

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Biodegradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp.* a
diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. Chavez Otiniano, Stephanie Betheliz
Bach. Candelario Rojas, Claudia Sofía

ASESOR:

Blgo. Mblgo. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

**NUEVO CHIMBOTE – PERÚ
2025**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Biodegradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp.* a
diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. Chavez Otiniano, Stephanie Betheliz
Bach. Candelario Rojas, Claudia Sofía

Revisado y aprobado por el asesor

Blgo. Mblgo. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

**NUEVO CHIMBOTE – PERÚ
2025**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Biodegradación del colorante Orange II por *Phanerochaete* sp. a
diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA**

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel

PRESIDENTE

DNI: 32733772

ID ORCID: 0000-0002-5056-0001

Ms. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

INTEGRANTE

DNI: 32406295

ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

Ms. Lecca Zavaleta, Victor Eduardo

INTEGRANTE

DNI: 42636735

ID ORCID: 0000-0022-3759-8128

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2025

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en el Aula Multimedia 3er piso de la Facultad de Ciencias de la UNS, dando cumplimiento a la Resolución N° 148-2025-UNS-CFC , siendo las 18:00 horas del día 20 junio del 2025

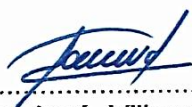
se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Ms. Blgo Mblgo José Villanueva Carlos, teniendo como miembros a. Ms. Víctor E. Lecca Zavaleta. (secretario) (a) y al . Ms. Eterio A. Alva Muñoz (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por él, (la), (los) tesista (as) Chávez Otiniano, Stephanie Betheliz y Candelario Rojas, Claudia Sofía de la Escuela Profesional de Biotecnología .quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

"Biodegradación del Colorante Orange II por *Phanerochaete sp.* a Diferentes Concentraciones de Glucosa y Sulfato de Amonio".

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de diecisiete (17) puntos. Según artículo 112° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 337-2024-CU-R-UNS)

Siendo las 19:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: Ms. José Villanueva Carlos
Presidente



Nombre: Ms. Víctor E. Lecca Zavaleta
Secretario



Nombre: Ms. Eterio A. Alva Muñoz
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesisas () y archivo FC (02).

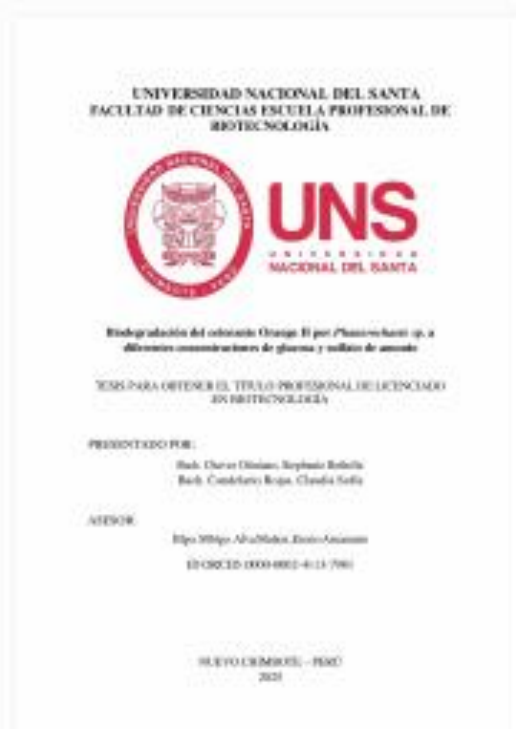


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: **Jose Villanueva**
Título del ejercicio: **TESIS**
Título de la entrega: **Biodegradación del colorante Orange II por Phanerochaete sp....**
Nombre del archivo: **ci_n_del_colorante_Orange_II_-_CHAVEZ_Y_CANDELARIO_-turni...**
Tamaño del archivo: **2.39M**
Total páginas: **125**
Total de palabras: **30,835**
Total de caracteres: **162,501**
Fecha de entrega: **21-sept-2025 06:35p. m. (UTC-0500)**
Identificador de la entrega: **2747597244**



Biodegradación del colorante Orange II por Phanerochaete sp. a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	13%	3%	4%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	4%
2	www.ptolomeo.unam.mx:8080 Fuente de Internet	1%
3	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repository.uaeh.edu.mx Fuente de Internet	1%
5	www.scielo.org.co Fuente de Internet	1%
6	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1%
7	Hanae Abdelouahab Reddam, Rachad Elmail, Sara Cerro Lloria, Guillermo Monrós Tomás et al. "Synthesis of Fe, Mn and Cu modified TiO2 photocatalysts for photodegradation of Orange II", Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2019 Publicación	1%
8	revistas.unicauca.edu.co Fuente de Internet	<1%
9	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1%
10	Submitted to Colegio San Ignacio - Asturias ESP Trabajo del estudiante	<1%
11	Marín Pérez, María, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental. "Del residuo al producto : recuperación de enzimas	<1%

DEDICATORIA

Esta investigación está principalmente dedicada a Dios por ser mi fuente de inspiración, guía y mi fortaleza en este proceso. Asimismo, dedicada a mis padres, quienes estuvieron todo el tiempo animándome a seguir adelante, sus palabras de aliento y sus oraciones fueron esenciales para concluir con esta etapa en mi carrera profesional.

Stephanie Betheliz Chavez Otiniano

Dedicado a mis padres por brindarme el apoyo necesario durante todo el proceso y darme las fuerzas necesarias cuando más lo necesitaba asimismo para todos los profesores que nos brindaron sus conocimientos durante toda la carrera y este trabajo va dedicado a mi persona especial Stefano, gracias por darme una razón más para poder seguir adelante.

Claudia Sofia Candelario Rojas

AGRADECIMIENTO

Agradezco sinceramente a todas aquellas personas que, de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo de investigación. A mis compañeras de esta carrera profesional, a mi compañera de tesis y los técnicos del laboratorio, por su valiosa colaboración al compartir sus conocimientos, lo que facilitó el desarrollo y ejecución de esta investigación. A mis padres, por su apoyo constante, tanto emocional como económico, y por ser siempre un sostén en cada etapa de este proceso. Gracias Dios, a mis padres y hermanos, por su amor incondicional, y a mi compañera de tesis, por el compromiso entregado en la realización de nuestro proyecto de investigación.

Stephanie Betheliz Chavez Otiniano

Doy gracias a Dios por permitirme estar a la altura de este momento culminante de mi carrera profesional, agradecida con mis padres por brindarme los recursos económicos para realizar este proyecto y con todas las personas que apoyaron este proyecto para poder hacerlo posible, gracias a mi compañera de tesis por el trabajo en equipo que hizo posible realizar este proyecto.

Claudia Sofia Candelario Rojas

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
INDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción y formulación del problema	1
1.2. Problema.....	2
1.3. Objetivos	2
1.4. Formulación de hipótesis.....	3
1.5. Justificación.....	3
1.6. Importancia de la investigación	3
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Microorganismo.....	3
2.2. Phanerochaete sp.....	5
2.3. Lignina Peroxidasa, Manganese Peroxidasa y Lacasa.....	6
2.3.4. Fenoles	8
2.3.5. Reacción de Oxidación de los Fenoles	9
2.3.6. Colorantes.....	10
2.3.6.1. Colorantes Naturales.....	10
2.3.6.2. Colorantes Artificiales.....	11
2.3.6.4. Colorante Orange II	13
2.3.6.4.1. Estructura Química	14
2.3.6.4.2. Propiedades Físicas.....	14
2.3.6.4.3. Usos Industriales del Orange II.....	15
2.3.6.4.4. Toxicidad	15
2.3.6.4.5. Seguridad.....	15
2.3.6.4.6. Impacto Ambiental y Biodegradación	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Recolección de la muestra de Phanerochaete sp.....	16
3.2. Aislamiento del hongo Phanerochaete sp.....	17
3.3. Curva de calibrado del colorante Orange II.....	19
3.4. Curva de calibración de glucosa	19
3.5. Medios de cultivo y ajuste de medio de cultivo para crecimiento de Phanerochaete sp.	20

3.6. <i>Recolección de Datos</i>	21
3.7. <i>Modelos Cinéticos de Biomasa</i>	24
3.7.2. <i>Modelos para el Sustrato y el Producto</i>	26
3.8. <i>Resumen de Parámetros</i>	27
3.9. <i>Análisis Estadístico</i>	28
IV. RESULTADOS	28
4.1. Resultados.....	28
4.2. Discusión	35
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1. Conclusiones.....	38
5.2. Recomendaciones	38
ANEXO I	42
ANEXO II.....	45
ANEXO III	47
ANEXO IV	95
ANEXO V	106
ANEXO VI	107
ANEXO VII.....	107

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Estructura química de lignina. Cocero, M J, (2010) Nuevas Tendencias en el diseño de procesos para aprovechamiento de residuos alimentarios dirigidas a conseguir una sociedad sostenible.	7
Fig 2. Ruta biosintética de la lignina. PAL: Fenilalanina amoníaco liasa; TAL: Tirosina amoníaco liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato, CoA ligasa; HCT: p-hidroxicinamoil-CoA, quinato shikimato p-hidroxicinamoiltransferasa; C3H: p-cumarato 3-hidroxilasa; CCoACOMT: cafeoil-CoA O-metiltransferasa; CCR: cinamoil-CoA reductasa; COMT: ácido caféico /5- hidroxiconiferaldehído O- metiltransferasa; CAD: alcohol cinamílico deshidrogenasa; CCR: cinamoil CoA reductasa; 4CL: 4-(hidroxi)cinamoil CoA ligasa; F5H: ferulato 5-hidrolasa; Acyl-T, aciltransferasa; Px: peroxidasas, Lac: Lacasas, fp: fenilpropanoide. (Modificado de Lu y Ralph, 2010; Tobimatsu et al, 2013).	8
Fig 3. Estructura química del fenol. Zvi Rappoport, ed. (2003) The chemistry of Phenols. PATAI'S Chemistry of Functional Groups. Jhon Wiley & Sons.	9
Fig 4. Ejemplo de reacción de fenol con cloruros. Google, (s.f.) Fenoles. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de https://quimicayalgomas.com/quimica-organica/alcoholes-aldehidos-cetonas/alcoholes-parte-4/	9
Fig 5. Colorante índigo. Google (s.f.) Azul N° 2 – CARMIN INDIGO. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de https://gli.pe/producto/azul-n-o-2-carmin-indigo/	10
Fig 6. Colorante Azafrán. Google (s.f.) Colorante Amarillo en Polvo (Extracto de Azafrán) 10 gr. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de https://www.tutallernatural.com/colorantes/1552-colorante-amarillo-extracto-de-azafran-10-gr.html	11
Fig 7. Colorante Orange II. Google (s.f.). Nombre del producto: Naranja acida II. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de https://www.xcwydyes.com/es/acid-orange-ii.html	11
Fig 8. Colorante Artificial Tartrazina. Google, (s.f.) Amarillo N°5 – TARTRAZINA. Recuperado el 27 de mayo del 2025 de https://gli.pe/producto/amarillo-n-o-5-tartrazina/	12
Fig 9. Colorante Artificial Rojo 40. Google (s.f.) Rojo N°40- ALLURA. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de https://gli.pe/producto/rojo-n-o-40-allura/	12
Fig 10. Estructura química del colorante Tartrazina. Google (s.f.) Un colorante amarillo ayuda a los investigadores a imprimir estructuras semejantes a las de nuestros órganos. Recuperado el 27 de mayo del 2025 de https://cen.acs.org/materials/3-d-printing/es-Un-colorante-alimentario-amarillo-ayuda/97/i18	13
Fig 11. Estructura química del colorante Rojo 40. Amaringo, F. (2018) Adsorción de rojo 40: determinación del equilibrio, cinética y termodinámica.....	13
Fig 12. Curva de Calibrado de Concentración de colorante Orange II	19
Fig 13. Promedio de porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la segunda réplica.....	28
Fig 14. Promedio de Análisis de Proteínas totales.....	29
Fig 15. Comportamiento de Biomasa, Sustrato y Producto a lo largo del tiempo para la relación C:N de 30:1.	32
Fig 16. Curvas ajustadas para el mejor tratamiento con relación C:N de 30:1: Para Biomasa modelo Gompertz.	33
Fig 17. Diagrama de Pareto de efecto Estandarizado obtenido de ANOVA.....	33
Fig 18. Diagrama de Método de Superficie de Respuesta en el porcentaje de Degradación de Colorante Orange II	34
Fig 19. Representación gráfica del promedio de degradación del Colorante Orange II en la primera replica en fermentación líquida	45
Fig 20. Representación gráfica del promedio de degradación del Colorante Orange II en la segunda replica en fermentación líquida	45
Fig 21. Representación gráfica del promedio de degradación del Colorante Orange II en la tercera	

replica en Fermentación líquida	46
Fig 22.Crecimiento en superficie relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido	47
Fig 23. Crecimiento en superficie relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido	48
Fig 24.Crecimiento en superficie relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido	48
Fig 25.Crecimiento en superficie relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido	49
Fig 26. Crecimiento en superficie relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido	50
Fig 27.Crecimiento en superficie relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido	50
Fig 28.Crecimiento en superficie relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido	51
Fig 29.Crecimiento en superficie relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido	52
Fig 30.Crecimiento en superficie relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido	52
Fig 31.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L).....	53
Fig 32.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L).....	54
Fig 33.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L).....	54
Fig 34.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L).....	55
Fig 35.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L).....	56
Fig 36.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L).....	56
Fig 37. Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L).....	57
Fig 38.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L)	58
Fig 39.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L)	58
Fig 40.Promedio de degradación de colorante Orange II por tratamiento en fermentación líquida ..	59
Fig 41. Evaluación del pH al final del tratamiento en fermentación líquida	60
Fig 42.Crecimiento en superficie relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido	61
Fig 43.Crecimiento en superficie relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido	62
Fig 44.Crecimiento en superficie relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido	62
Fig 45.Crecimiento en superficie relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido	63
Fig 46.Crecimiento en superficie relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido	64
Fig 47.Crecimiento en superficie relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido	64

Fig 48.Crecimiento en superficie relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido	65
Fig 49.Crecimiento en superficie relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido	66
Fig 50.Crecimiento en superficie relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido	66
Fig 51.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L)	67
Fig 52.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L)	68
Fig 53.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L)	68
Fig 54.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L)	69
Fig 55.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L)	70
Fig 56.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L)	70
Fig 57.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L)	71
Fig 58.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L)	72
Fig 59.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L)	72
Fig 60.Porcentaje de degradación de colorante Orange II por tratamiento en fermentación líquida	73
Fig 61. Analisis de Proteinas Totales por Metodo de Bradford en fermentación líquida en segunda replica	74
Fig 62.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L) en tercera replica	75
Fig 63.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L) en tercera replica	76
Fig 64.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L) en tercera replica	76
Fig 65.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L) en tercera replica	77
Fig 66.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L) en tercera replica	78
Fig 67.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L) en tercera replica	78
Fig 68.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L) en tercera replica	79
Fig 69.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L) en tercera replica	80
Fig 70.Concentración de degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L) en tercera replica	80
Fig 71.Diagrama de barras de porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la tercera réplica	81
Fig 72.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera replica	82
Fig 73.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por	

<i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera replica	83
Fig 74.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera replica.....	83
Fig 75.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera replica.....	84
Fig 76.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera replica.....	85
Fig 77.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera replica.....	85
Fig 78.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera replica	86
Fig 79.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera replica	87
Fig 80.Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> en fermentación en estado líquido, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera replica	87
Fig 81.Diagrama de barras del análisis de proteínas Totales por Metodo de Bradford en fermentación liquida en tercera replica	88
Fig 82.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera replica	89
Fig 83.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera replica	90
Fig 84.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera replica	90
Fig 85.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera replica	91
Fig 86.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera replica	92
Fig 87.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera replica	92
Fig 88.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera replica	93
Fig 89.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera replica	94
Fig 90.Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera replica	94
Fig 91. Datos ingresados en el prgrama ANOVA	95
Fig 92. Diagrama de pareto de efecto estimado estándar	95
Fig 93. Daots ingresados en relacion a la degradación de colorane Orange II.....	96
Fig 94. Diagrama de Pareto en relación a ladegradación de colorante OOrange II	96
Fig 95. Datos ingresado en el ANOVA con respecto al porcentaje de degradación de colorate Orange II	97
Fig 96. Observación de Predicciones	97

Fig 97. Diagrama de método de superficie de respuesta en porcentaje de biodegradación de colorante Orange II	98
Fig 98. Diagrama de método de superficie de respuesta en relación al porcentaje de degradación del colorante Orange II	100
Fig 99. Diagrama de metodo de superficie de respuesta en la degradación de colorante orange II	100
Fig 100. Curva de Caalibrado de Concentración de colorante Orange II	100
Fig 101. Aislamiento de hongo <i>Phanerochaete</i> sp en medio Kirk (A) parte frontal de la placa (B) parte posterior dela placa	101
Fig 102. Curva de Calibración de Glucosa.....	101
Fig 103. Curva de Calibrado de Método Bradford	102
Fig 104. Proceso de medición en superficie en relación a los tratamientos de C/N (A)40:3 , (B) 40:1, (C) 40:3, (D) 30:1, (E) 30:2, (F) 30:3, (G) 20:1, (H) 20:2,(I) 20:3	102
Fig 105. Proceso de fermentación en medio liquido definido en relación a los diferentes tratamientos de C/N	103
Fig 106.Evaluación de crecimiento del hongo <i>Phanerochaete</i> sp. cada 24 horas, vista por ambos lados de la placa (A) parte frontal y (B) parte posterior de la placa.....	103
Fig 107. Observación de la decoloración en estado sólido, (B) blanco, (A) placa con la variación de la concentración de 40:3, observando la decoloración al 5 día.	104
Fig 108. Fermentación en estado líquido, medio de 100ml por matraz a diferentes concentraciones de C:N, para evaluar la degradación del colorante Orange II.	105
Fig 109.Evaluación de la degradación del colorante Orange II en medio líquido, con hongos obtenidos de pudrición blanca de pino.	105
Fig 110. Asilamiento del hongo de <i>Phanerochaete</i> mediante los métodos de identificación en la fila (A) con metodo de polifenoloxidasas y fila (B) metodo de degradació de rojo congo con capacidad lignoinolitica	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla diseñada para experimentación al Azar	17
Tabla 2. Curva de calibración de glucosa en los cinco tubos.....	20
Tabla 3. Tablas de componente ajustado de forma exacta en función al carbono.....	20
Tabla 4. Tabla de descripción de parámetros	27
Tabla 5. Parámetros de ajuste para el crecimiento de biomasa en distintos tratamientos	30
Tabla 6. Parámetros de ajuste para el consumo de sustrato en distintos tratamientos	30
Tabla 7. Parámetros de ajuste para la producción de MnP en distintos tratamientos	31
Tabla 8. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 20:1.	42
Tabla 9. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 20:2.	42
Tabla 10. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 20:3.	42
Tabla 11. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 30:1.	43
Tabla 12. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 30:2.	43
Tabla 13. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 30:3.	43
Tabla 14. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 40:1.	44
Tabla 15. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 40:2.	44
Tabla 16. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 40:3.	44
Tabla 17. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:1 en fermentación en estado sólido ...	47
Tabla 18. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:2 en fermentación en estado sólido ...	47
Tabla 19. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:3 en fermentación en estado sólido ...	48
Tabla 20. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:1 en fermentación en estado sólido ...	49
Tabla 21. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:2 en fermentación en estado sólido ...	49
Tabla 22. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:3 en fermentación en estado sólido ...	50
Tabla 23. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:1 en fermentación en estado sólido ...	51
Tabla 24. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:2 en fermentación en estado sólido ...	51
Tabla 25. Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:3 en fermentación en estado sólido ...	52
Tabla 26. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:1	53
Tabla 27. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:2	53
Tabla 28. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:3	54
Tabla 29. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:1	55
Tabla 30. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:2	55
Tabla 31. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:3	56
Tabla 32. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:1	57
Tabla 33. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:2	57
Tabla 34. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:3	58
Tabla 35. Porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la primera réplica	59

Tabla 36.Evaluación del pH al final del tratamiento	60
Tabla 37.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:1 en fermentación en estado sólido	61
Tabla 38.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:2 en fermentación en estado sólido	61
Tabla 39.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:3 en fermentación en estado sólido	62
Tabla 40.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:1 en fermentación en estado sólido	63
Tabla 41.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:2 en fermentación en estado sólido	63
Tabla 42.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:3 en fermentación en estado sólido	64
Tabla 43.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:1 en fermentación en estado sólido	65
Tabla 44.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:2 en fermentación en estado sólido	65
Tabla 45.Crecimiento de <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:3 en fermentación en estado sólido	66
Tabla 46.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:1	67
Tabla 47.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:2	67
Tabla 48.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:3	68
Tabla 49.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:1	69
Tabla 50.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:2	69
Tabla 51.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:3	70
Tabla 52.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:1	71
Tabla 53.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:2	71
Tabla 54.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:3	72
Tabla 55.Porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la segunda réplica.....	73
Tabla 56. Análisis de proteínas Totales por Metodo de Bradford en fermentación líquida	74
Tabla 57.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:1 en tercera replica	75
Tabla 58.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:2 en tercera replica	75
Tabla 59.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 20:3 en tercera replica	76
Tabla 60.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:1 en tercera replica	77
Tabla 61.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:2 en tercera replica	77
Tabla 62.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 30:3 en tercera replica	78
Tabla 63. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:1 en tercera replica	79
Tabla 64.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:2 en tercera replica	79
Tabla 65.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por <i>Phanerochaete sp</i> en relación 40:3 en tercera replica	80

Tabla 66. Porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la tercera réplica	81
Tabla 67. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 20:1 en la tercera réplica	82
Tabla 68. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 20:2 en la tercera réplica	82
Tabla 69. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 20:3 en la tercera réplica	83
Tabla 70. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 30:1 en la tercera réplica	84
Tabla 71. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 30:2 en la tercera réplica	84
Tabla 72. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 30:3 en la tercera réplica	85
Tabla 73. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 40:1 en la tercera réplica	86
Tabla 74. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 40:2 en la tercera réplica	86
Tabla 75. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp</i> , tratamiento 40:3 en la tercera réplica	87
Tabla 76. Análisis de proteínas Totales por Método de Bradford en fermentación líquida en tercera réplica	88
Tabla 77. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II en el tratamiento 20:1 de la tercera réplica	89
Tabla 78. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 20:2 en la tercera réplica	89
Tabla 79. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 20:3 en la tercera réplica	90
Tabla 80. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 30:1 en la tercera réplica	91
Tabla 81. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 30:2 en la tercera réplica	91
Tabla 82. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 30:3 en la tercera réplica	92
Tabla 83. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 40:1 en la tercera réplica	93
Tabla 84. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 40:2 en la tercera réplica	93
Tabla 85. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 40:3 en la tercera réplica	94
Tabla 86. Curva de calibración de Glucosa	101
Tabla 87. Curva de calibrado de método Bradford	102

RESUMEN

La industria textil genera grandes volúmenes de aguas residuales que contienen colorantes difíciles de eliminar con tratamientos convencionales. Hongos de podredumbre blanca, como *Phanerochaete sp.*, pueden degradar estos compuestos tóxicos. Este estudio evaluó la degradación del colorante Orange II mediante fermentación en estado sólido y líquido, variando la relación carbono/nitrógeno (C/N).

En este trabajo se evaluará a *Phanerochaete sp.*, en función de la degradación del colorante Orange II empleando métodos biológicos en una fermentación en estado sólido y líquido en función al tiempo, variando las concentraciones de la fuente de carbono y de nitrógeno a (40:1), (40:2), (40:3), (30:1), (30:2), (30:3), (20:1), (20:2), (20:3), en relación a C/N.

Palabras Clave: *Phanerochaete sp.*, manganeso peroxidasa, biorremediación.

ABSTRACT

The textile industry generates large volumes of wastewater containing dyes that are difficult to remove with conventional treatments. White-rot fungi, such as *Phanerochaete sp.*, can degrade these toxic compounds. This study evaluated the degradation of Orange II dye through solid- and liquid-state fermentation, varying the carbon-to-nitrogen (C/N) ratio.

In this work, *Phanerochaete sp.*, will be evaluated for the degradation of Orange II dye using biological methods in solid- and liquid-state fermentation over time, varying the concentrations of the carbon source and nitrogen at (40:1), (40:2), (40:3), (30:1), (30:2), (30:3), (20:1), (20:2), (20:3), in relation to C/N.

Keywords: *Phanerochaete sp.*, *manganese peroxidase*, *bioremediation*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1.Descripción y formulación del problema

La industria textil en el Perú ha experimentado un considerable crecimiento en los últimos años, esto gracias a la calidad de sus confecciones y de su materia prima, teniendo claros ejemplos como la fibra de alpaca y su fino algodón, este sector es una de las más importantes de nuestro país. Sin embargo, es una de las industrias con mayor consumo de agua por ende sus aguas residuales que se generan contienen un gran número de contaminantes de diferente naturaleza. Entre los contaminantes se destacan los colorantes ácidos. Estos compuestos se diseñan para ser altamente resistentes, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento convencionales además existen más de diez mil diferentes tipos de pigmentos y colorantes sintéticos son usados en diferentes industrias como la textil, papelera, cosmética y farmacéutica, entre otras. Muchas actividades industriales liberan grandes cantidades de efluentes, contaminadas con colorantes, al ambiente que es la principal fuente emisora de colorantes es la industria textil (Anjaneyulu *et al.*, 2005 y Días, *et al.*, 2007).

Dependiendo del tipo de colorante, se estima que del 2 al 50% de estos compuestos se desechan en las aguas residuales y se consideran como contaminantes persistentes que no pueden removerse con los métodos convencionales de tratamiento de aguas, debido a su origen y las estructuras complejas que presentan (Kuhad *et al.*, 2004; Días *et al.*, 2007 y Dos Santos *et al.*, 2007).

Más del 90% de los colorantes persisten después de los tratamientos con lodos activados y son recalcitrantes a la acción de depuración con dichos tratamientos (Días *et al.*, 2007). Las estructuras químicas de las moléculas de colorantes resisten la exposición solar o el ataque químico (Brown y De Vito, 1993; Ramsay y Nguyen, 2002; Gavril y Hodson, 2007).

La mayoría de las poblaciones humanas están expuestas a una variedad considerable de sustancias tóxicas. Los monitoreos biológicos han llevado a estudiar diferentes ocupaciones para explorar sus riesgos en la salud. Dönbak *et al.* (2007) evaluaron el posible riesgo genotóxico para los trabajadores de la industria textil, quienes se exponen a una amplia variedad de químicos como colorantes textiles, agente blanqueador, ácido, álcalis y sales donde se revelan que existe un riesgo de genotoxicidad en los trabajadores. Por otro lado, algunos compuestos químicos orgánicos pueden ser absorbidos y utilizados por algunas plantas, tales como: el melón, el rábano y la papa. Los efluentes textiles pueden reducir la germinación de las semillas y el crecimiento temprano de algunos vegetales (Zhou, 2001 y Rehman *et al.*, 2008)

Con respecto a sus exportaciones, a pesar de haber perdido un poco de terreno en el año 2016, las exportaciones de la industria textil y confecciones se recuperaron durante el 2017, creciendo un 6,1% y generando un total de US\$ 1,271 millones. Es importante destacar que las ventas en este sector se dirigieron a 119 mercados en 2017, doce más con respecto al 2016.

Mientras tanto, los principales mercados de destino de exportaciones textiles son Estados Unidos (US\$ 628 millones), Ecuador (US\$ 62 millones), Chile (US\$ 58 millones), Brasil

(US\$ 57 millones) y Colombia (US\$ 57 millones).(Instituto de Estudios Economicos y sociales,2018)

Los hongos de putrefacción blanca son los organismos más estudiados en la biodegradación de colorantes ya que degradan compuestos químicos, compuestos tóxicos, que son eliminadas de las industrias textiles causando deterioro de los ecosistemas en general, *Phanerochaete chrysosporium* con su capacidad especializada para degradar la abundante lignina de polímero aromático, mientras deja la celulosa blanca casi intacta, es uno de los basidiomicetos amigables con el medio ambiente que participa en los procesos de degradación de maderas duras, esto es debido a la actividad de sus enzimas extracelulares que posee este hongo ligninolítico como la lacasa, manganoso peroxidasa, lignina peroxidasa, entre otros, lo que le permite romper los enlaces de la lignina, la habilidad de los hongos de podredumbre blanca le permite degradar colorantes y otros compuestos xenobióticos se debe a la naturaleza no específica de su sistema enzimático.(Echevarría et al., 2010)

En este proyecto de investigación se evaluarán diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio para determinar la mejor concentración en la biodegradación del colorante Orange II con el empleo del hongo *Phanerochaete sp*, además de evaluar la actividad enzimática en los fermentadores.

1.2.Problema

¿Qué efecto produce la variación de las concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en la biodegradación del colorante Orange II en condiciones de laboratorio en un medio definido?

1.3.Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la variación de las diferentes concentraciones de glucosa (11 g/L, 8.25 g/L, 5.5 g/L) y sulfato de amonio (0.275 g/L, 0.55 g/L, 0.825 g/L) sobre la capacidad biodegradativa de *Phanerochaete sp* frente al colorante Orange II en condiciones de laboratorio.

1.3.2. Objetivo específico

- Determinar la concentración de glucosa y sulfato de amonio más efectiva para la biodegradación del colorante orange II utilizando *Phanerochaete sp*.
- Determinar por técnicas espectrofotométricas el porcentaje biodegradativo y la cantidad de glucosa del colorante Orange II en medios líquidos a diferentes concentraciones con relación a C/N.
- Identificar la actividad de la enzima manganoso peroxidasa (MnP) utilizando técnicas espectrofotométricas en medios líquidos fermentativos con relación a C/N.

- Cuantificar las proteínas totales para determinar la presencia de enzimas biodegradativas de forma indirecta en los medios líquidos de fermentación.
- Evaluar el modelo matemático del porcentaje biodegradativo con el colorante orange II.

1.4. Formulación de hipótesis

La biodegradación del colorante Orange II utilizando *Phanerochaete sp* a una concentración de glucosa de 8.25 gr/l y sulfato de amonio de 0.275 gr/l en un medio definido será la más favorable.

