

Biodegradación de colorantes industriales con extractos enzimáticos obtenidos en sistemas (FES) y (FEL), con *Pleurotus djamor*

Cindy Yaritza Wittong-Zambrano¹, Lissette Dayanara Montalvo-Villaprado¹, Ernesto Alonso Rosero-Delgado^{2*}, y Julio César Dustet-Mendoza²

1. Universidad Técnica de Manabí, Av. Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador.
cwittong7036@utm.edu.ec, lmontalvo2656@utm.edu.ec

* eroser@utm.edu.ec

2. Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría. Avenida 114 # 11901 entre Ciclovía y Rotonda, Marianao, La Habana, Cuba.
jcdm@química.cujae.edu.cu

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la biodegradación de los colorantes azul reactivo 19 (A19) y amarillo tartrazina (A5), que se utilizan en la industria textil y alimenticia ecuatoriana respectivamente; con la aplicación de extractos crudos obtenidos de la fermentación en estado sólido (FES) y de la fermentación en estado líquido (FEL) del bagazo de caña de azúcar (BC). Se utiliza como agente biológico una cepa obtenida de un hongo basidiomiceto que se recolecta en la costa ecuatoriana (*Pleurotus djamor*), codificado como Pd318. Experimentos iniciales demostraron que no existe inhibición del crecimiento de Pd318 (hasta la etapa de colonización) por la presencia del colorante en el medio. En el sistema (FEL) se observó que la máxima actividad lacasa (Lac) fue de 0.952 UL⁻¹ a los 14 días de fermentación, y para la enzima manganoso peroxidasa (MnP) fue de 0.074 UL⁻¹ a los 9 días de fermentación. En (FES), las máximas actividades se presentaron a los 20 y 15 días de fermentación, con valores de 0.18 UL⁻¹ y 0.11 UL⁻¹ para Lac y MnP, respectivamente. Se utilizaron los extractos enzimáticos crudos (ExC), obtenidos en el sistema (FEL), con la cepa Pd318, se alcanzaron porcentajes de biodegradación del 9.91 ± 0.6 % y 9.92 ± 0.5 % de los colorantes A19 y A5, respectivamente, en un tiempo de 10 minutos de reacción; para el caso de los ExC obtenidos en el sistema (FES), se alcanzaron porcentajes de biodegradación del 18.54 ± 2.1 % y 14.58 ± 0.3 % de los colorantes A19 y A5, respectivamente.

Palabras clave: biodegradación, colorantes industriales, extractos enzimáticos.

ABSTRACT

In this work the biodegradation of reactive blue dyes 19 (A19) and tartrazine yellow (A5), used in the Ecuadorian textile and food industry respectively, was evaluated; with the application of raw extracts obtained from solid state fermentation (FES) and liquid state fermentation (FEL) of sugarcane bagasse (BC). Using as a biological agent a strain obtained from a basidiomycete fungus collected on the Ecuadorian coast (*Pleurotus djamor*) encoded as Pd318. Initial experiments showed that there is no inhibition of the growth of Pd318 (until the colonization stage) due to the presence of the dye in the medium. In the FEL system it was observed that the maximum lacasa (Lac) activity was 0.952 UL⁻¹ at 14 days of fermentation, and for the manganese peroxidase enzyme (MnP) it was 0.074 UL⁻¹ at 9 days of fermentation. In (FES) the maximum activities were presented at 20 and 15 days of fermentation, with values of 0.18 UL⁻¹ and 0.11 UL⁻¹ for Lac and MnP respectively. Using the crude enzyme extracts (ExC) obtained in the (FEL) system with strain Pd318, biodegradation percentages of 9.91 ± 0.6 % and 9.92 ± 0.5 % of the dyes A19 and A5 respectively were reached, in a reaction time of 10 minutes, in the case of ExC obtained in the (FES) system, biodegradation percentages of 18.54 ± 2.1 % and 14.8 ± 0.3 % of the dyes A19 and A5 were reached respectively.

Key words: biodegradation, industrial dyes, enzymatic extracts.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad miles de moléculas sintéticas, como pigmentos y colorantes, son usados a diario en las industrias textiles, papeleras, farmacéuticas y de alimentos (1). Los procesos industriales y el avance de la tecnología aún no han permitido lograr que el 100 % de estas moléculas sean retenidas por el material o producto al que estén destinados a colorear. De acuerdo con el tipo de colorante que se utilice, se estima que la remoción de estas moléculas, por medio de métodos convencionales, logre remover entre el 2 y 50 % de estas, generalmente, la complejidad de los procesos de remediación se da debido a su origen sintético y a la estructura de estas (2).

