

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



TÍTULO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

**EVALUACIÓN DE POLYPORALES LIGNINOLÍTICOS DE LA
ESTACIÓN BIOLÓGICA GUANDERAS EN EL TRATAMIENTO DE
BIOMASA DE MAÍZ**

**PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR/A:

JUAN ANDRES VILLARREAL VILLARREAL

DIRECTOR:

SANTIAGO ZARATE MSc.

Ibarra – Ecuador

2021

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE POLYPORALES LIGNINOLÍTICOS DE LA ESTACIÓN BIOLÓGICA GUANDERAS EN EL TRATAMIENTO DE BIOMASA DE MAÍZ”

Tesis de Grado previa a la revisión por el Comité Asesor; por lo cual, está pendiente la autorización para su presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

REVISADO:

SANTIAGO ZARATE MSc.

DIRECTOR

JUAN CARLOS GARCÍA PhD.

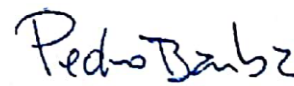
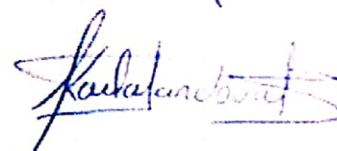
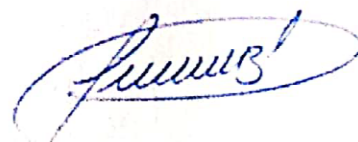
ASESOR

CARLA SANDOVAL MSc.

ASESORA

PEDRO BARBA MSc.

ASESOR





UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN

A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0401769310		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Villarreal Villarreal Juan Andrés		
DIRECCIÓN:	Av. Argentina y Cotopaxi, Tulcán		
EMAIL:	jmeteora8613@gmail.com		
TELÉFONO FIJO:	2983710	TELÉFONO MÓVIL:	0999767897

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE POLYPORALES LIGNINOLÍTICOS DE LA ESTACIÓN

	BIOLÓGICA GUANDERAS EN EL TRATAMIENTO DE BIOMASA DE MAÍZ
AUTOR (ES):	Juan Andrés Villarreal Villarreal
FECHA: DD/MM/AAAA	12/03/2021
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	MSc. Santiago Zárate Vaca

2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.



EL AUTOR

Ibarra, a los 12 días del mes de marzo de 2021

Nombre: Juan Andrés Villarreal Villarreal

AGRADECIMIENTO

Agradezco de todo corazón a mi familia por todo el apoyo brindado en estos años de labor estudiantil, a mis maestros quienes a través de este tiempo me han sabido inculcar la ciencia y sus fundamentos. Agradezco a mis compañeros por su incasable amistad, a pesar de todo lo que no pude ser para ellos. Agradezco también a la vida y las circunstancias que me han permitido ser lo que soy y que lo que seré después.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi madre, el motor de mi vida y razón para seguir vivo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido

Páginas

AGRADECIMIENTO	5
DEDICATORIA	6
ÍNDICE DE CONTENIDOS	7
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
CAPITULO I	16
INTRODUCCIÓN	16
1.1 Antecedentes	16
1.2 Planteamiento del problema.....	18
1.3Justificación	20
1.4 Pregunta directriz de la investigación	22
1.5Objetivos	22
1.5.1 <i>Objetivo general</i>	22
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	22
CAPITULO II	25
MARCO TEORICO.....	25
2.1 Residuos agroindustriales	25

Residuos de Maíz.....	25
2.2 Composición química de los residuos agroindustriales	26
Celulosa.....	26
Hemicelulosa.....	27
Lignina	27
Lignocelulosa.....	28
2.3 Pretratamiento de material lignocelulósico.....	28
2.3.1 Pretratamientos físicos	28
2.3.2 Pretratamientos Fisicoquímicos	29
2.3.3 Pretratamientos Químicos	30
2.4.5 Tratamiento Biológico.....	31
2.5 Hongos Polyporales	32
2.6 Producción enzimática de los Polyporales.....	33
2.6.1 Actividad lacasa en Polyporales.....	33
2.6.2 Determinación de actividad enzimática	34
CAPÍTULO III.....	38
3. METODOLOGÍA	38
3.1 Descripción del área de estudio	38
3.2 Muestreo	38
3.3 Aislamiento y purificación de cepas	40
3.4 Conservación y mantenimiento de cepas	41
3.5 Caracterización molecular.....	42

3.6	Cinética de crecimiento in vitro	43
3.6.1	Preparación de sustrato	43
3.6.2	Inoculación.....	44
3.6.4	Medición del área de crecimiento	47
3.6.5	Análisis estadístico de crecimiento radial	48
3.7	Actividad Enzimática.....	49
3.7.1	Preparación de sustrato.....	49
3.7.2	Incubacion y condiciones de crecimiento	49
3.7.3	Obtención de extractos enzimáticos.....	50
CAPITULO IV.....		52
RESULTADOS.....		52
4.2	Caracterización molecular.....	53
4.3	Velocidad de crecimiento micelial en caja Petri.....	54
4.3.1	Análisis de cinética de crecimiento.....	56
4.4	Análisis de actividad enzimática lacasa	57
CAPITULO V		60
5	DISCUSIÓN	60
5.1	Establecimiento in vitro de cepas.....	60
5.2	Caracterización molecular.....	61
5.3	Velocidad de crecimiento micelial.....	62
5.4	Pruebas de actividad enzimática	65
CAPITULO VI.....		69

6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	69
6.1	Conclusiones	69
6.2	Recomendaciones.....	70
7.	REFERENCIAS.....	71
	ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tabla de tratamientos.....	35
Tabla 2.	Composición porcentual de ensayos.....	35
Tabla 3.	Diseño de experimento	36
Tabla 4.	Esquema del análisis de la varianza para la evaluación de la cinética de crecimiento	38
Tabla 5.	Experimentos para determinación de actividad enzimática.	39
Tabla 6.	Especímenes muestreados.....	41
Tabla 7.	Resultados de secuenciación de IDGen.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de ubicación Estación Biológica Guanderas	32
Figura 2.	Esquema de medición de halo de crecimiento	37
Figura 3.	Colonización miceliar sobre sustrato de biomasa de maíz	43
Figura 4.	Fluctuación de velocidad de colonización.....	44
Figura 5.	Velocidad de crecimiento entre tratamientos	44

Figura 6 Cambio de coloración debido a la reacción de syringaldazina y lacasa.....	45
Figura 7. Evolución de actividad enzimática en el tiempo de fermentación.....	46

RESUMEN

El tratamiento biológico de residuos agrícolas empleando organismos descomponedores, representa una alternativa fiable que contribuye a disminuir el impacto ambiental y genera insumos de interés comercial. En la presente investigación se buscó evaluar la actividad ligninolítica de hongos del orden Polyporales extraídos de la Estación Biológica Guanderas. Para ello, se realizó la identificación de especímenes recolectados mediante análisis molecular, para verificar su pertenencia al orden Polyporales. Para la evaluación de crecimiento micelial, se elaboraron ensayos de biomasa residual de maíz, suplementada con micronutrientes y fuente de nitrógeno. La determinación del área de crecimiento se efectuó en ensayos *in vitro* donde se hicieron mediciones del halo de crecimiento micelial. A partir de las mediciones, se analizó la velocidad de colonización micelial, evaluando tres diferentes tratamientos los cuales incluyeron dos diferentes sustancias: carbonato de calcio y sulfato de calcio y la combinación de ambas. Adicionalmente, se elaboraron ensayos de biomasa de maíz enriquecida donde se inoculó micelio para la verificación de actividad enzimática vinculada a la degradación de lignina. Así, se extrajeron periódicamente fragmentos homogéneos de micelio colonizado sobre sustrato, de los cuales se obtuvieron muestras de exudados, verificados a través de pruebas espectrofotométricas. La identificación de lacasa, enzima involucrada en procesos de delignificación, se registró mediante el cambio de coloración y aumento de absorbancia durante la reacción del reactivo syringaldazina y la enzima. Tras los análisis moleculares, se identificó a la especie *Ganoderma australe*, empleada en los ensayos de crecimiento micelial. Los resultados de crecimiento mostraron una tendencia exponencial al inicio del crecimiento, al igual que en la producción de extractos enzimáticos. Se verificó que las sales añadidas al medio no tienen mayor influencia en el crecimiento de micelio. Finalmente, se determinó que la producción de enzimas ligninolíticas es

elevada tras completarse la fase de colonización de micelio sobre sustrato comprobándose la enzima lacasa durante toda la fase de medición. Los resultados obtenidos muestran que la especie identificada, al mostrar indicios de producción de enzimas ligninolíticas, puede ser empleada en el tratamiento de residuos agrícolas como el bagazo de maíz.

ABSTRACT

The final disposal of waste and an inadequate treatment are factors that affect environmental pollution and its potential use. The biological treatment of agricultural residues using decomposer organisms is a reliable alternative that contributes to reducing the environmental impact and generating inputs of commercial interest. This research aimed to evaluate the ligninolytic activity of polyporal fungi extracted from the Guanderas Biological Station. First, the identification of the specimens collected by molecular analysis was attempted, for verifying their belonging to the order of Polyporales. For the evaluation of mycelial growth, tests were carried out on residual biomass of maize, supplemented with micronutrients and a nitrogen source. The growth area was determined in in vitro tests where measurements of the mycelial growth halo were made. From the measurements, the rate of mycelial colonization was analyzed, evaluating three different treatments which included two different substances, calcium carbonate and calcium sulfate and the combination of both. Additionally, enriched corn biomass tests were carried out where mycelium was inoculated for the verification of enzymatic activity linked to lignin degradation. Thus, homogeneous fragments of colonized mycelium on substrate were periodically extracted from which samples of exudates were obtained, verified through spectrophotometric tests. The identification of laccase, an enzyme involved in delignification processes was recorded by changing its coloration and increasing absorbance during the reaction of the syringaldazine substrate and the enzyme. After molecular analysis, the species *Ganoderma australe*, used in mycelial growth tests, was identified. The growth results showed an exponential trend at the beginning of growth, as well as in the production of enzyme extracts. It was verified that the salts added to the medium did not have a significant influence on the growth of mycelium. Finally, it was determined that the production of ligninolytic enzymes is high after completing the colonization

phase of mycelium on substrate, checking the laccase enzyme throughout the measurement phase.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La conversión de biomasa residual procedente de actividades agrícolas como el cultivo de maíz o, caña de azúcar, hacia sustancias o productos de valor agregado ha resultado ser uno de los potenciales industriales y bioenergéticos más prometedores dentro del aprovechamiento de los recursos renovables (World Energy Council, 2017). Cabe aclarar que a nivel mundial se generan alrededor de 2.2×10^6 t de biomasa seca, con un poder calorífico de alrededor de 4.5×10^{21} J/año (Salcedo et al., 2016). Dentro de la agroindustria cabe aclarar que gran parte de los residuos generados, no son aprovechados como recursos de optimización energética o en la generación de productos de valor agregado. En oposición, se opta por desecharlos contribuyendo al agravamiento en la contaminación ambiental y calentamiento global (Geoffrey, 2009).

En la producción agrícola nacional, el cultivo de maíz, a pesar de no representar aportes significativos al producto interno bruto, es de fundamental importancia alimentaria para la población nacional (Castro, 2017). Esto implica una importante producción de biomasa residual derivada de este cultivo, residuos que no se aprovechan debido a la escases de recursos económicos e insuficiente tratamiento (Instituto Nacional de Preinversión, 2014). Estas carencias han repercutiendo en un mal aprovechamiento de este recurso, impidiendo la generación de potenciales productos biotecnológicos de valor agregado (INP, 2014). Actualmente, se ha optado por emplear estos residuos como forraje para ganado, abonos verdes y en escasa medida, como material combustible en las comunidades rurales (Almada et al., 2011).

Dentro de la biotecnología industrial, se ha buscado optimizar el uso de residuos agrícolas mediante el empleo de organismos degradadores para lograr la conversión de materiales lignocelulósicos en productos de valor agregado, así como también hacia insumos energéticos derivados de estos (Liese, 1975). Los organismos más empleados en procesos de fermentación refieren tanto a hongos y bacterias, cuyo empleo estriba en su capacidad metabólica y adaptativa sobre sustratos recalcitrantes (composición, escasa disponibilidad de nutrientes, etc) (Kuhad & Singh, 1993). La búsqueda de organismos cuya capacidad metabólica permita una rápida y eficiente conversión de residuos, ha sido uno de los objetivos principales de la biotecnología industrial, y dicha búsqueda se ha enfocado hacia ecosistemas que reúnen características ambientales que permiten el desarrollo de organismo con un potencial degradativo industrial (Wilson, 2011) (Berrin et al., 2012).

En los ecosistemas terrestres, tanto basidiomicetos como procariotas, se han caracterizado por una elevada capacidad de desdoblamiento de sustancias orgánicas, siendo capaces de aprovechar completamente la biomasa residual disponible (Cullen & Kersten, 1996). Esta característica está asociada a la producción de metabolitos y sustancias de interés especial, tanto enzimas, pigmentos, antibióticos, entre otros (Dávila, 2006). La identificación de basidiomicetos, en específico Polyporales descomponedores de compuestos lignocelulósicos, ha sido un campo escasamente explorado en Latinoamérica, y menos aún en Ecuador (Toapanta, 2014). La identificación de estos organismos ha sido especialmente fructífera en zonas tropicales de la región amazónica ecuatoriana específicamente en el bosque protector Yasuní, donde se han identificado más de 110 especímenes tanto en un área de bosque primario y en un área de bosque intervenida (Toapanta, 2014).

La prospección de Polyporales en los bosques alto montanos andinos de la sierra norte apenas se ha documentado, por lo cual existen escasos

reportes de diversidad, distribución ecológica o posibles hallazgos de especies de interés industrial, investigativo, o reportes de caracterización biológica y distribución geográfica (Ambrose et al., 2006). Una de las características más resaltantes de los Polyporales, es su capacidad de sintetizar enzimas de gran poder catalítico, característica que les permite atacar directamente los enlaces covalentes presentes en moléculas orgánicas asociadas a manera de polímero como la lignina, hemicelulosa y celulosa, presentes en residuos agrícolas (Sánchez, 2009). La escasa investigación disponible ha impedido identificar posibles hallazgos de Polyporales que pudiesen ser empleados en el tratamiento de biomasa residual procedente de labores agrícolas.

La actividad ligninolítica característica de los hongos del orden de los Polyporales se fundamenta en su capacidad de secreción de enzimas, cuya actividad en consorcio, además de su elevada especialización, muestran un enorme potencial en investigación y desarrollo de grandes prospectos en biotecnología. No obstante, en Latinoamérica y Ecuador, son escasos los registros de datos sobre ensayos de biotransformación de residuos agrícolas mediante el empleo de hongos (World Energy Council, 2017).