1.5. Justificación

La contaminación industrial en el proceso de teñido, ocasiona pérdida de agua y químicos en grandes cantidades, que a la vez son muchos tóxicos para la salud y el medio ambiente. Los tratamientos utilizados para la degradación de este y otros colorantes son mayormente métodos químicos costosos que requieren gran cantidad de energía y reactivos. Por lo cual, este trabajo ofrece una alternativa de tratamiento, donde se pretende lograr la biodegradación del colorante Orange II empleando métodos biológicos con *Phanerochaete chrysosporium*, que tiene la capacidad de degradar diferentes tipos de compuestos químicos y tóxicos. Evaluando la velocidad de degradación con respecto al tiempo en una fermentación en estado sólido (FES) y en un fermentador en estado líquido (FEL).

1.6. Importancia de la investigación

El uso de técnicas y procesos que incluyan la presencia de *Phanerochaete sp* en la biorremediación de los efluentes de las industrias textiles es verdaderamente significativa ya que este microorganismo produce enzimas ligninolíticas que genera con mayor expresión y una alta velocidad de crecimiento en estos procesos, evitando el deterioro en el ecosistema más cercano a estas industrias, como son la disminución de los procesos fotosintéticos que son generados por la eliminación de los efluentes.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Microorganismo

Diversos estudios han explorado exhaustivamente la capacidad del hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* para degradar colorantes azoicos, compuestos orgánicos complejos utilizados de manera intensiva en diversas industrias, especialmente en la industria textil. La presencia de estos colorantes en las aguas residuales constituye un problema medioambiental significativo debido a su toxicidad y persistencia, lo cual demanda la investigación y el desarrollo de estrategias sostenibles y efectivas para su remoción. Estos colorantes azoicos, al ser liberados sin tratamiento adecuado, representan una amenaza tanto para los ecosistemas acuáticos como para la salud humana, lo cual enfatiza la necesidad de abordar esta problemática desde una perspectiva multidisciplinaria que integre biotecnología, química ambiental y biología. (dos Santos et al. 2006b).

La investigación pionera de Spadaro et al. (1992) demostró que los cultivos de *P. chrysosporium* con capacidad para degradar lignina también poseían la habilidad de decolorar varios colorantes poliméricos. Este hallazgo sugirió que el sistema enzimático implicado en la degradación de lignina podría también ser efectivo en la degradación de colorantes azoicos, lo que generó un considerable interés en la aplicación de este hongo para la remediación ambiental. Además, este estudio inicial abrió nuevas líneas de investigación para comprender cómo la maquinaria enzimática de *P. chrysosporium* podría ser modulada y optimizada para aplicaciones en biorremediación, especialmente en entornos contaminados con una alta carga de compuestos recalcitrantes.

Cripps et al. (1990) investigaron de manera más profunda la biodegradación de tres colorantes azoicos (Tropaeolina O, Rojo Congo y Naranja II) y un colorante heterocíclico (Azul B) utilizando *P. chrysosporium*. Los resultados revelaron que la decoloración era más extensa en cultivos lignolíticos, aunque también se observó una decoloración significativa en cultivos no lignolíticos, con tasas de decoloración superiores al 90% en las primeras 24 horas. Esto indica que, si bien las enzimas ligninolíticas juegan un papel fundamental, existen otros mecanismos enzimáticos implicados en la degradación de los colorantes azoicos. Estos hallazgos destacan la complejidad del metabolismo fúngico y sugieren que la cooperación entre distintas rutas enzimáticas podría ser clave para la eficiente transformación de estos contaminantes.

Spadaro et al. (1992) demostraron que *P. chrysosporium* podía mineralizar de manera eficiente una amplia gama de colorantes azoicos marcados con ^{14}C bajo condiciones de limitación de nitrógeno, alcanzando porcentajes de mineralización entre el 23% y el 48% después de 12 días. Se observó que los anillos aromáticos con sustituyentes como hidroxilo, amino, acetamido o nitro se mineralizaban con mayor eficacia que los anillos no sustituidos. Estos resultados sugieren que la estructura del colorante influye de manera determinante en su biodegradabilidad, y que ciertos grupos funcionales pueden facilitar su descomposición por parte de *P. chrysosporium*. La capacidad del hongo para mineralizar estos compuestos bajo condiciones limitantes también resalta su potencial en la biorremediación de ambientes empobrecidos en nutrientes, que suelen ser características comunes de los sitios contaminados.

Chivukula et al. (1995) examinaron el mecanismo de degradación de colorantes azoicos sulfonados mediante la peroxidasa de lignina (LiP), una enzima extracelular producida por *P. chrysosporium*. Identificaron hidroperóxidos de sulfofenilo como productos de la oxidación de estos colorantes y propusieron un mecanismo basado en la identificación de productos y estudios de marcaje con ^{18}O . La oxidación de los colorantes sulfonados resultó en la formación de nuevos productos con masas moleculares específicas detectadas por espectrometría de masas, lo cual proporcionó una comprensión más profunda de las transformaciones químicas que sufren los colorantes durante su degradación. Este conocimiento es crucial para diseñar sistemas de tratamiento más eficaces y predecir el destino de estos contaminantes en el medio ambiente.

Mielgo et al. (2001) evaluaron la viabilidad de un biorreactor de flujo pulsado con *P. chrysosporium* inmovilizado para la decoloración continua del colorante azoico Naranja II. Su estudio mostró que el sistema podía operar de manera continua durante aproximadamente cinco meses, logrando niveles de eficiencia de decoloración superiores al 95% cuando la carga de colorante era de $0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y la actividad de manganeso peroxidasa (MnP) se mantenía por encima

de 10 U L^{-1} . Estos hallazgos subrayan el potencial de los biorreactores fúngicos en el tratamiento de efluentes industriales, particularmente aquellos que contienen colorantes azoicos persistentes. Además, los resultados obtenidos ponen de relieve la estabilidad y robustez del sistema de biorreactor, lo cual es un aspecto crítico para la aplicación a gran escala. La inmovilización de *P. chrysosporium* no solo permite una mayor eficiencia en la decoloración, sino que también facilita la reutilización del hongo, haciendo el proceso más económico y viable a largo plazo.

Wang et al. (2009) aislaron una nueva cepa de *Phanerochaete* sp., HSD, la cual mostró una producción superior de manganeso peroxidasa (MnP) con una actividad máxima de 2613 U L^{-1} . Tras optimizar los componentes del medio, demostraron que el extracto enzimático de esta cepa podía decolorar de manera rápida y eficiente tres colorantes azoicos: para concentraciones de 120 mg L^{-1} de Rojo Congo, se logró una decoloración del 95% en 5 horas, mientras que para concentraciones de 600 mg L^{-1} de Naranja II, el 95% de decoloración se alcanzó en 9 horas. Este estudio destaca el potencial de diferentes cepas de *Phanerochaete* para aplicaciones de biorremediación, subrayando la relevancia de la diversidad microbiana en el desarrollo de estrategias efectivas para el tratamiento de contaminantes. La selección y optimización de cepas con características mejoradas para la producción de enzimas específicas representa un enfoque prometedor para maximizar la eficiencia en procesos de biorremediación, y subraya la importancia de la investigación continua en la biología de estos hongos para mejorar su aplicación práctica.

Los estudios disponibles indican que *Phanerochaete chrysosporium* posee un notable potencial para la degradación de colorantes azoicos. Las enzimas ligninolíticas, tales como la lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), desempeñan un papel crucial en este proceso; sin embargo, también se ha evidenciado la intervención de otros mecanismos enzimáticos adicionales. Asimismo, la estructura química del colorante azoico tiene una influencia significativa en su biodegradabilidad. La investigación futura sobre las rutas metabólicas y las enzimas específicas implicadas en este proceso permitirá el desarrollo de estrategias más eficientes para la biorremediación de efluentes industriales y suelos contaminados con colorantes, promoviendo un enfoque sostenible para la gestión de contaminantes industriales. Además, la integración de estudios mecanísticos detallados con innovaciones en ingeniería de bioprocesos, como la optimización de biorreactores y la inmovilización de hongos, representa una línea de investigación clave para escalar estas tecnologías y aplicarlas en escenarios reales de contaminación. La biorremediación basada en *P. chrysosporium* no solo ofrece una alternativa más ecológica en comparación con los métodos químicos convencionales, sino que también genera nuevas oportunidades para el desarrollo de tecnologías limpias que contribuyan a la sostenibilidad ambiental a largo plazo.

2.2. *Phanerochaete* sp

Phanerochaete sp es un hongo ligninolítico ampliamente investigado debido a su capacidad para degradar una variedad de compuestos recalcitrantes, incluidos los colorantes industriales. Su papel principal en este contexto es la producción de enzimas que descomponen lignina y otros compuestos aromáticos complejos, contribuyendo a la biorremediación de ambientes contaminados (Bumpus y Aust, 1987). Las enzimas principales producidas por *Phanerochaete* sp son la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa y la lacasa. La lignina peroxidasa (LiP) actúa oxidando compuestos aromáticos

complejos; la manganoso peroxidasa (MnP) oxida iones Mn^{2+} a Mn^{3+} , que luego pueden oxidar compuestos fenólicos; la lacasa cataliza la oxidación directa de compuestos fenólicos (Bumpus y Aust, 1987). A diferencia de otros hongos ligninolíticos, *Phanerochaete sp* produce un conjunto sinérgico de enzimas que le permite una degradación más eficaz de la lignina y de compuestos recalcitrantes. Además, tiene una capacidad más amplia para descomponer compuestos altamente tóxicos (Bumpus y Aust, 1987).

2.3. Lignina Peroxidasa, Manganoso Peroxidasa y Lacasa

2.3.1. Introducción a Lignina Peroxidasa, Manganoso Peroxidasa y Lacasa y su Importancia

La lignina peroxidasa, manganoso peroxidasa y la lacasa son enzimas ligninolíticas producidas por *Phanerochaete sp*. Estas enzimas se investigaron inicialmente en el contexto de la degradación de la lignina debido a la necesidad de comprender mejor los procesos de descomposición de la materia orgánica en el ambiente (Bumpus y Aust, 1987). Estas enzimas son fundamentales en la regulación de la degradación de la lignina y otros compuestos recalcitrantes. La lignina peroxidasa, por ejemplo, es capaz de romper enlaces C-C y C-O de compuestos aromáticos, lo cual es crucial para la degradación de la lignina (Bumpus y Aust, 1987). Las enzimas ligninolíticas interactúan con factores como el pH, la disponibilidad de oxígeno y la presencia de mediadores redox, que influyen en su actividad y en la eficiencia de la descomposición de los compuestos tóxicos ((Cameron et al., 2000)).

2.3.2. Estructura Química de Lignina Peroxidasa, Manganoso Peroxidasa y Lacasa

La lignina peroxidasa es una hemoproteína que contiene un grupo hemo como cofactor. La manganoso peroxidasa también contiene un grupo hemo y requiere manganoso como cofactor. La lacasa es una multicobre oxidasa que contiene cuatro átomos de cobre que participan en la transferencia de electrones (Bumpus y Aust, 1987). La estructura química de estas enzimas está directamente relacionada con su capacidad catalítica. Por ejemplo, el grupo hemo de la lignina peroxidasa permite la transferencia de electrones para romper enlaces en la lignina (Bumpus y Aust, 1987). Las variaciones estructurales entre estas enzimas, como la presencia de diferentes cofactores, afectan su actividad catalítica y su especificidad frente a diferentes sustratos (Bumpus y Aust, 1987).

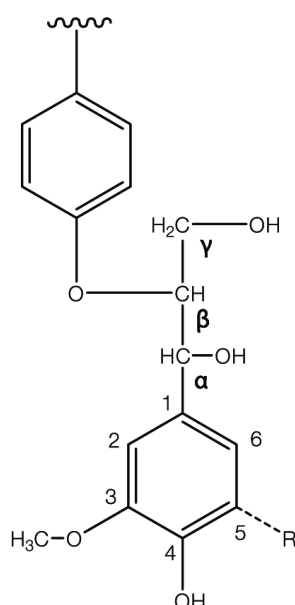


Fig 1. Estructura química de lignina. Cocero,M J,(2010)Nuevas Tendencias en el diseño de procesos para aprovechamiento de residuos alimentarios dirigidas a conseguir una sociedad sostenible.

2.3.3. Biosíntesis de Enzimas Ligninolíticas en *Phanerochaete sp.*

Las principales rutas metabólicas para la biosíntesis de lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa en *Phanerochaete sp* incluyen la vía de los ácidos tricarboxílicos y la vía del mevalonato, que proporcionan precursores como el acetato y el escualeno (Cameron et al., 2000). Estas rutas difieren en términos de precursores y productos intermedios, lo que influye en la eficiencia y la cantidad de enzimas producidas (Cameron et al., 2000). La relevancia de cada ruta radica en su contribución a la producción eficiente de enzimas necesarias para la degradación de compuestos recalcitrantes (Cameron et al., 2000).

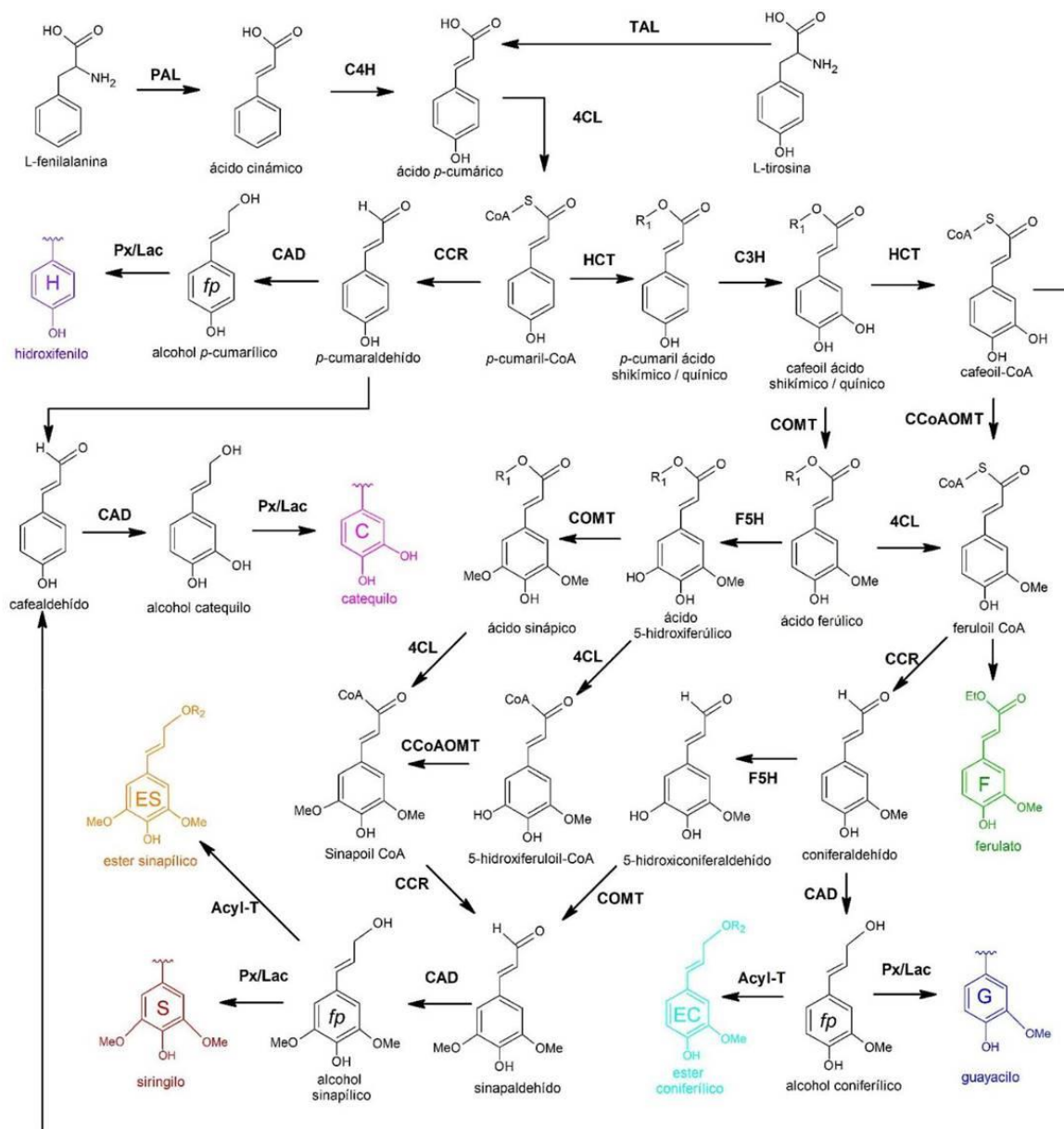


Fig 2. Ruta biosintética de la lignina. PAL: Fenilalanina amonía liasa; TAL: Tirosina amonía liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato, CoA ligasa; HCT: p-hidroxicinamoil-CoA, quinato shikimato p-hidroxicinamoiltransferasa; C3H: p-cumarato 3-hidroxilasa; CCoAOMT: cafeoil- CoA O-metiltransferasa; CCR: cinamoil -CoA reductasa; COMT: ácido caféico /5- hidroxiconiferaldehído O- metiltransferasa; CAD: alcohol cinámico deshidrogenasa; CCR: cinamoil CoA reductasa; 4CL: 4-(hidroxi)cinamoil CoA ligasa; F5H: ferulato 5-hidrolasa; Acyl-T, aciltransferasa; Px: peroxidasa, Lac: Lacasas, fp: fenilpropanoide. (Modificado de Lu y Ralph,2010; Tobimatsu et al,2013).

2.3.4. Fenoles

Los fenoles son compuestos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. Son contaminantes comunes en aguas residuales industriales debido a su uso en la producción de plásticos, resinas, adhesivos y colorantes (Lu et al., 2009). Existen diferentes tipos de fenoles presentes en los efluentes industriales, como el fenol simple, el bisfenol A y los cresoles, que tienen efectos específicos en la salud y el ambiente, incluyendo toxicidad para la biota acuática y potencial carcinogénico (Lu et al., 2009). Los fenoles se diferencian de otros contaminantes aromáticos en términos de su toxicidad y resistencia a la degradación. Su

estructura química, que incluye un grupo hidroxilo, les otorga una mayor reactividad, lo que puede aumentar su toxicidad (Lu et al., 2009).

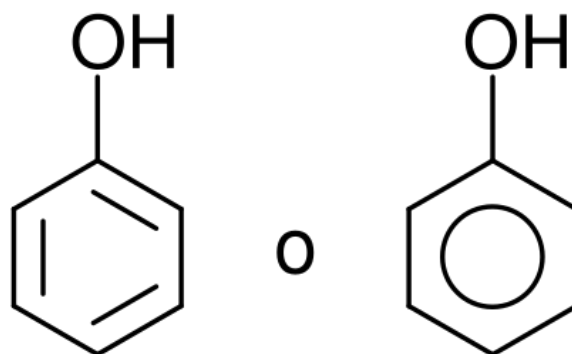


Fig 3. Estructura química del fenol. Zvi Rappoport, ed. (2003) *The chemistry of Phenols*. PATAI'S Chemistry of Functional Groups. Jhon Wiley & Sons.

2.3.5. Reacción de Oxidación de los Fenoles

2.3.5.1. Introducción a la Reacción de Oxidación de los Fenoles

La reacción de oxidación de los fenoles implica la conversión de fenoles en compuestos menos tóxicos mediante la acción de enzimas oxidativas. Esta reacción es fundamental en el tratamiento de efluentes industriales (Cameron et al., 2000). La lignina peroxidasa juega un papel crucial en la oxidación de fenoles, ya que su actividad catalítica permite la formación de radicales libres que descomponen estos compuestos (Cameron et al., 2000). Los fenoles también interactúan con otras enzimas ligninolíticas, como la manganoso peroxidasa y la lacasa, para su descomposición, aumentando la eficiencia del proceso (Cameron et al., 2000).

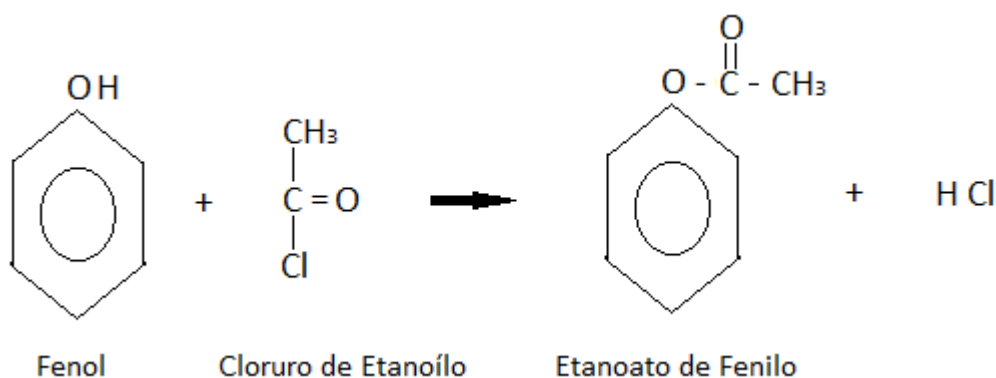


Fig 4. Ejemplo de reacción de fenol con cloruros. Google, (s.f.) Fenoles. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de <https://quimicavalgomas.com/quimica-organica/alcoholes-aldehidos-cetonas/alcoholes-parte-4/>

2.3.5.2. Estructura Química de los Fenoles

Los fenoles tienen una estructura química básica que consiste en un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático (Lu et al., 2009). La presencia del grupo hidroxilo aumenta la reactividad de los fenoles, lo que influye en su toxicidad y resistencia a la degradación (Lu et al., 2009). Las variaciones estructurales, como la presencia de grupos alquilo o halógenos, afectan la solubilidad y la actividad de los fenoles, modificando su toxicidad (Lu et al., 2009).

2.3.6. Colorantes

Los colorantes son compuestos que se utilizan para dar color a productos en diversas industrias, como la textil, alimentaria y cosmética. Han jugado un papel importante en la evolución de estas industrias (Fernando et al., 1989). Existen dos grupos principales de colorantes: los naturales y los artificiales. Los colorantes naturales se obtienen de fuentes vegetales, animales y minerales, mientras que los artificiales se sintetizan químicamente para proporcionar una amplia gama de colores (Fernando et al., 1989). Los colorantes naturales suelen ser menos estables pero más seguros para el ambiente, mientras que los artificiales son más estables y adecuados para la producción a gran escala, aunque pueden tener un mayor impacto ambiental (Fernando et al., 1989).

2.3.6.1. Colorantes Naturales

2.3.6.1.1. Colorantes Naturales y su Importancia

Los colorantes naturales se han utilizado históricamente en las industrias textil y cosmética. Se extraen de plantas, animales y minerales, como el índigo y el azafrán (Pezzella et al., 2017). Su importancia radica en la seguridad y sostenibilidad que ofrecen, ya que son biodegradables y no contienen compuestos tóxicos (Pezzella et al., 2017). Los colorantes naturales interactúan con factores ambientales, como la luz y el pH, lo cual puede influir en la estabilidad del color en los productos finales (Pezzella et al., 2017).



Fig 5. Colorante índigo. Google (s.f.) Azul N° 2 – CARMIN INDIGO. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de <https://gli.pe/producto/azul-n-o-2-carmin-indigo/>



Fig 6. Colorante Azafrán. Google (s.f.) Colorante Amarillo en Polvo (Extracto de Azafrán) 10 gr. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de <https://www.tutallernatural.com/colorantes/1552-colorante-amarillo-extracto-de-azafran-10-gr.html>



Fig 7. Colorante Orange II. Google (s.f.). Nombre del producto: Naranja acida II. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de <https://www.xcwydyes.com/es/acid-orange-ii.html>

2.3.6.1.2. Estructura Química de los Colorantes Naturales

La estructura química del índigo ($C_{16}H_{10}N_2O_2$) y del azafrán (compuesto principalmente por crocina, $C_{44}H_{64}O_{24}$) determina su capacidad colorante y biodegradabilidad (Pezzella et al., 2017). La estructura química influye en su función colorante y en su capacidad para ser degradados en el ambiente (<https://gli.pe/producto/azul-n-o-2-carmin-indigo/biente>) (Pezzella et al., 2017). Las variaciones estructurales, como la presencia de grupos funcionales específicos, afectan la intensidad del color y la estabilidad de los colorantes naturales (Pezzella et al., 2017).

2.3.6.2. Colorantes Artificiales

2.3.6.2.1. Colorantes Artificiales y su Importancia

Los colorantes artificiales son compuestos sintetizados químicamente que se desarrollaron para satisfacer la demanda de colores estables y variados en la industria moderna (Bishnoi et al., 2008). Son importantes debido a su estabilidad y capacidad para producir una amplia gama de colores, lo que los hace esenciales en diversas aplicaciones industriales (Bishnoi et al., 2008). Sin embargo, su uso presenta implicaciones ambientales debido a su baja biodegradabilidad y toxicidad potencial (Bishnoi et al., 2008).



Fig 8. Colorante Artificial Tartrazina. Google, (s.f.) Amarillo N°5 – TARTRAZINA. Recuperado el 27 de mayo del 2025 de <https://gli.pe/producto/amarillo-n-o-5-tartrazina/>



Fig 9. Colorante Artificial Rojo 40. Google (s.f.) Rojo N°40- ALLURA. Recuperado el 27 de mayo de 2025 de <https://gli.pe/producto/rojo-n-o-40-allura/>

2.3.6.2.2. Estructura Química de los Colorantes Artificiales

Los colorantes anilinos, de cromo, fluorescentes y azoicos tienen estructuras químicas complejas que incluyen grupos funcionales específicos que determinan su color y propiedades (Zeng et al., 2012). La estructura química influye en la estabilidad y toxicidad de estos colorantes. Por ejemplo, los colorantes azoicos contienen el grupo azo ($-N=N-$) que es responsable de su coloración (Zeng et al., 2012). Las variaciones estructurales, como la adición de grupos sulfonato, afectan la solubilidad y la capacidad de adhesión de los colorantes (Zeng et al., 2012).



Fig 10. Estructura química del colorante Tartrazina. Google (s.f.) Un colornate amarillo ayuda a los investigadores a imprimir estructuras semejantes a las de nuestros órganos. Recuperado el 27 de mayo del 2025 de <https://cen.acs.org/materials/3-d-printing/es-Un-colorante-alimentario-amarillo-ayuda/97/i18>

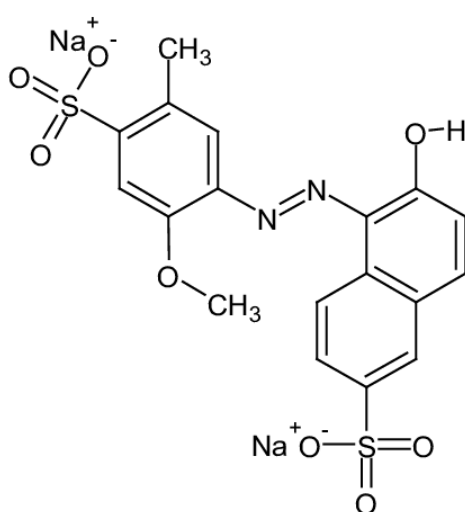


Fig 11. Estructura química del colorante Rojo 40. Amaringo, F. (2018) Adsorción de rojo 40: determinación del equilibrio, cinética y termodinámica

2.3.6.2.3. Biosíntesis y Regulación de Colorantes en la Industria

Las principales rutas de síntesis de colorantes artificiales incluyen procesos como la diazotación y la copulación, que permiten la formación de enlaces azo (Huang, Zeng et al., 2008). La producción de colorantes se regula para minimizar el impacto ambiental, utilizando tecnologías de producción más limpias y optimizando el uso de materias primas (Huang, Zeng et al., 2008). La relevancia de estas rutas radica en su eficiencia para producir colorantes en grandes cantidades y con propiedades específicas (Huang, Zeng et al., 2008).

2.3.6.4. Colorante Orange II

El colorante *Orange II*, también conocido como ácido naranja 7, es uno de los colorantes azo más utilizados en la industria textil y otras aplicaciones. Su popularidad radica en su color naranja brillante, que resulta de la interacción entre los elementos químicos que lo componen y su estructura molecular específica. Este colorante se destaca no solo por su capacidad de generar colores intensos, sino también por su facilidad de disolución en agua, lo que lo hace práctico para diversas aplicaciones industriales (Mielgo et al., 2001).

Desde un punto de vista químico, *Orange II* presenta la siguiente fórmula molecular: $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$, con una masa molecular de 350.32 g/mol. Su composición elemental incluye carbono (C), hidrógeno (H), nitrógeno (N), sodio (Na), oxígeno (O) y azufre (S). Las proporciones en peso de estos elementos son las siguientes: 54.86% de carbono, 3.17% de hidrógeno, 8.00% de nitrógeno, 6.56% de sodio, 18.27% de oxígeno y 9.15% de azufre. Estas proporciones son cruciales para la estabilidad y funcionalidad del colorante en distintas aplicaciones (Chivukula et al., 1995).

2.3.6.4.1. Estructura Química

La estructura química del *Orange II* está dominada por la presencia de un grupo azo ($-N=N-$), el cual es responsable de la coloración del compuesto. Este grupo cromóforo está vinculado a sistemas aromáticos, como un anillo de benceno y un anillo de naftileno (Cripps et al., 1990). Además, el colorante incluye grupos funcionales adicionales, como el grupo $-OH$ (hidroxilo) y el grupo $-SO_3^-Na^+$ (sulfonato de sodio), que juegan un papel clave en su solubilidad en agua y en su capacidad para adherirse a las fibras textiles durante los procesos de teñido (Spadaro et al., 1992). La presencia de estos grupos hace que el *Orange II* sea especialmente adecuado para la tintura de materiales hidrofílicos, como el algodón y la lana.

El grupo azo en la estructura del *Orange II* es de especial interés ya que es común en muchos colorantes sintéticos. Este grupo consiste en dos átomos de nitrógeno unidos por un doble enlace, lo que contribuye no solo a la coloración sino también a la reactividad química del compuesto. En el caso del *Orange II*, este grupo cromóforo está unido a dos sistemas aromáticos que ayudan a estabilizar la molécula y facilitan su interacción con otros compuestos, como las fibras textiles o los agentes fijadores utilizados en los procesos de tintura (Wang et al., 2009).