Existen muchos métodos ya establecidos para el tratamiento de aguas contaminadas con colorantes, entre los cuales destacan procesos físicos y químicos, donde los contaminantes no son destruidos del todo sino degradados, muchas veces en compuestos más tóxicos que los originales (3); en la actualidad, los métodos biológicos se destacan por ser amigables con el medio ambiente y por tener una alta efectividad en la remoción de contaminantes (4). Los métodos biológicos utilizan microorganismos, tales como hongos y bacterias, en mecanismos aerobios o anaerobios, estos métodos son conocidos como biorremediación (5) y, para que esto suceda, se le debe otorgar a los microorganismos las condiciones físicas y químicas adecuadas, para que puedan adaptarse a un medio, en presencia de los colorantes, y los degrade; o bien puedan producir metabolitos útiles como las enzimas, para ser utilizadas en procesos de biorremediación.

Los hongos de pudrición blanca son organismos que tienen la capacidad de producir un complejo enzimático, conformado por un grupo de enzimas, entre las cuales se destacan las enzimas manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac); enzimas que tienen actividad oxidativa frente a una amplia variedad de compuestos tóxicos, tales como, plaguicidas, colorantes industriales, hidrocarburos poliaromáticos, entre otros (6-8). Los sistemas de fermentación son procesos utilizados, fundamentalmente, para la producción de sustancias o enzimas deseadas, en donde, determinados sustratos orgánicos son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa, mediante el control adecuado de los factores físico-químicos, que afectan el rendimiento de las fermentaciones, tales como, oxígeno, temperatura, pH, entre otros (9). El objetivo del estudio fue evaluar la efectividad y la caracterización de la cinética enzimática de dos cepas de hongos de pudrición blanca nativas del Ecuador y analizar su efectividad de remoción de colorantes industriales presentes en aguas residuales, en procesos fermentativos (FES) y (FEL).

MÉTODOS

Cultivos fúngicos

Se utilizó un hongo de pudrición blanca recolectado en la costa ecuatoriana, del cual se obtuvo una cepa que fue codificada como Pd318, perteneciente a la especie *Pleurotus djamor*. La cepa fue identificada, molecularmente, en los laboratorios MacroGen de Corea, y fue depositada en el banco de cepas de la Universidad Técnica de Manabí. Los cultivos puros se mantuvieron en tubos con agar papa dextrosa (PDA), a 4 °C.

Crecimiento y presencia de la enzima lacasa con ABTS

Para evaluar si la cepa Pd318 es capaz de crecer en presencia de los colorantes A19 y A5, así como expresar enzima lacasa, se establecieron experimentos en placas Petri, las cuales contenían disueltos los colorantes seleccionados, en un medio de cultivo con agar-agar y los nutrientes definidos por Chang *et al.* (10). Se evaluó la velocidad de crecimiento (cm/día) del hongo frente a un blanco (placas Petri sin presencia del colorante), durante 7 días de incubación a 26.5 °C. En el caso de la evaluación de la expresión de la enzima lacasa, se utilizó el reactivo ABTS (2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico]), en el medio con una concentración de 0.1 g/L; la presencia de un halo de color verde confirma la presencia de la enzima lacasa.

Pretratamiento del sustrato lignocelulósico

Se seleccionó bagazo de caña de azúcar como sustrato lignocelulósico, que fue sometido a una reducción del tamaño hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0.15 a 20 mm (Φ equivalente = 1.30 mm) (11), posteriormente, fue deshidratado (8 horas /65 °C), hasta alcanzar una humedad de almacenaje del 16 %.

Condiciones de fermentación y cultivo

El cultivo en fermentación líquida (FEL) se realizó en matraces Erlenmeyer, que contenían 1 g de bagazo de caña de azúcar pretratado y tarados a 100 mL, con un medio líquido enriquecido, previamente optimizado ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 1 \text{ gL}^{-1}$; $\text{C}_{22}\text{H}_{12}\text{O}_{22} = 4.7951 \text{ gL}^{-1}$; y $\text{K}_3\text{PO}_4 = 0.1 \text{ gL}^{-1}$) (12). En el caso del sistema de fermentación sólida (FES), la experimentación se desarrolló en matraces Erlenmeyer de 250 mL, empleando 10 g de ba-

gazo de caña de azúcar pretratado, a los cuales se les adicionó la cantidad necesaria de agua enriquecida, con los mismos nutrientes utilizados en el sistema (FEL), para que el sustrato lignocelulósico alcance una humedad del 75 ± 5 %. Todos los matraces (FEL) y (FES), se esterilizaron en autoclave (BIOBASE BKQ-B75 II) y, posteriormente, fueron inoculados con un bucle de agar, de 1 cm^2 proveniente de placas obtenidas de las cepas en estudio, según lo establecido por Sandhya *et al.* (13).

Los procesos fermentativos en los dos sistemas se llevaron a cabo a una temperatura de 26.5 ± 5 °C, durante 16 días, para (FEL), y 21 días para (FES). En el caso de (FEL), el proceso se desarrolló en agitación orbital (120 rpm) (14). Todos los experimentos fueron planteados por triplicado.