1.2 Planteamiento del problema

Solo en territorio ecuatoriano, se han estimado más de 10000 especies de hongos de las cuales solo 5000 se han descrito (Ortiz et al., 2016). La descripción macroscópica de organismos fúngicos ha sido la principal forma en cómo se han reportado su diversidad, morfología, características de crecimiento y biología en general. La caracterización genético-molecular ha sido escasamente reportada (Læssøe & Petersen, 2008; Ordoñez, 2018; Sánchez, 2009). Además, el empleo de esta diversidad fúngica como elemento clave en el desarrollo de biotecnología sustentable aun no cuenta

con estudios fiables de aplicabilidad (Hawksworth, 1991; Soccol et al., 2017).

La vasta mayoría de hongos del orden Polyporales, se caracterizan por su capacidad de transformar mediante reacciones enzimáticas, la matriz lignocelulósica en sustancias y elementos más fácilmente asimilables por otras especies vivas (Daley et al., 2017). La capacidad de transformación de la matriz lignocelulósica en compuestos más simples de parte de los Polyporales (xilosa, sacarosa, terpenos, esteroides, etc.), cuenta con pocos estudios de investigación y son escasos los reportes donde se mencione su potencial uso, respecto a cepas comerciales (Quintero et al., 2006). Las reacciones enzimáticas de transformación de materiales lignocelulósicos de desecho, aún no cuentan con modelos fiables donde se esclarezca el rendimiento de transformación de biomasa, lo cual dificulta su aplicabilidad en el sector industrial (Boddy, 2006)(Luangharn et al., 2017).

El ataque enzimático varía en dependencia del tipo de matriz lignocelulósica (variable entre especies vegetales) humedad del medio ambiente, temperatura, pH y disponibilidad de micronutrientes (Gutiérrez & Martínez, 1996). No obstante, aún no se ha esclarecido el mecanismo general de reacción entre las enzimas segregadas y el tipo de matriz donde se producen las reacciones de delignificación (Mehra et al., 2018). Además, las evaluaciones del desempeño y crecimiento micelial sobre sustratos enriquecidos, no reportan la capacidad de adaptación del micelio en fase de colonización (Yan et al., 2015).

En el país, aún no se han aplicado tecnologías que optimicen el uso de residuos agroindustriales para la obtención de productos de valor agregado como bioetanol, metabolitos de interés comercial o enzimas (Ortiz et al., 2016b). En el sector industrial, se ha venido empleando ciertas cepas de basidiomicetos, como *Phanerochaete chrysosporium*, cuya capacidad ligninolítica sobre sustratos maderosos se ha establecido como modelo (C &

Enao, 2017). No obstante, estas especies comerciales requieren ciertas condiciones específicas de desarrollo, que hacen difícil su cultivo, así como su aplicación sobre residuos agroindustriales como el bagazo de maíz (Boddy, 2006).

En dependencia de la composición del tejido vegetal, suele existir diferentes grados de degradación de los componentes de la matriz lignocelulósica (Daley et al., 2017), no obstante, aún no están esclarecidos los mecanismos tanto ecológico como fisiológico por el cual estos especímenes son capaces de adaptarse y producir enzimas ligninolíticas. Por ello, es preciso evaluar las interacciones y condiciones de desarrollo además del crecimiento miceliar, respecto a los sustratos empleados especialmente sobre residuos agroindustriales (Yang et al., 2011).

1.3 Justificación

Ecuador, es considerado como uno de los puntos de mayor diversidad a nivel mundial, y esta no es la excepción para los organismos fúngicos (Bogner et al., 2016). Alrededor de 9600 especies de hongos basidiomicetos pertenecientes a cerca de 3776 taxones han sido identificadas, lo que representa cerca del 4% del total explorado en el territorio nacional (UTPL, 2015). La vasta diversidad biológica ha sido encontrada principalmente dentro de áreas protegidas pertenecientes al sistema nacional de áreas protegidas y en reservas privadas (Cuesta et al., 2017).

La estación biológica Guanderas, perteneciente al grupo ecológico Jatún Sacha, situada en la provincia del Carchi, ha sido considerada como un punto caliente de biodiversidad dentro de los bosques nublados andinos (Ambrose et al., 2006). La elevada diversidad biológica registrada representa una fuente fiable de potenciales organismos, cuya capacidad metabólica podría ser explotada (Bogner et al., 2016). Varios de los saprófitos primarios

reportados, han sido identificadas como especies pertenecientes al filo Basidiomycota, en particular al orden de los Polyporales (Ordoñez, 2018).

Particularmente, las especies nativas de Polyporales degradadores de lignocelulosa, podrían tener un buen aprovechamiento en el contexto agroindustrial, dado su relativo bajo costo de cultivo, mínimas condiciones de crecimiento, gran potencial alimenticio y farmacéutico (Ortiz et al., 2016b). Según reportan Saha, Qureshi, Kennedy, & Cotta, (2016), la degradación y transformación enzimática de residuos agroindustriales hacia productos de interés con cepas fúngicas, llega a ser altamente significativa, en especial al emplearse cepas cuya actividad ligninolítica está establecida.

La diversidad fúngica del orden de los Polyporales hace de estos organismos, candidatos idóneos en aplicaciones de fermentación sólida sobre residuos agroindustriales de abundante generación, como el maíz (Yoon et al., 2014). Este residuo agroindustrial ha alcanzado volúmenes de producción anuales de cerca de 104 876.64 toneladas métricas, cantidad que va en aumento año a año (INP, 2014). La creciente generación agroresidual de maíz hace necesaria la búsqueda de tecnologías sustentables, eficientes y amigables con el medio ambiente para la correcta disposición final de los mismos (INP, 2014).

El uso de tecnologías basadas en organismos vivos que podrían usar la matriz lignocelulósica del maíz como sustrato base para su desarrollo y final descomposición representa una alternativa fiable respecto a pajas de cereales y sustratos maderosos, debido a porcentajes mayores de azúcares solubles (Quiroz et al., 2016), glúcidos que mejoran el tiempo de adaptación y crecimiento miceliar de los hongos (Stamets, 1993). Además, este residuo cuenta con índices calóricos superiores respecto a las gramíneas, fluctuando entre 1.69 y 2.1 Mcal/kg en masa seca (Quiroz et al., 2016) (INP, 2014). Dado que la matriz lignocelulósica de maíz presenta una baja concentración relativa de lignina y otras moléculas recalcitrantes (Yoon et al., 2014), el

tratamiento biológico con hongos Polyporales representa una alternativa eficaz y económica, aprovechando recursos considerados como desecho. Además, este tipo de biotecnología, tiene el potencial de generar insumos y productos de especial interés nutraceútico y alimenticio (Farinas, 2015).

1.4 Pregunta directriz de la investigación

¿Los hongos Polyporales recolectados de la estación biológica Guanderas, poseen actividad ligninolítica para el tratamiento de residuos agrícolas de maíz?

1.5 Objetivos

1.5.1 *Objetivo general*

Evaluar la capacidad ligninolítica de hongos Polyporales de la estación biológica Guanderas, para la degradación de residuos agrícolas de maíz.

1.5.2 *Objetivos específicos*

- Caracterizar molecularmente hongos Polyporales de capacidad ligninolítica, recolectados del área protegida.
- Analizar mediante cultivo *in vitro* en estado sólido, la cinética de crecimiento de las cepas caracterizadas de hongos Polyporales recolectados.
- Determinar la actividad enzimática de cepas de Polyporales recolectados, en residuos de maíz.

1.5.3 *Hipótesis*

Las poblaciones de hongos Polyporales recolectados de la estación biológica Guanderas son capaces de degradar residuos agrícolas de maíz.

1.6 Marco legal

Principalmente los puntos que se toman para el desarrollo del marco legal del tema de tesis se receptaron de la Constitución del Ecuador 2008 y al Plan Nacional del Buen Vivir 2017-2021.

Constitución del Ecuador

Capítulo Segundo: Ambiente sano

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Art. 15.- El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias.

Capítulo séptimo: Derechos de la naturaleza

Art. 71.- La naturaleza o *Pacha Mama*, donde se reproduce y realiza la vida, tiene derecho a que se respete integralmente su existencia y el mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales, estructura, funciones y procesos evolutivos.

Art 73. Se deberán aplicar medidas de precaución sobre actividades que causen deterioro en el ecosistema y alteraciones en los ciclos vitales.

Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales

Sección séptima: Biosfera, ecología urbana y energías alternativas

Art. 413.- El Estado promoverá la eficiencia energética, el desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías renovables, diversificadas, de bajo impacto y que no pongan en riesgo la soberanía alimentaria, el equilibrio ecológico de los ecosistemas ni el derecho al agua.

De acuerdo con el Plan Nacional del Buen Vivir 2017-2021:

Objetivo 3: Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones.

Promueve buenas prácticas ambientales que aporten a la disminución de la contaminación, la conservación, la mitigación y la adaptación a los efectos del cambio climático, e impulsar las mismas en el ámbito global.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Residuos agroindustriales

Los desechos agrícolas, que incluyen tanto de producción primaria así como aquellos generados a partir de fuentes ajenas a la producción neta, son un término utilizado para describir aquellos desperdicios producidos en una granja a través de diversas actividades derivadas de la labor campestre (Banco Central del Ecuador, 2015; Almada et al., 2011). Estas actividades pueden incluir, pero no se limitan a, la producción lechera, la horticultura, el cultivo de semillas, la cría de ganado, las tierras de pastoreo, las huertas, las parcelas de viveros e incluso los bosques (Castro, 2017). Los residuos de la agricultura y la industria alimentaria, constituyen una proporción significativa de la productividad agrícola mundial (Geoffrey, 2009), representando más del 30%. Dado que los residuos agrícolas no están restringidos a un lugar en particular, sino que se distribuyen ampliamente, su empleo inadecuado y desecho, poseen efectos adversos sobre los recursos naturales, como las aguas superficiales y subterráneas, el suelo y los cultivos, así como la salud humana (Geoffrey, 2009).

Residuos de Maíz

El cultivo del maíz produce una gran cantidad de biomasa, de la cual el hombre cosecha aproximadamente el 50% en forma de grano (Castro, 2017). La mayor parte, corresponde a diversas estructuras de la planta tales como caña, hoja, limbos, mazorca, entre otros, con lo que la biomasa residual generada en un cultivo de maíz fluctúa entre 20 a 35 t/ha y en el maíz de choclo (cañas y hojas) varía entre 16 a 25 t/ha (Almada et al., 2011). La proporción entre los componentes del residuo depende principalmente de la

variedad, nivel de fertilización y tipo de cultivo (Quiroz et al., 2016). Las estructuras vegetativas de la planta de maíz poseen diversas características fisicoquímicas que van a ser clave al momento de su degradación y transformación. En dependencia de la composición, los valores de nutrientes variarían dependiendo de si el residuo corresponde a maíz de grano o maíz para consumo fresco. Los tallos presentan las estructuras más lignificadas y de menor contenido de proteína bruta (3.1%) y las hojas entre 4 y 7 % (Quiroz et al., 2016).

2.2 Composición química de los residuos agroindustriales

Celulosa

La celulosa es un polisacárido sintetizado en gran medida por parte de organismos eucariotas fotosintéticos y ciertas especies de procariotas también fotosintéticos, y constituye entre el 35 y el 50% del peso neto seco de estos (Bandyopadhyay et al., 2010). Este polisacárido se establece en la pared celular, formando conglomerados submicroscópicos alargados, cuyo designio corresponde a micelas. Estas micelas se constituyen en complejos aún mayores, las microfibrillas, cuya naturaleza es el empaquetamiento, formando un arreglo cristalino sumamente ordenado, en el cual todos los átomos dispuestos permanecen fijos en posiciones discretas, uno en contraposición de otro; este empaquetamiento previene la intrusión de moléculas catalíticas, así como también de moléculas de agua (Cuervo et al., 2009).

Esta estructura se encuentra rodeada por polisacáridos de hemicelulosa que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, haciéndola aún más resistente a la hidrólisis química y biológica (Gutiérrez, Sarmiento, & Montoya, 2015). En dependencia del organismo

sintetizador, la estructura global de la celulosa puede tener entre 8.000 y 15.000 unidades monoméricas por cadena. Dicha estructura molecular está constituida por moléculas de D-glucosa fijadas por enlaces glucosídicos β -1,4, por lo que se requieren 8 módulos monoméricos de glucosa para estructurar una matriz impermeable (Lampi et al., 2013).

Hemicelulosa

Es un polisacárido compuesto de unidades moleculares orgánicas más simples, generalmente glucosa, xilanosa, arabinosa, dispuestas en tres dimensiones y en disposición ramificada (Lampi et al., 2013). Generalmente esta estructura molecular se asocia con la matriz celulósica y de lignina a través de enlaces covalentes y puentes de hidrogeno; esto le confiere mayor rigidez a la estructura global del tejido de la planta (Bhutto et al., 2017).

Lignina

La lignina es un complejo polimérico de elevada estructura, donde es posible encontrar un entramado tridimensional formado por unidades propano-benceno unidas a través de enlaces covalentes orgánicos (Kameshwar & Qin, 2016). Se encuentra en todas las plantas vasculares incluyendo especies herbáceas, a las cuales brinda rigidez soporte y protección. Como macromolécula y polímero de alta complejidad, la lignina forma una barrera fija contra agentes patógenos y contra ataques enzimáticos dirigidos a entramados más simples como la celulosa (Liese, 1975).

Lignocelulosa

Se define como el consorcio molecular y estructural de los organismos vegetales terrestres, representando más del 50% de su masa neta seca. El termino hace referencia al conglomerado estructural conformado por lignina, celulosa y hemicelulosa además de otras biomoléculas como proteínas, cuyo papel anexo brinda estabilidad y resistencia al conglomerado. La lignocelulosa, el principal componente la pared celular de las plantas terrestres, se describe como una estructura dinámica y compleja compuesta por polisacáridos, anillos aromáticos y cadenas polipeptídicas (Kristensen, 2009).

2.3 Pretratamiento de material lignocelulósico

El pretratamiento del material lignocelulósico es un proceso requerido para remover la matriz de lignina y hemicelulosa, con el fin de reducir la estructura cristalina de la celulosa e incrementar la porosidad del material (Machado & Ferraz, 2017). El pretratamiento debe obtener los siguientes resultados: mejorar la propensión subsecuente para formar azúcares a través de hidrólisis enzimática; evitar la degradación o pérdida de carbohidratos; evitar de formación de subproductos que podrían inhibir la subsecuente hidrólisis y fermentación; ser eficiente (Sindhu et al., 2016).

2.3.1 Pretratamientos físicos

Trituración mecánica

A través de trituración de los desperdicios agrícolas es posible reducir el tamaño de las partículas al mínimo requerido para la hidrólisis enzimática, ello permite un mejor aprovechamiento; si lo que se pretende es extraer

directamente la energía de la biomasa se logra mejor a través de incineración (Alderetes, 2016). En el caso de un postratamiento, será necesario realizar el cálculo del tamaño óptimo de partícula para así lograr una eficiente transformación catalítica (Rabemanolontsoa & Saka, 2016).