2.3.6.4.2. Propiedades Físicas

El *Orange II* es un colorante que presenta un color naranja brillante, con una tonalidad que puede variar ligeramente dependiendo de la concentración y las condiciones del entorno en el que se aplique. Debido a su naturaleza, este colorante es ampliamente utilizado en la industria textil para teñir materiales como lana, papel y cuero, ofreciendo una coloración duradera y vibrante. Además de su aplicación en textiles, el *Orange II* ha sido utilizado en la coloración de alimentos y cosméticos, aunque en estos campos su uso ha disminuido debido a preocupaciones sobre su seguridad (Mielgo et al., 2001).

2.3.6.4.2.1. Solubilidad

Una de las características más importantes del *Orange II* es su alta solubilidad en agua, lo que facilita su uso en procesos industriales a gran escala. Esta propiedad se debe a la presencia del grupo sulfonato ($-SO_3Na$), que aumenta la afinidad del colorante por el agua y permite que se disuelva con facilidad. Esta característica lo convierte en un colorante ideal para procesos de tintura que requieren la inmersión de los materiales en soluciones acuosas (Cripps et al., 1990).

2.3.6.4.2.2. Punto de fusión

El punto de fusión del *Orange II* es aproximadamente de 163-164°C, lo que indica que es relativamente estable a temperaturas moderadas. Esta propiedad es importante durante los procesos industriales que requieren temperaturas elevadas, como la fijación del color en textiles. Sin embargo, cabe mencionar que la sensibilidad del *Orange II* a la luz puede limitar su durabilidad en productos expuestos a la luz solar o a fuentes de luz artificial durante largos períodos. La exposición prolongada a la luz puede provocar un desvanecimiento del color debido a la degradación de los enlaces del grupo azo (Chivukula et al., 1995).

2.3.6.4.2.3. Rango de pH y Estabilidad

El rango de pH óptimo para la estabilidad del colorante *Orange II* oscila entre 4 y 6, lo que lo hace adecuado para su uso en medios ligeramente ácidos. Fuera de este rango, el colorante puede perder su intensidad o incluso degradarse, lo que afecta tanto su apariencia como su efectividad en procesos industriales (Mielgo et al., 2001). Por ejemplo, en medios más alcalinos, es posible que se observen cambios en la estructura del colorante que reduzcan su capacidad para generar una coloración estable.

2.3.6.4.3. Usos Industriales del Orange II

El *Orange II* ha sido históricamente uno de los colorantes más utilizados en la industria textil, debido a su facilidad de aplicación y la intensidad del color que produce. En particular, se ha empleado en el teñido de tejidos como lana y cuero, donde proporciona una tonalidad naranja intensa y brillante (Spadaro et al., 1992). También se ha utilizado para la tintura de papel, donde su alta solubilidad en agua facilita el proceso de coloración en grandes cantidades de material.

2.3.6.4.4. Toxicidad

En el pasado, el *Orange II* también se empleaba en la coloración de alimentos y cosméticos. Sin embargo, en la actualidad su uso en estos campos ha disminuido considerablemente debido a preocupaciones sobre su toxicidad y su potencial impacto en la salud. Estudios han indicado que algunos colorantes azoicos, como el *Orange II*, pueden descomponerse en productos químicos que, en altas concentraciones, pueden ser perjudiciales para la salud humana (Wang et al., 2009). Estas preocupaciones han llevado a la implementación de regulaciones más estrictas sobre el uso de colorantes azoicos en productos de consumo.

2.3.6.4.5. Seguridad

Aunque el *Orange II* es generalmente seguro para su uso en aplicaciones industriales, debe ser manipulado con precaución para evitar el contacto prolongado con la piel o la inhalación de polvo durante su manejo. Al igual que otros colorantes azoicos, el *Orange II* puede presentar riesgos de toxicidad si no se manipula adecuadamente. Es importante tomar medidas de seguridad en el entorno de trabajo para minimizar la exposición directa, especialmente en áreas donde se utilicen grandes cantidades del colorante (Chivukula et al., 1995).

2.3.6.4.6. Impacto Ambiental y Biodegradación

El *Orange II*, como muchos colorantes sintéticos, plantea desafíos ambientales debido a su persistencia en el medio ambiente. Una vez liberado en el agua, el colorante puede ser difícil de degradar, lo que contribuye a la contaminación de los cuerpos de agua. Este es un problema particularmente significativo en áreas donde se descargan aguas residuales no tratadas provenientes de plantas textiles. El colorante puede resistir los métodos de tratamiento convencionales debido a su estructura química estable, lo que ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías de degradación, como la fotocatálisis y el uso de frameworks metal-orgánicos para la eliminación de estos compuestos de los residuos industriales (Cripps et al., 1990).

Recientemente, se ha investigado el uso de hongos ligninolíticos como *Phanerochaete chrysosporium* para la biodegradación de colorantes azoicos, incluido el *Orange II*. Estos hongos tienen la capacidad de producir enzimas que pueden descomponer las estructuras aromáticas complejas presentes en los colorantes, facilitando su transformación en productos más simples y menos tóxicos. Este enfoque biológico ofrece una solución potencialmente sostenible para la eliminación de colorantes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales (Wang et al., 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección de la muestra de *Phanerochaete sp*

3.1.1. Población

Las muestras fueron recolectadas de la corteza de los árboles de mango, pino y eucalipto, localizados en Tangay, en el departamento de Áncash, provincia del Santa, y distrito de Nuevo Chimbote (Latitud: -9.07917 Longitud: -78.5322). Estos árboles fueron seleccionados debido a su ubicación en zonas con condiciones ambientales propicias para el crecimiento de hongos ligninolíticos, específicamente en áreas con alta humedad relativa. Las muestras se obtuvieron directamente de la médula del tallo de estos árboles, ya que esta región suele ser un nicho favorable para el desarrollo de hongos ligninolíticos, como *Phanerochaete sp*. (Fuente propia)

3.1.2. Muestras

Las muestras recolectadas cuyas características consistían en manchas blancas, las cuales son indicativas de la presencia de hongos, especialmente aquellos que degradan la lignina. Estas manchas fueron cuidadosamente seleccionadas, asegurando que se encontraban en un estado de frescura adecuado y en un ambiente húmedo, lo cual es esencial para la viabilidad del hongo durante el proceso de recolección y transporte al laboratorio. (Fuente propia)

3.1.3. Muestreo

Las muestras se extrajeron utilizando pinzas estériles y bisturí estéril para cortar las muestras en cuadrados de 1 cm x 1 cm. Una vez cortadas, las muestras fueron colocadas en un matraz estéril, que contenía pedazos de algodón igualmente estériles, los cuales fueron previamente humedecidos para mantener la viabilidad del hongo durante su transporte (Fuente propia). Este método de muestreo permitió preservar las condiciones de humedad necesarias para que el hongo permaneciera viable hasta su procesamiento en el laboratorio, donde se procedió al aislamiento de *Phanerochaete sp.*

3.1.4. Diseño experimental

En este estudio se utilizó un diseño completamente al azar y 3 réplicas. El factor fue la concentración de glucosa y sulfato de amonio con respecto a la biodegradación del colorante Orange II. El experimento se replicó tres veces dando un total de 27 corridas más un control correspondiente, la variable respuesta fue la degradación del colorante Orange II y la producción de enzimas ligninolíticas.

Diseño completamente al Azar

Tabla 1. Tabla diseñada para experimentación al Azar

Repeticiones: 3 Réplicas:3		Proporción de Glucosa		
		Relación de 40 a:	Relación de 30 a:	Relación de 20 a:
Proporción de Sulfato de Amonio	Relación de 1 a:	Tratamiento C:N (40:1) (11g/L:0.275 g/L)	Tratamiento C:N (30:1) (8.25g/L:0.275 g/L)	Tratamiento C:N (20:1) (5.5g/L:0.275 g/L)
	Relación de 2 a:	Tratamiento C:N (40:2) (11g/L:0.55 g/L)	Tratamiento C:N (30:2) (8.25g/L:0.55 g/L)	Tratamiento C:N (20:2) (5.5g/L: 0.55 g/L)
	Relación de 3 a:	Tratamiento C:N (40:3) (11g/L:0.825 g/L)	Tratamiento C:N (30:3) (8.25g/L:0.825 g/L)	Tratamiento C:N (20:3) (5.5g/L:0.825 g/L)

3.2. Aislamiento del hongo *Phanerochaete sp*

El aislamiento del hongo *Phanerochaete sp.* se realizó mediante la implementación de varios métodos que permitieron confirmar su capacidad ligninolítica y su identificación precisa.

2.7.2.1. Método de identificación de Actividad ligninolítica

Para el primer método, se prepararon medios definidos enriquecidos con minerales, utilizando concentraciones específicas de carbono y nitrógeno (C/N), establecidas en 0.825 g/L y 0.275 g/L, respectivamente. Además, se añadió 0.1 g/L del colorante Orange II, un colorante azoico utilizado como indicador en la detección de la actividad ligninolítica. Este medio se preparó siguiendo la metodología descrita por Kirk (1978), quien desarrolló un medio específico para la detección de hongos ligninolíticos. La preparación del medio incluyó la creación de una solución madre del sulfato de hierro, pesando las sales ($MnSO_4 \cdot H_2O$, $NaCl$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4$, $CaCl_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) y disolviéndolas en 80 ml de agua destilada. Posteriormente, se preparó una solución madre del colorante Orange II a una concentración de 0.1 g/L. El medio de cultivo final incluyó glucosa y sulfato de amonio en una relación C/N de 30:3, y agar para 100 ml de medio, que fue sometido a calentamiento para asegurar su homogeneidad. El medio fue esterilizado mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez el medio alcanzó una temperatura de aproximadamente 45°C, se adicionaron 3 ml de cloranfenicol (500 mg disueltos en 100 ml de agua estéril), se homogeneizó agregando las sales y el sulfato de hierro, y se vertió en placas Petri. Las placas inoculadas se incubaron durante 5 días a 30°C.

2.7.2.2. Método de identificación de polifenoloxidasas

Se evaluó la presencia de polifenoloxidasas utilizando el método de Bavendamm (1928), el cual es un método clásico para la identificación de hongos ligninolíticos. El hongo se inoculó en un medio de agar malta que contenía 1 % de ácido tánico. La presencia de polifenoloxidasas se determinó por la formación de un halo café alrededor del crecimiento fúngico, lo cual es un indicativo de la actividad de estas enzimas. Este método es útil para diferenciar entre basidiomicetes ligninolíticos y aquellos que no poseen esta capacidad enzimática.

2.7.2.3. Método de degradación de rongo congo en la capacidad ligninolítico

En el tercer método, se utilizó un medio PDA suplementado con 40 gr de rojo congo para aislar el hongo y determinar su capacidad celulolítica o ligninolítica. El rojo congo es un colorante que permite visualizar la actividad enzimática del hongo, ya que su decoloración en el medio indica la presencia de enzimas ligninolíticas capaces de degradar la celulosa o la lignina. Y como respuesta en el medio se observó una decoloración en forma de halo alrededor del hongo ligninolítico.

2.7.2.4. Método de conservación y preservación del hongo *Phanerochaete sp* en medio PDA

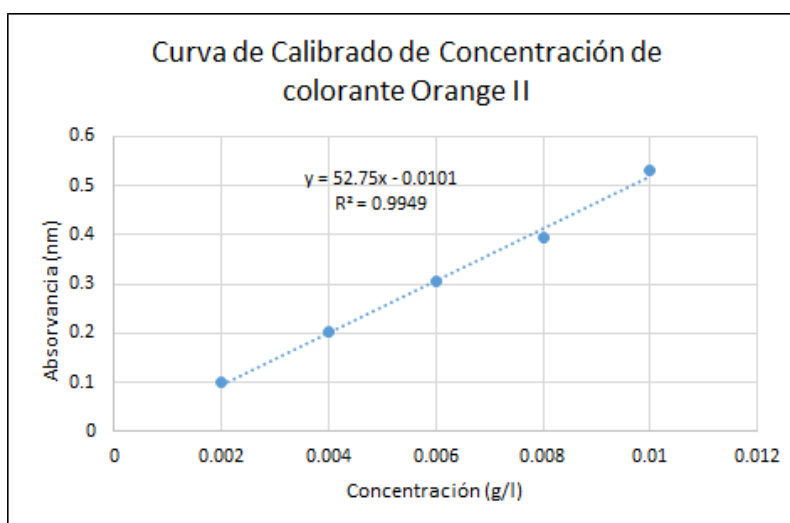
Finalmente, se aislaron hongos en medio PDA con la adición de 3 ml de cloranfenicol de la solución descrita previamente, para su conservación. Este método asegura la preservación del hongo sin contaminación microbiana, permitiendo su almacenamiento y uso en experimentos posteriores.

3.3. Curva de calibrado del colorante Orange II

Para establecer la relación entre la concentración de Orange II y su absorbancia, se prepararon diluciones seriadas del colorante. En dos fioas de 100 ml se diluyó el Orange II hasta obtener una concentración final de solución madre de 0.34g en 100 ml.

Se prepararon cinco tubos de ensayo con diluciones que variaron entre 0.01 g/L, 0.008 g/L, 0.006 g/L, 0.004 g/L, 0.002 g/L y un tubo de control sin colorante. La absorbancia de cada muestra se midió a 485 nm utilizando un espectrofotómetro, de acuerdo con las directrices del National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. Esta curva de calibración se utilizó posteriormente para evaluar la degradación del colorante en presencia del hongo *Phanerochaete sp.* (fuente propia)

Fig 12. Curva de Calibrado de Concentración de colorante Orange II



3.4. Curva de calibración de glucosa

Para la determinación cuantitativa de glucosa, se preparó una solución madre diluyendo 0.3 g de glucosa en 100 ml de agua destilada. A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones para crear una curva de calibración que incluyó concentraciones específicas de glucosa 3 g/L, 0.6 g/L, 1.2 g/L, 1.8 g/L, 3 g/L en cinco tubos de ensayo. La absorbancia de estas soluciones se midió a 540 nm utilizando un espectrofotómetro, lo que permitió generar una curva de calibración precisa que se empleó en la cuantificación de glucosa durante los experimentos.

Tabla 2. Curva de calibración de glucosa en los cinco tubos

Tubo	Sol. Madre (ml)	H ₂ O destilada (ml)	DNS	[] g/L	Abs
1	0	0.5	0.5	3	0,000
2	0.1	0.4	0.5	0,6	0,277
3	0.2	0.3	0.5	1,2	0,601
4	0.3	0.2	0.5	1,8	0,999
5	0.5	0	0.5	3	1,725

Fuente: Elaboración propia

3.5. Medios de cultivo y ajuste de medio de cultivo para crecimiento de *Phanerochaete sp.*

3.5.1. Fermentación del medio Kirk

Se empleó el medio de cultivo propuesto por Kirk et al. (1978) como base para la biodegradación del colorante Orange II. Este medio, conocido por su capacidad para inducir la actividad ligninolítica en hongos, fue ajustado para este estudio en función de la glucosa y la biomasa esperada del hongo. Se realizó un ajuste preciso de las proporciones de los componentes, especialmente del sulfato de amonio, que se utilizó como fuente de azufre. Las concentraciones de sulfato de amonio fueron 0.0673 g/L, 0.0503 g/L y 0.0338 g/L, seleccionadas para no interferir con la relación C/N y asegurar una respuesta adecuada del hongo en términos de degradación de lignina.

Tabla 3. Tablas de componente ajustado de forma exacta en función al carbono

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN					
	40:1		40:2		40:3	
Relación C/N	11 g/L	0.275 g/L	11 g/L	0.5 g/L	11 g/L	0.825 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	0.0673 g/L					

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN					
	30:1		30:2		30:3	
Relación C/N	8.25g/L	0.275 g/L	8.25 g/L	0.55 g/L	8.25 g/L	0.825 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	0.0503 g/L					

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN					
	20:1		20:2		20:3	
Relación C/N	5.5 g/L	0.22 g/L	5.5 g/L	0.55 g/L	5.5 g/L	0.825 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	0.0338 g/L					

3.5.2. Fermentación en estado sólido

Para evaluar la capacidad del hongo *Phanerochaete sp.* en la biodegradación del colorante Orange II en estado sólido, se prepararon 9 placas Petri con 20 ml de medio sólido cada una y un blanco, el cual contenía 20 ml de medio sólido sin colorante Orange II. Se utilizaron diferentes relaciones de C:N (40:1, 30:1, 20:1; 40:2, 30:2, 20:2; 40:3, 30:3, 20:3), siguiendo la metodología de Kirk et al. (1978). A cada placa se le añadió 0.01 g/L de Orange II. Las placas se incubaron a 30°C y se observaron diariamente durante 5 días. El crecimiento del hongo se midió en centímetros y se registró la decoloración del medio como indicativo de la degradación del colorante.

3.5.3. Fermentación en estado líquido

Para el estudio de la fermentación en estado líquido, se utilizaron 9 matraces de 250 ml, cada uno con 100 ml de medio de cultivo Kirk. Se evaluaron las mismas relaciones de C:N utilizadas en el estado sólido (40:1, 30:1, 20:1; 40:2, 30:2, 20:2; 40:3, 30:3, 20:3). A cada matraz se le añadió 0.01 g/L de Orange II, y se inoculó con un pedazo de agar colonizado de 1 cm x 1 cm., obtenido de las placas de crecimiento de hongo *Phanerochaete sp.*, respectivamente de las concentraciones realizadas previamente. Los matraces se incubaron a 35°C durante 5 días a 150 rpm. Se tomaron muestras cada 24 horas y se inactivó la actividad fúngica mediante shock térmico donde se utilizó dos vasos precipitados de 100 ° C y 5 ° C respectivamente. Para el control, se preparó un medio idéntico sin inoculación, para comparar la degradación del colorante en los medios fermentadores.

3.6. Recolección de Datos

3.6.1. Determinación de crecimiento y decoloración en cultivos de estado sólido

La determinación del crecimiento del hongo en estado sólido se realizó midiendo el diámetro de los halos formados en las placas Petri con una regla graduada. En caso de halos irregulares, se calculó un promedio del diámetro. Esta medida permitió cuantificar la extensión del colorante, como indicador de la actividad ligninolítica del hongo.

3.6.2. Determinación del grado de biodegradación en los medios de fermentación en estado líquido

Se tomaron muestras de 3 ml del medio líquido cada 24 horas durante 6 días, las cuales fueron centrifugadas para precipitar la biomasa. La biodegradación del colorante Orange II se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a 485 nm en un espectrofotómetro, siguiendo el método descrito por Guerra-Rivera, G. (2011). La concentración del colorante degradado se calculó utilizando la curva de calibración previamente establecida, obtenido de la fermentación en estado líquido comparando los valores iniciales y finales de la absorbancia.

3.6.3. Determinación del pH y glucosa para el estudio de enzimas

El pH del medio de cultivo se midió antes y después del proceso de fermentación para evaluar las condiciones óptimas de la actividad enzimática. Se utilizó un potenciómetro calibrado para medir el pH de cada muestra a lo largo del tiempo de fermentación. El pH de 4.0 - 4.5 es óptimo para la actividad de enzimas como el manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y lacasas, que requieren un ambiente específico para su funcionamiento. Los valores de pH se registraron al inicio y final del proceso para cada condición experimental evaluada.

Por otro lado, la actividad enzimática fue medida a través del método DNS, ideado por Olmos (1987) y perfeccionado por Avilés (1991); por ende, se tomará 170 μ l de muestra cada 24 horas durante 6 días.

Para ejecutar esta metodología se elaborará la solución de DNS (ácido 3, 5 dinitrosalicílico) integrada por estos reactivos en mención: 0,5 g de ácido -3,5 dinitrosalicílico, 15 g de tartrato sódico potásico y 0,8 g de *NaOH*, se diluyó todo en 100 ml de agua destilada. Para comprender la acción enzimática es necesario elaborar una curva patrón utilizando glucosa anhidra grado reactivo, producida de la siguiente forma:

- A concentración de 500 μ l/ml. se elaborará una solución madre de glucosa
- Posteriormente elaboramos la solución patrón de glucosa a distintas concentraciones de 100- 500 μ l/ml
- Se vertirá la solución de glucosa en sendos tubos de ensayos de 330 μ l, agua destilada y 0.5 ml del reactivo DNS.
- Añadido todos los reactivos, se colocará a baño maría a 100°C en un lapso de 5 minutos.
- Finalizado los 5 minutos se procederá a enfriar a temperatura ambiente y se agregará 5 ml de agua destilada.
- Se removerá y se ejecutará la lectura de la absorbancia a 540 nm a través del espectrofotómetro.

Posteriormente, serán tabulados en Excel los efectos de absorbancia de la glucosa y se elaborará la curva patrón con su ecuación propia; la cual será empleada para determinar la actividad enzimática del extracto crudo enzimático (ECE).

3.6.4. Identificación de la actividad de la enzima manganeso peroxidasa

La determinación de la enzima manganeso peroxidasa se realizará por la oxidación del rojo de fenol, el cual consiste en adicionar 50 μL de rojo de fenol con concentración de 0.01 % y 50 μL de MnSO_4 0.1 mM en buffer de succinato de sodio a pH 4,5, 0.1 ml de H_2O_2 . Por último, se adicionará 700 μL de extracto enzimático y la lectura de absorbancia se leerá a 610 nm después de la reacción en el espectrofotómetro previamente mencionado. Luego de 10 minutos de incubación en baño de agua a 30°C Las unidades enzimáticas (U/L) de MnP se definirá como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de rojo fenol oxidado por minuto.

3.6.5. Identificación de la actividad de la enzima lignina peroxidasa

La determinación de la enzima lignina peroxidasa es la oxidación de 80 μL de alcohol veratrílico (Aldrich D-13) 10mM en presencia de 20 μL de H_2O_2 (Merck) 4mM, 400 μL de buffer glicina (Riedel-Dehaen.Seelze-Hannover) 0,25M y 1500 μL del extracto enzimático. Esta reacción completó un volumen de 2 ml. El blanco para esta medición es reemplazado por agua destilada. El producto de la reacción, veratraldehído, se detectó mediante espectrofotometría a 310 nm.

3.6.6. Identificación de la actividad de la enzima lacasa

La determinación de la enzima lacasa se llevó a cabo por la oxidación ABTS [2,2- Azinobis (3 – ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] al catión ABTS⁺ con un volumen de reacción de 2 ml que comprende a 200 μL de ABTS 1 mM, 600 μL de buffer acetato de sodio 0,1M, pH 5 y 1200 μL de extracto enzimático. La reacción se llevó a cabo por 2 minutos a 25 °C. Para detener la reacción se añadieron 300 μL de H_2SO_4 1 M. El producto coloreado de la reacción se detectó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 420 nm.

3.6.7. Determinación de la concentración de las proteínas totales

Se utilizará 100 μL de muestra con 1 ml de bradford y se dejará reposar 10 min para posteriormente homogenizar la muestra y llevarla a la lectura en el espectrofotómetro a 595 nm.

3.7. Modelos Cinéticos de Biomasa

En el estudio de los bioprocesos, es fundamental comprender las dinámicas de crecimiento de la biomasa, así como las interacciones entre sustratos y productos. Para describir y predecir el comportamiento de estos componentes a lo largo del tiempo, se emplean diversos modelos cinéticos. Estos modelos permiten una representación matemática que facilita el análisis y la optimización de los procesos biológicos. A continuación, se presentan y analizan los principales modelos utilizados para la biomasa, el sustrato y el producto en bioprocesos.

3.7.1. Modelos para la Biomasa

El crecimiento de la biomasa es un fenómeno complejo influenciado por múltiples factores ambientales y bioquímicos. Para describir este crecimiento, se han desarrollado varios modelos matemáticos que capturan diferentes aspectos de su dinámica. Entre los modelos más reconocidos se encuentran el Modelo Logístico, el Modelo de Gompertz y el Modelo de Moser.

3.7.1.1. Modelo Logístico

El modelo logístico es uno de los más sencillos y ampliamente usados para describir el crecimiento de la biomasa. Este modelo parte de la premisa de que, en ausencia de limitaciones de recursos, el crecimiento poblacional seguirá una trayectoria exponencial. Sin embargo, a medida que la biomasa se acerca a una capacidad de carga máxima del entorno, el crecimiento se ralentiza debido a la competencia de recursos limitados.

La ecuación que describe el modelo logístico es la siguiente:

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 + \left(\frac{X_{max} - X_0}{X_0} \right) e^{-\mu_{max}t}} \quad (1)$$

donde:

$X(t)$ = Concentración de biomasa en el tiempo t ,

X_0 = Concentración inicial de biomasa,

X_{max} = Capacidad máxima de biomasa que el entorno puede sostener,

μ_{max} = Tasa específica de crecimiento.

(Zwietering, 1990)

Este modelo presenta una fase de crecimiento inicial rápida que se ralentiza progresivamente a medida que $X(t)$ se aproxima a X_{max} . La forma diferencial del modelo logístico se expresa como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} * X \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (2)$$

En esta ecuación, el término $\mu_{max} * X$ representa el crecimiento exponencial de la biomasa, mientras que el factor $1 - \frac{X}{X_{max}}$ introduce una regulación que limita este crecimiento a medida que la biomasa se acerca a la capacidad de carga X_{max} .

3.7.1.2. Modelo de Gompertz

El modelo de Gompertz ofrece una alternativa al modelo logístico, proporcionando una descripción más flexible de ciertos tipos de crecimiento biológico. Este modelo es particularmente útil para describir sistemas donde el crecimiento asintótico es más suave y la fase de crecimiento exponencial es menos pronunciada.

La ecuación del modelo de Gompertz se define como:

$$X(t) = X_{max} * \exp \left[- \exp \left(\frac{\mu_{max} * e}{X_{max}} (\lambda - t) + 1 \right) \right] \quad (3)$$

$X(t)$ = Concentración de biomasa en el tiempo t ,

X_{max} = Capacidad máxima de biomasa,

μ_{max} = Tasa específica de crecimiento,

λ = Tiempo de retardo o lag

(Zwietering, 1990)

Este modelo incorpora un tiempo de retardo λ , que representa el periodo inicial de adaptación del microorganismo al entorno antes de iniciar un crecimiento significativo. La forma diferencial del modelo de Gompertz es:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} * X * \ln \left(\frac{X_{max}}{X} \right) \quad (4)$$

Aquí, el término $\ln \left(\frac{X_{max}}{X} \right)$ modula la tasa de crecimiento, disminuyéndola exponencialmente a medida que el tiempo avanza, lo que refleja una disminución en la disponibilidad de recursos o un aumento en la inhibición del crecimiento.

3.7.1.3. Modelo de Moser

El modelo de Moser está diseñado para describir el crecimiento microbiano en condiciones donde no se observa un crecimiento exponencial inmediato, reflejando fases de adaptación o retardo. Este modelo es particularmente relevante en estudios donde se observa una adaptación prolongada del microorganismo antes de que comience un crecimiento activo.

La ecuación del modelo de Moser se expresa como:

$$\mu = \mu_{max} * \frac{S^n}{K_s + S^n} \quad (5)$$

Moser, W. (1958)

donde:

μ = Tasa específica de crecimiento en el tiempo t ,

μ_{max} = Tasa máxima específica de crecimiento,

S = Concentración de sustrato,

K_s = Constante de semi saturación,

n = Coeficiente de cooperatividad (Moser); si

$n = 1$, modelo se reduce al modelo de Monod

$n > 1$, hay cooperatividad positiva

$n < 1$, comportamiento sublineal (menos frecuente)

En este modelo, la constante de semi saturación K_s representa el periodo durante el cual el crecimiento de la biomasa es insignificante debido a la adaptación inicial del microorganismo al entorno. La forma diferencial del modelo de Moser se expresa como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu(S) * X = \mu_{max} * \frac{S^n}{K_s + S^n} * X \quad (6)$$

Este término exponencial introduce una reducción en la tasa de crecimiento después del periodo de retardo, reflejando una adaptación gradual de la biomasa al entorno.

3.7.2. Modelos para el Sustrato y el Producto

Además de los modelos que describen el crecimiento de la biomasa, es fundamental entender cómo se comportan el sustrato y el producto en el sistema biológico. Las ecuaciones de Luedeking-Piretson ampliamente utilizadas para modelar la cinética de consumo de sustrato y la producción de producto en relación con el crecimiento de la biomasa.

3.7.2.1. Consumo de Sustrato

La tasa de consumo de sustrato S se modela mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{dS}{dt} = -\alpha * \frac{dX}{dt} - \beta * X \quad (7)$$

donde:

$S(t)$ = Concentración de sustrato en el tiempo t ,

α = Constante de Luedeking-Piret asociada al crecimiento,

β = Constante de Luedeking-Piret asociada al mantenimiento.

En esta ecuación, el término $-\alpha * \frac{dX}{dt}$ representa el consumo de sustrato asociado directamente al crecimiento de la biomasa, mientras que el término $-\beta * X$ refleja el consumo de sustrato asociado a las necesidades de mantenimiento celular, independientes del crecimiento activo. Este modelo permite capturar tanto el consumo de sustrato relacionado con el crecimiento como el consumo basal necesario para mantener la viabilidad de las células.

3.7.2.2. Producción de Producto

La tasa de producción de producto P se modela mediante la siguiente ecuación

$$\frac{dP}{dt} = \alpha * \frac{dX}{dt} + \beta * X \quad (8)$$

donde:

$P(t)$ = Concentración de producto en el tiempo t ,

α = Constante de Luedeking-Piret asociada a la formación,

β = Constante de Luedeking-Piret asociada a la formación secundaria.

En esta ecuación, el término $\alpha * \frac{dX}{dt}$ representa la producción de producto directamente relacionada con el crecimiento de la biomasa, mientras que el término $\beta * X$ denota la producción de producto secundaria, que puede estar asociada a procesos metabólicos que ocurren incluso en ausencia de crecimiento activo. Este modelo es útil para describir la producción tanto primaria como secundaria de productos en bioprocesos.