Ensayos enzimáticos

Los extractos fúngicos en (FES), se obtuvieron por arrastre con una solución de Tween 80 (0.1 % v/v, pH 5.5) (15), con una relación de 5 mL/g de sustrato. En (FEL) el muestreo fue directo, tomando alícuotas de 15 mL, cada 48 horas. Los extractos fueron filtrados ($0.45 \mu\text{m}$) y centrifugados (5000 rpm / 20 min / 27 °C), con la finalidad de eliminar partículas en suspensión que interfieran en la medición espectrofotométrica. La actividad lacasa (Lac) se determinó midiendo el cambio de absorbancia A_{420} ($\epsilon_{420}=36000 \text{ LM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), cada 3 min, a 21 °C, debido a la oxidación de 10 mM de ABTS (2,2-azino-bis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico]), en 100 mM de tampón acetato de sodio (pH 5) (16). Una unidad de actividad Lac (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar $1 \mu\text{m}$ de ABTS, en 1 minuto. La actividad Manganese Peroxidasa (MnP) fue determinada debido a la oxidación del reactivo 2-metoxifenol (guaiacol, pH 4.5) con 2 mM de MnSO_4 (pH 5), 1 mM de H_2O_2 y 100 μL de los diferentes extractos, el cambio de absorbancia A_{465} ($\epsilon_{465}=5570 \text{ LM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) fue evaluado cada 3 min, a 21 °C. Una unidad de actividad enzimática MnP (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar $1 \mu\text{m}$ de guaiacol, en 1 minuto (17,18).

Degradación de los colorantes A19 y A5 en (FEL) y (FES)

La degradación de los colorantes fue evaluada con un espectrofotómetro UV marca THERMO SCIENTIFIC - EVOLUTION 60S. Se utilizaron soluciones modelo de los colorantes A19 (A_{594}) y A5 (A_{429}), con una concentración de 200 ppm. Se prepararon experimentos con: 500 μL de la solución modelo y 500 μL de los ExC, obtenidos en los días de máxima actividad de las enzimas Lac y MnP de las diferentes fermentaciones (FEL y FES); cada experimento se mantuvo a una temperatura constante de 26.5 °C 'al baño de María', para, posteriormente, determinar el cambio de absorbancia en el tiempo. El blanco utilizado contenía la solución modelo y agua destilada. Modificado de Garcés *et al.* (19).

Análisis estadísticos

Los valores obtenidos de la velocidad de crecimiento de la cepa Pd318, en presencia de los colorantes A19 y A5 y del indicador ABTS, fueron comparados mediante la prueba de múltiples rangos, con la ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento y presencia de la enzima lacasa con ABTS

En la figura 1, se observa la velocidad crecimiento de la cepa Pd318 sobre placas que contenían los diferentes colorantes evaluados. En ninguno de los casos se observó una inhibición del crecimiento (longitud del micelio) por la presencia de los colorantes en el medio, sin embargo, se observaron cambios en la densidad de este, lo cual fue más evidente en el caso del colorante A19.

En la tabla 1, se observan las velocidades de crecimiento del micelio, durante los 7 días de incubación. Las placas que contenían el colorante A19 mostraron una velocidad prácticamente constante, durante los 7 días de incubación con un promedio de crecimiento por día de $0.052 \pm 0.003 \text{ cm día}^{-1}$, para el colorante A5, la velocidad promedio fue relativamente mayor, con un valor de $0.054 \pm 0.004 \text{ cm día}^{-1}$. La velocidad del crecimiento de la cepa Pd318, en placas que contenían los colorantes A19 y A5, en comparación con las placas que no lo contenían (blanco), son estadísticamente iguales, (tabla 2), en el caso de las placas que contenían el indicador ABTS, la velocidad disminuyó notablemente y, estadísticamente, es diferente como se muestra en la tabla 2.

La formación de un halo verdoso en todas las placas que contenían ABTS, indica que la cepa Pd318 es capaz de expresar enzimas lignolíticas como las lacasas (figura 1), sobre esto Dai *et al.* (20) mencionan que, *Pleurotus spp.*, es uno de los géneros de hongos de pudrición blanca que tiene una alta capacidad de producción de enzimas lacasas, y que la cantidad de isoformas expresadas son mayores que las producidas por otros géneros.