Pirólisis

Consiste en un pretratamiento en que se somete al material lignocelulósico a temperatura superiores a los 300 °C; en estas condiciones, la celulosa rápidamente se descompone para dar lugar a productos gaseosos y ceniza residual (Alderetes, 2016). La descomposición es mucho más lenta y los productos gaseosos formados son menos volátiles a más bajas temperaturas (Shirkavand et al., 2016).

2.3.2 Pretratamientos Fisicoquímicos

Explosión con CO₂

La explosión con dióxido de carbono es un pretratamiento muy usado para la conversión de material lignocelulósico. Se hipotetiza que el CO₂ formaría ácido carbónico e incrementaría el grado de hidrólisis (Luo et al., 2013). Este pretratamiento al igual que los dos anteriores, desintegra parte la matriz lignocelulósica, pero tiene la ventaja adicional de consumir poca energía, no generar compuestos inhibitorios, así como también el mínimo riesgo de contaminación por fugas como ocurre con la explosión de fibra con amoníaco (Shirkavand et al., 2016).

2.3.3 Pretratamientos Químicos

Ozonólisis

El gas ozono puede emplearse en la degradación de residuos vegetales tales como hojas, bagazo, madera, residuos de algodón y residuos de maíz. El proceso de ozonólisis ataca principalmente a la matriz de lignina y hemicelulosa, pero apenas si interactúa con la celulosa (Travaini, Juárez, Rodríguez, 2016). El grado de hidrólisis enzimática se ve incrementado por un factor de 5 seguido de un 60 % de remoción de lignina de los restos húmedos tratados (Cardona et al., 2010). Según se reporta, el grado de hidrólisis enzimática lograda, previo el pretratamiento con ozono, se incrementa hasta un 57% así como el porcentaje de lignina se reduce desde un 29% hasta un 8% luego del pretratamiento (Travaini et al., 2016). El pretratamiento con ozono posee importantes puntos a favor como: remoción efectiva de lignina, no produce residuos tóxicos y las reacciones necesarias se llevan a cabo en condiciones normales de presión y temperatura. Empero, su gran limitante es su costo, dada la gran cantidad de ozono que se requiere para el proceso de reacción (Bhutto et al., 2017).

Hidrólisis Ácida

Ácidos concentrados como H_2SO_4 y HCl se han usado para el tratamiento de material lignocelulósico (Cardona et al., 2010). El carácter químico de estas sustancias permite una buena conversión hidrolítica, no obstante, sus elevadas concentraciones llegan a ser muy tóxicas, corrosivas y biopeligrosas por lo que requieren reactores especialmente diseñados que resistan la corrosión (Behera et al., 2014). La dilución de ácido sulfúrico puede alcanzar altos rendimientos en la destrucción de la matriz celulósica. A

una moderada temperatura se ha reportado una escasa sacarificación y destrucción de azúcares (Behera et al., 2014).

Hidrólisis Alcalina

Ciertas bases pueden emplearse en el pretratamiento de material lignocelulósico, no obstante, sus efectos dependen del contenido neto de lignina del material a tratarse (Cardona et al., 2010). El mecanismo de hidrólisis alcalina se teoriza como una reacción de saponificación de los enlaces intermoleculares, en específico de los puentes éster que unen la porción xileno de la hemicelulosa y otros componentes como la lignina (Bhutto et al., 2017). La adición de altas concentración de sustancias cáusticas promueve la remoción y separación entre los agregados moleculares que conforman la lignocelulosa, así mediante el empleo de bases fuertes como NaOH, se aumenta la disgregación de las paredes celulares, disminuyendo la cristalización celulósica y eliminan los enlaces entre el conglomerado de lignina y los carbohidratos libres (Seok et al., 2016).

2.4.5 Tratamiento Biológico

Hidrólisis enzimática

Se define generalmente como una reacción catalítica llevada a cabo por hidrolasas, cuya actividad estriba en la capacidad de hidrolizar los enlaces glucosídicos presentes en la matriz lignocelulósica (Y. Sun & Cheng, 2002). La hidrólisis enzimática de la celulosa se lleva a cabo gracias a la acción concomitante de un consorcio enzimático conocido como celulasas, que pertenecen a la superfamilia de las glicosil hidrolasas, nombre correspondiente debido a que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico

entre 2 o más hidratos de carbono o entre estos y una porción glucosídica (S. Sun et al., 2016).

Las glicosil hidrolasas se han clasificado en más de 100 familias, y cada una de estas contiene cadenas peptídicas que están emparentadas por su secuencia genómica, su estructura tridimensional y por supuesto, por su accionar catalítico (Rabemanolontsoa & Saka, 2016). La conformación molecular deducida para estas enzimas representa a dos módulos globulares autónomos: un dominio catalítico, garante de la reacción de hidrólisis como tal, y un módulo de unión a la celulosa, que desempeña funciones de estabilización: así, su función base es mantener la enzima cerca a las proximidades del sustrato, a continuación, desempeña una función de reconocimiento, y como punto culminante, una función disruptiva (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

2.5 Hongos Polyporales

Los Polyporales son un orden del reino fungi perteneciente a la clase Agaromycetes, de la división Basidiomycota (Toapanta, 2014). Estos macromicetos se caracterizan por presentar un crecimiento restringido a madera, y muy pocos crecen como ectomicorizas anclados al suelo (Laura & Castellanos, 2009). En general son hongos saprófitos de podredumbre blanca o parda, no obstante, varias especies se especializan en el parasitismo de árboles (Hashemi & Mohammadi, 2016). El orden contiene alrededor de 1800 especies a nivel mundial (Binder et al., 2013). Los cuerpos fructíferos derivados de este tipo de organismos, siempre se ven asociados a madera en descomposición o árboles moribundos (Toapanta, 2014). Los Polyporales descomponedores representan una parte crucial en el ciclo del carbono, al ser organismos capaces de degradar completamente todos los componentes recalcitrantes de la pared celular de las plantas: lignina, hemicelulosa y

celulosa (Binder et al., 2013). Las especies de pudrición blanca del orden Polyporales se han reportado como eficientes degradadores de lignina, dejando, como residuo de su actividad biológica, un remanente de celulosa (Binder et al., 2013). Dentro de este orden, existen especies de considerable interés tanto comercial y como alimento nutracéutico, entre los que cuentan las especies de los géneros *Ganoderma*, *Trametes* y *Felinus*.

2.6 Producción enzimática de los Polyporales

Las especies del orden Polyporales han sido identificadas como saprófitos primarios dentro de la cadena de recirculación de bioelementos, ello implica su rol como transformadores de materia orgánica en compuestos asimilables (Kuhad & Singh, 1993). La producción enzimática de los Polyporales está restringida a las condiciones ambientales y las características fisicoquímicas del sustrato (Elissetche et al., 2007). Se ha observado que la vasta mayoría de Polyporales se han adaptado a sustratos ricos en lignina (Hammel, 1997), ello debido probablemente como una forma de adaptación sobre sustratos que previamente no existían en la naturaleza (Berrin et al., 2012). Los miembros de este orden metabolizan principalmente enzimas degradativas, tales como ligninasas dependientes de peróxido (ligninoperoxidasas) manganeso peroxidadas, lacasas y otras cuya acción en conjunto contribuye a la degradación de materiales recalcitrantes de origen vegetal (Ferreira et al., 2015)

2.6.1 Actividad lacasa en Polyporales

La actividad metabólica de descomposición está asociada a la producción de enzimas capaces de oxidar enlaces altamente estables propios de entramados moleculares como la lignina, celulosa y hemicelulosa (Cotter, 2014). Se ha reportado que la degradación de la lignina es llevada cabo por

un complejo extracelular proteico conformado por enzimas peroxidasas, oxidorreductasas, entre otras, al encontrarse el organismo en condiciones atípicas de crecimiento tales como deficiencia de nutrientes, temperaturas fluctuantes, entre otras (Lizbeth & López, 2012).

La actividad lacasa está relacionada con la descomposición de los polifenoles constituyentes de la lignina (Kirk & Lynch, 1987). La lacasa posee un centro activo rígido, constituido por tres átomos de cobre, por lo que es llamada también multicobre oxidasa (Quintero, Feijoo, & Lema, 2006). La capacidad catalítica de las lacasas se basa en la reducción final del oxígeno molecular en agua, reacción acompañada por la oxidación de un sustrato fenólico generalmente asociado a una estructura macromolecular de la lignina (Csoklich, 1994). La catálisis de aminas aromáticas de los componentes fenólicos de la lignina se ha reportado como la principal forma de ataque hacia este compuesto (Mehra, Muschiol, Meyer, & Kepp, 2018).

2.6.2 Determinación de actividad enzimática

La medición de actividad enzimática, dentro del Sistema Internacional de Unidades se define como la cantidad de enzima que cataliza la reacción de 1 μmol de sustrato hacia la formación de 1 μmol de producto en un lapso de 1 minuto (International System of Units, 2018). La determinación de la actividad enzimática suele realizarse de forma discontinua, a través de la cuantificación de la cantidad de sustrato transformado, en un tiempo determinado (Almeida & Espín, 2015). Mediante espectrofotometría, es posible estimar la presencia de actividad enzimática por cuanto el sustrato y las enzimas presentes reaccionan para producir, subproductos y sustancias que absorben a ciertas longitudes de onda (Biermann, 1996).

A través del cambio de absorbancia y transmitancia es posible evaluar de forma cualitativa, la actividad enzimática de interés, esto gracias a que, durante procesos de catálisis enzimática, existirá un cambio configuracional en las moléculas intervinientes lo que propicia un cambio en la absorción de un determinado tipo de onda electromagnética (Lizbeth & López, 2012). El cambio de absorbancia se basa en la ley de Beer, donde se especifica que un haz luminoso monocromático al atravesar un medio líquido o gaseoso, será absorbido en cierta intensidad, ya que el medio no se mantendrá perfectamente transparente y absorberá ciertas frecuencias debidas a los cambios en los estados energéticos dentro de las moléculas reaccionantes (Ashby & Sherif, 2012). La absorbancia está dada según la ecuación 1:

$$A = \log \frac{(P_0)}{(P)}$$

Ecuación 1. Ecuación de la absorbancia basado en la ley de Beer

Donde A es la absorbancia, P_0 la intensidad de luz proyectada a la muestra y P la intensidad emergida de la muestra (International System of Units, 2018). Dado que la cantidad de sitios donde se produce la absorción del haz luminoso debe estar expresado en términos de la longitud y trayectoria de este y la concentración del absorbente, se tiene la ecuación 2:

$$A = C * d * \epsilon$$

Ecuación 2.

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molecular, d, el ancho del recipiente dado en centímetros (cm), y C, la concentración del medio donde se produce la absorbancia. Despejando C, e incluyendo el intervalo de reacción enzimática determinado, además de la longitud del recipiente correspondiente a 1 cm, se tiene una expresión donde es posible usar datos de absorbancia y poder verificar actividad enzimática:

$$C = \frac{\Delta A}{\varepsilon * t}$$

Ecuación 3. Cálculo de la concentración a partir de la absorbancia

Esta expresión relaciona la concentración en dependencia de la diferencia en la absorbancia dada, respecto a un intervalo de tiempo determinado de reacción. Finalmente se incluye a la expresión correspondiente, el volumen total de reacción respecto al volumen del extracto usado. Para la cuantificación en $\mu\text{mol/L}$ se igualan las unidades, incluyendo la mayor cantidad de parámetros físico-químicos presentes en la reacción (Agrawal & Verma, 2019), así es posible calcular la concentración del medio absorbente en función de la variación de la absorbancia, el tiempo de reacción y el volumen de mezcla del extracto enzimático:

$$C = \frac{\Delta A * Vt * 1000000}{\varepsilon * t * d * Vs}$$

Ecuación 4. Ecuación general de actividad enzimática

Las reacciones enzimáticas dependen de las condiciones fisicoquímicas donde se desarrolla la reacción catalítica. Parámetros como el pH, temperatura, concentración de sustrato e inclusive la incidencia de radiación electromagnética, pueden influir en la velocidad de reacción de un complejo enzimático (TAPPI, 2018) (Álvarez Godoy et al., 2007).

Finalmente, la determinación de la actividad enzimática se determina en dependencia del sustrato empleado. Es preciso incluir las relaciones de sustrato y sustrato seco (Ss) empleado durante el proceso de obtención de extractos enzimáticos:

$$C = \frac{IU * Ve * ghT}{Vsa * ghs * gsT}$$

Ecuación 5. Ecuación de determinación de actividad enzimática

Donde IU corresponde al valor obtenido de unidades de reacción obtenido (unidades internacionales), V_e el volumen de extracto enzimático empleado (ml), ghT masa (dada en gramos) de sustrato húmedo del ensayo empleado (g), V_{sa} volumen de extracto de reacción (ml), ghs masa de extracto de biomasa usada (g) y gsT masa del sustrato seco del ensayo usado (g).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Descripción del área de estudio

La presente investigación constó de dos fases: una fase de muestreo y una fase experimental. La fase de muestreo de hongos Polyporales fue llevada a cabo en la estación biológica Guanderas, ubicada al nororiente de la parroquia Mariscal Sucre, en el cantón Huaca, provincia del Carchi. La estación tiene una extensión de más de 1000 ha, en un rango altitudinal desde 2900 hasta 3900 msnm, caracterizada por poseer empinadas montañas y quebradas (Chaparro et al., 2009). La mayor parte de la reserva se encuentra dominada por páramo de frailejones y bosque de chaparral. Esta área ha sido descrita como una zona de alta pluviosidad (800-2000 mm), elevada densidad forestal, y considerada como uno de los últimos remanentes de bosque de ceja andina existentes en el mundo (Ambrose et al., 2006).

Por otra parte, la fase experimental fue llevada a cabo en los laboratorios de Biotecnología Aplicada en el campus San Vicente Paúl, donde se efectuó el aislamiento y purificación de las cepas muestreadas.

