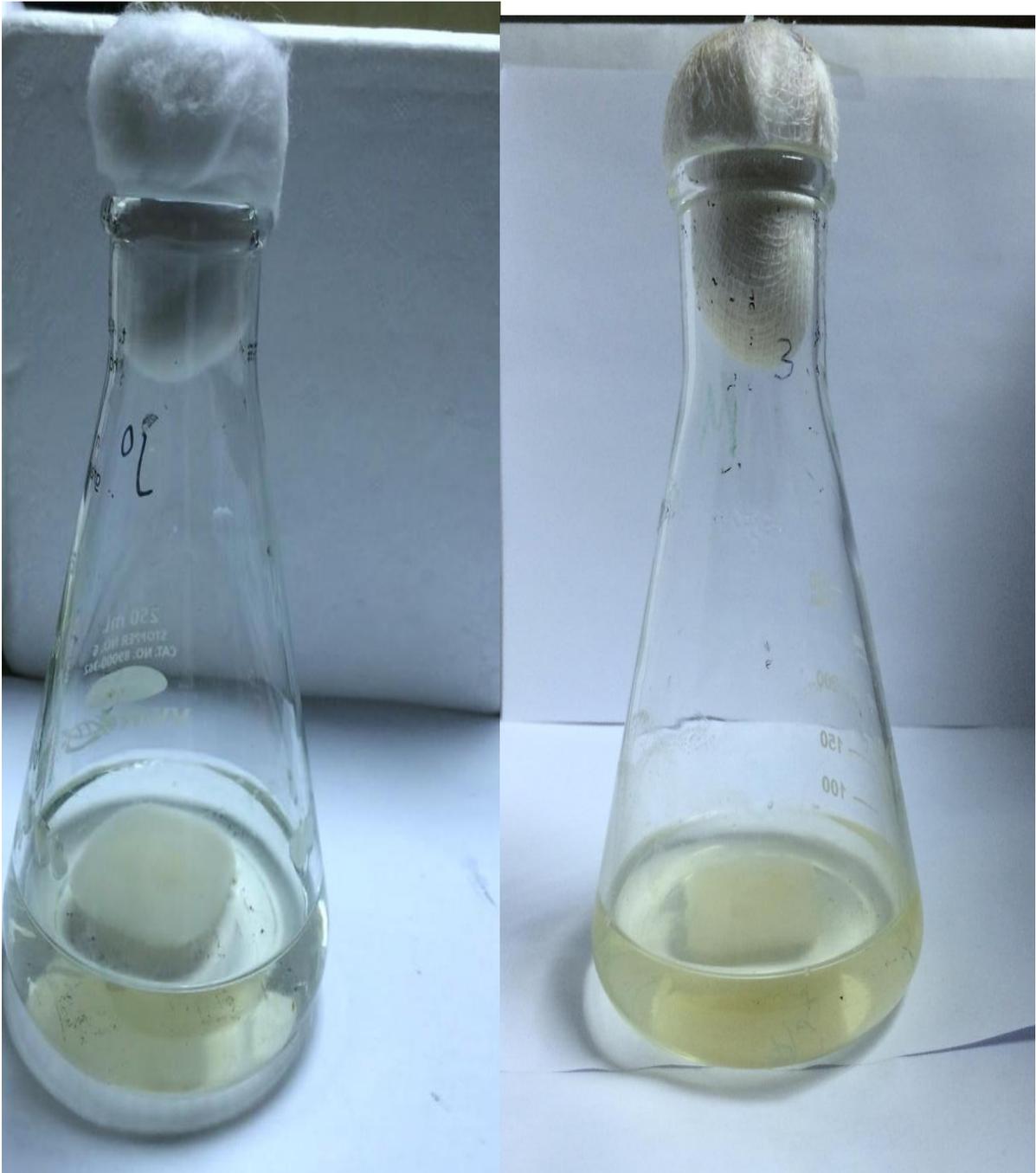


Foto 5.2. Adhesión de esporas en medio de producción PDA Y Formación de biopelícula en sustrato papel filtro



Foto 5.4. Biomasa producida de cinco basidiomicetos procedentes del santuario del Ampay



Foto 5.6. Preparación de materiales en el laboratorio de biotecnología de la escuela académica profesional de ingeniería agroindustrial