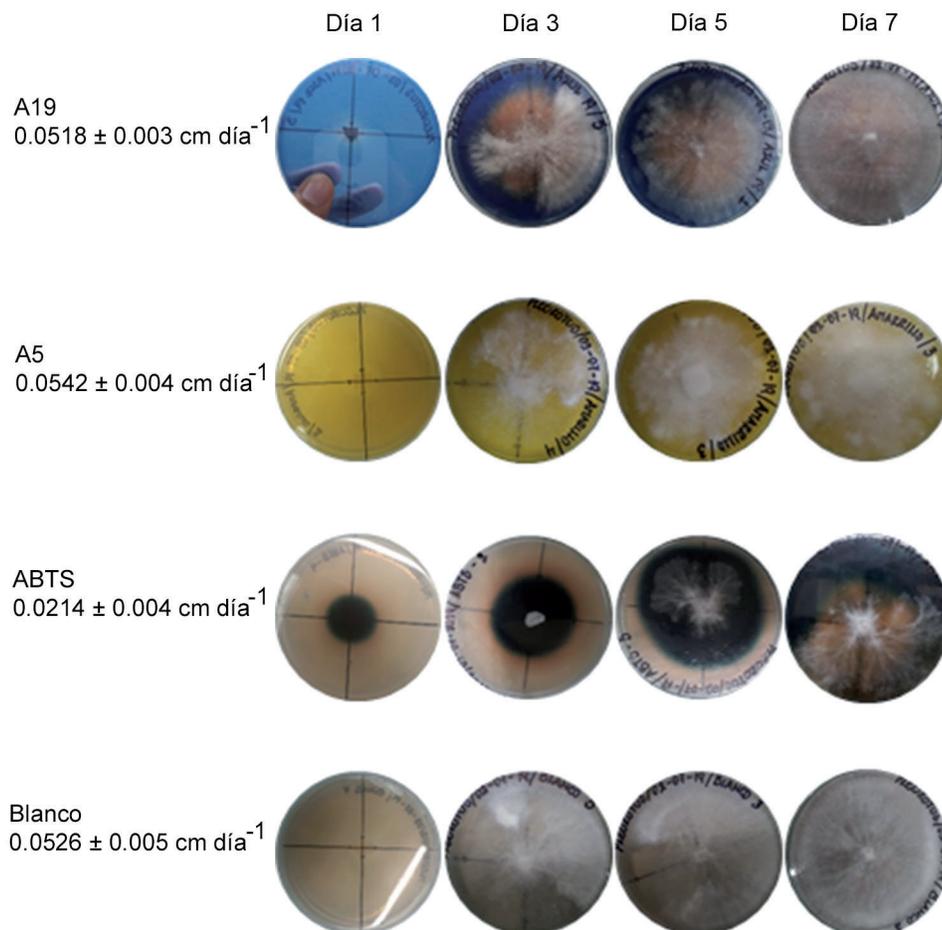


Figura 1. Velocidad de crecimiento de la cepa Pd318 sobre un medio, con los colorantes A19, A5 y el indicador de ABTS.

Tabla 1. Velocidad de crecimiento, de la cepa Pd318 en presencia de A19, A5 y el indicador ABTS

	Velocidad de crecimiento durante 7 días de incubación						
	Día 1	Día 1	Día 1	Día 1	Día 1	Día 1	Día 1
A19	0,046±0,005	0,050±0,003	0,054±0,003	0,055±0,003	0,055±0,003	0,056±0,006	0,053±0,008
A5	0,054±0,004	0,052±0,002	0,061±0,002	0,058±0,003	0,060±0,003	0,054±0,007	0,057±0,005
ABTS	0,033±0,002	0,021±0,003	0,019±0,008	0,019±0,001	0,019±0,001	0,0200±0,023	0,020±0,028
BLANCO	0,047±0,006	0,047±0,002	0,055±0,004	0,057±0,003	0,057±0,003	0,058±0,0054	0,054±0,000

Tabla 2. Prueba de múltiples rangos de la velocidad de crecimiento de la cepa Pd318, en presencia de A19, A5 y el indicador ABTS

	Casos	Media	Grupos homogéneos
ABTS	7	0,0216286	X
A19	7	0,0525286	X
BLANCO	7	0,0533857	X
A5	7	0,0552571	X

Tres familias de enzimas lignolíticas han sido reportadas como el complejo enzimático de las especies de *Pleurotus*; lacasa (21), manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa (VP) (22), pero carecen de peroxidasa de lignina; sobre esto, Díaz-Godínez et al. (23) informan que en *Pleurotus ostreatus*, el papel que, generalmente, jugaba la peroxidasa de lignina, ha sido asumido por la peroxidasa versátil.

Ensayos enzimáticos en (FES) y (FEL)