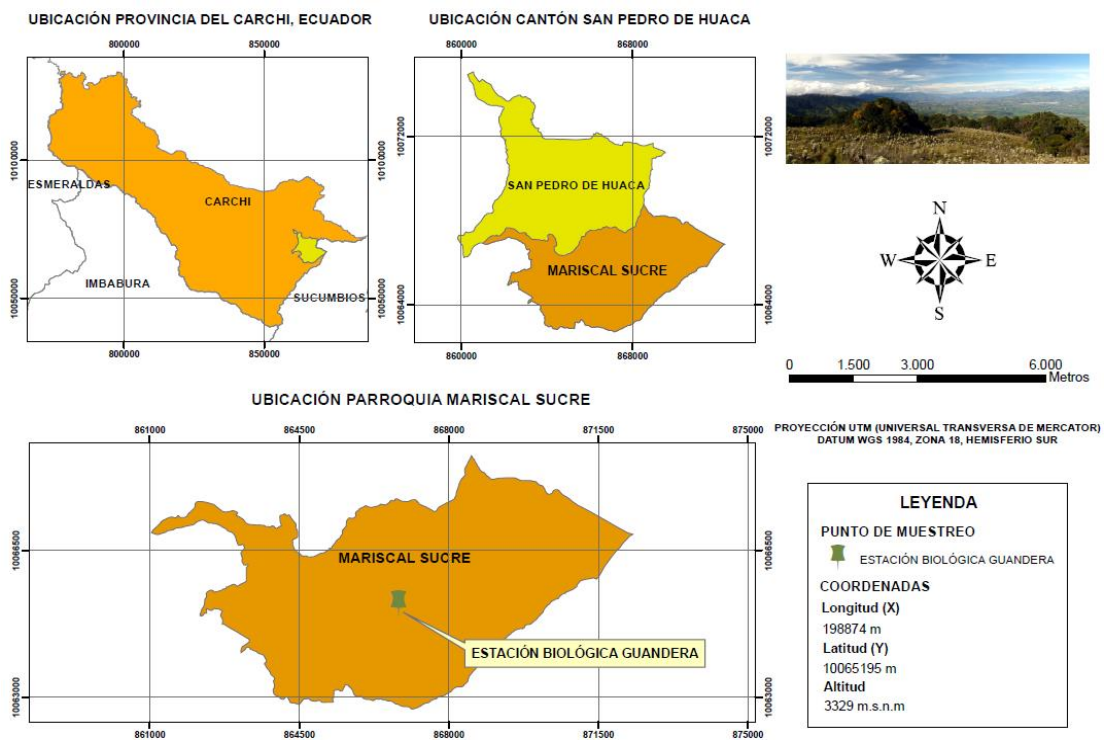
3.2 Muestreo

Esta actividad fue realizada mediante la metodología del muestreo por conveniencia debido al difícil acceso al bosque primario. El lugar exacto de muestreo estuvo ubicado en el bosque en las coordenadas 0°35'19.84'' N, 77°42'13.38'' E a 3438 msnm (Figura 1). La toma de muestras se realizó a partir de especímenes del árbol *Clusia flaviflora* pues esta planta, es la especie dominante dentro del bosque. El árbol seleccionado se encontraba en

etapas tempranas de descomposición. Los cuerpos fructíferos recolectados se encontraban en pleno desarrollo y esporulación activa.

Figura 1.

Mapa de ubicación Estación Biológica Guanderas



Para la selección de cuerpos fructíferos recolectados, se precisó de parámetros específicos para Polyporales (Watanabe, 2010). Las características idóneas para la selección fueron: a) consistencia dura del cuerpo fructífero, b) himenio carnoso y en pleno desarrollo, y apariencia similar a la madera (Watanabe, 2010; Alonso, 2017). Los cuerpos fructíferos fueron seleccionados procurando que su estructura se mantenga intacta. Posteriormente, se desinfectó el carpóforo con una solución de etanol al 70%, luego, se almacenaron las muestras en recipientes plásticos de 500 ml con orificios en la parte superior que permitían el intercambio gaseoso (Alonso,

2017). Durante el transporte, se evitó la deshidratación de los cuerpos fructíferos, rociando agua destilada y esterilizada en los mismos cada cierto tiempo hasta su arribo al laboratorio (Alonso, 2017). Durante la prospección, se procuró alterar el hábitat al mínimo posible, esto para impedir la introducción de posibles especies invasoras y también evitando llevar posibles especies no involucradas en la investigación hacia otros nichos ecológicos.

3.3 Aislamiento y purificación de cepas

Los cuerpos fructíferos fueron esterilizados con una solución de etanol al 96% para su ulterior tratamiento dentro de una cabina de seguridad (TermoScientific®). A continuación, se hicieron incisiones en los cuerpos fructíferos recolectados, para así tomar un fragmento de tejido vivo de aproximadamente 1 cm³. Se extrajeron 2 fragmentos de tejido vivo por cada cuerpo fructífero procesado. Cada porción se inoculó en cajas Petri previamente preparadas con medio PDA (Neogen™ Culture Media) más antibiótico gentamicina en proporción 1µl/ml de medio. El medio PDA se preparó según especificaciones del fabricante (Acumedia® LAB).

Finalmente, cada individuo fue etiquetado según especie tentativa y fecha de inoculación. Las condiciones físicas de incubación fueron 26°C y 70% de humedad relativa medida con un termohigrómetro. El crecimiento óptimo se verificó al constatar micelio blanquecino o marrón y de apariencia algodonosa (Alonso, 2004). A partir de los inóculos obtenidos, se realizaron resiembras regulares cada 8 días, hasta obtenerse micelio puro. Cabe recalcar que se efectuaron máximo 4 resiembras por duplicado, dado que a mayor cantidad de replicaciones, mayor es el riesgo de senescencia de la cepa (Stamets, 1993b).

3.4 Conservación y mantenimiento de cepas

3.4.1 Conservación en medio PDA en refrigeración y congelación

Las cepas purificadas, fueron puestas a conservación, tanto a temperatura de refrigeración (4 °C) como de congelación (-20 °C) durante un periodo de 12 meses. Para la conservación en refrigeración, se tomaron aquellos cultivos puros cuyas características como color del micelio, crecimiento y morfología, denotaran vigor en la cepa (Toapanta, 2014).

Para ambos métodos de conservación, se realizaron resiembras en tubos falcon de 15 ml con medio PDA. Posteriormente, se sometieron a incubación hasta evidenciar crecimiento miceliar completo. Al evidenciarse colonización en los tubos, se inoculó cada uno con agua destilada autoclavada, hasta cubrir todo el micelio. A continuación, se colocaron a refrigeración un grupo de tres tubos etiquetados y otro grupo de tres en ultracongelación; ambos grupos se seleccionaron para futuras resiembras.

3.4.2 Conservación de cepas en semilla de maíz

Para la aplicación de esta metodología, se procedió según reportó Toapanta, (2014), cuya investigación sugiere tomar aproximadamente 5 gramos de grano seco de maíz duro, por cada caja Petri que contiene micelio puro de hongo. Así se prepararon 20 gramos de grano para cuatro cajas de micelio. Una vez pesados los granos, se sometieron a cocción húmeda en agua estéril hasta alcanzarse una temperatura de ebullición y evidenciarse un ligero ablandamiento de los granos. La cocción tomó alrededor de 25 minutos. Posteriormente se añadió sulfato de calcio en proporción de 0.5% de masa de grano empleado. La mezcla de granos y minerales se sometió a esterilización por vapor durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C y 1.5 atm en una autoclave (Tuttnaver®). La mezcla estéril, se llevó a una

cabina de seguridad para su inoculación en cajas Petri con micelio puro de hongo, previamente obtenido. A continuación, las cajas inoculadas se sometieron a incubación en una estufa (Memmert®) a una temperatura de 26 °C hasta evidenciar crecimiento miceliar sobre los granos. Los cultivos desarrollados se sometieron a refrigeración a una temperatura de 4 °C cubiertos con papel empaque para evitar la incidencia de luz y así minimizar el riesgo de senescencia (Mueller et al., 2004).

3.5 Caracterización molecular

Se realizó la purificación de las cepas mediante aislamiento en medio PDA para su posterior caracterización molecular en el laboratorio IDGen. La identificación de los individuos colectados se realizó en base al análisis filogenético de las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal del hongo. La región que se amplificó incluyó a las regiones ITS1, 5.8s, e ITS2, cuyos primers específicos fueron los ITS-1F e ITS-4B, definidos para hongo basidiomicetes, y los primers más generales ITS-1, ITS4 e ITS5 (Binder et al., 2013).

La extracción de ADN, según reportes del laboratorio contratado, se realizó por métodos convencionales utilizando aproximadamente 100mg de micelio. Se realizó electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad y calidad del ADN. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20ng/uL para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los primers universales ITS 1 y 4 para la amplificación. Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos. Se compararon las secuencias con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI.

3.6 Cinética de crecimiento in vitro

3.6.1 Preparación de sustrato

El bagazo de maíz procedente de la zona agrícola de Otavalo fue previamente triturado en un molino (Fisher®), en un tamaño de partícula de 5mm. El bagazo procesado se dejó secar a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco. Con el sustrato triturado, se procedieron a preparar tres tratamientos, los cuales fueron mezclados con las sales: CaCO₃, CaSO₄, y una en que se incluyó ambas sales (Tabla 1.).

Tabla 1.

Tabla de tratamientos

Tratamiento	Sustancia	Medio enriquecido
T1	CaCO ₃	Bagazo de maíz + CaCO ₃
T2	CaSO ₄	Bagazo de maíz + CaSO ₄
T3	CaCO ₃ + CaSO ₄	Bagazo de maíz + CaSO ₄ + CaCO ₃

Adicionalmente, todos los ensayos fueron enriquecidos con extracto de levadura en una proporción al 3% respecto a la biomasa empleada por cada experimento (Tabla 2.). La humedad relativa de todos los experimentos se estableció en 65%. Posteriormente, todos los ensayos fueron sometidos a esterilización por vapor húmedo durante 2 horas (Mendoza et al., 2014). Cada unidad experimental contó con una masa neta de 20 g. Cada ensayo fue

etiquetado según la sal adicionada, además del número de experimento y la fecha de elaboración.

Tabla 2.

Composición porcentual de ensayos (biomasa seca)

Ensayos	Medio	Composición porcentual	Masa total
Carbonato de calcio	Bagazo de maíz	96.5%	20 g
	CaCO ₃	0.5%	
	Extracto de levadura	3%	
Sulfato de Calcio	Bagazo de maíz	96.5%	20 g
	CaSO ₄	0.5%	
	Extracto de levadura	3%	
Carbonato de calcio + Sulfato de Calcio	Bagazo de maíz	96.5%	20
	CaCO ₃ + CaSO ₄	(0.25 + 0.25) % 3%	
	Extracto de levadura		

3.6.2 Inoculación

Todos los tratamientos previamente preparados, fueron inoculados con micelio puro de la cepa GAC1, para lo cual se cortó un fragmento de micelio de aproximadamente 1 cm² a partir de aislados previamente

obtenidos. Cada fragmento obtenido se procuró colocarlo en el centro de cada caja Petri correspondiente a cada experimento, ello como premisa necesaria para la obtención de datos de medición. La biomasa aproximada del micelio inoculado se determinó en 1 gramo usando una balanza marca Camry®. Todos los ensayos se incubaron a en una estufa a una temperatura de 27°C y una humedad ambiental relativa de entre 60 y 70% medida con un termohigrómetro.

3.6.3 Diseño Experimental

Para propósitos de esta investigación, todas las unidades experimentales fueron cultivadas en cajas Petri de 90 mm de diámetro, cada una con 20 g de medio enriquecido de bagazo de maíz. Para la evaluación de la velocidad de crecimiento micelial, se elaboró un experimento, dividido en tres tratamientos, los cuales contaron con tres repeticiones dando un total de 9 unidades experimentales (Tabla 3.). El factor de estudio fue la velocidad de colonización micelial sobre bagazo triturado de maíz enriquecido. La evaluación de crecimiento micelial se realizó según el estudio de Soto, Pineda, & Ramos (2013). Dentro de esta citada investigación se especifica el medir el halo de crecimiento del micelio en milímetros en un ambiente controlado, conociendo la composición del medio y cantidad de biomasa empleada.

Tabla 3.*Diseño de experimento*

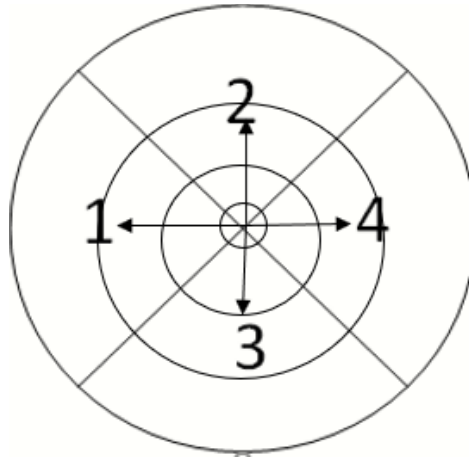
Tratamiento	Codificación	Unidades experimentales
Carbonato de calcio	CaCO ₃	3
Sulfato de calcio	CaSO ₄	3
Carbonato de calcio + Sulfato de calcio	CaCO ₃ + CaSO ₄	3

Siguiendo la metodología de Soto, Pineda, & Ramos (2013), con algunas modificaciones, se realizó un diseño de dos trazos perpendiculares cuyo punto de cruce coincidió con el centro aproximado de cada caja Petri (Figura 2.). Determinado el origen, se definieron abscisas y ordenadas, lo cual facilitó la toma de datos regulares (Guadarrama-Mendoza et al., 2014).

Posteriormente se efectuó una medición cada 24 horas de cada unidad experimental a partir del primer día de inoculación. Las mediciones se efectuaron hasta evidenciarse una completa colonización miceliar sobre el sustrato de cada unidad experimental.

Figura 2.

Esquema de medición de halo de crecimiento



3.6.4 Medición del área de crecimiento

De los ensayos evaluados, se obtuvieron datos diarios de crecimiento midiendo el halo de expansión en cada abscisa y ordenada registrados con el uso de un vernir (calibre). El cálculo del área de expansión miceliar se realizó definiendo como radio a la media de los datos recogidos para cada eje (Straatsma et al., 2009). El radio medio calculado se multiplicó por la relación de la circunferencia, estableciendo así una magnitud de superficie. Así, se procedió a calcular el área de crecimiento aproximada usando la ecuación del área de la circunferencia, dado que el crecimiento del micelio es aproximadamente circular (Zervakis et al., 2001). A partir de los datos obtenidos de área proximal, se realizó una media del crecimiento por experimento.

3.6.5 *Análisis estadístico de crecimiento radial*

La velocidad de expansión micelar se determinó mediante el cálculo del área de crecimiento alcanzada respecto al intervalo de tiempo en que se efectuaba cada medida (Guadarrama-Mendoza et al., 2014). La normalidad de datos se verificó mediante una prueba de Shapiro-Wilk y Kolmogórov-Smirnov. Para determinar diferencias entre tratamientos, se realizó un ANOVA ajustado a un modelo de DBCA con arreglo factorial (Tabla 4.). Los datos se transformaron con una función raíz cuadrada para cumplir con los supuestos de normalidad. El análisis de significancia estadística se llevó a cabo efectuando un test de Tukey con un 5% y una prueba de Levene, para determinar la homegenidad de varianzas (Zervakis et al., 2001).

El factor de estudio fue la velocidad de colonización micelar, respecto a los factores de enriquecimiento de las sales evaluadas (Tabla 3.; Tabla 4.). Todas las pruebas estadísticas se realizaron por triplicado, y fueron evaluadas utilizando el programa IBM SPSS Statistics, Versión 22.

Tabla 4.

Esquema del análisis de la varianza para la evaluación de la cinética de crecimiento

Fuentes de variación	Gl
Total	81
Tratamientos	3
Días	9
Repeticiones	3
Error experimental	54

3.7 Actividad Enzimática

3.7.1 Preparación de sustrato

Para los ensayos de determinación enzimática de extractos crudos, se preparó bagazo de maíz como sustrato base. El bagazo de maíz fue previamente triturado hasta un tamaño de partícula de 5 mm aproximadamente. Posteriormente el sustrato fue enriquecido con extracto de levadura en proporción al 3% de biomasa seca empleada. Adicionalmente se incluyó CaCO₃ como estabilizador de pH (6.5) y antiapelmazante (Cotter, 2014). Finalmente, se determinó un 65% de humedad para todos los ensayos.