3.8. Resumen de Parámetros

A continuación, se presenta un resumen de los parámetros utilizados en los modelos cinéticos descritos anteriormente

Tabla 4. Tabla de descripción de parámetros

Símbolo	Descripción
$X(t)$	Concentración de biomasa en el tiempo t
X_0	Concentración inicial de biomasa
X_{max}	Capacidad máxima de biomasa
μ	Tasa específica de crecimiento
λ	Tiempo de retardo (lag)
K_s	Constante de retardo
$S(t)$	Concentración de sustrato en el tiempo t
	$P(t)$ Concentración de producto en el tiempo t
α	Constante de Luedeking-Piret (crecimiento) q
	Constante de Luedeking-Piret (mantenimiento) α
	Constante de Luedeking-Piret (formación)
β	Constante de Luedeking-Piret (formación secundaria)

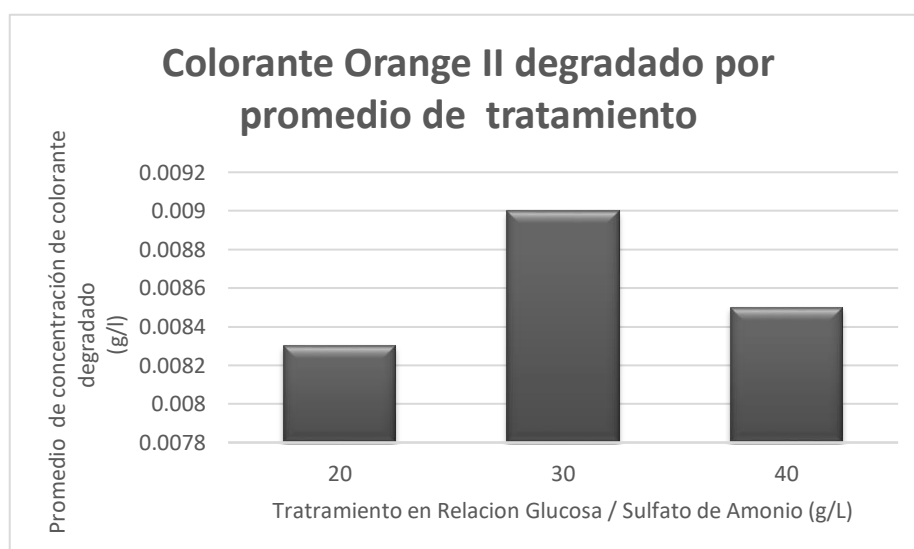
3.9. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizará un Análisis de Varianza 3k Utilizando el Programa ANOVA del programa Statistica.10 porque el programa nos permite comprar los datos y así determinar si existen diferencias significativas entre ellas y al usar una sola variable dependiente fue el más óptimo para analizar y con el fin de hallar una relación entre el porcentaje decolorante degradado según las proporciones de fuente de Glucosa y Sulfato de amonio que se llevara a cabo 3 repeticiones considerando nueve experimentos que se evaluarán por cada réplica

IV. RESULTADOS

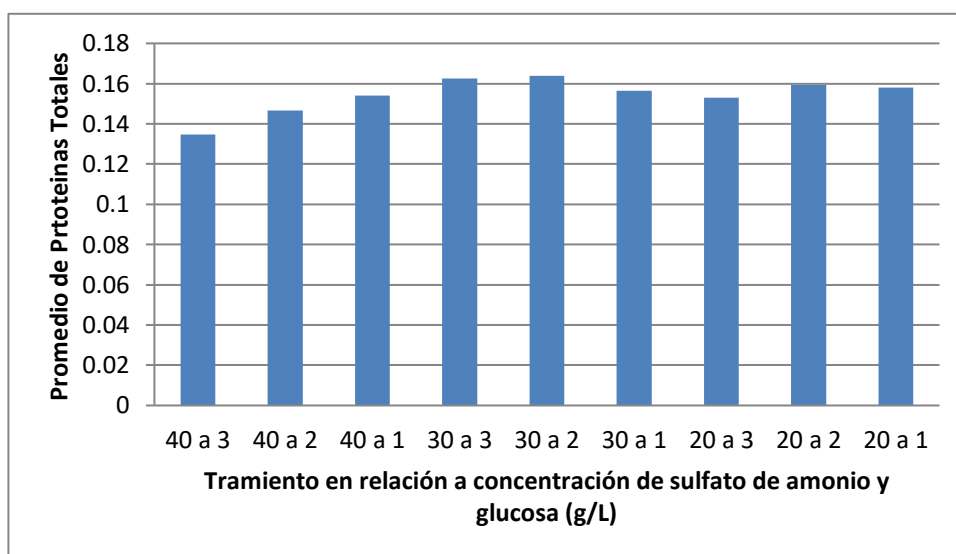
4.1. Resultados

Fig 13. Promedio de porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la segunda réplica



Nota: Se evidencia mayor cantidad de colorante Orange II degradado en relación de glucosa y sulfato de amonio de 30 en la segunda replica de fermentación líquida

Fig 14. Promedio de Análisis de Proteínas totales en la segunda réplica



Nota: Se evidencia mayor cantidad de proteínas totales en relación de glucosa y sulfato de amonio de 30 en fermentación líquida en la segunda réplica

El crecimiento de biomasa de *Phanerochaete sp.* en los diferentes tratamientos de relación C: N mostró patrones variados que se ajustaron óptimamente a distintos modelos cinéticos. En el tratamiento con relación C:N 20:1 (Carbono: 5.5 g/L, Nitrógeno: 0.275 g/L), el modelo Moser proporcionó el mejor ajuste con un y y un R^2 de 0.997, reflejando una fase de adaptación compleja necesaria para el crecimiento en condiciones de alta relación C:N.

Para los tratamientos con relaciones C:N 20:3, 30:1, 30:2 y 30:3 (Carbono: 5.5 g/L a 8.25 g/L y Nitrógeno: 0.55 g/L a 0.55 g/L), el modelo de Gompertz fue el más adecuado, indicando una fase de adaptación inicial (fase lag) que facilita un crecimiento sostenido y eficiente de la biomasa. Lo que sugiere una excelente capacidad predictiva en estas condiciones.

En los tratamientos con relaciones C:N 40:1, 40:2 y 40:3 (Carbono: 8.25 g/L a 11 g/L y Nitrógeno: 0.275 g/L a 0.825 g/L), el modelo de Moser nuevamente demostró ser el más adecuado, indicando una adaptación metabólica más compleja necesaria para optimizar el crecimiento en entornos con abundantes nutrientes.

Tabla 5. Parámetros de ajuste para el crecimiento de biomasa en distintos tratamientos

Relación C:N (C, N) (g/L)	Mejor Modelo	R²
20:1 (5.5, 0.275)	Moser	0.997
20:2 (5.5, 0.550)	Logístico	0.984
20:3 (5.5, 0.825)	Gompertz	0.986
30:1 (8.25, 0.275)	Gompertz	0.989
30:2 (8.25, 0.550)	Gompertz	0.994
30:3 (8.25, 0.825)	Gompertz	0.941
40:1 (11, 0.275)	Moser	0.993
40:2 (11, 0.550)	Moser	0.972
40:3 (11, 0.825)	Moser	0.974

El consumo de sustrato en los distintos tratamientos de relación C:N mostró variaciones significativas que se ajustaron adecuadamente a diferentes modelos cinéticos. En el tratamiento con relación C:N 20:2 (Carbono: 5.5 g/L, Nitrógeno: 0.550 g/L), el modelo Logístico proporcionó un ajuste razonable indicando un consumo de sustrato moderadamente predecible.

Para los tratamientos con relaciones C:N 20:1 (5.5 g/L, 0.275g/L), 20:3(5.5 g/L, 0.825 g/L), 30:1 (8.25 g/L, 0.275 g/L) ,30:2 (8.25 g/L, 0.55 g/L), 30:3 (8.25 g/L, 0.825 g/L), 40:1 (11 g/L, 0.275 g/L) y 40:3 (11 g/L, 0.825 g/L), el modelo de Moser destacó, lo que refleja una alta precisión en la predicción del consumo de sustrato y una fase de adaptación clara al inicio del proceso fermentativo.

Tabla 6. Parámetros de ajuste para el consumo de sustrato en distintos tratamientos

Relación C:N (C, N) (g/L)	Mejor modelo	R²
20:1 (5.5, 0.275)	Moser	0.624
20:2 (5.5, 0.550)	Logístico	0.607
20:3 (5.5, 0.825)	Moser	0.548
30:1 (8.25, 0.275)	Moser	0.889
30:2 (8.25, 0.550)	Moser	0.875
30:3 (8.25, 0.825)	Moser	0.736
40:1 (11, 0.275)	Moser	0.989
40:2 (11, 0.550)	Gompertz	0.986
40:3 (11, 0.825)	Moser	0.987

La producción de manganeso peroxidasa (MnP) mostró una variabilidad en su asociación con el crecimiento de biomasa dependiendo del tratamiento y el modelo cinético aplicado. En los tratamientos con relación C:N 20:2, 20:3, 30:1 y 30:2 (Carbono: 5.5 g/L a 8.25 g/L y

Nitrógeno: 0.55 g/L a 0.55 g/L), el modelo de Moser fue el que mejor se ajustó. Este ajuste indica una producción de MnP que no está directamente ligada al crecimiento de biomasa, reflejando una fase de adaptación más compleja.

Por otro lado, en los tratamientos con relaciones C:N 20:1, 30:3 y 40:1, el modelo logístico proporcionó un mejor ajuste, sugiriendo una relación más directa entre el crecimiento de la biomasa y la producción de producto.

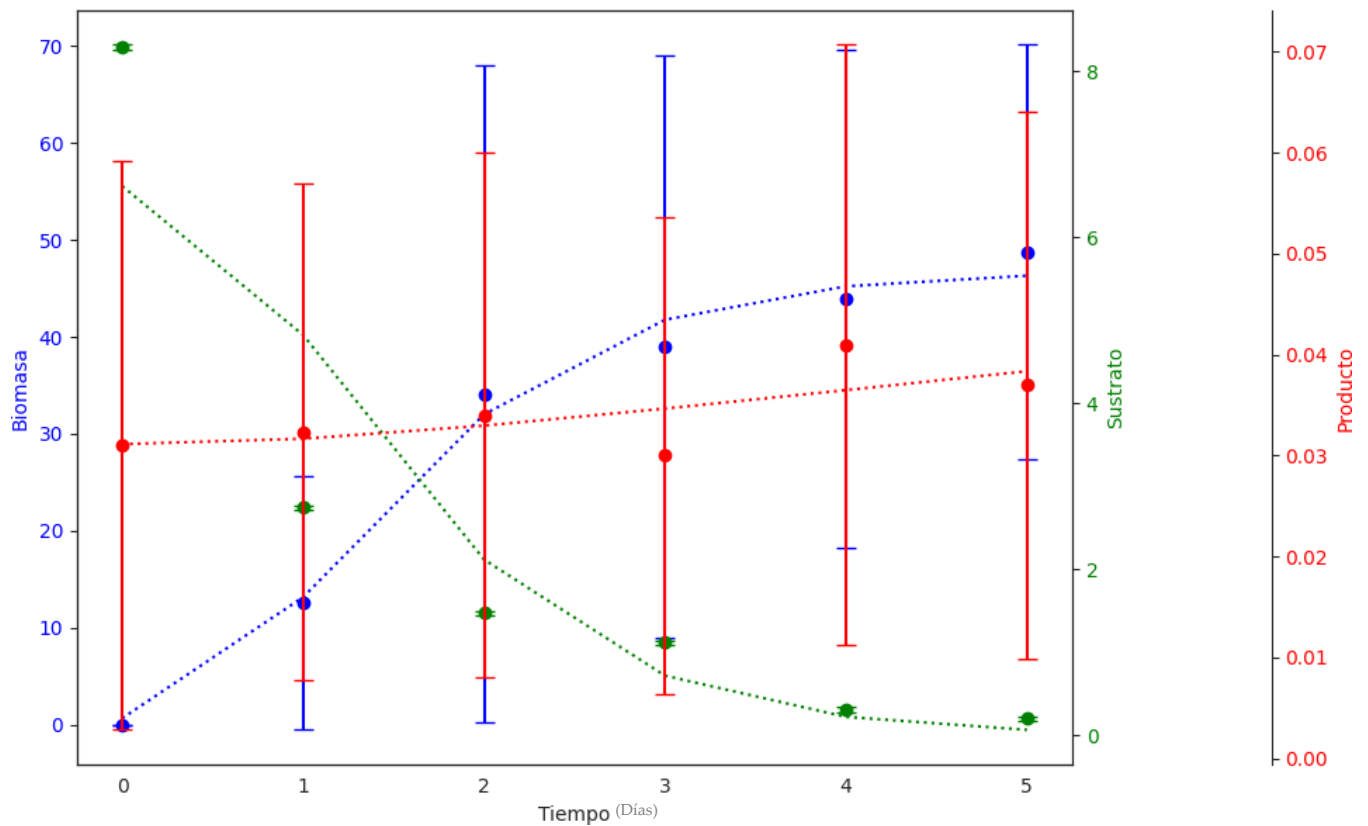
El tratamiento con relación C:N 40:2 mostró un ajuste con el modelo de Gompertz , indicando una fase de retardo en la producción de MnP y una transición gradual entre la producción asociada y no asociada al crecimiento de biomasa.

Tabla 7. Parámetros de ajuste para la producción de MnP en distintos tratamientos

Relación C:N (C, N) (g/L)	Mejor Modelo	R^2
20:1 (5.5, 0.275)	Logístico	0.614
20:2 (5.5, 0.550)	Moser	0.384
20:3 (5.5, 0.825)	Moser	0.622
30:1 (8.25, 0.275)	Moser	0.692
30:2 (8.25, 0.550)	Moser	0.469
30:3 (8.25, 0.825)	Logístico	0.321
40:1 (11, 0.275)	Logístico	0.559
40:2 (11, 0.550)	Gompertz	0.493

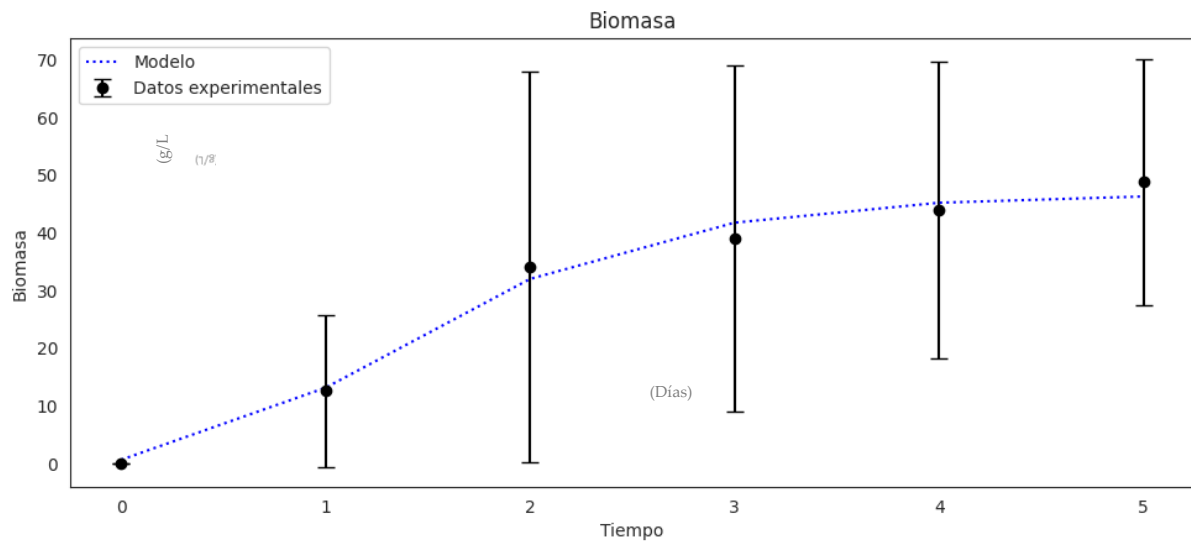
Entre estos tratamientos, la relación C:N de 30:1 (Carbono: 8.25 g/L, Nitrógeno: 0.275 g/L) se destaca como el mejor experimento. En este caso, el modelo de Gompertz para el consumo de sustrato alcanzó un $R^2 = 0.989$, mientras que el modelo de Moser para la formación de producto obtuvo un $R^2 = 0.469$. Este tratamiento mostró una combinación óptima de condiciones para el crecimiento de biomasa y eficiencia en el uso de nutrientes. La relación C:N de 30:1 permitió que el hongo consumiera el sustrato de forma gradual tras una fase de adaptación, logrando una degradación controlada y eficiente del colorante Orange II.

Fig 15. Comportamiento de Biomasa, Sustrato y Producto a lo largo del tiempo para la relación C:N de 30:1.



Nota. Los puntos representan datos experimentales, mientras que las líneas punteadas indican el ajuste del modelo. La biomasa está representada en azul, el sustrato en verde y el producto en rojo. El análisis y la visualización se realizaron con Python versión 3.9.

Fig 16. Curvas ajustadas para el mejor tratamiento con relación C:N de 30:1: Para Biomasa modelo Gomperzs.



Nota. El gráfico muestra el ajuste del modelo para el tratamiento con relación C:N de 30:1 en el modelo Gompertz a lo largo del tiempo, con barras de error para los datos experimentales. El análisis y la visualización se realizó con Python versión 3.9.

4.1. Análisis Estadístico

Fig 17. Diagrama de Pareto de efecto Estandarizado obtenido de ANOVA

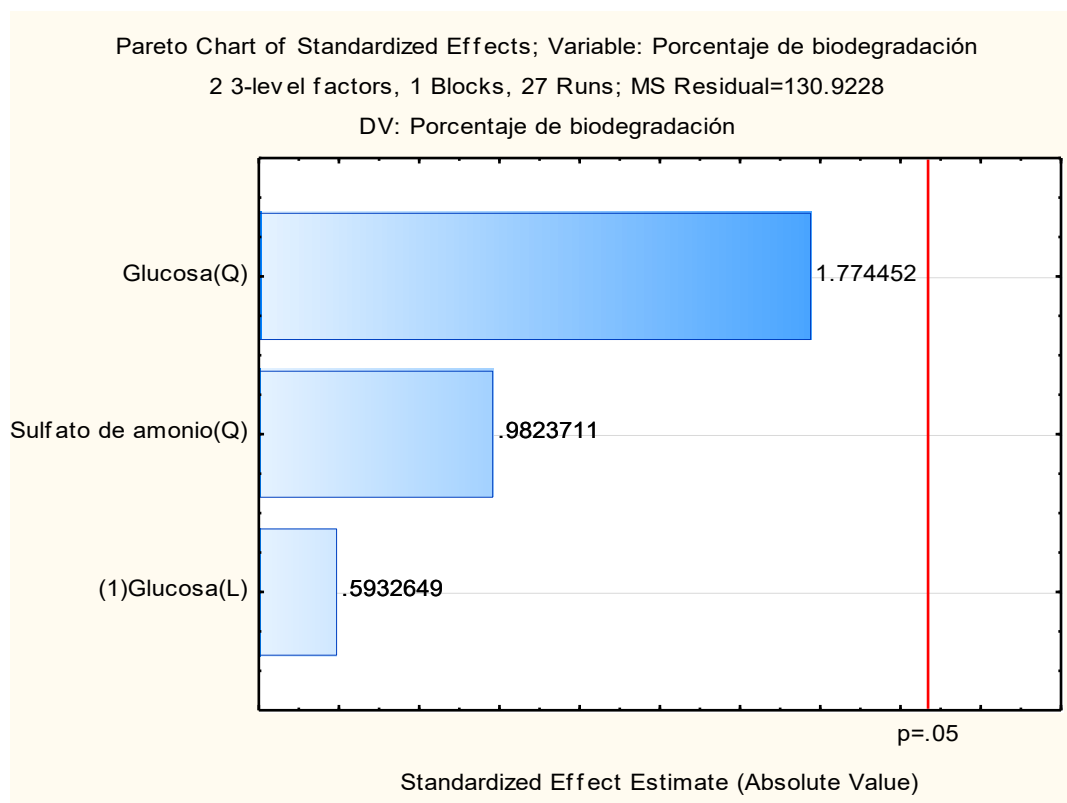
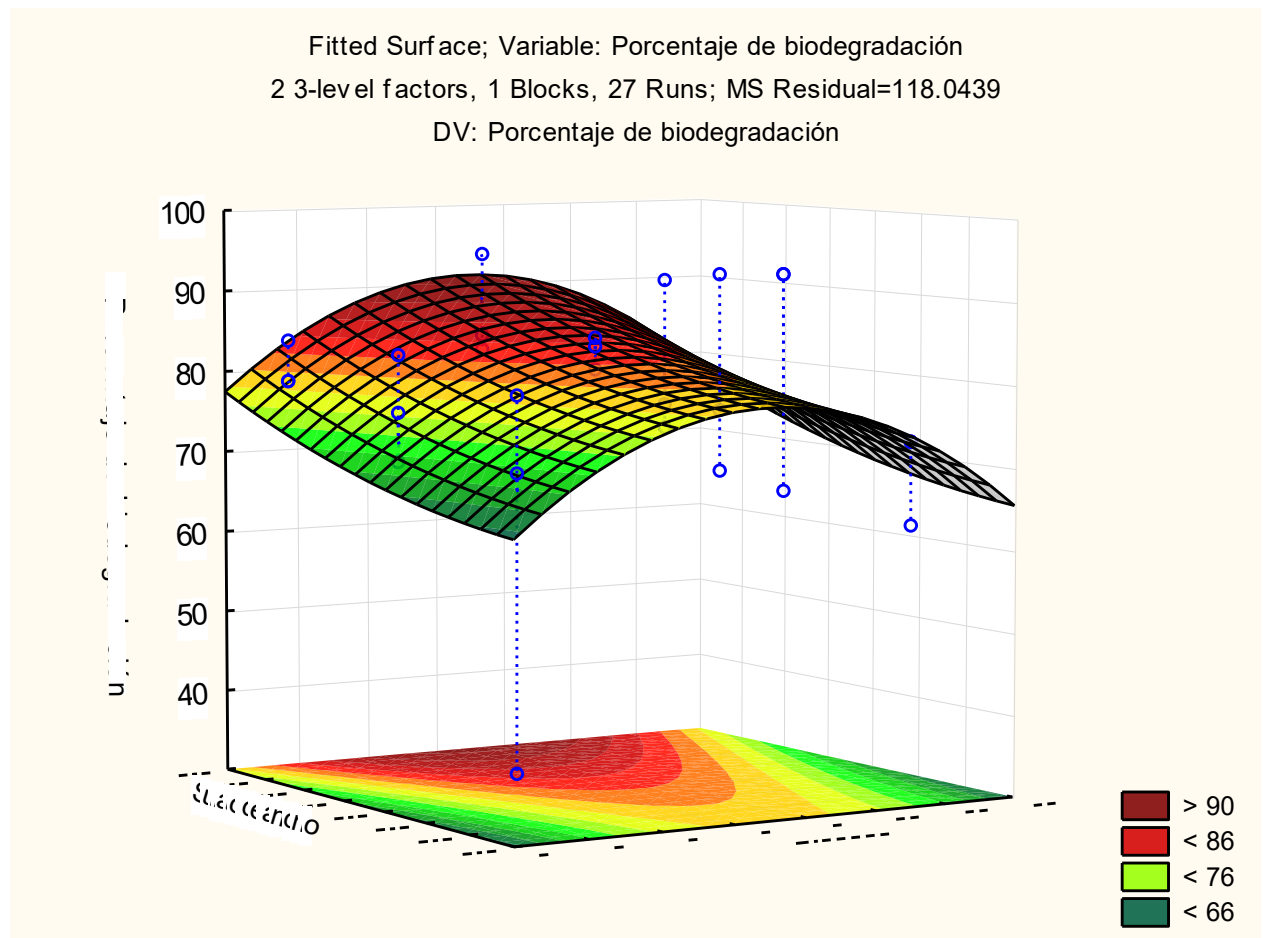


Fig 18. Diagrama de Método de Superficie de Respuesta en el porcentaje de Degradación de Colorante Orange II



Nota: Se sugiere que la gráfica de método de superficie de respuesta en relación de degradación de colorante Orange II obtuvo mayor degradación por sobre 90 % de degradación lo cual es óptimo, indicando que la concentración de C/N en relación 30:1 es clave para obtener mejor degradación de colorante Orange II.

4.2. Discusión

Cardona, M. et all. (2009) Los perfiles de degradación del tinte Orange II muestran una alta velocidad inicial de decoloración durante las primeras 30 horas de tratamiento y posteriormente se observa un incremento de coloración en el medio de cultivo que coincide con la fase estacionaria entre los dos periodos de crecimiento exponencial. En este periodo se observa un fenómeno de adsorción del tinte en la biomasa del hongo. Finalmente, a partir de la hora 50, se observa nuevamente una disminución de la coloración del medio, esta vez a una velocidad mucho menor que durante las primeras 30 horas y esta tendencia se conserva por el resto del tratamiento hasta alcanzar una decoloración del 98% con hongos en 9 días. En todas las réplicas se evidenció degradación del colorante Orange II sin embargo existen intervalos de degradación de aumento del colorante durante el procedimiento que mayormente en las comparaciones se evidencia por presencia de mayor cantidad de carbono lo que puede indicar una sobre-adsorción no deseada en el proceso biodegradativo y causando interferencias en los estudios de este tipo, sin embargo no se puede dejar de lado la importancia de obtener una cantidad adecuada de biomasa adecuada para el proceso de biodegradación que ayude a una mayor segregación de enzimas, por lo que éste tema es un punto importante a tomar en cuenta sin embargo teniendo en cuenta el tiempo de degradación en este caso se trabajó 6 días que equivale a 144 horas donde los máximos puntos que alcanzaron mayor degradación y formación de biomasa equivale a un tiempo mayor de 100 horas teniendo en cuenta la fase de adaptación del hongo al colorante Orange II.

Sharma, P. et all (2009) en sus estudios observaron que al aumentar el pH desde condiciones altamente ácidas (pH 3 a pH 4) la decoloración aumentó del 39,84 % al 71,56% además la decoloración óptima del colorante (86,34 %) se observó a pH 5.

Por otro lado tras realizarse en la primera réplica los niveles de pH bajaron mucho volviéndose el medio muy ácido lo que dificulta el estudio de proteínas totales a diferencia de los estudios realizados en la segunda y tercera réplica lo que genera dificultad en el estudio final de proteínas totales, por lo que un estudio por tiempo de análisis de proteínas sería mejor para éste inconveniente por ello el tiempo del estudio es un factor determinante debido a que al prolongarlo y tratar de mantener los niveles de potencial hidrogeniónicos estables incluiría el uso de sales orgánicas o buffers que afectaría indirectamente el proceso de bio adsorción mostrando en las gráficas biodegradativas mayor expulsión de colorante, lo cual no es deseable en este estudio, sin embargo los niveles de degradación si llegarían a ser más bajos debido a potenciarse la degradacion por bioadsorcion o lo que se llama biodegradacion dentro de la matriz acuosa intracelular.

Las principales enzimas modificadoras de lignina son las oxido reductasas, que son dos tipos de peroxidasas: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa (Toh et al., 2003). En la mayoría de los casos, un medio limitado en nitrógeno aumentó la producción de peróxido de lignina, y el peróxido de manganeso aumentó así la tasa de decoloración (Banat et al., 1996 , Singhal y Rathore, 2001).

Para la evaluación se prepararon medios nutritivos pobres en Nitrógeno o Carbono. Los resultados demostraron que la actividad MnP al 5 día en el medio deficiente de Nitrogeo fue de 1913+59U/L, además que la decoloración fue rápida y eficiente para todos los

colorantes azoicos. (Wang et al.,2009). Durante el trabajo realizado se observó que las limitaciones de nitrógeno es un estímulo clave para la producción de enzimas ligninolíticas eso se observó en las eficientes degradaciones de colorante lo que nos dice que si hubo formación de enzimas así mismo la proporción C/N 30:1 mostró mayor eficacia para crecimiento y producción de lacasa (Lillian,2006). Encontraron una máxima producción de lacasa, con la relación 30:1, por ello se decidió utilizar las relaciones 40:1 y 20:1, valores cercanos a esta condición (Tychanowycz et al., 2004) para ello en el trabajo realizado se obtuvo mejor degradación de colorante en relación C/N 30:1 lo cual sin embargo es de decir este resultado se observó en la segunda réplica mas en las relaciones de C/N 30:2 y 30:3 en la primera réplica y tercera réplica también se obtuvieron buenos porcentajes de degradación lo cual quiere decir que de manera general la relación de C/N 30 es favorable para una buena degradación de colorante orange II además se podría agregar que en diferentes variaciones de C/N se obtuvieron resultados aceptables para la degradación de colorante Orange.

Las condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno estimulan la producción de enzimas ligninolíticas, ya que el hongo entra en una fase secundaria de metabolismo, sin embargo esta estrategia presentó ciertas limitaciones. Aunque la producción enzimática fue mayor, se evidenció una reducción de crecimiento fungico, lo que puede afectar la estabilidad y velocidad del proceso a largo plazo (Pointing,2001) mientras que Tien y Kirk (1984) mostraron que un equilibrio nutricional es esencial para mantener tanto actividad enzimática como estabilidad del proceso a largo plazo. En relación al estudio se pudo comprobar que bajos niveles de nitrógeno si favorecen a la producción de enzimas ligninolíticas y por lo cual a la degradación de colorante orange II pero no por ello se vio limitado el crecimiento del hongo al contrario en el estudio realizado se observó que el hongo al estar expuesto al colorante le favoreció y lo tomo como fuente de carbono para seguir creciendo y poder formar las enzimas pero si también podríamos concluir y coincidir con los autores citados que es necesario un equilibrio nutricional para mantener una degradación constante.

La capacidad de los modelos Logístico y Gompertz para describir con alta fidelidad la dinámica de crecimiento de la biomasa en la mayoría de las condiciones experimentales (C:N 20:1 a C:N 40:3, con R^2 consistentemente >0.95) subraya la naturaleza fundamentalmente sigmoideal del crecimiento microbiano en sistemas por lotes. Este fenómeno se alinea con las observaciones de Nosheen et al. (2010), quienes demostraron que la bioestimulación nutricional, es decir, la manipulación de la disponibilidad de nutrientes, puede alterar significativamente las fases iniciales del crecimiento y la actividad metabólica general de consorcios bacterianos.

Es importante decir que *Phanerochaete chrysosporium* es un hongo aeróbico estricto, y las enzimas responsables de la degradación requiere peróxido de hidrógeno y oxígeno como cofactores. Por ello la aireación del medio y la agitación influyen directamente en la actividad enzimática. Cultivos con baja oxigenación muestran menor tasa de decoloración (Reid,1979) así mismo las temperaturas superiores a 37° C pueden afectar la viabilidad del micelio y disminuir la eficiencia enzimática (Pointing,2001)

Es importante destacar que otros factores físicos como la temperatura y la velocidad de agitación también tienen una influencia significativa sobre el crecimiento fungico y la actividad enzimática, se ha documentado que *Phanerochaete* necesita una temperatura óptima de crecimiento y producción de lignina peroxidasa de 30 y 37 °C (Tien & Kirk, 1984). Por otro lado la velocidad de agitación regula el oxígeno disuelto en el medio, lo cual es fundamental para el metabolismo oxidativo del hongo y la actividad de enzimas ligninolíticas que dependen del oxígeno como cofactor. (Rothschild et al, 1995).