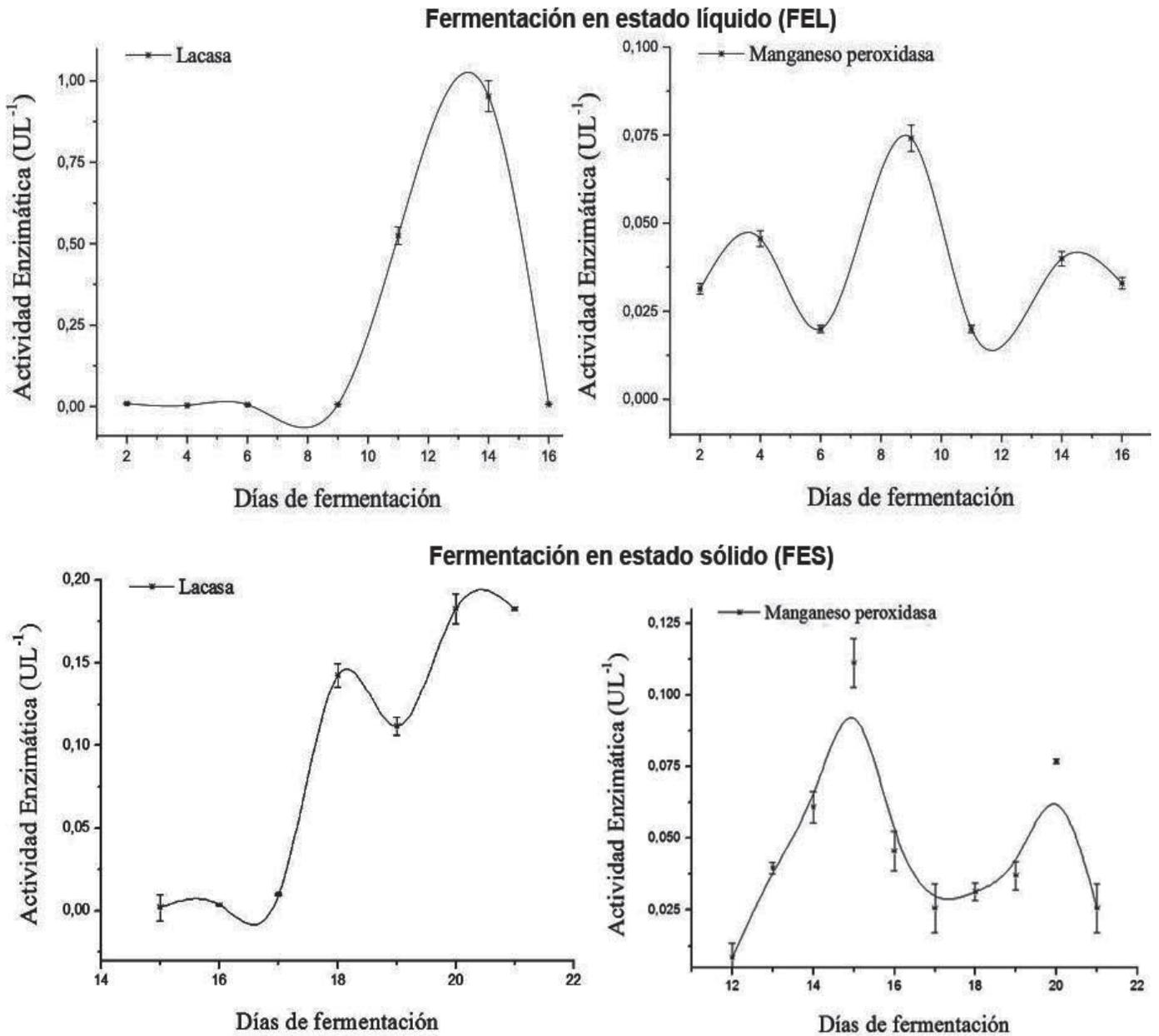


Figura 2. Actividad enzimática Lac y MnP con la cepa Pd318, en los sistemas (FEL) y (FES).

En la figura 2, se muestran los perfiles enzimáticos para las enzimas lacasa (Lac) y manganeso peroxidasa (MnP), que se obtuvieron en los sistemas (FEL) Y (FES), con la cepa Pd318. Existe una marcada diferencia en los tiempos en que se presenta la mayor actividad enzimática, en cada sistema. Se observó que en el sistema (FEL) la actividad enzimática incrementa después de los 9 días de fermentación, y alcanza una actividad enzimática máxima a los 14 días, con un valor de 0.95 UL⁻¹, mientras que en el sistema de (FES), la actividad enzimática Lac, muestra un incremento acelerado de la actividad a partir de los 15 días de fermen-

tación, llegando a un valor máximo de 0.18 UL^{-1} , a los 20 días de fermentación, que resulta mucho menor al valor alcanzado en el sistema (FEL).

En el sistema (FEL), la actividad MnP muestra un incremento a partir del segundo día de fermentación para, posteriormente, descender; el valor máximo alcanzado en este sistema fue de 0.074 UL^{-1} , a los 9 días de fermentación, mientras que en el sistema (FES), se mostraron dos picos de actividad (figura 2); el primero, a los 16 días, con un valor de 0.0456 UL^{-1} y, el segundo y máximo valor de actividad de 0.076 UL^{-1} , a los 20 días de fermentación.

Los resultados mostraron que la mayor actividad enzimática lac, se alcanza en el sistema (FEL). En el caso de la actividad enzimática MnP, se observó que en los dos sistemas (FEL) y (FES), se alcanzan similares valores de actividad enzimática pero, en diferentes tiempos. Motato *et al.* (24) mencionan que en un sistema (FES), las enzimas MnP y Lac, incrementan su actividad justo en la etapa de fructificación de los hongos (formación de las setas), lo que evidencia el rol fisiológico de estas enzimas dentro de esta etapa de crecimiento de los hongos de pudrición blanca.