El sustrato enriquecido fue distribuido de forma homogénea en una masa correspondiente a 200 g, en 5 bolsas de polipropileno, grupo dentro del cual se estableció un blanco. A continuación, los ensayos fueron sometidos a esterilización mediante autoclave a 1.5 atmosferas y 121 °C durante 2 horas.

3.7.2 Incubación y condiciones de crecimiento

Los ensayos previamente preparados fueron inoculados con micelio del espécimen GAC1, en adición de un testigo sin inocular (Tabla 5.). Para la inoculación, se hicieron cortes de micelio puro para su posterior inoculación en medio PDA, en cuatro secciones aproximadamente iguales de 2 g (Stamets, 1993). Cada sección se usó como inóculo en cada ensayo de fermentación sólida. Los ensayos inoculados, se incubaron en una estufa marca Memmert® a 26°C. Se midió la humedad relativa durante cada día de crecimiento, verificándose una variación de entre el 60 y 70%.

Tabla 5.*Experimentos para determinación de actividad enzimática*

Ensayo	Código	Masa total (gramos), $\pm 0.1g$
Micelio + sustrato	GA1	202
Micelio + sustrato	GA2	202
Micelio + sustrato	GA3	202
Micelio + sustrato	GA4	202
Sustrato sin inculo	BL	200

3.7.3 Obtención de extractos enzimáticos

Durante la fase de fermentación, se extrajeron de todos los ensayos una porción de aproximadamente un gramo de sustrato colonizado de micelio a intervalos de 4 días durante dos semanas. A partir de entonces, se procedió a realizarlo cada 8 días hasta completarse 56 días de fermentación (Elissetche et al., 2007). Cada porción extraída incluido el blanco, fueron colocadas en 5 Erlenmeyer de 50 ml en una solución buffer de acetato de sodio 50 mM con un volumen de 5 ml (Manole et al., 2008). Seguidamente, los extractos fueron sometidos a agitación constante de 150 RPM en un agitador orbital durante 30 minutos. Terminada la agitación, se filtraron los extractos empleando una bomba de vacío. Finalmente, se obtuvieron de 3 a 4 ml de extracto enzimático crudo de cada ensayo, los cuales se sometieron a centrifugación constante de 3000 rpm durante 15 minutos y 7°C (Manole et al., 2008).

3.7.4 Determinación de actividad enzimática lacasa

La determinación de actividad enzimática se efectuó midiendo el incremento de absorbancia en un espectrofotómetro marca (Jenway®) durante un tiempo de reacción de 20 minutos (Harkin & Obst, 1973). La medición de absorbancia fue determinada de acuerdo con el método modificado de Manole, Herea, Chiriac, & Melnig (2008), donde se emplea syringaldazina como sustrato específico de reacción enzimática de lacasa.

Para cada medición, la reacción contempló 0.1 ml de syringaldazina 0.216 mM en adición con 0.74 ml de acetato de sodio (Elisashvili et al., 2008). La reacción inició al incluir 0.17 ml de sobrenadante (Harkin & Obst, 1973). Así, las mediciones espectrofotométricas de actividad se registraron cada minuto durante un tiempo total de reacción de 20 minutos a una longitud de onda de 525 nm con un $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Adicionalmente se preparó un blanco, en cual no se incluyó el extracto enzimático.

La actividad enzimática se reportó en unidades internacionales (IU), definiendo para este ensayo como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de syringaldazina a su azina final durante cada minuto, en condiciones de reacción establecidas (International System of Units, 2018). El cálculo de la actividad enzimática lacasa procedió según se establece en la ecuación 5 (pág. 29) cuyo resultado muestra la actividad enzimática respecto a la biomasa seca empleada (IU/gSs) (Agrawal & Verma, 2019). El valor específico reportado, de cada cubeta se registró en una hoja de cálculo. De los valores obtenidos en cada día, se calculó el valor promedio de las lecturas, para verificar la actividad total por día.

$$C = \frac{IU * Ve * ghT}{Vsa * ghs * gsT}$$

Ecuación 6. Ecuación de determinación de actividad enzimática.

CAPITULO IV

RESULTADOS

En el presente capítulo se darán a conocer los resultados obtenidos en la fase experimental de la investigación, y el análisis efectuado para la determinación de las características de los especímenes muestreados, su capacidad de crecimiento y la actividad ligninolítica, basada en la actividad enzimática.



4.1 Especímenes muestreados

Se identificaron dos especímenes etiquetados como GAC1 y TV1 (Tabla 6), presumiblemente de los géneros *Ganoderma* y *Fusarium*. Los cuerpos fructíferos fueron colectados dentro de la zona de bosque primario de la Estación Biológica Guanderas. Los especímenes encontrados reunieron la mayoría de las características visuales de los Polyporales, esto es: presencia de múltiples poros en su himenio y cuerpo fructífero carnoso de consistencia dura, entre otras.

Ambos carpóforos (cuerpos fructíferos) fueron encontrados en árboles del género *Clusia* en estado previo de descomposición. Del aislamiento efectuado a partir de los cuerpos fructíferos, solamente una especie pudo ser aislada con éxito, específicamente *Ganoderma australe*, especie identificada dentro del orden de los Polyporales.

Tabla 6.

Especímenes muestreados

Posible espécimen	Carpóforo (Características)	Código	Sustrato (Árbol)	Carpóforo
Ganoderma sp.	Carnoso, consistencia maderosa	GAC1	<i>Clusia flaviflora</i>	
Trametes sp.	Carnoso, consistencia semidura	TV1	<i>Clusia flaviflora</i>	

4.2 Caracterización molecular

Según reportes del Laboratorio IDGen, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 600 pb, para las dos muestras, correspondientes a la región ITS. El ADN obtenido fue de buena calidad para todas las muestras. La cepa H52, correspondiente a la muestra GAC1, se identificó como correspondiente a la especie *Ganoderma australe*, con un porcentaje de identidad del 99.8%. El otro organismo aislado etiquetado como TV1, (H49), que tentativamente fue identificado como perteneciente al género *Trametes*, correspondió a un ascomiceto, identificado como *Fusarium clamydosporum*, cuyo porcentaje de identidad correspondió al 100% (Figura 7.). Por tanto, esta especie identificada (ascomiceto) no se consideró para los fines de la presente investigación, dado que no se reportó como especie del orden de los

Polyporales. La búsqueda en la base de datos GenBank permitió corroborar la identidad de las especies secuenciadas, a través de la clave de acceso vinculada a cada organismo.

Tabla 7.

Resultados de secuenciación de IDGen

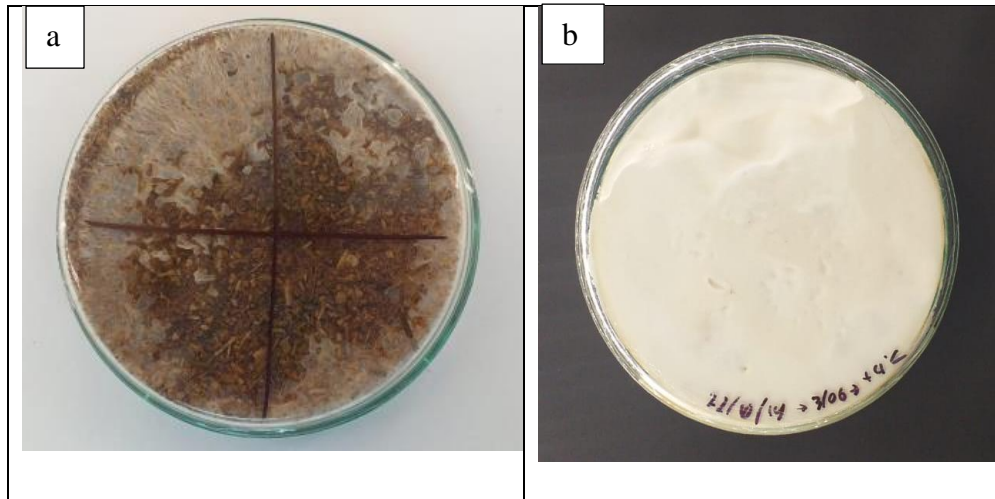
Código	Longitud Secuencia	Calidad Secuencia	Organismo	Fragmento	Identidad %	Nº Accesoión
H52	555	95.0	<i>Ganoderma australe</i>	ITS	99.8	KU569541.1
H49	495	97.6	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	ITS	100	AY213655.1

4.3 Velocidad de crecimiento micelial en caja Petri

Se determinó que la máxima colonización se alcanza a los 9 días de iniciada la fermentación. La adaptación del organismo al medio sintético se apreció entre 4 y 5 días hasta iniciar el crecimiento exponencial. A partir del 6^o día, la colonización del sustrato fue superficial, sin embargo, el crecimiento de los ensayos no mostraba signos de penetración de hifas (Figura 3.). La colonización superficial de micelio en los ensayos fue completa a los 13 días de inoculación.

Figura 3.

Colonización miceliar sobre sustrato de biomasa de maíz (a. inicio de penetración miceliar; b. colonización completa a 9 días de colonización)

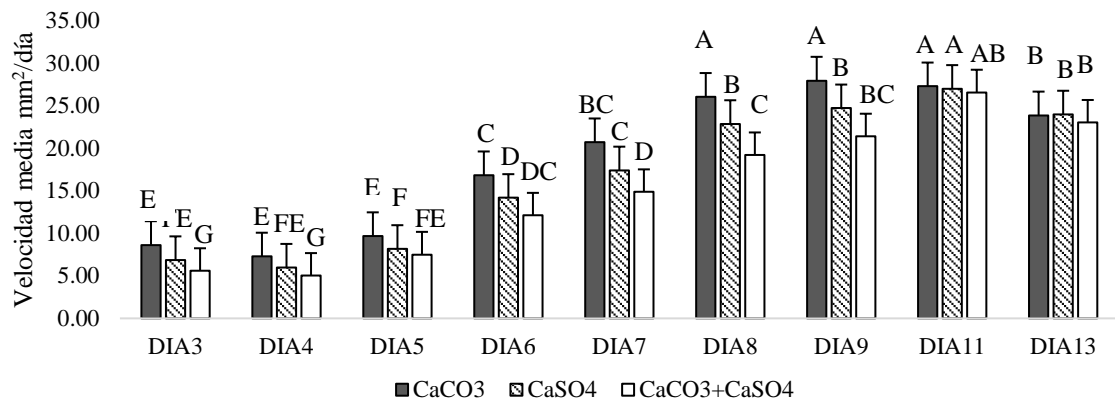


Finalizada la fase de medición, se determinó que el halo de crecimiento para el tratamiento con carbonato de calcio (CaCO_3), tuvo desde el inicio del experimento (tercer día) una mayor tasa de crecimiento ($8.63 \text{ mm}^2/\text{día}$), respecto a los tratamientos de sulfato de calcio (CaSO_4) ($6.86 \text{ mm}^2/\text{día}$) y la combinación de los dos minerales ($5.58 \text{ mm}^2/\text{día}$) (Figura 4.). La tendencia se mantuvo hasta el noveno día ($\text{CaCO}_3= 27.94 \text{ mm}^2/\text{día}$; $\text{CaSO}_4= 24.70 \text{ mm}^2/\text{día}$; Combinación= $21.39 \text{ mm}^2/\text{día}$) verificándose, además, un aumento en la velocidad de colonización para todos los ensayos. A partir del noveno día, se evidenció un equilibrio en la tasa de crecimiento en los tres tratamientos, equiparándose su velocidad ($\text{CaCO}_3= 23.85 \text{ mm}^2/\text{día}$; $\text{CaSO}_4= 23.97 \text{ mm}^2/\text{día}$; Combinación= $23.00 \text{ mm}^2/\text{día}$) hasta la completa colonización superficial. Todos los ensayos evaluados mostraron signos de estrés a partir de los 20 días de inoculación, tales como secreción de exudados y crecimiento de micelio endurecido.

Al efectuarse el ANOVA y prueba de Tukey, se determinó que, entre tratamientos, no existe diferencia significativa al considerar cada día de crecimiento ($F=59.52$; $gl=80$; $p>0.05$) (Figura 4.).

Figura 4.

Fluctuación de velocidad de colonización



4.3.1 Análisis de cinética de crecimiento

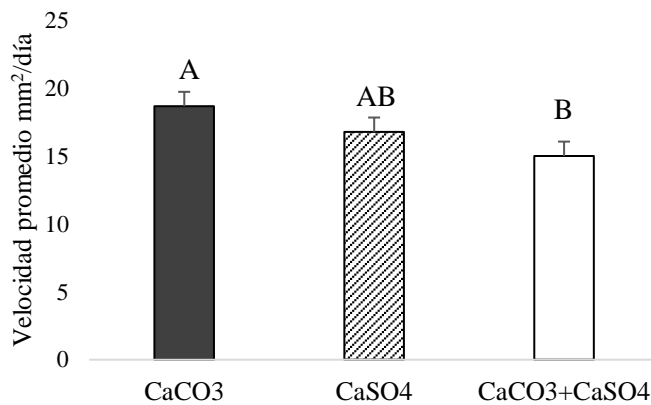
El área de crecimiento micelial fue de aproximadamente 6000 mm², evidenciándose una variación de la cinética de colonización entre ensayos, mostrando una tendencia exponencial al inicio del crecimiento para culminar con un crecimiento más pausado hasta detenerse por completo.

Al efectuarse un ANOVA y una prueba de Tukey, se evidenció que la velocidad de colonización, al comparar cada tratamiento globalmente (incluyendo el tiempo total de colonización), es significativamente diferente entre los tratamientos tanto de CaCO₃ (subconjunto A) y CaCO₃+CaSO₄

(combinación) (subconjunto B) ($p < 0.05$) (Figura 5.). Además, se evidenció que el tratamiento correspondiente a CaSO_4 no mostró diferencias estadísticamente significativas con los otros dos tratamientos tanto de CaCO_3 y aquel donde se emplean ambas sales en conjunto ($p > 0.05$), situándose en el subconjunto AB.

Figura 5.