Cultivos estáticos pueden favorecer el crecimiento superficial, pero no garantizan buena oxigenación interna. En cambio los sistemas agitados o con burbujeo de aire mejoran el contacto oxígeno- micelio y aumentan la eficiencia de decoloración. (Patel & Gupte, 2016).

En el trabajo realizado se mantuvo una correcta aireación con ayuda de los equipos de agitación lo que influye directamente en la producción de enzimas así mismo se trabajó en una temperatura ambiente promedio porque al ser un hongo de pobredumbre blanca no tolera altas temperaturas y al estar trabajando con enzimas se tenían que monitorear correctamente la temperatura porque son termolábiles, teniendo en cuenta estos aspectos es de decir que no basta con optimizar los factores individuales como fuente de carbono o nitrógeno sino que es necesario considerar factores como aireación y temperatura para una correcta producción de enzimas y obtener mejores resultados de degradación.

Tien y Kirk (1989) observaron que la lignina peroxidasa no se produce durante el crecimiento activo, sino solo cuando el nitrógeno está agotado, lo cual existe una fase logarítmica donde el hongo consume nutrientes para formar biomasa y en la fase estacionaria activa el metabolismo secundaria, en el cual se sintetizan enzimas ligninolíticas.

Durante el proceso de degradación, se generan intermediarios aromáticos que pueden ser tóxicos para el propio hongo. Si estos se acumulan sin ser metabolizados, pueden inhibir el crecimiento o dañar las enzimas. Por ello, la capacidad del hongo para mineralizar o transformar los productos intermedios es clave para mantener la eficiencia del sistema a lo largo del tiempo.(Reddy & Mathew, 2001).

Se puede determinar que el nitrógeno sí es un factor importante en la producción de enzimas así tal cual como limitamos las fuentes de nitrógeno en diferentes concentraciones observando que si hubo una correcta síntesis de enzimas ligninolíticas así mismo el hongo *Phanerochaete* sp si presentó una fase fase logarítmica, esto se observó en el proceso de crecimiento de biomasa en placas sin embargo es difícil determinar si hubo un componente intermediario que inhiba su crecimiento porque en este caso el hongo creció correctamente ya que al verse limitado las fuentes de C/N de glucosa y sulfato de amonio, se ve obligado hacer uso del colorante orange II como fuente de carbono y si bien es necesario decir que los colorantes están mezclados con sales, metales pesados o detergentes, estos pueden representar un problema en la actividad enzimática, en este caso el hongo *Phanerochaete* es un hongo que presenta resistencia ante esos compuestos por eso no presentó problemas ante la síntesis de enzimas pero siempre es importante seguir investigando porque más allá del control de nutrientes y condiciones físicas, resulta crucial considerar la dinámica enzimática, la presencia de otros compuestos que podrían inhibir el proceso, la implementación de estrategias como la adaptación celular, la inmovilización del hongo podrían potenciar significativamente la eficiencia del proceso en contexto real de tratamientos de efluentes como el colorante Orange II.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El hongo *Phanerochaete sp* demostró una alta eficiencia en la producción de manganeso peroxidasa (MnP) bajo diferentes relaciones C:N, siendo la relación 30:1 la que presentó el mejor ajuste con los modelos cinéticos utilizados.
- La relación C:N de 30:1 se identificó como el tratamiento óptimo, ya que permitió una alta eficiencia en el consumo de sustrato y una producción sostenida de MnP, respaldada por los ajustes precisos de los modelos cinéticos aplicados.
- Se identificó la actividad de la enzima manganeso peroxidasa en el medio de fermentación así mismo se realizó un análisis de proteínas donde se pudo determinar que la relación 30:2 y 30:3 fue más eficiente.
- Se logró identificar que en la relación C:N de 30:1 presentó una mejor degradación de colorante Orange II con un 94 % en la segunda réplica

5.2. Recomendaciones

- **Optimización de Relaciones C:N:** Se recomienda continuar investigando y optimizando las relaciones C:N alrededor de 30:1 para confirmar y mejorar los resultados obtenidos, asegurando así una mayor eficiencia en la producción de MnP y el consumo de sustrato.
- **Aplicación de Modelos Cinéticos:** Es fundamental utilizar los modelos cinéticos de Moser y Gompertz en futuros estudios, ya que demostraron una alta precisión en el ajuste de los datos obtenidos para diferentes relaciones C:N. Esto facilitará la predicción y optimización de los procesos fermentativos.
- **Escalabilidad del Proceso:** Se recomienda realizar estudios a mayor escala basados en los tratamientos óptimos identificados, especialmente la relación C:N de 30:1, para evaluar la viabilidad técnica y económica de su implementación en aplicaciones industriales de biorremediación.
- **Evaluación de Factores Ambientales:** Además de la relación C:N, es aconsejable explorar la influencia de otros factores ambientales como el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno, utilizando los modelos cinéticos adecuados para maximizar la producción de MnP y la eficiencia del consumo de sustrato.
- **Integración de Ingeniería Genética:** Considerar la implementación de técnicas de ingeniería genética en *Phanerochaete sp* para potenciar aún más la producción de MnP y otras enzimas ligninolíticas, lo que podría incrementar significativamente la capacidad del hongo para la degradación de compuestos recalcitrantes.
- **Monitoreo y Control del Proceso Fermentativo:** Desarrollar sistemas de monitoreo y control basados en los modelos cinéticos seleccionados para mantener condiciones óptimas de cultivo, asegurando así una producción consistente y

eficiente de MnP.

- **Investigaciones Futuras:** Realizar estudios adicionales que integren múltiples modelos cinéticos para comprender mejor las interacciones metabólicas en *Phanerochaete chrysosporium* y optimizar simultáneamente el crecimiento de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de MnP.

VI. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Bishnoi, K., Kumar, R., & Bishnoi, N. (2008). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* in sterile and unsterile soil. *Journal of Scientific Industrial Research*, 67, 538-542. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:25131203>.
- Bumpus, J., & Aust, S. (1987). Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system. *BioEssays*, 6, 405. <https://doi.org/10.1002/BIES.950060405>
- Cameron, M. D., Timofeevski, S., & Aust, S. (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 751-758. <https://doi.org/10.1007/s002530000459>
- Chivukula, M., Spadaro, J. T., & Renganathan, V. (1995). Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Sulfonated Azo Dyes Generates Novel Sulfohenyl Hydroperoxides. *Biochemistry*, 34(26), 8445-8451. <https://doi.org/10.1021/bi00023a024>
- Cripps, C., Bumpus, J. A., & Aust, S. D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 1114-1118. <https://doi.org/10.1128/aem.56.4.1114-1118.1990>
- Fernando, T., Aust, S., & Bumpus, J. (1989). Effects of culture parameters on DDT biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 19, 1387-1398. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90087-8)
- Huang, D., Zeng, G., et al. (2008). Degradation of lead-contaminated lignocellulosic waste by *Phanerochaete chrysosporium* and the reduction of lead toxicity. *Environmental Science Technology*, 42(13), 4946-4951. <https://doi.org/10.1021/ES800072C>
- Lai, Y., Wang, F., Zhang, Y., Ou, P., Wu, P., Fang, Q., Chen, Z., & Li, S. (2019). Effective removal of methylene blue and orange II by subsequent immobilized laccase decolorization on crosslinked polymethacrylate/carbon nanotubes. *Materials Research Express*, 6(8), 085309. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab26a5>
- Li, H., Gong, Y., Huang, Q., & Zhang, H. (2013). Degradation of Orange II by UV-assisted advanced Fenton process: Response surface approach, degradation pathway, and biodegradability. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(45), 15560–15567. <https://doi.org/10.1021/ie401503u>
- Lu, Y., Yan, L., Wang, Y., Zhou, S., Fu, J., & Zhang, J. (2009). Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1-3), 1091-1097. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.091>
- Mielgo, I., Moreira, M., Feijoo, G., & Lema, J. (2001). A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). *Journal of Biotechnology*, 89(1), 99-106. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00218-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00218-1)
- Patel, Y., Mehta, C., & Gupte, A. (2012). Assessment of biological decolorization and degradation of sulfonated di-azo dye Acid Maroon V by isolated bacterial consortium EDPA. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.016>

- Pezzella, C., Macellaro, G., Sannia, G., et al. (2017). Exploitation of *Trametes versicolor* for bioremediation of endocrine disrupting chemicals in bioreactors. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178758>
- Ribeiro, R. S., Fathy, N. A., Attia, A. A., Silva, A. M. T., Faria, J. L., & Gomes, H. T. (2012). Activated carbon xerogels for the removal of the anionic azo dyes Orange II and Chromotrope 2R by adsorption and catalytic wet peroxide oxidation. *Chemical Engineering Journal*, 195–196, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.04.069>
- Singh, S., & Pakshirajan, K. (2010). Enzyme activities and decolourization of single and mixed azo dyes by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(3), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.10.002>
- Spadaro, J. T., Gold, M. H., & Renganathan, V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2397–2401. <https://doi.org/10.1128/aem.58.8.2397-2401.1992>
- Wanderley, C. R. P., Andrade, M. V., Pereira, L. J., Siqueira, J. P. S., & Santos, V. L. (2018). Azo dye mineralization by *Phanerochaete chrysosporium* in a sequencing batch reactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61, e18170263. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170263>
- Wang, H., Li, P., Pang, M., Zhai, Z., Yu, G., Liu, G., & Yao, J. (2009). Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete* sp. HSD. *Biochemical Engineering Journal*, 46(3), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.06.008>
- Zafiu, C., Antoniou, E., Grilla, E., Demetriou, K., & Ioannou, I. (2025). Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Phanerochaete velutina* FBCC 941 in the presence of heavy metals. *Bioresource Technology*, 398, 130542. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.130542>
- Zeng, G., Chen, A., Chen, G., et al. (2012). Responses of *Phanerochaete chrysosporium* to toxic pollutants: physiological flux, oxidative stress, and detoxification. *Environmental Science Technology*, 46(14), 7818–7825. <https://doi.org/10.1021/es301006j>
- Zhang, A., Fang, L., Wang, J., & Liu, W. (2013). Enzymatic decolorization of Orange II: Optimization by response surface methodology and pathway elucidation. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 32(3), 647–652. <https://doi.org/10.1002/ep.11628>

ANEXO I

Datos Cinéticos de las Relaciones C:N

Relación C:N 20:1

Tabla 8. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 20:1.

Tiempo(d)	Biomasa (g/L)	Sustrato(g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	5.533 ± 0.003	0.036 ± 0.002
1.000	7.685 ± 0.150	1.240 ± 0.025	0.036 ± 0.003
2.000	9.383 ± 0.200	0.803 ± 0.010	0.049 ± 0.004
3.000	14.481 ± 0.280	0.601 ± 0.008	0.064 ± 0.005
4.000	24.015 ± 0.350	0.445 ± 0.007	0.194 ± 0.009
5.000	39.142 ± 0.500	0.137 ± 0.004	0.123 ± 0.008

Relación C:N 20:2

Tabla 9. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 20:2.

Tiempo(d)	Biomasa (g/L)	Sustrato(g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	5.537 ± 0.003	0.028 ± 0.002
1.000	7.844 ± 0.160	0.897 ± 0.020	0.034 ± 0.003
2.000	11.388 ± 0.250	0.799 ± 0.009	0.036 ± 0.004
3.000	16.654 ± 0.310	0.686 ± 0.012	0.057 ± 0.005
4.000	29.022 ± 0.400	0.442 ± 0.007	0.085 ± 0.006
5.000	40.163 ± 0.520	0.218 ± 0.006	0.060 ± 0.004

Relación C:N 20:3

Tabla 10. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 20:3.

Tiempo(d)	Biomasa (g/L)	Sustrato(g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	8.286 ± 0.003	0.031 ± 0.002
1.000	12.589 ± 0.200	2.744 ± 0.015	0.032 ± 0.003
2.000	34.126 ± 0.300	1.479 ± 0.009	0.034 ± 0.004
3.000	38.985 ± 0.350	1.119 ± 0.007	0.030 ± 0.004
4.000	43.933 ± 0.400	0.312 ± 0.008	0.041 ± 0.005
5.000	48.776 ± 0.500	0.203 ± 0.009	0.037 ± 0.005

Relación C:N 30:1

Tabla 11. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 30:1.

Tiempo (d)	Biomasa (g/L)	Sustrato (g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	5.535 ± 0.001	0.038 ± 0.001
1.000	14.284 ± 0.110	2.063 ± 0.004	0.085 ± 0.002
2.000	18.947 ± 0.150	1.384 ± 0.003	0.054 ± 0.003
3.000	23.434 ± 0.170	1.028 ± 0.005	0.052 ± 0.004
4.000	28.759 ± 0.200	0.749 ± 0.002	0.068 ± 0.003
5.000	35.687 ± 0.250	0.552 ± 0.003	0.043 ± 0.002

Relación C:N 30:2

Tabla 12. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 30:2.

Tiempo (d)	Biomasa (g/L)	Sustrato (g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	5.533 ± 0.002	0.029 ± 0.001
1.000	24.855 ± 0.160	2.502 ± 0.005	0.034 ± 0.002
2.000	25.727 ± 0.170	1.715 ± 0.004	0.038 ± 0.002
3.000	26.803 ± 0.180	0.587 ± 0.002	0.054 ± 0.003
4.000	27.806 ± 0.200	0.200 ± 0.002	0.070 ± 0.003
5.000	31.416 ± 0.250	0.111 ± 0.001	0.046 ± 0.002

Relación C:N 30:3

Tabla 13. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 30:3.

Tiempo (d)	Biomasa (g/L)	Sustrato (g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	5.525 ± 0.001	0.029 ± 0.001
1.000	23.868 ± 0.180	2.678 ± 0.006	0.047 ± 0.002
2.000	27.596 ± 0.150	0.757 ± 0.004	0.025 ± 0.002
3.000	31.498 ± 0.200	0.718 ± 0.003	0.045 ± 0.002
4.000	32.701 ± 0.220	0.456 ± 0.002	0.037 ± 0.002
5.000	35.893 ± 0.230	0.258 ± 0.003	0.021 ± 0.001

Relación C:N 40:1

Tabla 14. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 40:1.

Tiempo (d)	Biomasa (g/L)	Sustrato (g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	8.291 ± 0.002	0.040 ± 0.001
1.000	13.685 ± 0.100	3.164 ± 0.003	0.030 ± 0.002
2.000	17.777 ± 0.120	1.708 ± 0.002	0.034 ± 0.002
3.000	21.258 ± 0.130	0.618 ± 0.003	0.044 ± 0.002
4.000	21.785 ± 0.150	0.350 ± 0.002	0.056 ± 0.002
5.000	23.953 ± 0.170	0.310 ± 0.001	0.044 ± 0.001

Relación C:N 40:2

Tabla 15. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 40:2.

Tiempo (d)	Biomasa (g/L)	Sustrato (g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	5.533 ± 0.002	0.029 ± 0.001
1.000	23.868 ± 0.150	2.678 ± 0.003	0.047 ± 0.002
2.000	27.596 ± 0.170	0.757 ± 0.002	0.025 ± 0.001
3.000	31.498 ± 0.200	0.718 ± 0.002	0.045 ± 0.002
4.000	32.701 ± 0.220	0.456 ± 0.001	0.037 ± 0.001
5.000	35.893 ± 0.230	0.258 ± 0.002	0.021 ± 0.

Relación C:N 40:3

Tabla 16. Promedio y desviación estándar de los datos cinéticos para la relación C:N 40:3.

Tiempo (d)	Biomasa (g/L)	Sustrato (g/L)	Producto (U/L)
0.000	0.00 ± 0.00	5.525 ± 0.002	0.029 ± 0.001
1.000	23.900 ± 0.150	2.678 ± 0.004	0.047 ± 0.002
2.000	27.300 ± 0.180	0.757 ± 0.003	0.025 ± 0.002
3.000	31.500 ± 0.200	0.718 ± 0.002	0.045 ± 0.001
4.000	32.800 ± 0.220	0.456 ± 0.001	0.037 ± 0.002
5.000	35.800 ± 0.250	0.258 ± 0.002	0.021 ± 0.001

ANEXO II

Fig 19. Representación gráfica del promedio de degradación del Colorante Orange II en la primera réplica en fermentación líquida

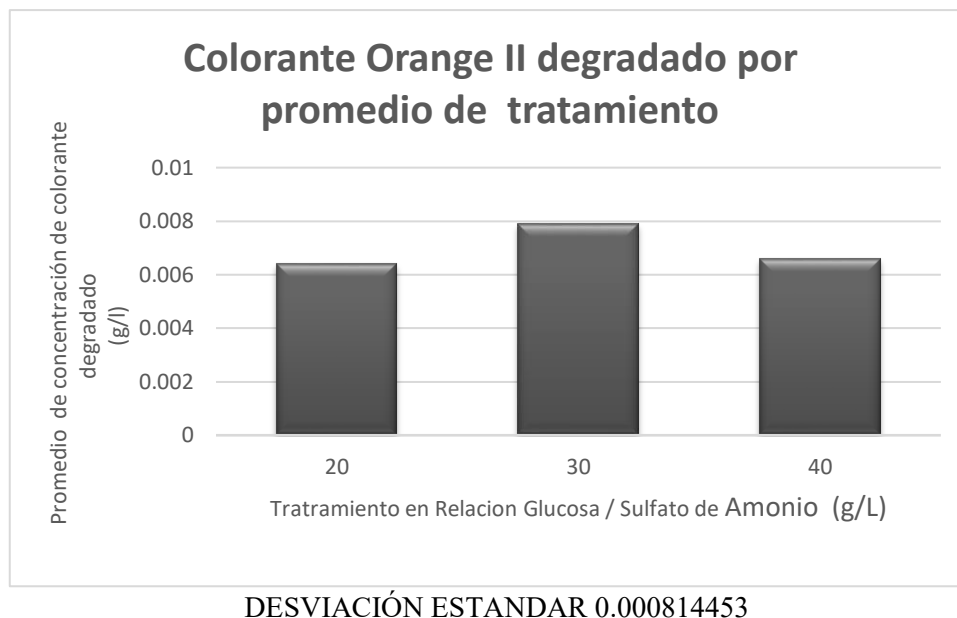


Fig 20. Representación gráfica del promedio de degradación del Colorante Orange II en la segunda réplica en fermentación líquida

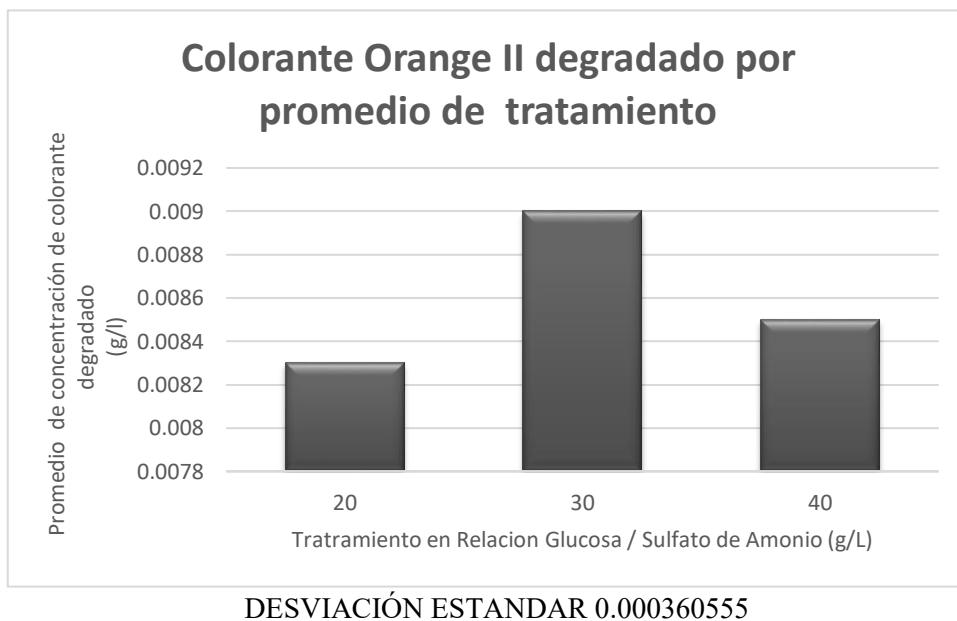
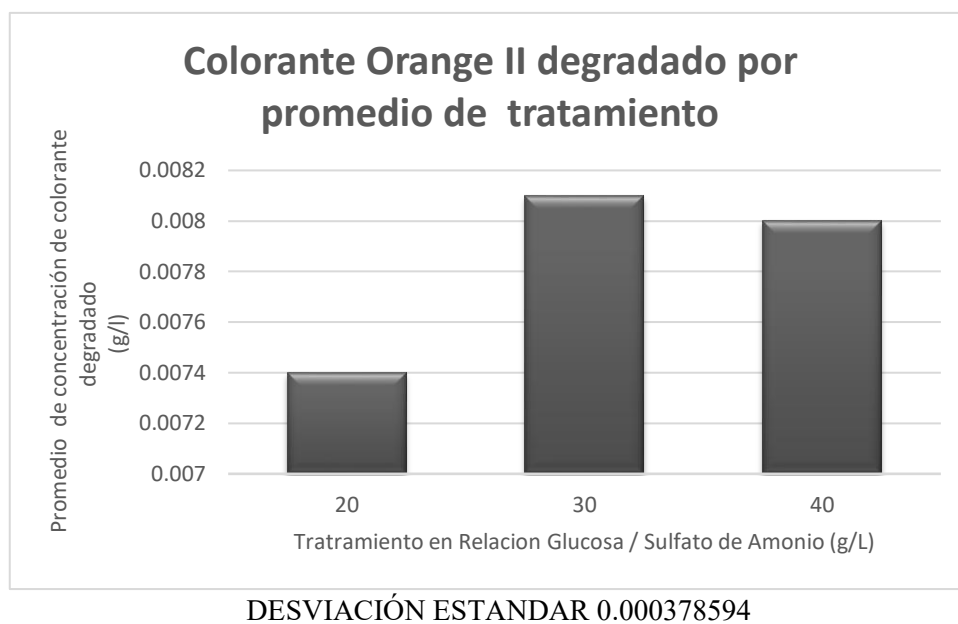


Fig 21. Representación gráfica del promedio de degradación del Colorante Orange II en la tercera réplica en Fermentación líquida



ANEXO III

PRIMERA REPLICA

Tabla 17.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 20:1 en fermentación en estado sólido

Relación 20 a 1		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm^2)
0	0	0.0000
1	0.5	0.1964
2	4.5	15.9044
3	8.5	56.7452
4	9	63.6174
5	9	63.6174

Fig 22.Crecimiento en superficie relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido

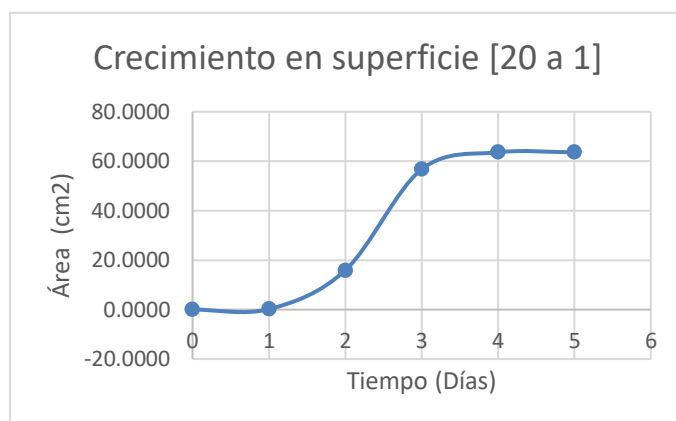


Tabla 18.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 20:2 en fermentación en estado sólido

Relación 20 a 2		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm^2)
0	0	0.0000
1	0.4	0.1257
2	1.6	2.0106
3	3.5	9.6212
4	4.8	18.0956
5	7.5	44.1788

Fig 23. Crecimiento en superficie relación 20:2 (5.5 g/L; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido

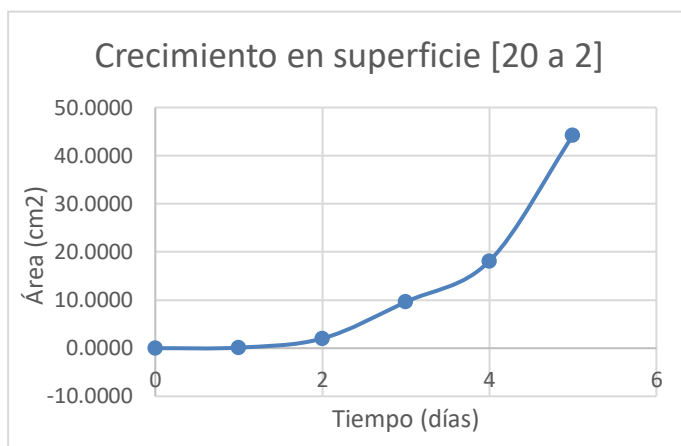


Tabla 19. Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 20:3 en fermentación en estado sólido

Relación 20 a 3		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
1	0.4	0.1257
2	1.3	1.3273
3	3	7.0686
4	5.2	21.2372
5	7	38.4846

Fig 24. Crecimiento en superficie relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido



Tabla 20. Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 30:1 en fermentación en estado sólido

Relación 30 a 1		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm^2)
0	0	0.0000
1	1.2	1.1310
2	2.3	4.1548
3	3.8	11.3412
4	5	19.6350
5	6	28.2744

Fig 25. Crecimiento en superficie relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido



Tabla 21 Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 30:2 en fermentación en estado sólido

Relación 30 a 2		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm^2)
0	0	0.0000
1	1.4	1.5394
2	1.8	2.5447
3	3.5	9.6212
4	4.8	18.0956
5	5.2	21.2372

Fig 26. Crecimiento en superficie relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido

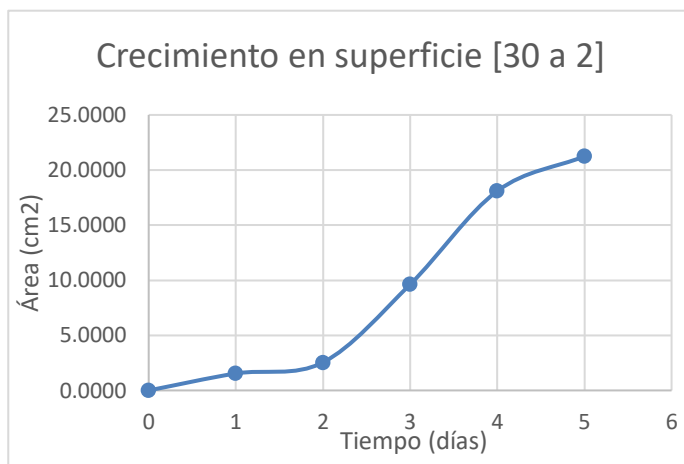


Tabla 22. Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 30:3 en fermentación en estado sólido

Relación 30 a 3		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
1	0.8	0.5027
2	2.6	5.3093
3	4	12.5664
4	4.6	16.6191
5	5.3	22.0619

Fig 27. Crecimiento en superficie relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido

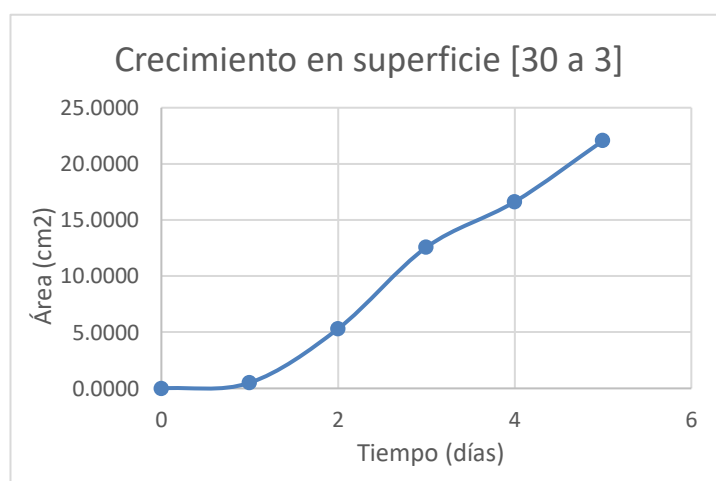


Tabla 23.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 40:1 en fermentación en estado sólido

Relación 40 a 1		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm^2)
0	0	0.0000
1	0.3	0.0707
2	0.4	0.1257
3	1	0.7854
4	1	0.7854
5	1.3	1.3273

Fig 28.Crecimiento en superficie relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido



Tabla 24.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 40:2 en fermentación en estado sólido

Relación 40 a 2		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm^2)
0	0	0.0000
1	0.3	0.0707
2	0.7	0.3848
3	1.3	1.3273
4	1.5	1.7672
5	2	3.1416

Fig 29.Crecimiento en superficie relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido

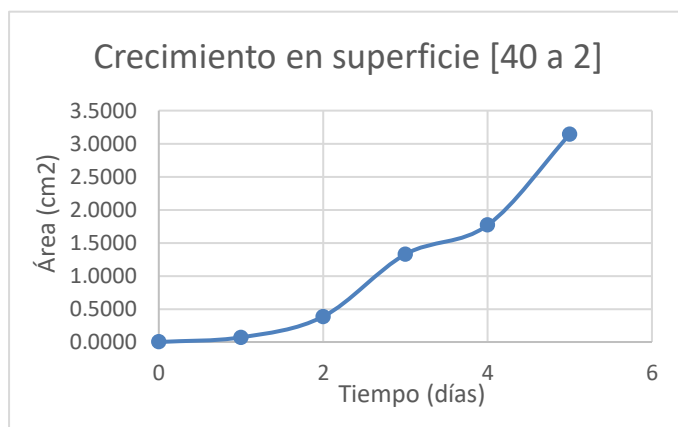


Tabla 25.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 40:3 en fermentación en estado sólido

Relación 40 a 3		
Tiempo (días)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
1	0.6	0.2827
2	1.4	1.5394
3	2.5	4.9088
4	2.7	5.7256
5	2.9	6.6052

Fig 30.Crecimiento en superficie relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido



Tabla 26. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:1

Relación 20 a 1		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.288	0.0057
2	0.259	0.0051
3	0.222	0.0044
4	0.128	0.0026
5	0.118	0.0024
6	0.322	0.0023

Fig 31. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L)

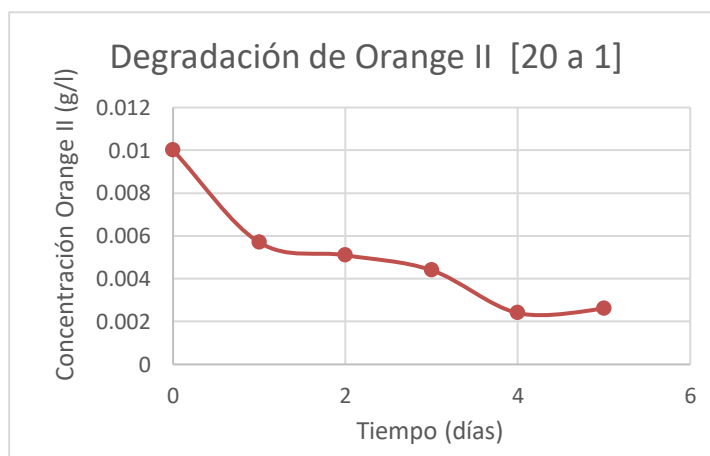


Tabla 27. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:2

Relación 20 a 2		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.231	0.0046
2	0.195	0.0039
3	0.13	0.0027
4	0.084	0.0018
5	0.112	0.0023
6	0.106	0.0022

Fig 32. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L)

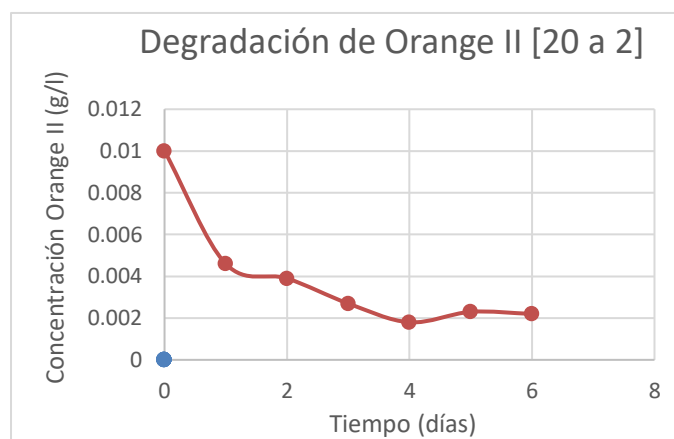


Tabla 28. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:3

Relación 20 a 3		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.253	0.0050
2	0.176	0.0035
3	0.083	0.0018
4	0.087	0.0018
5	0.102	0.0021
6	0.075	0.0016

Fig 33. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L)

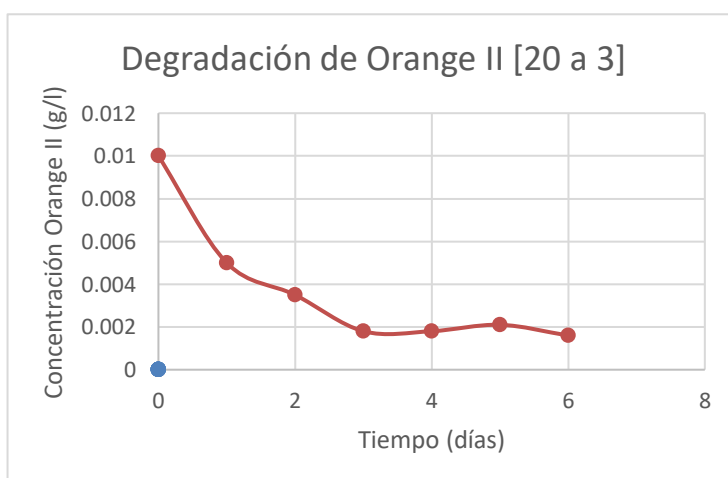


Tabla 29. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 30:1

Relación 30 a 1		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.228	0.0045
2	0.159	0.0032
3	0.28	0.0031
4	0.141	0.0029
5	0.084	0.0018
6	0.141	0.0017

Fig 34. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L)

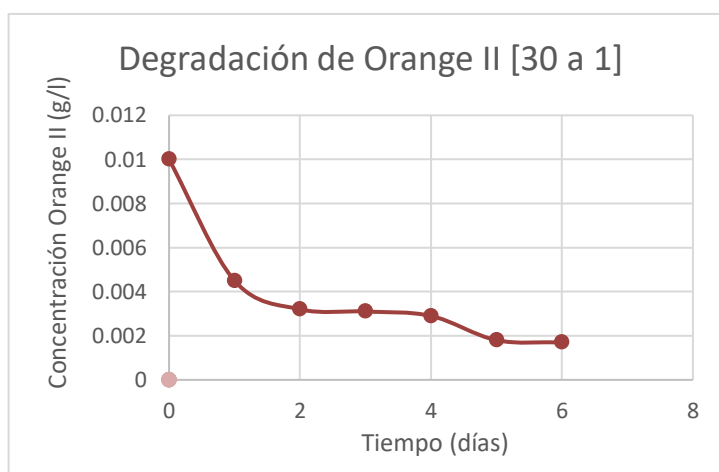


Tabla 30. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 30:2

Relación 30 a 2		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.261	0.0051
2	0.149	0.0030
3	0.061	0.0013
4	0.067	0.0015
5	0.062	0.0014
6	0.040	0.0009

Fig 35. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L)

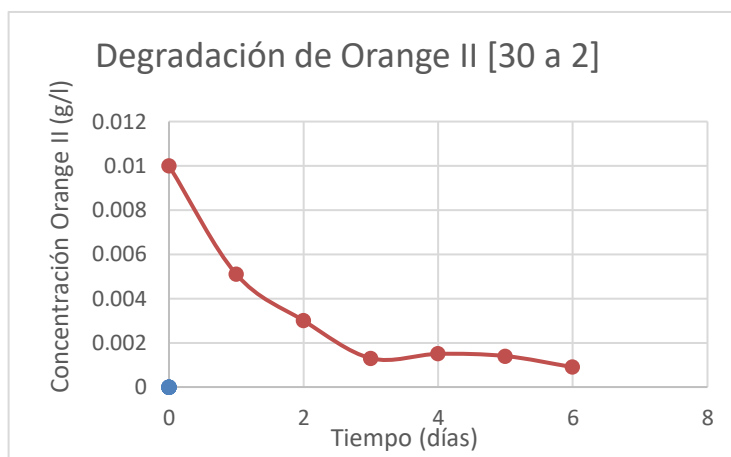


Tabla 31. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 30:3

Relación 30 a 3		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.308	0.0060
2	0.287	0.0056
3	0.083	0.0018
4	0.087	0.0018
5	0.086	0.0018
6	0.064	0.0014

Fig 36. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L)

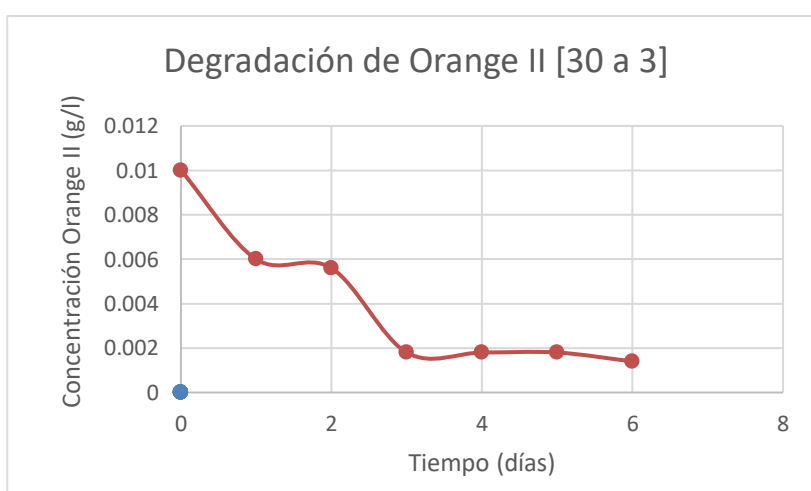


Tabla 32.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 40:1

Relación 40 a 1		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.213	0.0042
2	0.165	0.0033
3	0.118	0.0024
4	0.044	0.0019
5	0.091	0.0014
6	0.187	0.0014

Fig 37. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L)

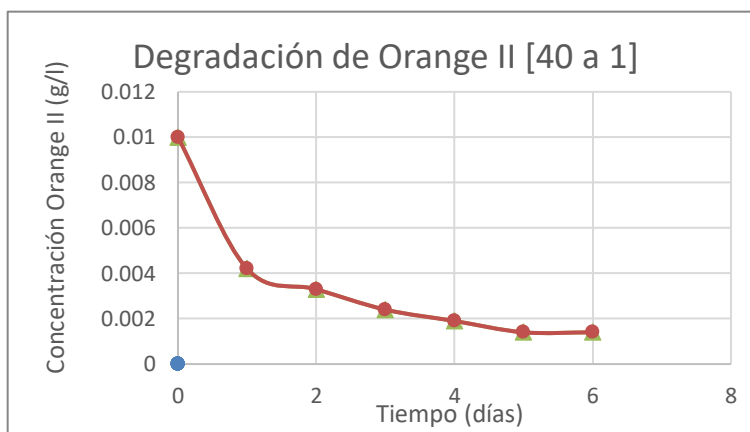


Tabla 33.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 40:2

Relación 40 a 2		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.291	0.0057
2	0.196	0.0039
3	0.052	0.0012
4	0.044	0.0010
5	0.04	0.0009
6	0.176	0.0008

Fig 38. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete* sp en fermentación en estado líquido, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L)

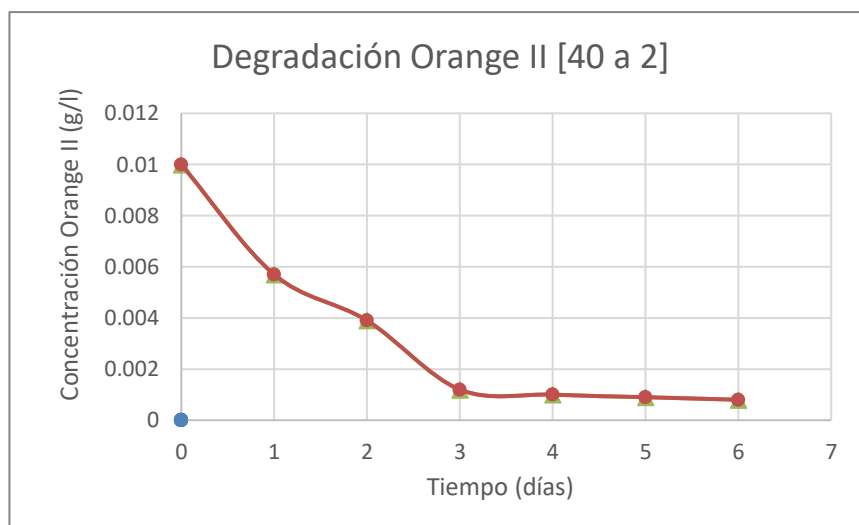


Tabla 34. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete* sp en relación 40:3

Relación 40 a 3		
Tiempo (días)	Absorbancia	Concentración g/l
0	0.517	0.0100
1	0.282	0.0055
2	0.191	0.0038
3	0.106	0.0022
4	0.059	0.0013
5	0.056	0.0013
6	0.141	0.0012

Fig 39. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete* sp en fermentación en estado líquido, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L)

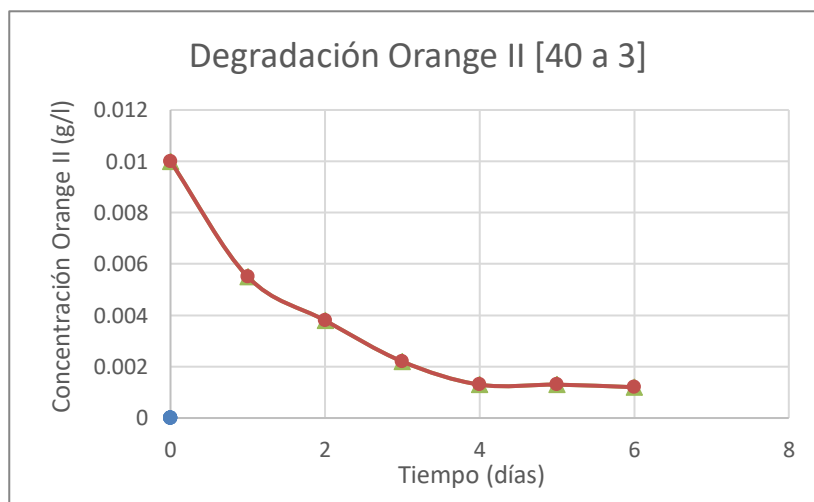
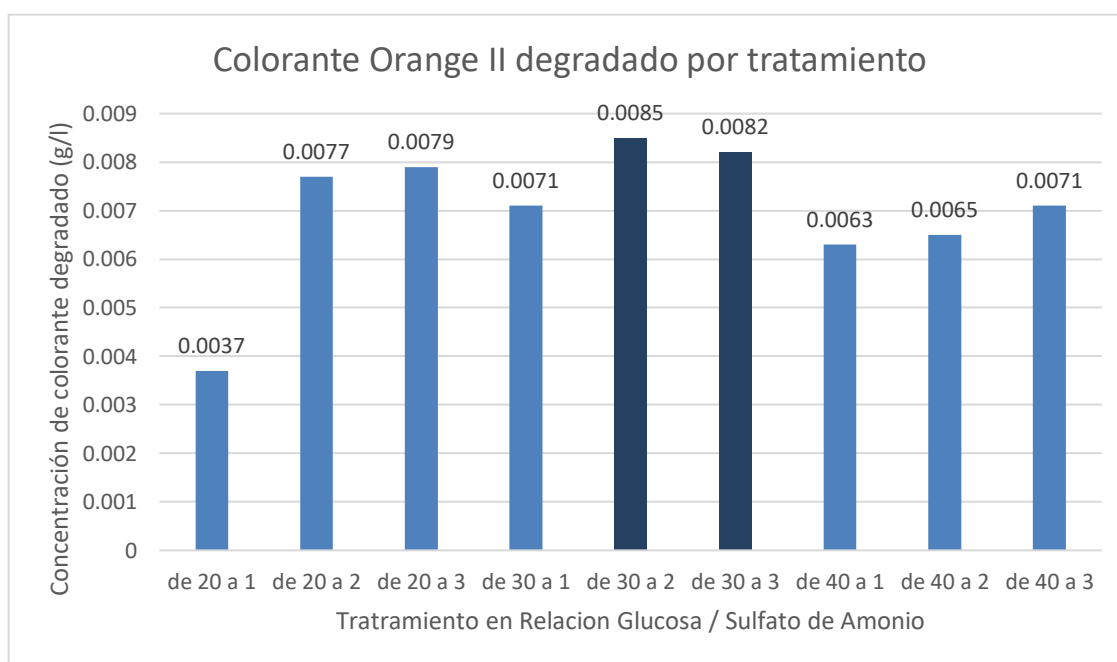


Tabla 35. Porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la primera réplica

Cantidad de colorante degradado por tratamientos g/l			
Nº	Tratamiento	Cantidad degradada	% degradado
1	20 a 1	0.000222	37
2	20 a 2	0.000462	77
3	20 a 3	0.000474	79
4	30 a 1	0.000426	71
5	30 a 2	0.00051	85
6	30 a 3	0.000492	82
7	40 a 1	0.000378	63
8	40 a 2	0.00039	65
9	40 a 3	0.000426	71
	Blanco	0	0

Fig 40. Promedio de degradación de colorante Orange II por tratamiento en fermentación líquida

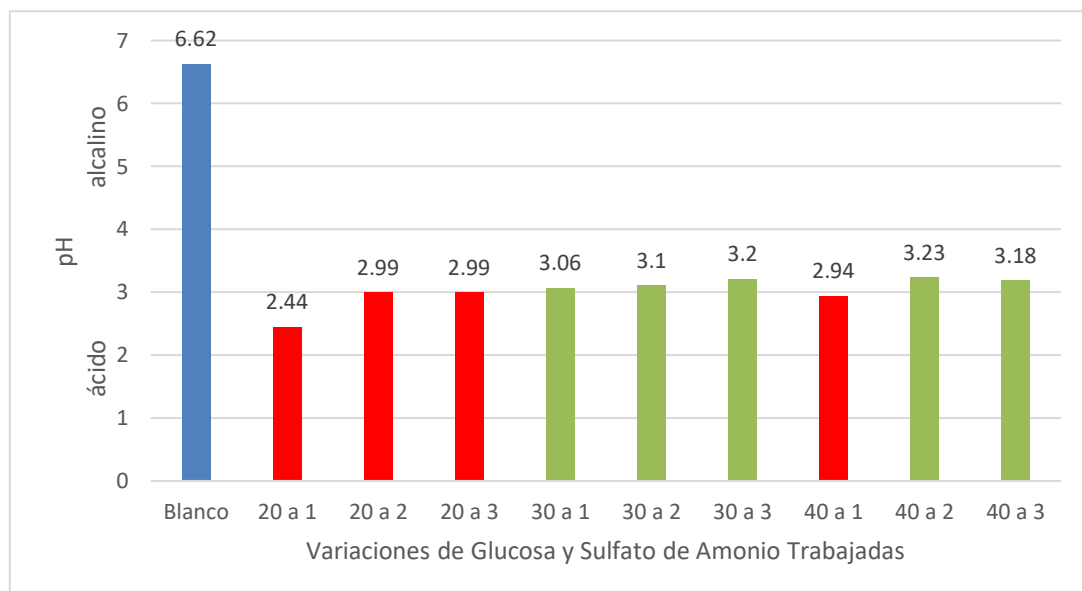


Nota: Se evidencia mayor cantidad de colorante Orange II degradado en relación de glucosa y sulfato de amonio de 30 a 2 y 30 a 3 en fermentación líquida

Tabla 36. Evaluación del pH al final del tratamiento

Muestra	pH
Blanco	6.62
20 a 1	2.44
20 a 2	2.99
20 a 3	2.99
30 a 1	3.06
30 a 2	3.1
30 a 3	3.2
40 a 1	2.94
40 a 2	3.23
40 a 3	3.18

Fig 41. Evaluación del pH al final del tratamiento en fermentación líquida



Nota: Evidencia del pH como factor importante para el funcionamiento de las enzimas. Afecta de manera contraproducente en la relación 20:1 para la desorción del colorante, como se muestran en los bloques rojos a diferencias de los bloques verdes en los cuales la degradación es mejor.

SEGUNDA REPLICA

Tabla 37. Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 20:1 en fermentación en estado sólido

Relación 20 a 1		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
24	3.8	11.3412
48	4	12.5664
72	4.8	18.0956
96	7.2	40.7151
120	7.6	45.3647

Fig 42. Crecimiento en superficie relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido

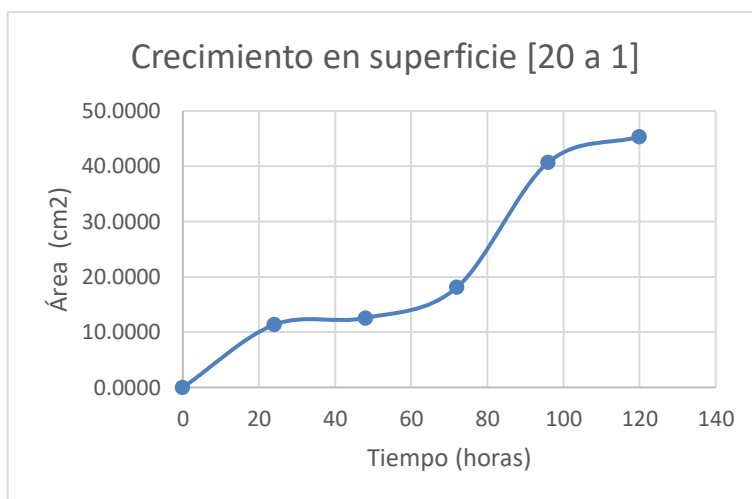


Tabla 38. Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 20:2 en fermentación en estado sólido

Relación 20 a 2		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
24	4.75	17.7206
48	4.8	18.0956
72	5	19.6350
96	6.2	30.1908
120	6.6	34.2120

Fig 43.Crecimiento en superficie relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido

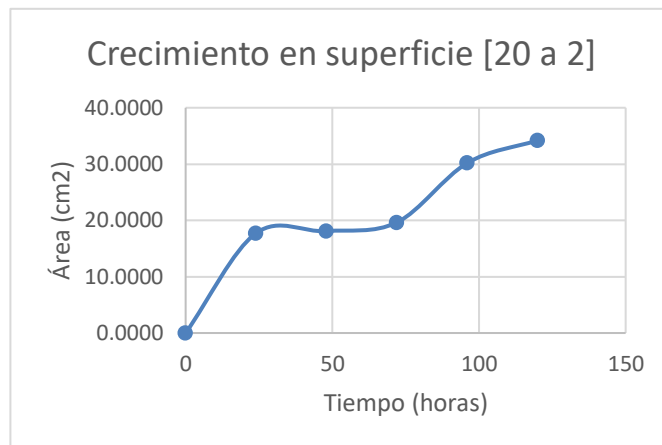


Tabla 39.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 20:3 en fermentación en estado sólido

Relación 20 a 3		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
24	4.8	18.0956
48	5.5	23.7584
72	5.9	27.3398
96	6.88	37.1764
120	7.3	41.8540

Fig 44.Crecimiento en superficie relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido

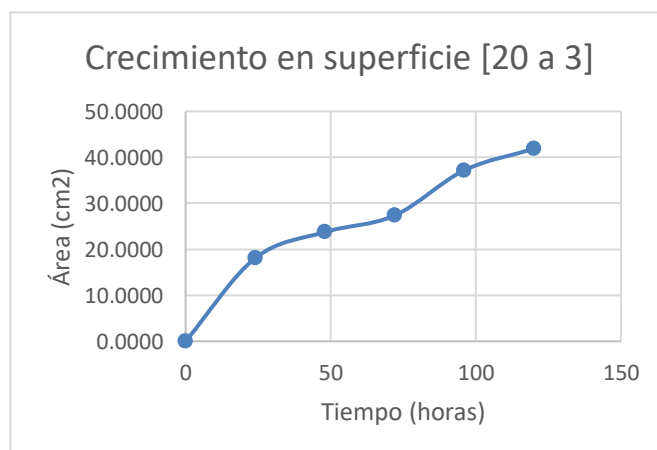


Tabla 40.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 30:1 en fermentación en estado sólido

Relación 30 a 1		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
24	5.85	26.8784
48	9.5	70.8824
72	9.5	70.8824
96	9.5	70.8824
120	9.5	70.8824

Fig 45.Crecimiento en superficie relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido

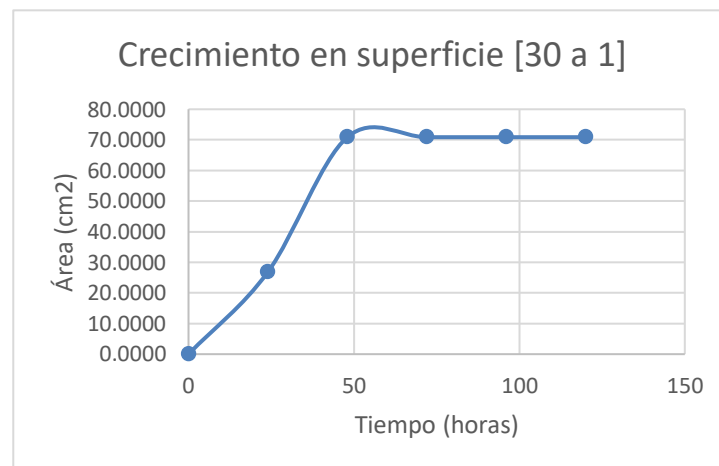


Tabla 41.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 30:2 en fermentación en estado sólido

Relación 30 a 2		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
24	5.6	24.6301
48	8.3	54.1062
72	8.3	54.1062
96	8.3	54.1062
120	8.3	54.1062

Fig 46.Crecimiento en superficie relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido

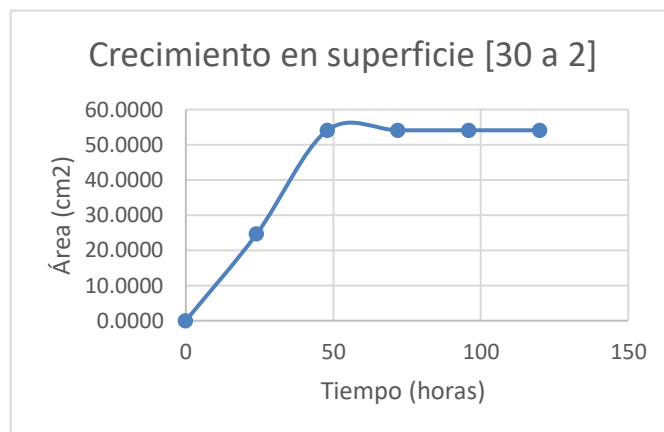


Tabla 42.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 30:3 en fermentación en estado sólido

Relación 30 a 3		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
24	6.4	32.1700
48	6.65	34.7324
72	6.7	35.2566
96	7.3	41.8540
120	8	50.2656

Fig 47.Crecimiento en superficie relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido

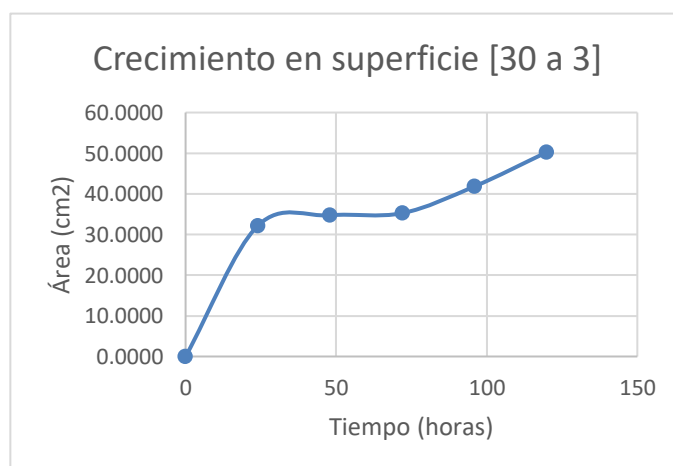


Tabla 43.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 40:1 en fermentación en estado sólido

Relación 40 a 1		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm^2)
0	0	0.0000
24	6.4	32.1700
48	7.28	41.6249
72	7.8	47.7837
96	7.9	49.0168
120	8.2	52.8103

Fig 48.Crecimiento en superficie relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L), fermentación en estado sólido

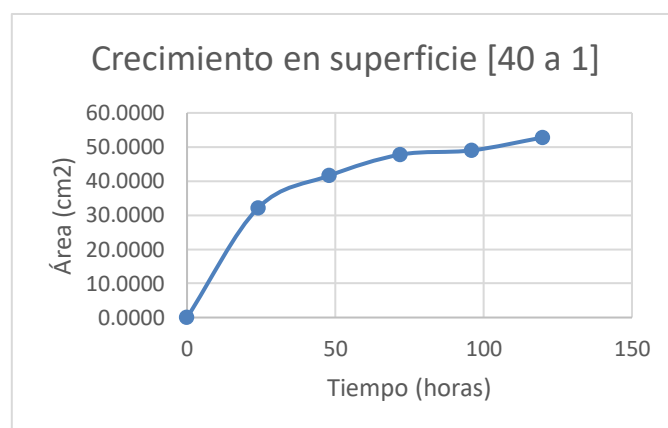


Tabla 44.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 40:2 en fermentación en estado sólido

Relación 40 a 2		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm^2)
0	0	0.0000
24	8.65	58.7656
48	8.7	59.4469
72	8.7	59.4469
96	8.8	60.8214
120	9.2	66.4763

Fig 49.Crecimiento en superficie relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L), fermentación en estado sólido

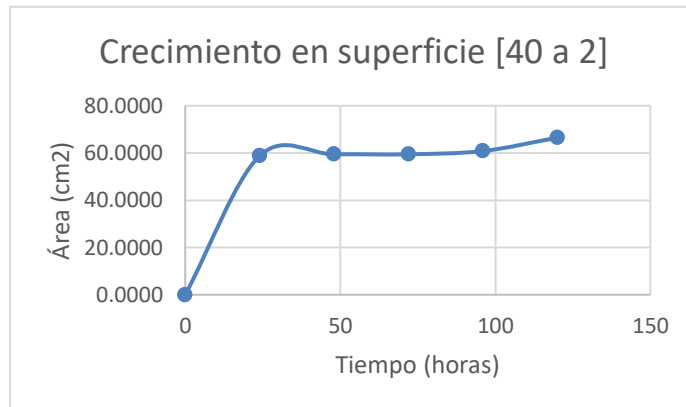


Tabla 45.Crecimiento de *Phanerochaete sp* en relación 40:3 en fermentación en estado sólido

Relación 40 a 3		
Tiempo (h)	Diámetro (cm)	Área (cm ²)
0	0	0.0000
24	8.4	55.4178
48	8.8	60.8214
72	9	63.6174
96	9.1	65.0390
120	9.5	70.8824

Fig 50.Crecimiento en superficie relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L), fermentación en estado sólido

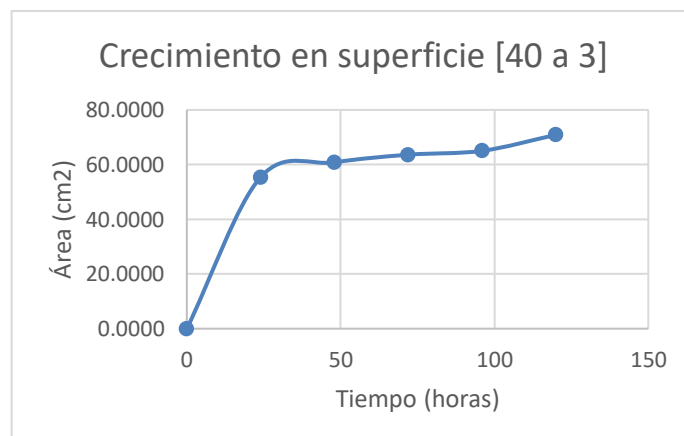


Tabla 46.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:1

Muestra	20 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0048
48	0.0042
72	0.0022
96	0.0019
120	0.0016