Velocidad de degradación de los colorantes A19 y A5 en (FEL) y (FES)

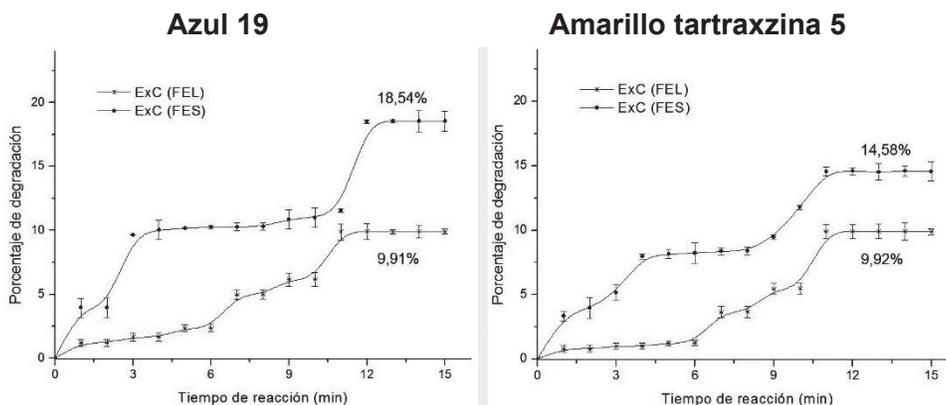


Figura 3. Relación lineal inversa.

En la figura 3, se observa la velocidad de la degradación de los colorantes textil A19 y alimenticio A5, con los ExC recolectados en los sistemas (FEL) y (FES), en los días de máxima actividad Lac y MnP. El comportamiento de la degradación de los colorantes fue similar en los dos colorantes para cada sistema, respectivamente, sin embargo, los valores de degradación alcanzados fueron diferentes para cada uno de los ExC provenientes de los dos sistemas de fermentación utilizados. La máxima degradación del colorante A19 se consiguió a los 12 minutos de reacción, con el ExC obtenido de la (FEL), con un valor de 9.91 % de degradación. En el caso del ExC, proveniente de la (FES), la degradación alcanzada fue mayor (18.54 %) en un tiempo de 13 minutos.

Para el colorante A5, la máxima degradación alcanzada con los ExC de la (FEL), fue similar al del colorante A19; con un valor máximo de 9.92 % en un tiempo de 12 minutos de reacción. Por el contrario, con los ExC obtenidos de la (FES), la degradación máxima alcanzada fue de 14.58 %, en un tiempo de 12 minutos.

Los valores encontrados demuestran que los ExC obtenidos de la (FES) tienen mayor efectividad sobre los colorantes.

DISCUSIÓN

La cepa Pd318 del hongo basidiomiceto *Pleurotus djamor*, produce dos tipos de enzimas lignolíticas, como la lacasa y manganeso peroxidasa, en sistemas de fermentación en medio líquido y en medio sólido.

Los comportamientos de la actividad de las enzimas Lac y MnP, son diferentes en ambos sistemas de fermentación, esto se debe a los fenómenos que rigen, de manera particular en cada uno los sistemas, como son la transferencia de oxígeno y el estado fisiológico del hongo. Sobre esto, Téllez-Téllez *et al.*; (25), Soccol *et al.* (26) y Ashok *et al.* (27) mencionan que los procesos de transferencia de masa son mucho más rápidos en los sistemas (FEL), en comparación con el sistema (FES), ya que presentan gradientes en la transferencia de oxígeno y el acceso a nutrientes, en cada uno de los sistemas. Por otro lado, el acceso a los nutrientes es

un condicionante de la actividad enzimática, debido a que la (FES) y (FEL) tienen parámetros de optimización diferentes. Para el sistema (FEL), existen informes que hacen énfasis en las condiciones y parámetros que rigen el medio de cultivo, señalan que en diversos de estos cultivos sumergidos de hongos filamentosos, la morfología y el tamaño de los pellets obtenidos para esta especie de *Pleurotus spp*, están determinados por el estrés mecánico, durante el cultivo (28), por lo que se necesita una distribución más homogénea del tamaño de estos.

Valores de actividad enzimática considerablemente mayores a los encontrados en esta investigación, han sido informados, Guillén, *et al.* (29) determinaron una actividad enzimática lac, de 307 UL⁻¹, y de manganeso peroxidasa 0.41 UL⁻¹, en un sistema (FEL); sin embargo, Mora, *et al.* (30), informan un valor de actividad enzimática menor, para lac de 0.025 UL⁻¹ a los 13 días de (FEL) de un residuo de vinaza, el mismo residuo utilizado por los dos autores.

La actividad enzimática MnP observada en esta investigación, para los dos sistemas de fermentación (FEL) y (FES), fue baja; Sarka *et al.* (31), demostraron que la actividad MnP de *Pleurotus ostreatus* es baja, en ausencia de una fuente alterna de manganeso, factor no fue estudiado en esta investigación; así mismo, Giardina *et al.* (32) informan que la adición de Mn²⁺ a medios que contienen residuos de álamo y abeto, como sustratos lignocelulósicos, triplican el valor de la actividad de la enzima MnP. Por otra parte, Stajić *et al.* (33), informan que la suplementación de un hidrolizado de caseína en el medio, estimulan 15 veces la expresión de la enzima MnP. Knop *et al.* (34), corroboran esta información, y mencionan que la concentración de Mn²⁺ afecta, diferencialmente, la expresión de los genes que codifican las enzimas lignolíticas peroxidadas, que consisten en seis diferentes tipos de MnP cortas. Sin embargo, valores de actividad MnP, como el informado por Ruíz *et al.* (35), (0.017 UL⁻¹), en un sistema FEL y el de Piña *et al.* (36) (0.25 UL⁻¹), en un sistema FES, se muestran similares a los de esta investigación.