Velocidad de crecimiento entre tratamientos

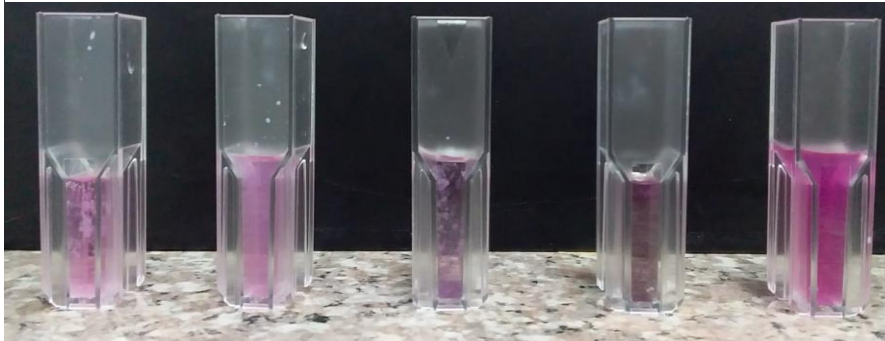


4.4 Análisis de actividad enzimática lacasa

Los resultados preliminares mostraron un cambio de coloración característico, indicativo de actividad enzimática para el reactivo empleado. El cambio de coloración continua hacia un púrpura intenso, denotó la actividad enzimática producto de la reacción entre lacasa y syringaldazina (Figura 6.).

Figura 6.

Cambio de coloración debido a la reacción de syringaldazina y lacasa

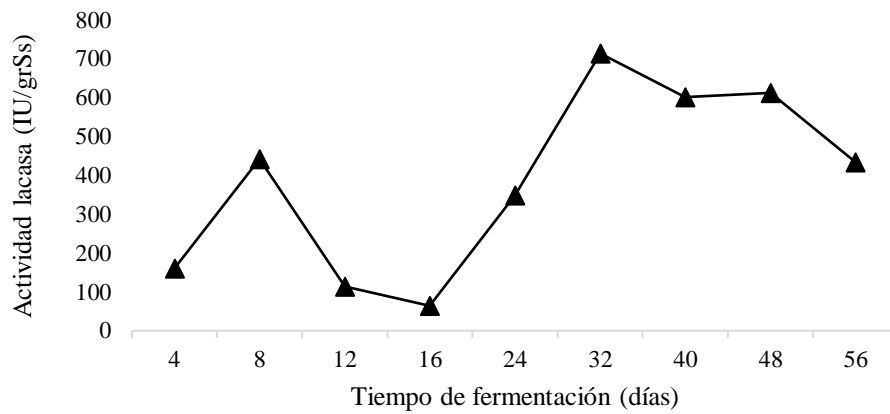


A través del análisis de datos de absorbancia (figura 7), se calculó la actividad enzimática (IU) en relación con los gramos de sustrato seco neto (gSs), empleando la ecuación 5 (pág. 29) donde se fijan los parámetros necesarios para la obtención de actividad enzimática. Se evidenció que, al inicio de la fermentación, la actividad enzimática fue 442.21 IU/gSs (8 días), para posteriormente disminuir (64.24 IU/gSs) (día 16). A continuación, se notó un incremento continuo de la actividad enzimática, alcanzando su valor máximo el día 32 (713.88 IU/gSs) (Figura 7.). A partir del día 32, la actividad enzimática decreció levemente hasta el día 48 (612.14 IU/gSs) y luego hasta el día 56 (434.56 IU/gSs).

La toma de datos concluyó al evidenciarse la formación de primordios, estructuras típicas de la fase de fructificación del hongo. Al finalizar la experimentación, se pudo evidenciar la formación de una capa compacta de micelio alrededor del sustrato.

Figura 7.

Evolución de actividad enzimática en el tiempo de fermentación establecido en la experimentación.



Nota. Adviértase el incremento de actividad enzimática a partir del día 16, correspondiente a la fase crecimiento exponencial del micelio.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento in vitro de cepas

De los especímenes muestreados, solo se pudo aislar exitosamente una especie del orden de los Polyporales, específicamente *Ganoderma australe*. Al realizar el aislamiento *in vitro* se evidenció la escasa capacidad de adaptación del espécimen en medio sintético (agar PDA). Esto pudo deberse a la alta senescencia del espécimen, dado que su aislamiento se realizó de cuerpos fructíferos en estado maduro (Maas et al., 2017). Esto fue más evidente al intentar aislar el otro organismo, presumiblemente del género *Trametes*, cuyo aislado presentó problemas de contaminación y escaso crecimiento al ser inoculado en medio PDA. No obstante, Jo et al., (2010), demostraron que las condiciones fisicoquímicas propias del medio PDA, son las más apropiadas al momento de incubar cepas del género *Trametes*.

La composición del medio de aislamiento, al contar con determinadas proporciones de nutrientes y vitaminas (Jo et al., 2010; Peay et al., 2013), favorecería la viabilidad de los aislados, además se demostró, que una carencia en el control de parámetros fisicoquímicos, repercute en la viabilidad de las cepas del género *Trametes*. No obstante, un medio rico en nutrientes favorecería un incremento de la actividad metabólica basal de las células miceliales, repercutiendo en la viabilidad de las cepas (D'souza & Maheshwari, 2002). Este hecho puede explicar la alta tasa de senescencia de los extractos de tejido maduro desarrollados en medio sintético. Adicionalmente, la senescencia propia de los basidiomicetos, juega un rol fundamental en su conservación y propagación además de la composición del medio en que se desarrollan (Van Etten et al., 1966). Durante el desarrollo de la presente investigación esto fue evidente, a pesar de incrementar las

medidas de asepsia y cuidado durante la fase de extracción de una porción de tejido del cuerpo fructífero.

En adición, el organismo identificado como *Fusarium clamidosporium*, no pertenece al orden Polyporales. Este espécimen fue puesto en conservación *in vitro*, dado que también pueden emplearse en procesos de sacarificación de materiales lignocelulósicos, etapa consiguiente en procesos de bioconversión (Deswal et al., 2014). Además este hongo, al igual que otros ascomicetos, representa una potencial fuente de aprovechamiento de metabolitos, pues se ha demostrado que su crecimiento sobre sustratos agroresiduales previamente tratados promueve en este organismo, la producción sustancias de interés (Ghorbani et al., 2015).

5.2 Caracterización molecular

Las cepas aisladas fueron secuenciadas tomando como referente a la región ITS del ADN ribosomal. Dado que dicha región es usada ampliamente en taxonomía y construcción de árboles filogenéticos en eucariotas (Baldwin et al., 2012). Dicha región ha sido especialmente empleada en la identificación de organismos del reino fungi, ya que se encuentra ampliamente conservada pero a la vez diferenciable entre especies según reportes de Peay et al., (2013), aunando como positivo el uso de la región ITS en identificación de especies. Además, Gardes & Bruns, (1993), han verificado la efectividad de las regiones ITS1 e ITS4, mostrando que al emplearse en basidiomicetos, la amplificación fue exitosa para todas las especies involucradas en la experimentación (*Amanita francheti*, *Phylloporus rhodoxantus*, *Laccaria bicolor*, entre otros). Estos resultados muestran que, al emplearse dichas regiones, los resultados en identificación molecular llegan a ser altamente confiables y eficaces.

A partir de los resultados de secuenciación, fue posible verificar la identidad de un espécimen muestreado, correspondiente a la especie *Ganoderma australe*, cuyo porcentaje de identidad correspondió al 99.8 %. Al verificarse la secuencia en la base de datos del GenBank, pudo corroborarse la identidad de la cepa muestreada (Morgulis et al., 2008). Este resultado muestra amplia similitud respecto a reportes de Salazar (2014) cuyos resultados demostraron la existencia de diversas especies del género *Ganoderma* en análisis de secuenciación molecular con un porcentaje de identidad superior al 99%, en áreas protegidas del Ecuador.

5.3 Velocidad de crecimiento micelial

A partir de los resultados obtenidos en la fase experimental, fue posible evidenciar que la capacidad de crecimiento de todos los ensayos evaluados, se asemeja a estudios previos empleando la técnica de medición directa en caja Petri (Martínez et al., 2015; Schnurer, 1993; Soto-Arroyave et al., 2013; Straatsma et al., 2009; Zervakis et al., 2001), mostrando similitud en el radio total de crecimiento alcanzado; sin embargo, empleando cepas de *Agaricus bisporus* sobre compost esterilizado mezclado con otros residuos agrícolas (paja de cereal). Los resultados aquí obtenidos, mostraron que el radio de colonización es relativamente más alto para todos los tratamientos ($\text{CaCO}_3=44.77$ mm; $\text{CaSO}_4=44.88$ mm; $\text{CaCO}_3+\text{CaSO}_4=43.94$ mm) respecto a cepas de hongos comerciales de *Agaricus* (Straatsma et al., 2009). El máximo radio se alcanzó a los 13 días de incubación asemejándose a otros basidiomicetos y saprófitos secundarios como *Agaricus*, el cual alcanza un radio de colonización de 17mm al completarse 12 días de incubación según muestran Straatsma et al., (2009). En contraste, la velocidad reportada en el presente estudio, mostró ser más lenta respecto a otros saprófitos primarios como *Pleurotus ostreatus*, cultivados sobre una mezcla de medio PDA y cascarilla de arroz (Coello-Loor et al., 2017) cuya radio máximo

(colonización completa) se alcanzó en solo 5 días posteriores a la inoculación.

Cabe mencionar que la mezcla de residuos agrícolas con medio sintético (PDA, Malta, entre otros) ha sido un método verificado para incrementar la tasa de colonización miceliar (Zervakis et al., 2001). El crecimiento entre tratamientos, hasta el completo crecimiento de micelio enriquecido con extracto de levadura y carbonato de calcio mostró ser más idóneo al repercutir en una mejor adaptación y velocidad de colonización; no obstante, según reportan Rios et al. (2010) y, Suarez y Holguin (2011), al evaluar *Lentinula edodes*, sobre sustrato enriquecido con carbonato de calcio en virutas de madera, el crecimiento tarda entre 9 y 10 días, respectivamente, en invadir por completo la caja petri de 90 mm de diametro, mostrando relativa semejanza con los resultados de la presente investigación (13 días).

Una posible razón del aumento del tiempo de colonización, es debido a que en los ensayos evaluados, la composición del medio y por tanto de moléculas recalcitrantes y presencia de azúcares disponibles en las muestras de rastrojo de maíz difiere respecto al medio natural donde se desarrolla el hongo (Zhang et al., 2012). Aproximadamente 32% de celulosa, 20% de hemicelulosa y 21.5% de lignina componen el rastrojo de maíz respecto a 30 % de celulosa, 33% de hemicelulosa y 29% de lignina en maderas duras (Valverde et al., 2007). Liese (1975), reportó que la presencia de lignina y otras moléculas recalcitrantes, posibilita una mejor adaptación de hongos de pudrición, dado que emular las condiciones naturales de crecimiento evita un posible estrés en la fase de adaptación del micelio. Estas conclusiones no se ajustan a lo encontrado en la presente investigación, verificando que un previo enriquecimiento, en realidad posibilita una mejor adaptación y mayor tasa de crecimiento micelial. Dado que la disponibilidad de azúcares libres de cadena corta como fructosa, glucosa y disacáridos, presentes dentro de la matriz del bagazo de maíz, favorecería la capacidad de adaptación del

micelio (Jo et al., 2010), por ello su influencia debería considerarse en futuras investigaciones.

Al compararse los resultados de la velocidad de colonización evaluando tres diferentes tratamientos de sales (CaCO_3 ; CaSO_4 ; $\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$) se pudo evidenciar que no existe influencia significativa sobre este parámetro. Reportes preliminares de Bekker (2016) demuestran que las principales variables, además de las consideradas como básicas (pH, temperatura y humedad), son en realidad la concentración de nitrógeno biodisponible y la presencia de vitaminas promotoras del crecimiento. Sin embargo Stamets, (1993), Luangharn et al., (2017) y Cotter, (2014) demostraron que ciertas sales repercuten en el desarrollo de hongos basidiomicetos, verificando que la adición de carbonato de calcio en proporciones menores al 1% respecto a la biomasa empleada por experimento, posibilita sobremanera en la adaptabilidad y capacidad de crecimiento sobre sustratos agroindustriales enriquecidos. Al verificar los datos correspondientes a los ensayos enriquecidos con carbonato de calcio, fue posible detectar diferencias respecto a los otros dos tratamientos. La adición de más minerales posiblemente tenga un efecto negativo en las condiciones estudiadas al intentar controlar el crecimiento micelial (Watanabe, 2010). Los resultados obtenidos en esta investigación implican que la composición de los minerales empleados no altera sustancialmente el crecimiento del hongo.

Finalmente, es preciso mencionar que la velocidad de colonización se ve directamente afectada por del tamaño del inóculo (Stamets, 1993). Este fenómeno se relaciona con la cantidad de células inoculadas, es decir que a mayor cantidad de micelio trasplantado, mayor es el vigor y la tasa de crecimiento alcanzado (Schnurer, 1993). Al verificar este factor en los estudios ya mencionados, se encontró que son muy pocos los autores que denotan la importancia de esta variable. Stamets (1993), ha reportado que

contar con mayor homogeneidad al momento de verificar variables influyentes en el desarrollo de micelio, es preciso considerar el tamaño del inoculo, para así obtener resultados fiables que corroboren la influencia de los parámetros estudiados.

5.4 Pruebas de actividad enzimática

A partir de los resultados de medición de absorbancia espectrofotométrica, es posible mencionar que los extractos poseen actividad enzimática, presumiblemente lacasa, dado que el sustrato empleado, se especifica como indicador de actividad de esta enzima (Harkin et al., 1974) Reportes de Stamets (1993), indican que la producción de enzimas extracelulares es un fenómeno vinculado al estrés propio del crecimiento de los basidiomicetos al actuar sobre sustancias recalcitrantes. Además, Cotter, (2014), precisa que el enriquecimiento con nutrientes de escasa disponibilidad en el sustrato base como vitaminas y minerales, representa un requisito básico para aumentar la producción de enzimas extracelulares de interés como lacasas, en especial al intentar transformar conglomerados moleculares de alta complejidad como la lignina.

Durante el transcurso de la fermentación desarrollada en esta investigación, la actividad enzimática presumiblemente lacasa, tuvo un considerable incremento hasta los primeros 8 días de iniciado el experimento, a partir del cual empezó a decrecer. Este resultado no muestra similitud respecto a la investigación de Elissetche et al., (2007), cuyos resultados muestran un característico incremento de la actividad enzimática lacasa a partir de los 10 primeros días de fermentación empleando la misma especie de hongo. Cabe recalcar que, en la investigación de comparación, el sustrato empleado fue madera de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), cuya composición lignocelulósica es más densa respecto al bagazo de maíz.

La transformación de datos hacia unidades del sistema internacional que demuestren actividad enzimática, se basó en reportes de (Agrawal & Verma, 2019), quienes demostraron la ambigüedad de los cálculos relacionados con actividad de enzimas lacasas. En dicho estudio se verificó que la ecuación 5 (página 29) usada en la presente investigación, incorpora todos los parámetros necesarios para denotar un resultado más fiable. Al realizar la transformación de datos, se pudo identificar que los resultados obtenidos, son semejantes respecto a resultados obtenidos en otras investigaciones (Risdianto et al., 2012; Szklarz et al., 2018). No obstante, los parámetros propios del cálculo de actividad enzimática refieren a la enzima pura, mas no a extractos enzimáticos cuya composición difiere respecto a un extracto puro, tanto en concentración de enzimas como en sustancias que no intervienen en procesos enzimáticos. La composición diversa de los sustratos empleados, además de los especímenes involucrados, son factores determinantes para la producción de enzimas degradativas (Schnurer, 1993)

Según los datos preliminares reportados en esta investigación, la actividad enzimática registrada es considerablemente menor respecto a investigaciones realizadas sobre residuos agrícolas comunes empleando cepas de Polyporales lignocelulósicos. Así, según reportan Risdianto, Sofianti, Suhardi, y Setiadi (2012) la producción de enzimas lacasas es mucho más elevada al optimizar ciertas condiciones de crecimiento, tales como el pH y humedad del sustrato. Esto se verificó empleando cepas de las especies: *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta* y *Phanerochaete cryosporium*.