Fig 51.Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L)

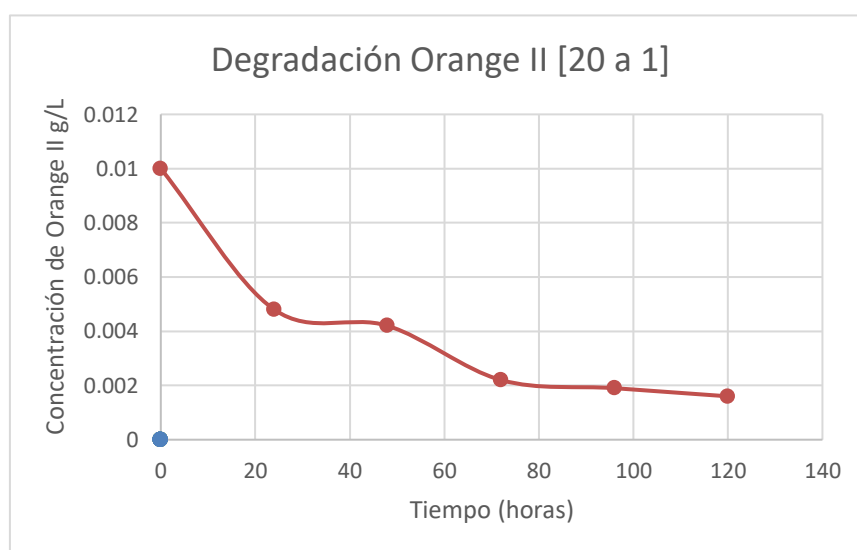


Tabla 47.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:2

Muestra	20 a 2
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0061
48	0.0037
72	0.0019
96	0.0016
120	0.0014

Fig 52. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L)

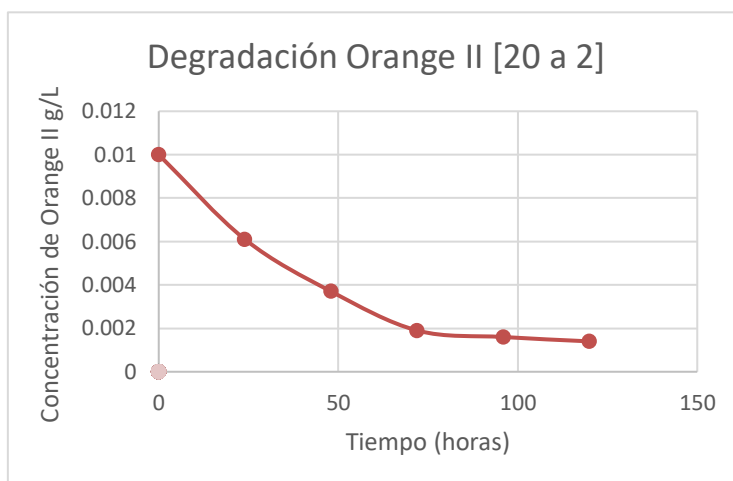


Tabla 48. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:3

Muestra	20 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0038
48	0.0030
72	0.0027
96	0.0015
120	0.0014

Fig 53. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L)

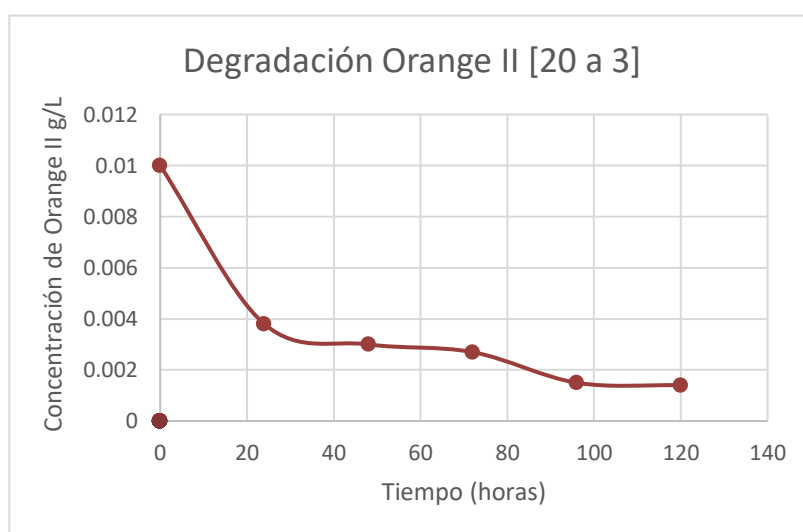


Tabla 49.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 30:1

Muestra	30 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0047
48	0.0034
72	0.0031
96	0.0020
120	0.0019

Fig 54.Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L)

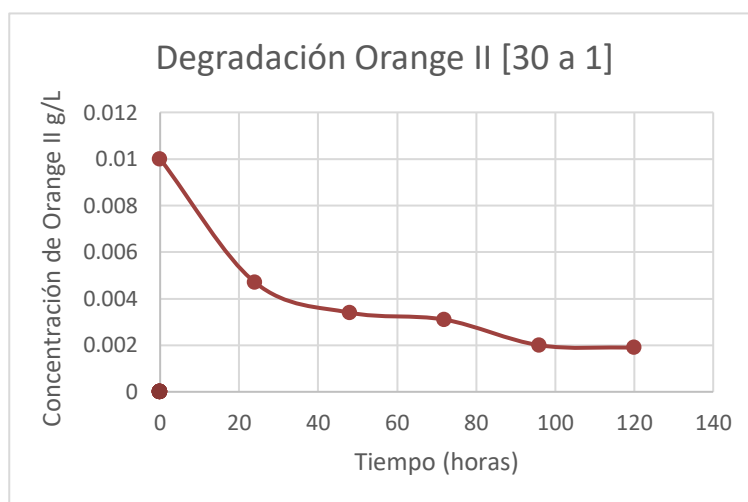


Tabla 50.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 30:2

Muestra	30 a 2
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0056
48	0.0032
72	0.0030
96	0.0016
120	0.0015

Fig 55. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete* sp en fermentación en estado líquido, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L)

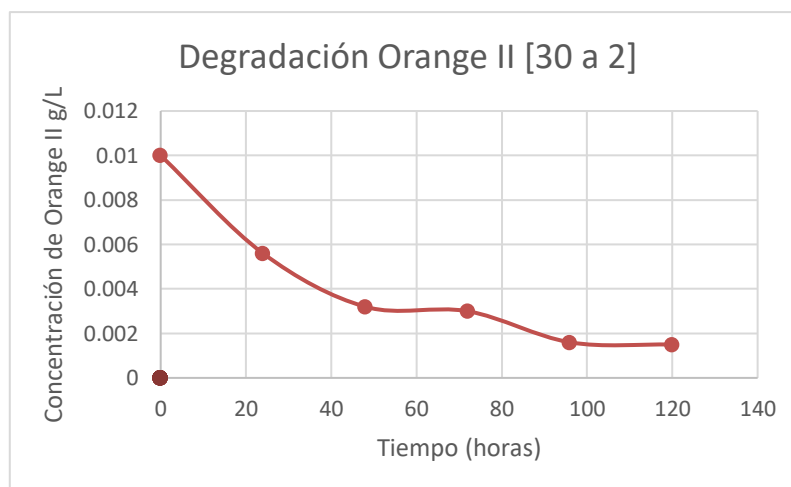


Tabla 51. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete* sp en relación 30:3

Muestra	30 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0080
48	0.0038
72	0.0037
96	0.0016
120	0.0006

Fig 56. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete* sp en fermentación en estado líquido, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L)

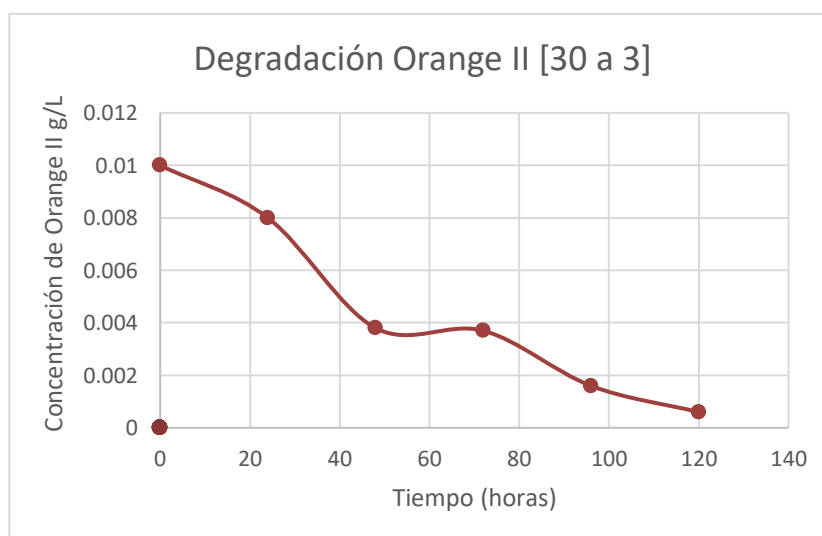


Tabla 52.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 40:1

Muestra	40 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0042
48	0.0034
72	0.0033
96	0.0017
120	0.0017

Fig 57.Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L)

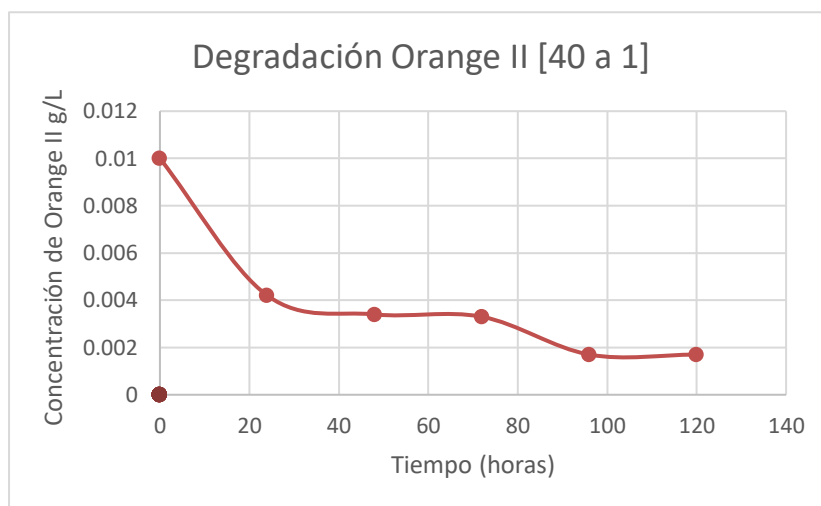


Tabla 53.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 40:2

Muestra	40 a 2
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0044
48	0.0037
72	0.0022
96	0.0007
120	0.0008

Fig 58. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete* sp en fermentación en estado líquido, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L)

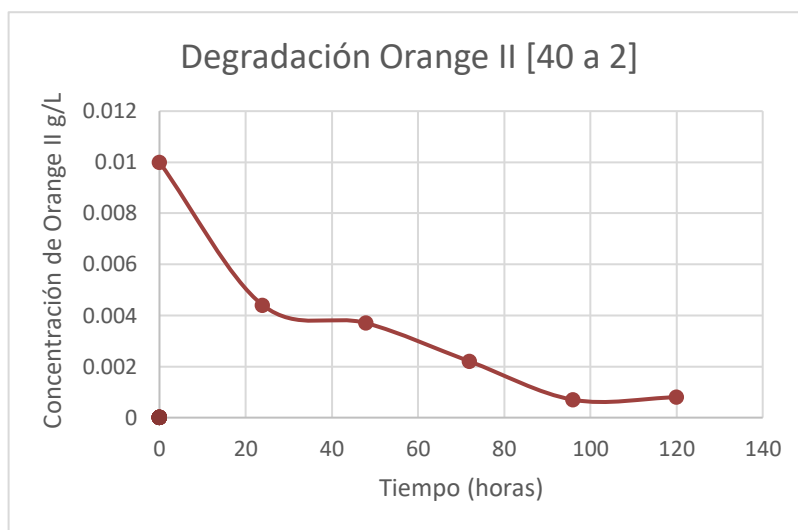


Tabla 54. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete* sp en relación 40:3

Muestra	40 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0049
48	0.0033
72	0.0031
96	0.0010
120	0.0009

Fig 59. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete* sp en fermentación en estado líquido, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L)

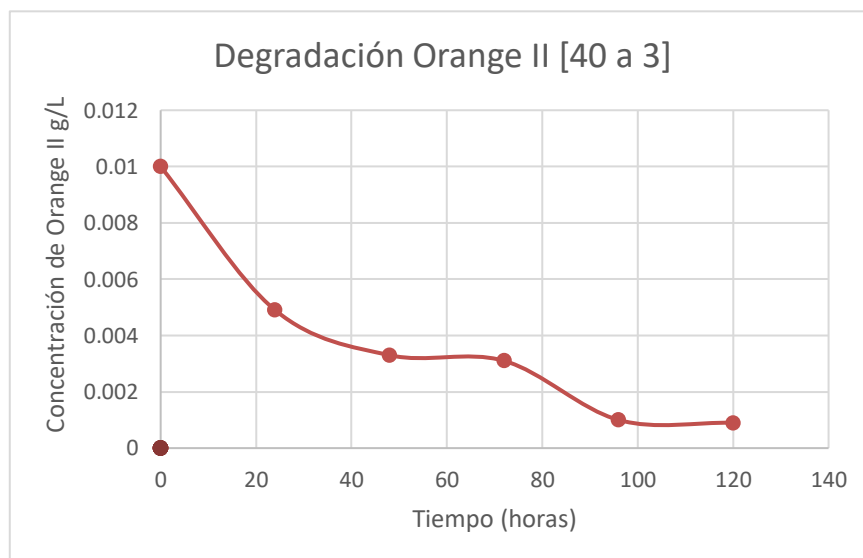
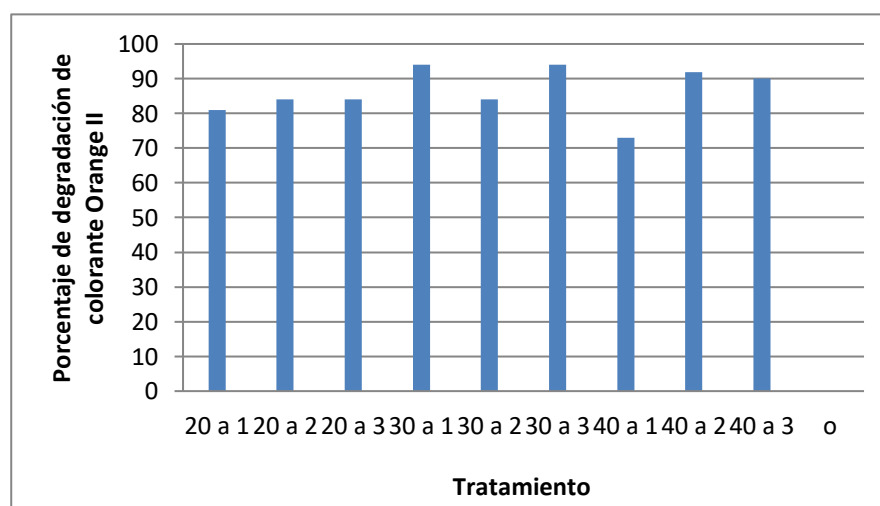


Tabla 55. Porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la segunda réplica

Cantidad de colorante degradado por tratamientos g/l			
Nº	Tratamiento	Cantidad degradada	% degradado
1	20 a 1	0.0081	81
2	20 a 2	0.0084	84
3	20 a 3	0.0084	84
4	30 a 1	0.0094	94
5	30 a 2	0.0084	84
6	30 a 3	0.0094	94
7	40 a 1	0.0073	73
8	40 a 2	0.0092	91.9
9	40 a 3	0.0090	90
	Blanco	0.0000	0

Fig 60. Porcentaje de degradación de colorante Orange II por tratamiento en fermentación líquida

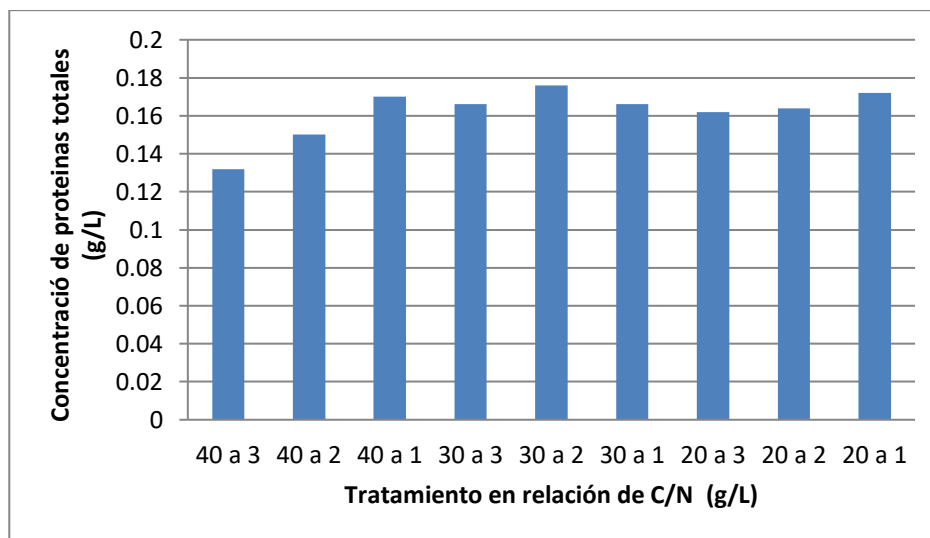


Nota: Se evidencia mayor cantidad de colorante Orange II degradado en relación de glucosa y sulfato de amonio de 30 a 1 y 30 a 3 en fermentación líquida

Tabla 56. Análisis de proteínas Totales por Metodo de Bradford en fermentación liquida en segunda replica

Réplica 2		
Nº	Tratamiento	Concentración g/l
1	40 a 3	0.132
2	40 a 2	0.150
3	40 a 1	0.170
4	30 a 3	0.166
5	30 a 2	0.176
6	30 a 1	0.166
7	20 a 3	0.162
8	20 a 2	0.164
9	20 a 1	0.172

Fig 61. Análisis de Proteínas Totales por Método de Bradford en fermentación liquida en la segunda réplica



TERCERA REPLICA

Tabla 57. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:1 en tercera replica

Muestra	20 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0040
48	0.0038
72	0.0032
96	0.003
120	0.0028

Fig 62. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L) en tercera réplica

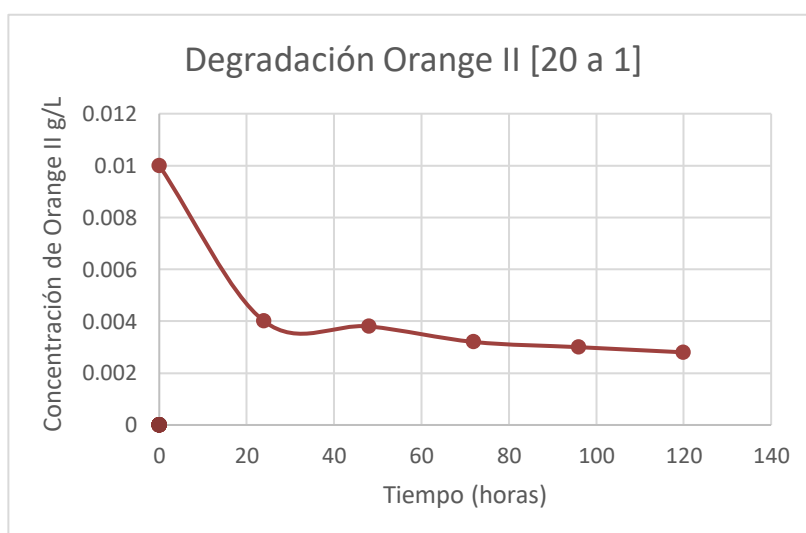


Tabla 58. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:2 en tercera réplica

Muestra	20 a 2
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0069
48	0.0041
72	0.0031
96	0.0031
120	0.0029

Fig 63. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L) en tercera réplica

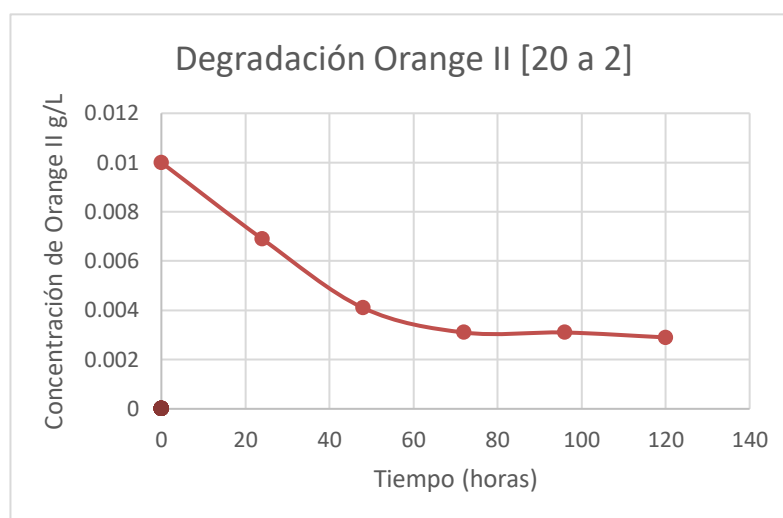


Tabla 59. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 20:3 en tercera réplica

Muestra	20 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0058
48	0.0037
72	0.0036
96	0.0033
120	0.0021

Fig 64. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L) en tercera réplica

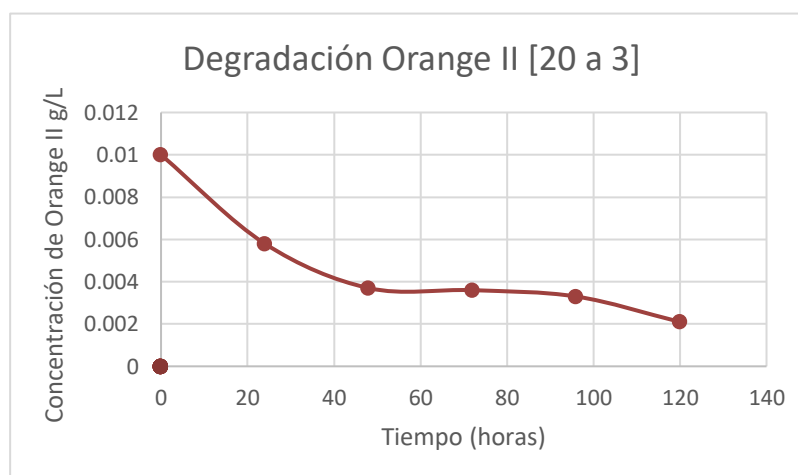


Tabla 60.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 30:1 en tercera réplica

Muestra	30 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0068
48	0.0047
72	0.0036
96	0.0030
120	0.0022

Fig 65.Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L) en tercera réplica

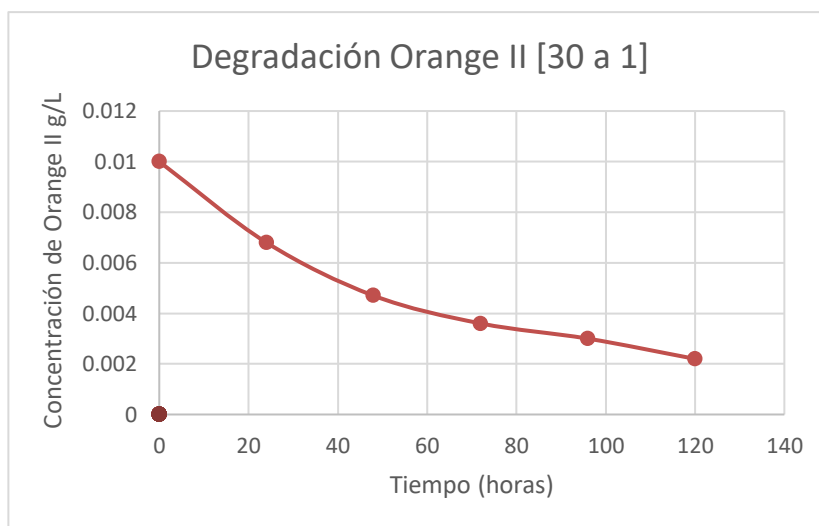


Tabla 61.Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 30:2 en tercera réplica

Muestra	30 a 2
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0079
48	0.0038
72	0.0032
96	0.0034
120	0.0019

Fig 66. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L) en tercera réplica

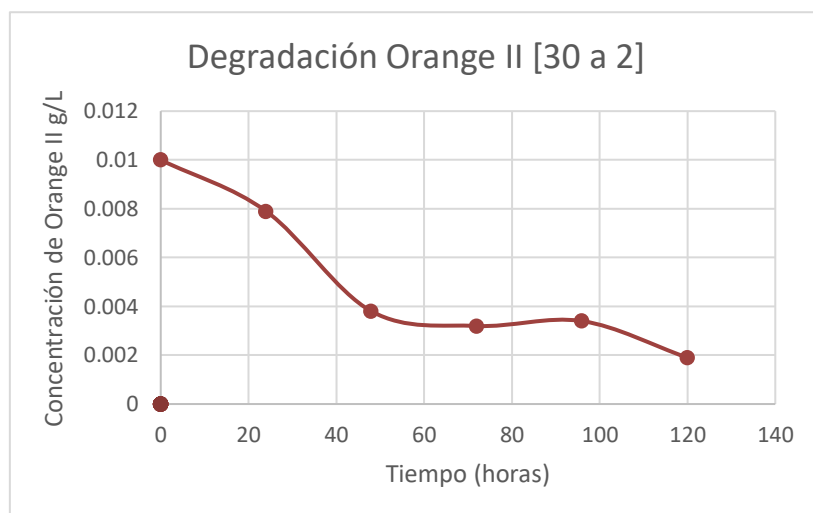


Tabla 62. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 30:3 en tercera réplica

Muestra	30 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0070
48	0.0031
72	0.0029
96	0.0028
120	0.0016

Fig 67. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L) en tercera réplica

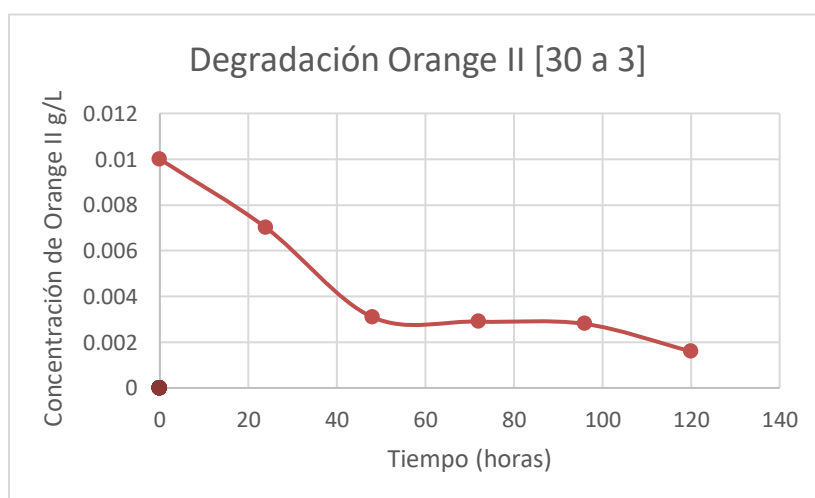


Tabla 63. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 40:1 en tercera réplica

Muestra	40 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0072
48	0.0055
72	0.0032
96	0.0030
120	0.0027

Fig 68. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L) en tercera réplica

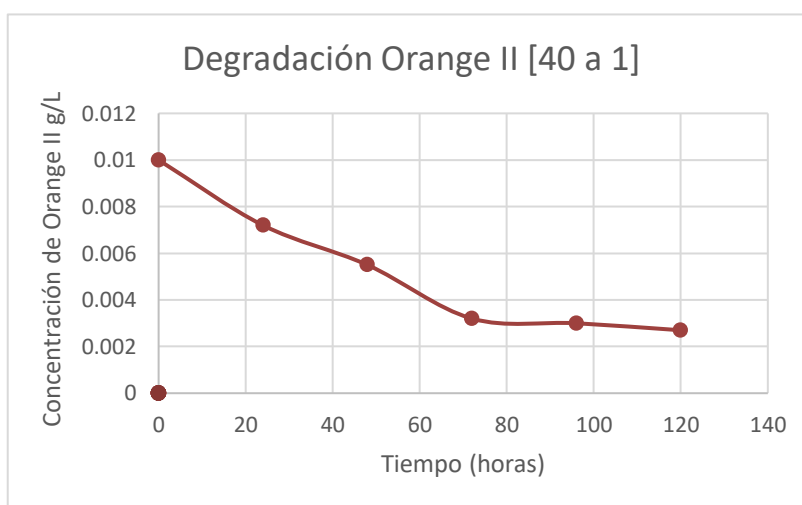


Tabla 64. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 40:2 en tercera réplica

Muestra	40 a 2
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0062
48	0.0044
72	0.0032
96	0.0030
120	0.0008

Fig 69. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L) en tercera réplica

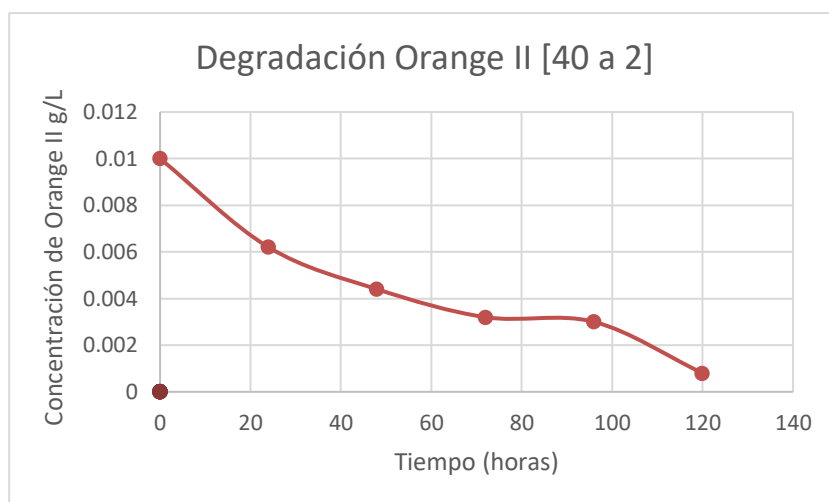


Tabla 65. Degradación del Colorante Orange II en fermentación líquida por *Phanerochaete sp* en relación 40:3 en tercera réplica