Los valores de degradación alcanzados son bajos en comparación a los informados por otros autores como Kalmış *et al.* (37), quienes mencionan valores del 40 % de degradación del colorante textil Benazol Black ZN y del 25 % para amarillo tartrazina, valor confirmado por Papadopoulou *et al.* (38), quienes informan el mismo valor para el colorante A5.

A pesar de que los valores de actividad enzimática son mayores en el sistema (FEL) que en los observados en el sistema (FES), los valores de degradación obtenidos con los ExC, del sistema (FEL), son muy bajos en comparación con los mencionados por otros autores y, sobre todo, a los encontrados en esta investigación, con los ExC del sistema (FES). Esto podría deberse a que los cultivos en (FEL), con este género de hongos, son utilizados, generalmente, para preparar mayor cantidad de inóculo, de un tamaño homogéneo, y que al sembrarse en medio sólido, los microorganismos crezcan rápidamente, y se evite la etapa de adaptación. Muchos autores hacen énfasis en la optimización de los parámetros de los diferentes sistemas de fermentación, con la finalidad de obtener enzimas lignolíticas. Los hongos basidiomicetos, como *Pleurotus djamor*, requieren gran cantidad de oxígeno para sus diferentes etapas de crecimiento (39). Es así que la cantidad de oxígeno que se transfiere a la célula de los hongos del género *Pleurotus spp*, limita la cantidad de isoformas de la enzima Lac y MnP, que produce este hongo (40), lo cual condiciona y limita la actividad enzimática o su aplicación en la degradación de los colorantes, como se observó en esta investigación.

CONCLUSIONES

La cepa Pd318, del hongo *Pleurotus djamor*, es capaz de crecer en un medio nutritivo en presencia de los colorantes: textil azul reactivo 19 (A19) y alimenticio amarillo tartrazina (A5), sin presentar inhibición, la formación de un halo de color verdoso confirma que el hongo es capaz de expresar enzimas lignolíticas, como las lacasas (Lac); además, las evaluaciones cuantitativas demostraron que la enzima manganeso peroxidasa (MnP) también se produjo durante el crecimiento de la cepa, en los dos sistemas de fermentación (FEL) y (FES); los más altos valores de actividad enzimática se presentaron en (FES), para Lac (0.952 UL⁻¹ a los 14 días), y en (FES), para MnP (0.11 UL⁻¹ a los 15 días). La máxima degradación de los colorantes A19 y A5 se obtuvo con los ExC, que se lograron con el sistema FES (18.54 ± 2.1 % y 14.58 ± 0.3 %). Las enzimas Lac y MnP obtenidas de la cepa Pd318, se muestran como una alternativa, directa o complementaria, promisoría para el tratamiento de aguas con altas cargas de colorantes textiles y alimenticios en el Ecuador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arias, P. E., Nájera, J. B., Hernández, I. C., Iván, H., & Ayala, S. (2018). Los colorantes textiles industriales y tratamientos óptimos de sus efluentes de agua residual: Una breve revisión textil. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. (19).
2. Cortazar, A., González, C. A., Coronel, C., Escalante, J. A., Castro, J., & Villagómez, J. R. 2012. Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Revista Universidad y Ciencia*, 28(2), 187-199.
3. Cardona, M., Osorio, J., & Quintero, J. 2009. Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (48), 27-37.
4. Fernández, J. A., Henao, L. M., Pedroza-Rodríguez, A. M., & Quevedo-Hidalgo, B. 2009. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 59-72.
5. Hernández-Ruiz, G. M., Álvarez-Orozco, N. A., & Ríos-Osorio, L. A. 2017. Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(1), 138-159.
6. Lopera, M., Peñuela, G., Domínguez, M., & Mejía, G. 2005. Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifós en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. *Rev Fac Ing Univ Antioq.* 33, 58-69.
7. Quintero, J. C. 2011. Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Rev Fac Nac Agron.* 64(1), 5867-5882.
8. Zavala, C., Gonza, A. P., Olivera, R. E., Pari, U. A., Mendoza, R., Lázaro, R., & Bocardo, E. 2015. Remoción anaerobia del colorante azul directo brl en Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) con carbón activado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 55-64.
9. Peix, A., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., & Velazquez, E. 2003. *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 2067-2072.
10. Chang, S. T., Lau, O. W., & Cho, K. Y. 1981. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 12(1), 58-62.
11. Rosero-Delgado, E. 2017. Fermentación de materiales lignocelulosicos con *Auricularia aurícula-judae*. (Doctoral dissertation, Universidad Tecnológica de la Habana "José Antonio Echeverría" Facultad de Ingeniería Química, Departamento de Ingeniería Química).
12. Chegwin, A., Nieto, R., & Ivonne, J. 2013. Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. *Revista mexicana de micología*, 37, 01-09
13. Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*, 40(8), 2689-2694.
14. Manjarrés, K., Castro, A., & Rodríguez Sandoval, E. 2010. Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de investigación*, 7(2).
15. Gómez, R., García, I., Rodríguez, L., Torres, M., Figueroa, A., Barragan, A., & Aguilar, C. 2012. Influencia del sustrato y tipo del bioreactor en la producción fungica de la tanin acil hidrolasa (3.1. 1.20) en cultivo sólido. *Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química*. 747-749.
16. Medina, D., Nuñez, M., & Ordoñez, M. 2010. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(1).
17. Rojas, M. 2010. Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en Nuevo León. (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas).
18. Sánchez, A. M., Gutiérrez, A. I., Muñoz, J. A., & Rivera, C. A. 2010. Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Revista Tumbaga*, 1(5),
19. Garcés, L., Hernández, M., Peñuela, G., Rodríguez, A., & Salazar, J. 2005. Degradación de aguas residuales de la industria textil por medio de fotocatalisis. *Revista Lasallista de investigación*, 2(1).