Adicionalmente, basado en reportes de Kirk & Lynch (1987) , la familia de las lacasas representan enzimas de importante actividad en procesos de degradación de lignina, en conjunto con otras oxidorreductasas. Según reportes de Elissetche et al. (2007), la producción de lacasa es significativamente más alta respecto a otras enzimas ligninolíticas dentro de

la especie *Ganoderma australe*. Este resultado concuerda con los datos de Szklarz, Antibus, Sinsabaugh, & Arthur, (2018), quienes han verificado que las enzimas lacasas son uno de los grupos enzimáticos más importantes del orden de los Polyporales que participan activamente en la degradación de materiales lignocelulósicos. Los ensayos realizados en esta tesis de investigación evidenciaron cualitativamente la presencia de esta enzima y su comportamiento durante 56 días de fermentación. La detección indirecta de enzimas lacasas durante la fase de fermentación, hace posible inferir el desarrollo de procesos de delignificación, según reportes preliminares de Kameshwar & Qin, (2016).

Además, los procesos de fermentación asociados a la descomposición de lignina tienen como característica particular, la producción de otras fenoloxidasas, además de oxidorreductasas, enzimas que en conjunto efectúan un ataque sinérgico a la matriz lignocelulósica (Csoklich, 1994). No obstante, Cullen & Kersten, (1996) afirman que las enzimas de la familia de las lacasas no necesariamente están ligadas a procesos de degradación de lignina. Estas conclusiones sin embargo, no reflejan los resultados obtenidos por parte de Gianfreda, Xu, & Bollag, (1999) cuyos datos arrojan como necesaria la presencia de lacasa en procesos de ataque enzimático para la conversión de sustancias como la lignina.

Cabe recalcar que la producción de enzimas ligninolíticas y aquellas asociadas al ataque de los demás componentes de la pared celular de plantas superiores, está asociada a un estrés metabólico, producto de la carencia de nutrientes en el medio de crecimiento y la abundancia relativa de sustratos recalcitrantes (Kirk & Lynch, 1987). En la presente investigación, los resultados obtenidos mostraron una tendencia hacia una baja actividad enzimática, especialmente durante las dos primeras semanas de fermentación. Ello no obstante podría explicarse debido al bajo contenido de lignina en el sustrato empleado. Sin embargo, la actividad se elevó nuevamente hacia el

final de la fermentación, mostrando un crecimiento más denso de micelio, y consecuentemente de actividad enzimática, cuya producción alta se sostuvo hasta el final del experimento. Este resultado muestra concordancia con el ciclo de vida de los basidiomicetos, ya que se ha demostrado que a mayor crecimiento y colonización, la actividad enzimática muestra una tendencia creciente (Cullen & Kersten, 1996).

CAPITULO VI

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- La identificación de especies del orden Polyporales obtenidos a través de aislados del cuerpo fructífero, debe ser siempre corroborada a través del análisis molecular, ello para evitar falsos positivos.
- El espécimen aislado (*Ganoderma australe*) demostró capacidad de crecimiento sobre sustrato de biomasa de maíz enriquecido.
- El enriquecimiento de carbonato de calcio mostró mayor influencia en la tasa de colonización respecto a los otros tratamientos, pero no repercutió en el desarrollo del hongo.
- El sustrato empleado fue determinante para el crecimiento micelial y capacidad de producción de exudados enzimáticos más que las sales minerales empleadas.
- La actividad enzimática reportada difiere respecto a investigaciones donde también se estudia su comportamiento, pero empleando distintos sustratos lignocelulósicos,
- Los extractos enzimáticos muestran la presencia de enzimas relacionadas a la degradación de sustancias recalcitrantes como la lignina, al corroborarse mediante pruebas espectrofotométricas.
- La presencia de enzimas relacionadas al ataque de la matriz lignocelulósica en los ensayos evaluados demuestra que la especie *Ganoderma australe*, del orden de los Polyporales, presumiblemente muestra capacidad ligninolítica sobre residuos agrícolas de maíz

6.2 Recomendaciones

- Para próximos ensayos de pretratamiento biológico, optar por realizar ensayos de viabilidad de hongos de pudrición blanca sobre sustratos ricos en lignina como aserrín de maderas duras.
- Verificar las condiciones de crecimiento del hábitat natural donde se desarrollan los hongos de pudrición, ya que tales condiciones repercuten el desarrollo posterior de la fase in vitro de la investigación.
- En próximas investigaciones, considerar la influencia de parámetros físicos-químicos durante la fase de fermentación sólida.
- Evaluar la influencia de fuentes de nitrógeno alternativas en la velocidad de crecimiento.
- Efectuar análisis de crecimiento sobre otros residuos agroindustriales de amplia producción agrícola como desechos de plantaciones de banano o palma de aceite.
- Realizar análisis de actividad enzimática empleando sustratos para la detección de ligninoperoxidasas, manganeso peroxidasas, oxidasas dependientes de peróxido de hidrogeno.
- Purificar los extractos enzimáticos, procurando aislar las enzimas responsables del proceso de delignificación.

7. REFERENCIAS

- Agrawal, K., & Verma, P. (2019). Laccase: addressing the ambivalence associated with the calculation of enzyme activity. *3 Biotech*, 9(10), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1895-1>
- Alderetes, C. (2016). *Calderas a Bagazo*.
- Almada, M., Focal, P., Octubre, C. F. A. O., & Aires, B. (2011). *ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA OFICINA REGIONAL PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE – RLC “ Estado del Arte y Novedades de la Bioenergía en el Paraguay ” Índice*.
- Alonso, J. (2017). *Aspectos Fundamentales Para la Identificación de Setas*. 6–20.
- Ambrose, K., Borja, R. M., González, L., Ordoñez, L., & Cueva, K. (2006). *APRENDIZAJE PARTICIPATIVO EN EL BOSQUE DE CEJA ANDINA CARCHI-ECUADOR* (First).
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., Donoghue, M. J., Porter, J. I. M., Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Wojciechowski, F., Campbell, S., & Donoghue, M. J. (2012). *THE ITS REGION OF NUCLEAR ROBOSONAL DNA: A VALUABLE SURCE OF EVIDENCE ON ANGIOSPERM PHYLOGENY*. <https://doi.org/10.2307/2399880>
- Banco Central del Ecuador. (2015). Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario. *Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario*, 87(IV), 84. <https://doi.org/ISSN 1390-0579>
- Bandyopadhyay, A., Stöckel, J., Min, H., Sherman, L. a, & Pakrasi, H. B. (2010). High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions. *Nature Communications*, 1, 139. <https://doi.org/10.1038/ncomms1139>
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 36, pp. 91–106). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Bekker, Z. E. (2016). *INFLUENCE OF VITAMINS ON GROTH AND DEVELOPTMENT OF MYCELIUM OF SOME BASIDIOMYCETES IN LIQUID MEDIUM*. 43(4), 43–50.
- Berrin, J. G., Navarro, D., Couturier, M., Olivé, C., Grisel, S., Haon, M., Taussac, S., Lechat, C., Courtecuisse, R., Favel, A., Coutinho, P. M., & Lesage-Meessen, L. (2012). Exploring the natural fungal biodiversity of tropical and temperate forests toward improvement of biomass

- conversion. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6483–6490. <https://doi.org/10.1128/AEM.01651-12>
- Bhutto, A. W., Qureshi, K., Harijan, K., Abro, R., Abbas, T., Bazmi, A. A., Karim, S., & Yu, G. (2017). Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. In *Energy* (Vol. 122, pp. 724–745). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.01.005>
- Biermann, C. J. (1996). *Handbook of PULPING AND PAPERMAKING* (Second).
- Binder, M., Justo, A., Riley, R., Salamov, A., Lopez-Giraldez, F., Sjökvist, E., Copeland, A., Foster, B., Sun, H., Larsson, E., Larsson, K.-H., Townsend, J., Grigoriev, I. V., & Hibbett, D. S. (2013). Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia*, 6, 1350–1373. <https://doi.org/doi:10.3852/13-003>
- Boddy, L. (2006). Fungal ecology. *Mycological Research*, 110(1), 120–121. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.11.003>
- Bogner, F., Bendix, J., & Beck, E. (2016). *Biodiversity hotspot Tropical Mountain Rainforest* (NCI FOUNDATION (ed.); First). NCI FOUNDATION. www.naturezaycultura.org
- C, E. R. P., & Enao, L. G. (2017). *Aislamiento y producción de semilla de Auricularia fuscosuccinea (Mont .) Henn . y Crepidotus palmarum Sing . usados tradicionalmente en Pauna (Boyacá , Colombia) Spawn production and isolation for Auricularia fuscosuccinea (Mont .) Henn . and Crepido. 11(1), 151–158.*
- Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Paz, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13), 4754–4766. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.097>
- Castro, M. (2017). *RENDIMIENTOS DE MAÍZ DURO SECO EN INVIERNO 2017*. http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/rendimiento_maiz_duro_seco_invierno2017.pdf
- Chaparro, D. F., Rosas, D. C., & Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.03.005>
- Coello-Loor, C., Avellaneda, J., Barrera, A., Peña, M. M., Yépez, P., & Racines, E. (2017). Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas del género. *Ciencia y Tecnología*, 10(2), 33–39.

- Cotter, T. (2014). *Organic Mushroom Farming and Mycoremediation*. Chelsea Green Publishing.
- Csoklich, P. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiological Research*, 1(1 994), 19–26. <https://doi.org/10.5771/9783845276564-901>
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología*, 13(3), 11–25. http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf
- Cuesta, F., Peralvo, M., Merino-Viteri, A., Bustamante, M., Baquero, F., Freile, J. F., Muriel, P., & Torres-Carvajal, O. (2017). Priority areas for biodiversity conservation in mainland Ecuador. *Neotropical Biodiversity*, 3(1), 93–106. <https://doi.org/10.1080/23766808.2017.1295705>
- Cullen, D., & Kersten, P. J. (1996). Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation. In USDA Forest Products Laboratory (Ed.), *Biochemistry and Molecular Biology* (First, pp. 295–312). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10367-8_13
- D'souza, A. D., & Maheshwari, R. (2002). Senescence in Fungi. *Resonance*, 7(3), 51–55. <https://doi.org/10.1007/bf02896308>
- Daley, D. K., Brown, K. J., & Badal, S. (2017). Fungal Metabolites. In J. Mérillon & G. Ranawat (Eds.), *Pharmacognosy* (First Edit, pp. 413–421). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00020-2>
- Dávila, G. (2006). AMBIENTALES Gustavo Dávila y Rafael Vázquez-Duhalt. *Mensaje Bioquímico*, XXX, 29–55. <http://bq.unam.mx/mensajebioquimicoUTH>
- Deswal, D., Gupta, R., Nandal, P., & Kuhad, R. C. (2014). Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. *Carbohydrate Polymers*, 99, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.045>
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., & Kvesitadze, G. (2008). Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*, 99(3), 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.011>
- Elissetche, J. P., Ferraz, A., Freer, J., & Rodríguez, J. (2007). Enzymes produced by Ganoderma australe growing on wood and in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3),

429–434. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9243-0>

Farinas, C. S. (2015). *Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector*. 52, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>

Ferreira, P., Carro, J., Serrano, A., & Martínez, A. T. (2015). A survey of genes encoding H₂O₂-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. *Mycologia*, 107(6), 1105–1119. <https://doi.org/10.3852/15-027>

GARDES, M., & BRUNS, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>

Geoffrey, A. (2009). *Agricultural Wastes* (First). Nova Science.

Ghorbani, F., Karimi, M., Biria, D., Kariminia, H. R., & Jaihanipour, A. (2015). Enhancement of fungal delignification of rice straw by *Trichoderma viride* sp. to improve its saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.005>

Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J. M. (1999). Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1), 1–25. <https://doi.org/10.1080/10889869991219163>

Guadarrama-Mendoza, P. C., Valencia del Toro, G., Ramírez-Carrillo, R., Robles-Martínez, F., Yáñez-Fernández, J., Garín-Aguilar, M. E., Hernández, C. G., & Bravo-Villa, G. (2014). Morphology and mycelial growth rate of *Pleurotus* spp. strains from the Mexican mixtec region. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 861–872. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300016>

Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>

Gutiérrez, A., & Martínez, A. T. (1996). Mecanismo de biodegradación de la lignina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 13, 18–23.

Hammel, K. E. (1997). Fungal Degradation of Lignin: Chapter 2. In *Driven by Nature: Quality and Decomposition* (pp. 33–45). <https://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1997/hamme97a.pdf>

Harkin, J. M., Larsen, M. J., & Obst, J. R. (1974). Use of Syringaldazine for

- Detection of Laccase in Sporophores of Wood Rotting Fungi. *Mycologia*, 66(3), 469–476.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1974.12019628>
- Harkin, J. M., & Obst, J. R. (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, 29(4), 381–387.
<https://doi.org/10.1007/BF01926734>
- Hashemi, H., & Mohammadi, H. (2016). Identification and characterization of fungi associated with internal wood lesions and decline disease of willow and poplar trees in Iran. *Forest Pathology*, 46(4), 341–352.
<https://doi.org/10.1111/efp.12269>
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655.
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)
- Instituto Nacional de Preinversión. (2014). ATLAS Bioenergético del Ecuador. In *Atlas bioenergético del Ecuador: Vol. Primera Ed.*
- International System of Units. (2018). *Enzyme Review*. Bipm.
<https://search.bipm.org/bipm/en/C=?q=enzyme+measurement&action=s&setcontext=&x=0&y=0>
- Jo, W., Kang, M., Choi, S., Yoo, Y., Seok, S., & Jung, H. (2010). Culture Conditions for Mycelial Growth of *Coriolus versicolor*. *Mycobiology*, 38(3), 195. <https://doi.org/10.4489/myco.2010.38.3.195>
- Kameshwar, A. K. S., & Qin, W. (2016). Lignin degrading fungal enzymes. In *Production of Biofuels and Chemicals from Lignin* (pp. 81–130).
<https://doi.org/10.1007/978-981-10-1965-4>
- Kirk, T. K., & Lynch, J. M. (1987). Lignin-Degrading Enzymes [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 321(1561), 461–474.
<https://doi.org/10.1098/rsta.1987.0024>
- Kristensen, J. B. (2009). *Enzymatic hydrolysis of lignocellulose Enzymatic hydrolysis of lignocellulose* (F. & L. D. Niels Elers Koch (editor-in-chief), director, professor, Forest & Landscape Denmark Frank Søndergaard Jensen (associate editor), senior researcher, Forest & Landscape Denmark Tilde Tvedt (associate editor), senior consultant, Forest & Landscape Denmark J. (ed.); Firsth). Princo Aalborg, DK.
- Kuhad, R. C., & Singh, A. (1993). Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 13(2), 151–172.
- Læssøe, T., & Petersen, J. H. (2008). *Svampe 58 2008. One*, 1–53.

- Lampi, M., Pitts, T., & Bhargava, V. (2013). *Biochemistry* (Wikipedia (ed.); First). Wikipedia.
- Laura, J., & Castellanos, P. (2009). Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg. *Revista Peruana de Biología*, 16(1), 125–128.
- Liese, W. (Ed.). (1975). *Biological Transformation of Wood by Microorganisms* (2nd ed.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-85778-2>
- Luangharn, T., Karunarathna, S., Khan, S., Xu, J., Mortimer, P., & Hyde, K. (2017a). Antibacterial activity, optimal culture conditions and cultivation of the medicinal *Ganoderma australe*, new to Thailand. *Mycosphere*, 8(8), 1108–1123. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/8/11>
- Luangharn, T., Karunarathna, S., Khan, S., Xu, J., Mortimer, P., & Hyde, K. (2017b). Antibacterial activity, optimal culture conditions and cultivation of the medicinal *Ganoderma australe*, new to Thailand. *Mycosphere*, 8(8), 1108–1123. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/8/11>
- Luo, J., Cai, M., & Gu, T. (2013). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Green Ionic Liquids. In *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6052-3_6
- Maas, M. F. P. M., Debets, A. J. M., Zwaan, B. J., & van Diepeningen, A. D. (2017). Why some fungi senesce and others do not: An evolutionary perspective on fungal senescence. *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*, 341–361. <https://doi.org/10.1017/9781139939867.017>
- Machado, S., & Ferraz, A. (2017). Bioresource Technology Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. *Bioresource Technology*, 225, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.053>
- Manole, A., Herea, D., Chiriac, H., & Melnig, V. (2008). LACCASE ACTIVITY DETERMINATION. *SCIENTIFIC ANNALS OF ALEXANDRU IOAN CUZA DIN IASI UNIVERSITY*, 11.
- Martínez, D. A., Buglione, M. B., Filippi, M. V., Reynoso, L. del C., Rodríguez, G. E., & Agüero, M. S. (2015). Mycelial growth evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe aegerita* on pear pomaces. *Anales de Biología*, 37, 1–10. <https://doi.org/10.6018/analesbio.37.1>
- Mehra, R., Muschiol, J., Meyer, A. S., & Kepp, K. P. (2018). A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35633-8>

- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, *24*(16), 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
- Mueller, G. M., Bills, G. F., & Foster, M. S. (2004). Endophytic Fungi. In *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. <https://doi.org/9780125095518>
- Ordoñez, M. (2018). *Fungi del Ecuador*. [https://bioweb.bio/fungiweb/FichaEspecie/Laxitextum bicolor](https://bioweb.bio/fungiweb/FichaEspecie/Laxitextum%20bicolor)
- Ortiz, E., Saransi, C., Ayala, K., Faz, L., Benavides, N., Vela, P., Rosero, P., Gómez, W., Pinchao, J. H., Imbaquingo, V. H., Trujillo, C., César Augusto Ponce, Soto, C. P., Guzmán, R. D., Parrado, G. A., Duarte, A. S., & Pineda, C. A. (2016a). Banco de recursos genéticos de *Auricularia* spp. con fines industriales: Una revisión. *Revista Bionatura*, *3*(1), 139–145. <http://revistabionatura.com/2016.01.03.8.html>
- Ortiz, E., Saransi, C., Ayala, K., Faz, L., Benavides, N., Vela, P., Rosero, P., Gómez, W., Pinchao, J. H., Imbaquingo, V. H., Trujillo, C., César Augusto Ponce, Soto, C. P., Guzmán, R. D., Parrado, G. A., Duarte, A. S., & Pineda, C. A. (2016b). Banco de recursos genéticos de *Auricularia* spp. con fines industriales: Una revisión. *Revista Bionatura*, *3*(1), 139–145. <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.03.8>
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Bruns, T. D. (2013). Fungal Community Ecology : *American Institute of Biological Sciences*, *58*(9), 799–810.
- Quintero, J. C., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, *13*(53), 61–67.
- Quiroz, D., Merchán, M., Caicedo, M., & Villavicencio, P. (2016). *Maíz Duro*. http://sinagap.agricultura.gob.ec/infoproductor/maiz/descargas/buenas_practicas/iniap.pdf
- Rabemanolontsoa, H., & Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. In *Bioresource Technology* (Vol. 199, pp. 83–91). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029>
- Risdianto, H., Sofianti, E., Suhardi, S. H., & Setiadi, T. (2012). Optimisation of laccase production using white rot fungi and agriculture wastes in solid state fermentation. *ITB Journal of Engineering Science*, *44 B*(2), 93–105. <https://doi.org/10.5614/itbj.eng.sci.2012.44.2.1>
- Saha, B. C., Qureshi, N., Kennedy, G. J., & Cotta, M. A. (2016).

- International Biodeterioration & Biodegradation Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 109, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.020>
- Salazar, A. (2014). Diversidad de los géneros *Ganoderma* y *Amauroderma* en el Ecuador. In *PUCE* (Vol. 66, Issue 1997). Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Salcedo, J., López, J., & Florez, L. (2011). Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna*, 169(x), 182–190.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. In *Biotechnology Advances* (Vol. 27, Issue 2, pp. 185–194). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Schnurer, J. (1993). Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 552–555.
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Bioresource Technology Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Soccol, C. R., Costa, E. S. F. da, Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & Vandenberghe, L. P. de S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- Soto-Aroyave, C. P., Pineda-Insuasti, J. A., & Ramos-Sánchez, L. B. (2013). Cinética del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en la etapa de producción del cuerpo fructífero. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 47(3), 56–61.
- Stamets, P. (1993a). Growing gourmet and medicinal mushrooms. In *Ten Speed Press*.
- Stamets, P. (1993b). Growing gourmet and medicinal mushrooms. In *Ten Speed Press*. Ten Speed Press.
- Straatsma, G., Gerrits, J. P. G., Gerrits, T. M., op den Camp, H. J. M., & van Griensven, L. J. L. D. (2009). Growth kinetics of *Agaricus bisporus* mycelium on solid substrate (mushroom compost). *Journal of General Microbiology*, 137(7), 1471–1477. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-7-1471>

- Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. In *Bioresource Technology* (Vol. 199, pp. 49–58). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Szklarz, G. D., Antibus, R. K., Sinsabaugh, R. L., & Arthur, E. (2018). *Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi*. 5514, 234–240. <https://doi.org/10.1080/00275514.1989.12025652>
- Toapanta, C. (2014). *Diversidad del orden Polyporales en un área de bosque intervenido y un área de bosque primario en la estación científica Yasuní* [Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9026/TESIS_EMPASTADO.pdf?sequence=1
- Travaini, R., Martín-Juárez, J., Lorenzo-Hernando, A., & Bolado-Rodríguez, S. (2016). Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. In *Bioresource Technology* (Vol. 199, pp. 2–12). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.143>
- UTPL. (2015). *Jornadas Micológicas UTPL-Ecuador*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Van Etten, J. L., Molitoris, H. P., & Gottlieb, D. (1966). Changes in fungi with age. II. Respiration and respiratory enzymes of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium bataticola*. *Journal of Bacteriology*, 91(1), 169–175. <https://doi.org/10.1128/jb.91.1.169-175.1966>
- Watanabe, T. (2010). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. In *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi*. <https://doi.org/10.1201/ebk1439804193>
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 259–263). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.004>
- World Energy Council. (2017). *World Energy Issue Monitor 2017*. 156. <https://www.worldenergy.org/data/issues/2017/?selected=energy-efficiency%2Cdigitalisation%2Crenewable-energies%2CIng%2Csustainable-cities%2Cccs%2Cinnovative-transport%2Celectric-storage%2Cunconventionals%2Cbiofuels%2Ccoal%2Chydro%2Chydrogen-economy%2Cnucl>
- Yan, J., Chen, Y., Niu, J., Chen, D., & Chagan, I. (2015). Laccase produced

- by a thermotolerant strain of *trametes trogii* LK13. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 59–65. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130895>
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S., & Wyman, C. E. (2011). *Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass*. 2, 421–449.
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 67, pp. 319–338). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>
- Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S., & Dlamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica*, 46(3), 231–234. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>
- Zhang, J., Ren, X., Chen, W., & Bao, J. (2012). Biological pretreatment of corn stover by solid state fermentation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 6(2), 146–151. <https://doi.org/10.1007/s11705-012-1220-6>

ANEXOS

Anexo 1. Resultado de la prueba de Tukey para tratamientos

HSD Tukey^{a,b}					
Tratami entos	N	Me días	Subconjunto		
CaCO ₃	2 7	18.6 9	A		
CaSO ₄	2 7	16.7 9	A B		
CaCO ₃ + CaSO ₄)	2 7	15.0 2	B		
Sig.		1.00 0	0. 107	0. 107	0. 084

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .174.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 27.000.

b. Alfa = .05.

Anexo 2. Protocolo de obtención de extractos enzimáticos

- A partir de los ensayos experimentales, tomar una muestra de biomasa de aproximadamente 1 gramo de dos o más ensayos según se especifique en el diseño experimental durante un periodo de 56 días.

Nota: La toma de muestras se realizará cada 4 días a partir del día de inoculación hasta completarse 16 días de incubación. A partir de aquel día, tomar las muestras cada 8 días hasta completarse los 56 días de incubación.

- Añadir a cada muestra, una solución buffer de acetato de sodio 50mM en proporción 5ml/gramo de muestra.

- Agitar las muestras con la solución tampón durante 30 min en un agitador a 150 rpm.
- Filtrar el contenido de cada muestra empleando una bomba de vacío y centrifugar a 3000 RPM durante 15 min a 7°C.
- Realizar una medición de presencia proteínica en el ensayo a frecuencia UV de 280nm <https://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/abs280.html> (opcional)

Medición de actividad laccasa utilizando syringaldazina: la reacción se lleva a cabo a 30°C, a una frecuencia de 525 nm y una longitud de absorbanza de 1cm (modificado de Of et al., 2008).

- En una cubeta de medición de espectrofotometría de 1ml, añadir 0.740 ml de solución buffer acetato de sodio 50mM a pH 5.
- Posteriormente incluir 0.170 ml de extracto enzimático con buffer acetato de sodio 50mM.
- Iniciar la reacción al añadir 0.1ml de solución de syringaldazina 0.216 mM (preparar la solución en metanol absoluto).
- Tomar los datos de absorbanza cada minuto durante 20 minutos (recomendado)
- En caso de no evidenciar actividad laccasa, incluir en el volumen de reacción, un volumen de 0.1ml de una solución de peróxido de hidrogeno 0.5mM (opcional).
- Iniciar la reacción al incluir una solución de peróxido de hidrogeno al 10% v/v, en volumen 0.02 ml. Se deja incubar la solución reaccionante en un baño maría a 30°C durante 20 minutos.

Anexo3. Medición de absorbanza y cálculo de actividad enzimática

- Medir la absorbanza del blanco y los ensayos realizados por cada muestra a una longitud de onda de 530-525 nm, así por la ley de Lambert – Beer, se precisa un $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ donde ϵ es el índice de extinción molar.
- La actividad enzimática se reporta en unidades internacionales (UI) definidas como la cantidad de laccasa necesaria para oxidar 0.001mol de syringaldazina hacia su azina oxidada durante un minuto, bajo las condiciones de reacción establecidas.

- El cálculo de la actividad se realiza en base a los datos obtenidos efectuando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{\Delta A * V_t * 1000000}{\epsilon * t * d * V_s}$$

Donde:

C= concentración de enzima

A= Absorbancia

ϵ = coeficiente de extinción molecular

V_t= Volumen total de reacción

t= tiempo de reacción

V_s= volumen de extracto

Nota: el resultado de esta ecuación se interpreta como la cantidad de actividad enzimática U, que se da en un volumen de extracto empleado. Para la realización de la reacción, en este caso, se empleó un volumen de 0.170 ml, por lo que se incluye este valor para su posterior transformación hacia IU/g de sustrato. Para la determinación de reacción en masa seca se emplea los valores de masa seca de cada ensayo muestreado con relación al volumen de extracto obtenido previa inoculación de la solución tampón.

Anexo 4. Gráficos cinética de crecimiento

Figura 8. Aumento del área de crecimiento

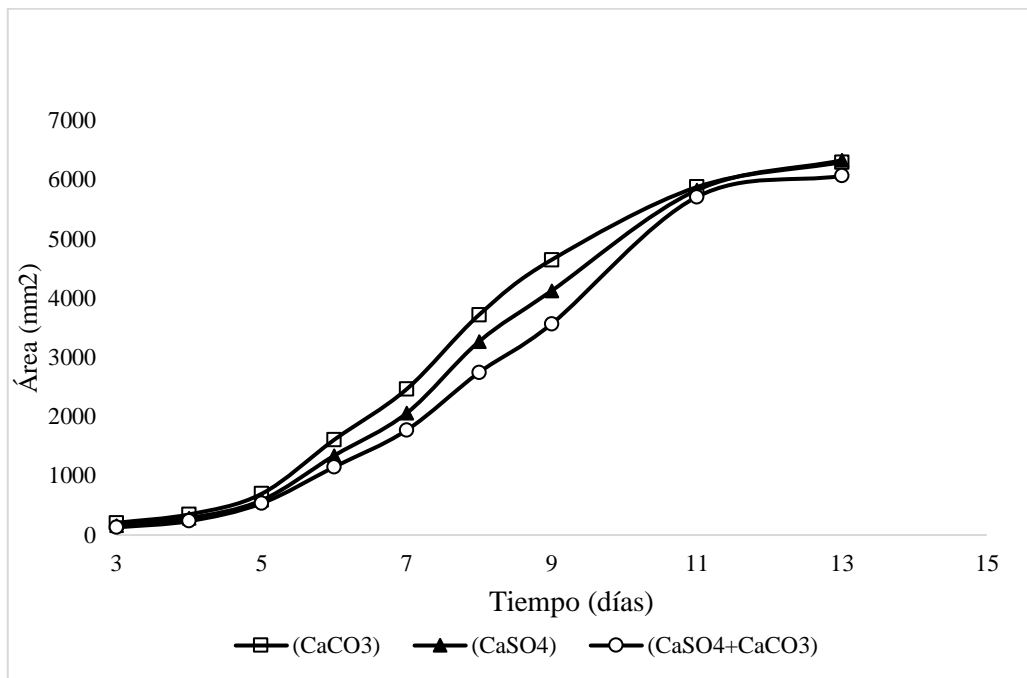


Figura 9. Cambio de absorbancia de ensayos evaluados