20. Dai, J., Wang, H., Chi, H., Wang, Y., & Zhao, J. 2016. Immobilization of laccase from *Pleurotus ostreatus* on magnetic separable SiO₂ support and excellent activity towards azo dye decolorization. *Journal of environmental chemical engineering*, 4(2), 2585-2591.
21. El-Batal, A. I., ElKenawy, N. M., Yassin, A. S., & Amin, M. A. 2015. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Journal Biotechnology Reports*, 5(1), 31-39.
22. Palma, C., Lloret, L., Sepúlveda, L., & Contreras, E. 2016. Production of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii* by solid-state fermentation using agricultural residues and evaluation of its catalytic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(2), 200-207.
23. Díaz-Godínez, G., Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., & Díaz, R. 2017. Characterization of the Solid-State and Liquid Fermentation for the Production of Laccases of *Pleurotus ostreatus*. *Fermentation Processes*, 57.
24. Motato, K. E., Mejía, A. I., & León, Á. 2006. Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. *Journal Vitae*, 13(1), 24-29.
25. Téllez-Téllez, M., *et al.* 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 675.
26. Soccol, C. R., Da Costa, E. S., Letti, L. A., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & De Souza, L. P. 2017. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 52-71.
27. Ashok, A., Doriya, K., Rao, D. R. M., & Kumar, D. S. 2017. Design of solid-state bioreactor for industrial applications: an overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 9, 11-18.
28. Cui, Y.Q., Van Der Lans, R., & Luyben, K. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 55, 715-726.
29. Guillén-Navarro, G. K., Márquez-Rocha, F. J., & Sanchez-Vázquez, J. E. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, 302-306.
30. Mora, V., & Martínez, D. 2007. Investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas (*Pleurotus*) en México. El cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México *Ecosur*, 1(1), 7-26.
31. Sarkar, S., Martinez, A. T., & Martinez, M. J. 1997. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1339(1), 23-30.
32. Giardina, P., Palmieri, G., Fontanella, B., Riviaccio, V., & Sannia, G. 2000. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376(1), 171-179.
33. Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S. P., Nevo, E., & Vukojević, J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 65-73.
34. Knop, D., Yarden, O., & Hadar, Y. 2015. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1025-1038.
35. Ruiz, L., Andrade, H., Sánchez, E., & Sur, F. 2014.. Biotechnological potential of ten *Pleurotus djamor*. *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)*, 1(2), 262-270.
36. Piña, A., Nieto, D., & Robles, F. 2017. Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible seta (*Pleurotus spp.*). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32, 141-151.
37. Kalmış, E., Azbar, N., & Kalyoncu, F. 2008. Evaluation of two wild types of *Pleurotus ostreatus* (MCC07 and MCC20) isolated from nature for their ability to decolorize Benazol Black ZN textile dye in comparison to some commercial types of white rot fungi: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor*, and *Pleurotus citrinopileatus*. *Canadian journal of microbiology*, 54(5), 366-370.
38. Papadopoulou, K., & Rigas, F. 2014. Degradación de los tintes utilizados en las industrias textiles por hongos seleccionados de la podredumbre blanca. *Avances recientes en la gestión energética y ambiental*, 163-168.

39. Nieto, I. J., & Chegwin, C. 2010. Influencia del sustrato utilizado para el crecimiento de hongos comestibles sobre sus características nutraceuticas. Revista Colombiana de Biotecnología, 12 (1), 169-178.
 40. Téllez-Téllez, M., Diaz-Godinez, G., Aguilar, M. B., Sánchez, C., & Fernández, F. J. 2012. Description of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* expressed under submerged fermentation conditions. Journal BioResources, 7 (2), 2038-2050.
-