Muestra	40 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de Orange II g/l
0	0.0100
24	0.0087
48	0.0081
72	0.0036
96	0.0030
120	0.0026

Fig 70. Concentración de degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L) en tercera réplica

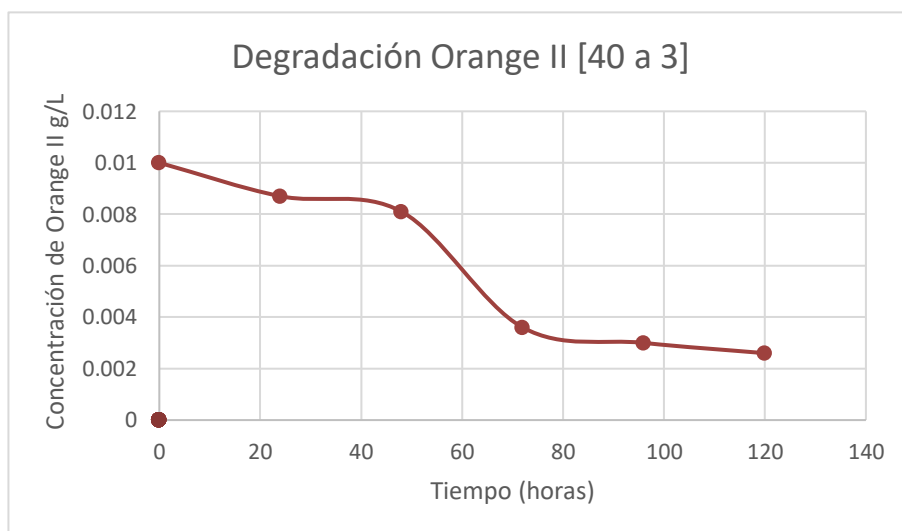
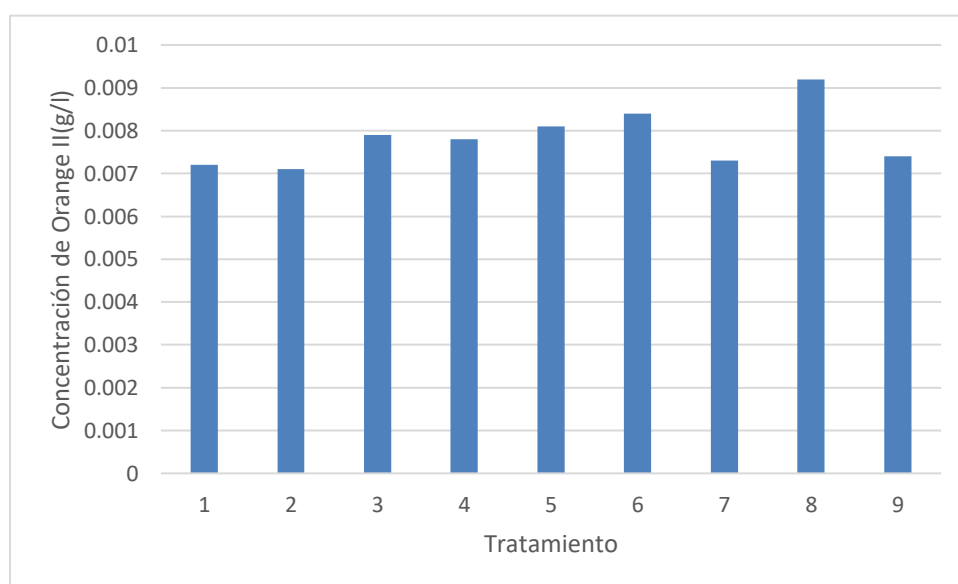


Tabla 66. Porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la tercera réplica

Cantidad de colorante degradado por tratamientos g/L			
Nº	Tratamiento	Cantidad degradada	% degradado
1	20 a 1	0.0072	72
2	20 a 2	0.0071	71
3	20 a 3	0.0079	79
4	30 a 1	0.0078	78
5	30 a 2	0.0081	81
6	30 a 3	0.0084	84
7	40 a 1	0.0073	73
8	40 a 2	0.0092	91.9
9	40 a 3	0.0074	74
	Blanco	0	0

Fig 71. Diagrama de barras de porcentaje de colorante Orange II degradado a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en fermentación líquida en la tercera réplica



Nota : Se evidencia mayor cantidad de colorante Orange II degradado en relación de glucosa y sulfato de amonio de 40 a 2 en fermentación líquida

Tabla 67. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 20:1 en la tercera réplica

Muestra	20 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de glucosa g/l
0	5.5
24	1.09
48	0.78
72	0.62
96	0.11
120	0.09

Fig 72. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera réplica

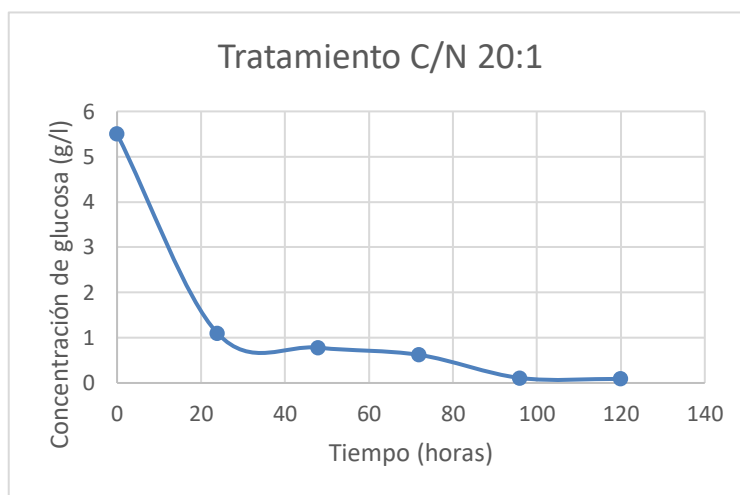


Tabla 68. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 20:2 en la tercera réplica

Muestra	20 a 2
Tiempo (hrs)	Concentración de glucosa g/l
0	5.5
24	1.21
48	0.77
72	0.56
96	0.41
120	0.12

Fig 73. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera réplica

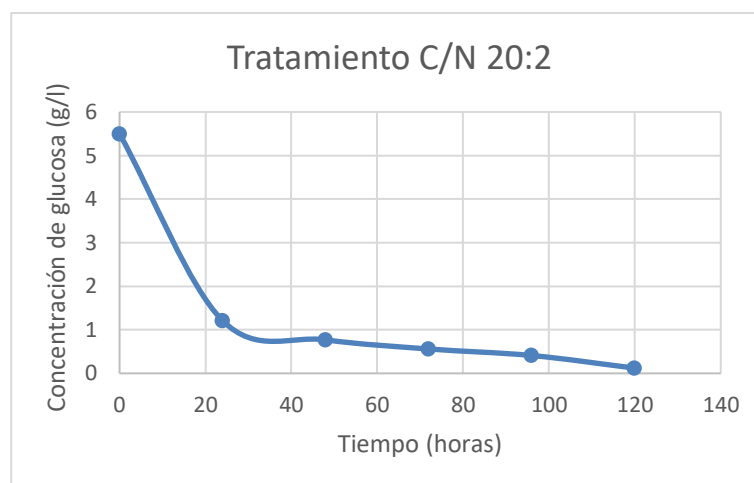


Tabla 69. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 20:3 en la tercera réplica

Muestra	20 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de glucosa g/l
0	5.5
24	0.86
48	0.76
72	0.65
96	0.41
120	0.19

Fig 74. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera réplica

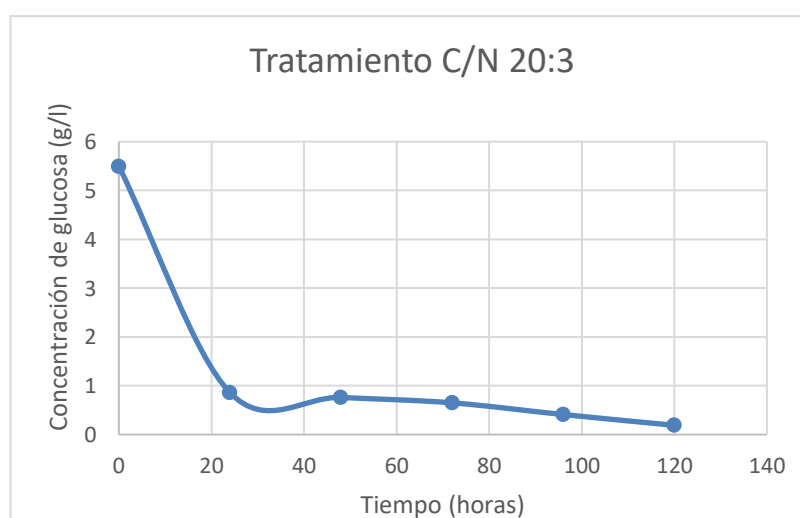


Tabla 70. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 30:1 en la tercera réplica

Muestra	30 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de glucosa g/l
0	8.25
24	2.71
48	1.45
72	1.09
96	0.28
120	0.17

Fig 75. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera réplica

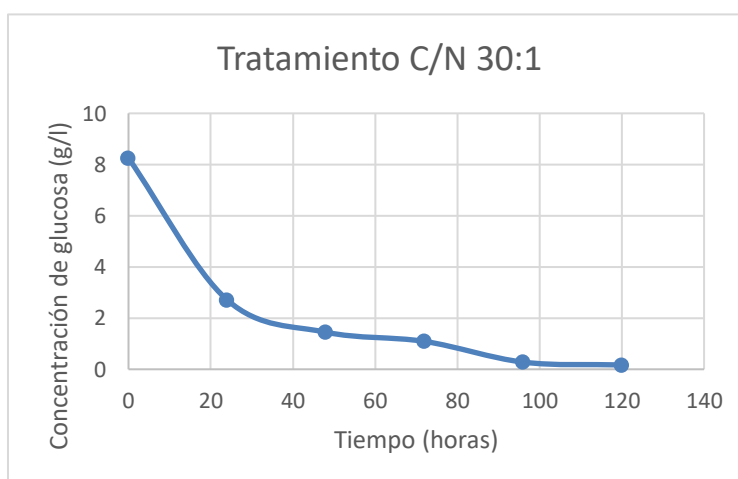


Tabla 71. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 30:2 en la tercera réplica

Muestra	30 a 2
Tiempo (hrs)	Concentración de glucosa g/l
0	8.25
24	2.26
48	1.42
72	0.95
96	0.13
120	0.08

Fig 76. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera réplica

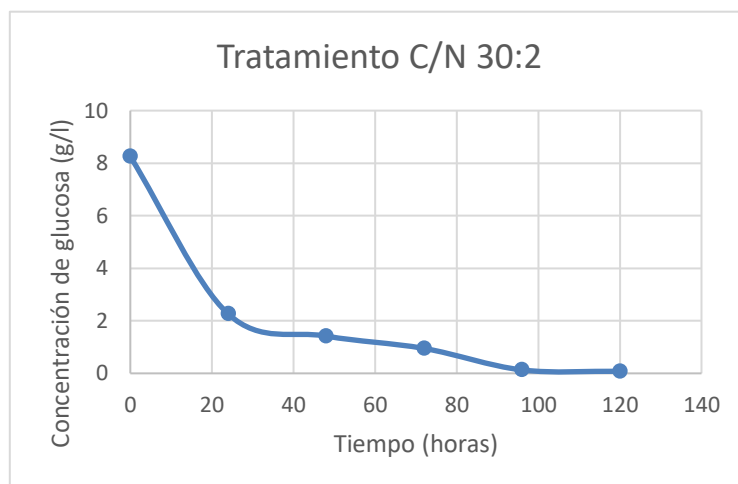


Tabla 72. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 30:3 en la tercera réplica

Muestra	30 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de glucosa g/l
0	8.25
24	2.03
48	1.36
72	0.99
96	0.72
120	0.53

Fig 77. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera réplica

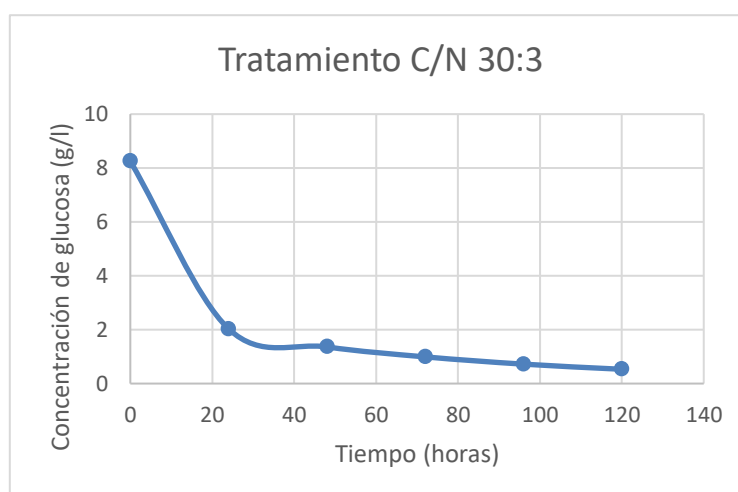


Tabla 73. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 40:1 en la tercera réplica

Muestra	40 a 1
Tiempo (hrs)	Concentración de glucosa g/l
0	5.5
24	3.13
48	1.67
72	0.59
96	0.32
120	0.28

Fig 78. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera réplica

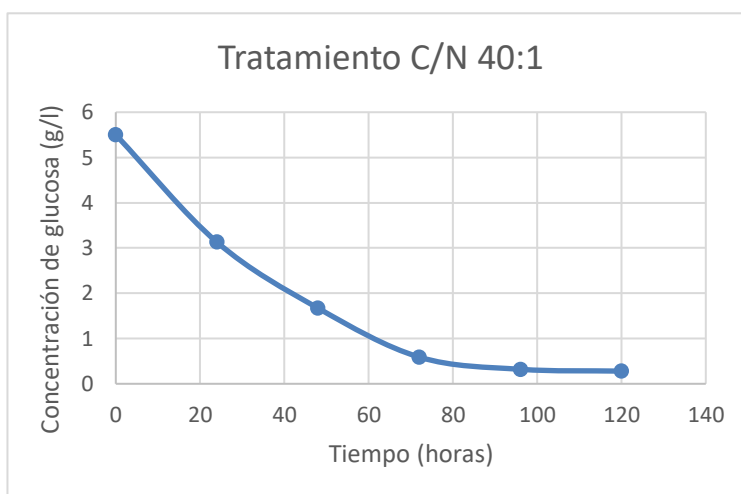


Tabla 74. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 40:2 en la tercera réplica

Muestra	40 a 2
Tiempo	Concentración de glucosa g/l
0	5.5
24	2.47
48	1.68
72	0.55
96	0.16
120	0.081

Fig 79. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera réplica

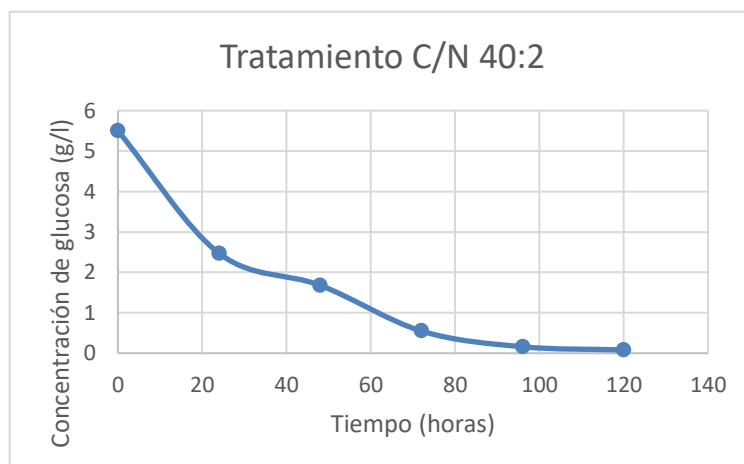


Tabla 75. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp*, tratamiento 40:3 en la tercera réplica

Muestra	40 a 3
Tiempo (hrs)	Concentración de glucosa g/l
0	5.5
24	2.64
48	0.72
72	0.69
96	0.42
120	0.22

Fig 80. Consumo de Glucosa por método DNS en la degradación del colorante Orange II por *Phanerochaete sp* en fermentación en estado líquido, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera réplica

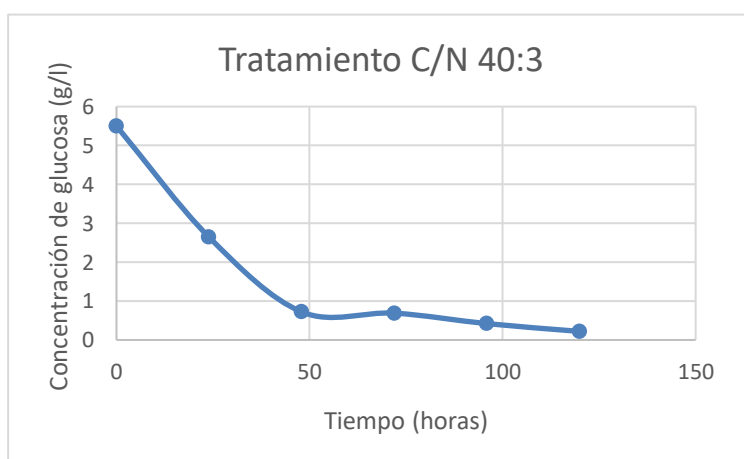


Tabla 76. Análisis de proteínas Totales por Metodo de Bradford en fermentación liquida en tercera réplica

Réplica 3		
Nº	Tratamiento	Concentración g/l
1	40 a 3	0.143
2	40 a 2	0.150
3	40 a 1	0.136
4	30 a 3	0.162
5	30 a 2	0.151
6	30 a 1	0.148
7	20 a 3	0.149
8	20 a 2	0.159
9	20 a 1	0.152

Fig 81. Diagrama de barras del análisis de proteínas Totales por Metodo de Bradford en fermentación liquida en tercera réplica

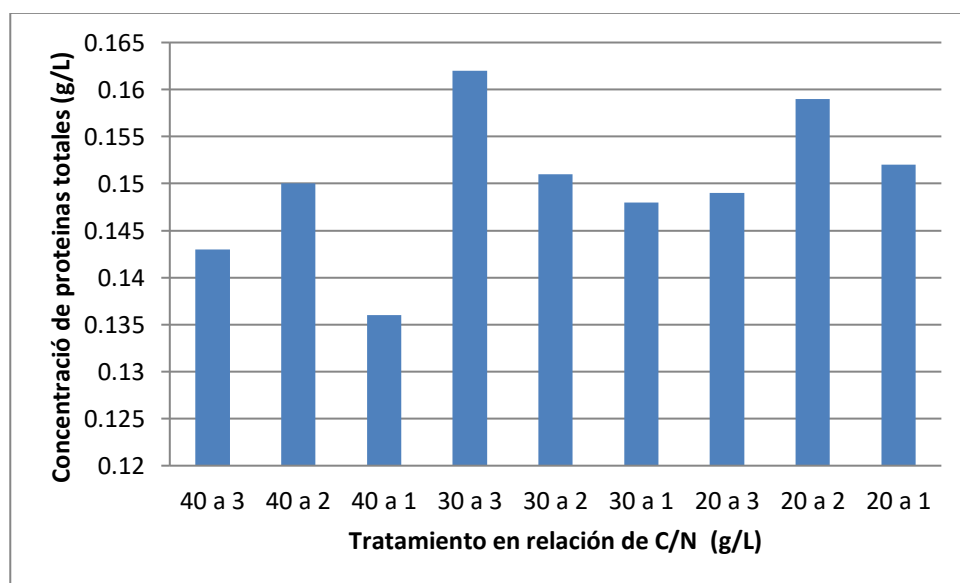


Tabla 77. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II en el tratamiento 20:1 de la tercera réplica

Muestra	20 a 1
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.004
48	0.005
72	0.008
96	0.004
120	0.006

Fig 82. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 20:1 (5.5 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera réplica

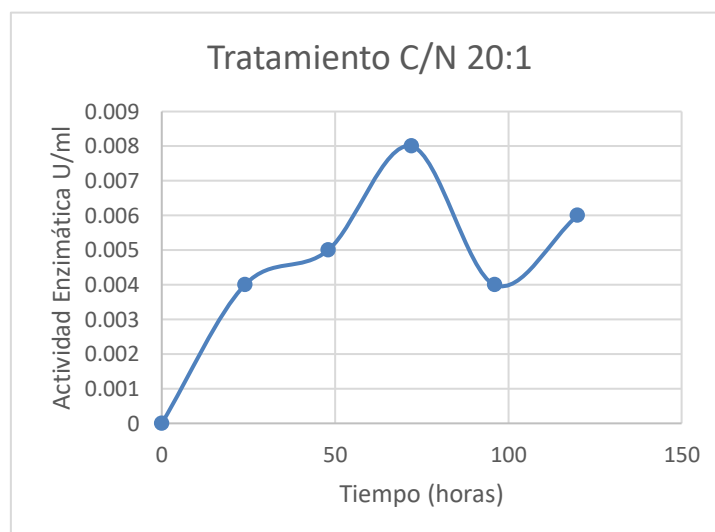


Tabla 78. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 20:2 en la tercera réplica

Muestra	20 a 2
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.008
48	0.016
72	0.016
96	0.162
120	0.12

Fig 83. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 20:2 (5.5 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera réplica

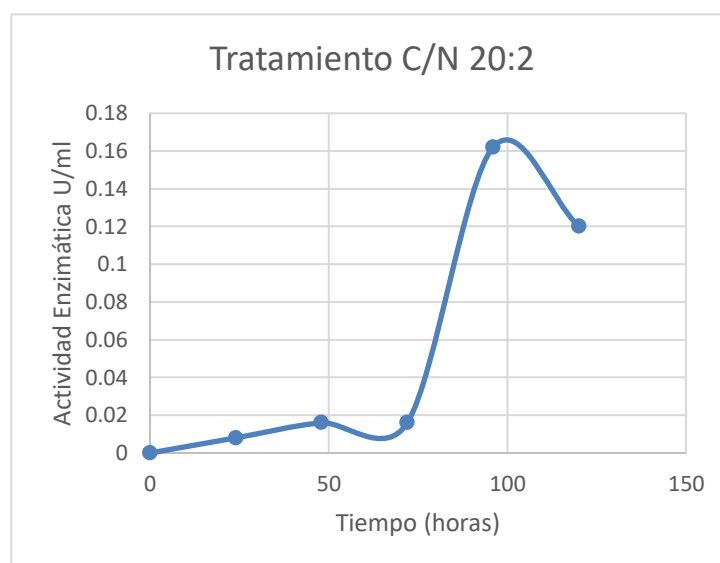


Tabla 79. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 20:3 en la tercera réplica

Muestra	20 a 3
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.002
48	0.005
72	0.028
96	0.051
120	0.042

Fig 84. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 20:3 (5.5 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera réplica

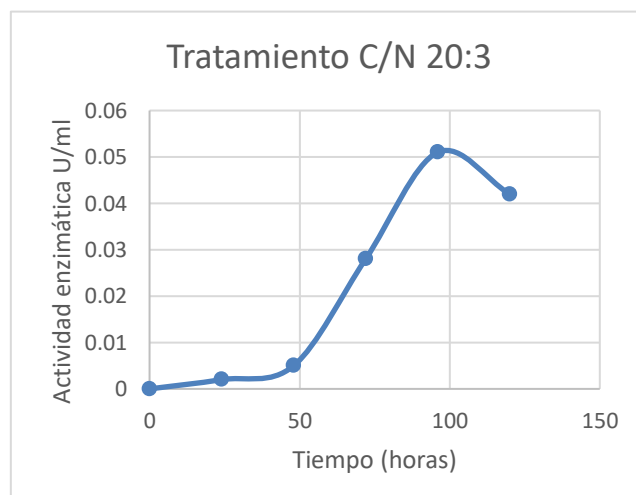


Tabla 80. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 30:1 en la tercera réplica

Muestra	30 a 1
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.004
48	0.004
72	0.004
96	0.007
120	0.006

Fig 85. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 30:1 (8.25 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera réplica

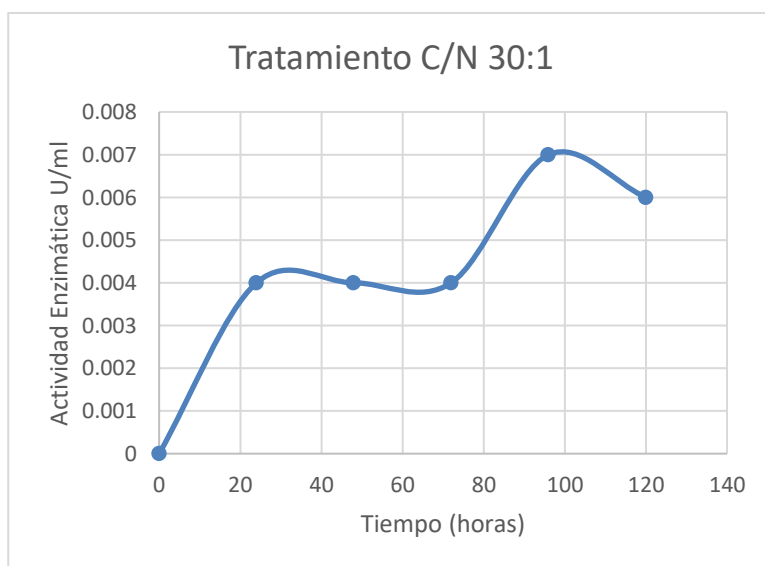


Tabla 81. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 30:2 en la tercera réplica

Muestra	30 a 2
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.001
48	0.01
72	0.02
96	0.004
120	0.0032

Fig 86. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 30:2 (8.25 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera réplica

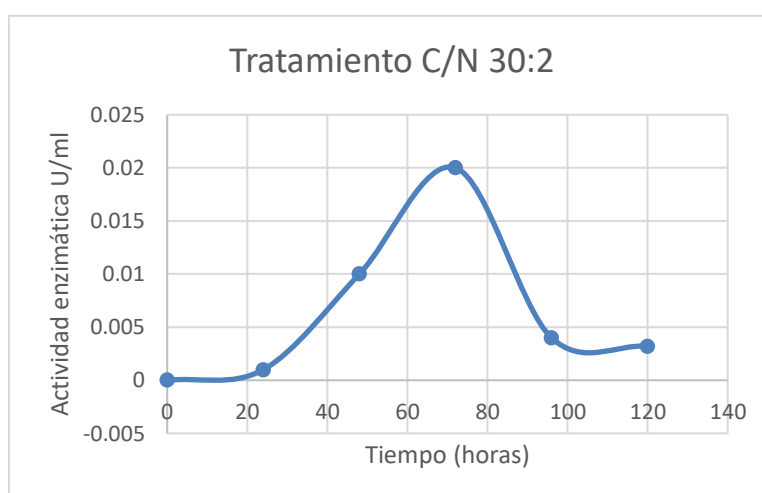


Tabla 82. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 30:3 en la tercera réplica

Muestra	30 a 3
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.048
48	0.021
72	0.012
96	0.032
120	0.026

Fig 87. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 30:3 (8.25 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera réplica

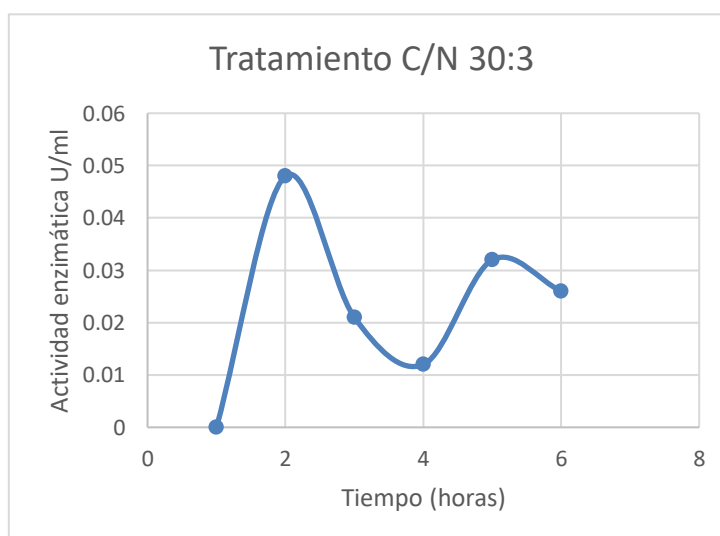


Tabla 83. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 40:1 en la tercera réplica

Muestra	40 a 1
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.001
48	0.004
72	0.015
96	0.026
120	0.023

Fig 88. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 40:1 (11 g/L ; 0.275 g/L) en la tercera réplica

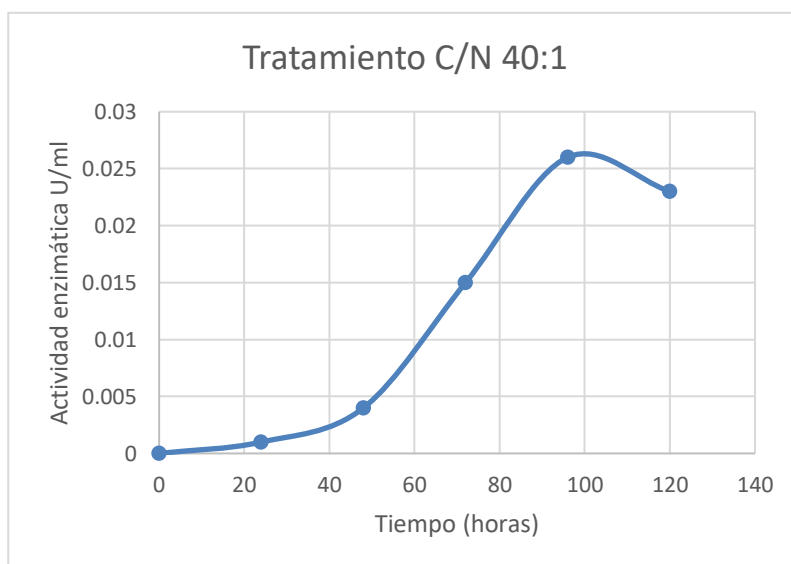


Tabla 84. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 40:2 en la tercera réplica

Muestra	40 a 2
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.004
48	0.001
72	0.014
96	0.042
120	0.034

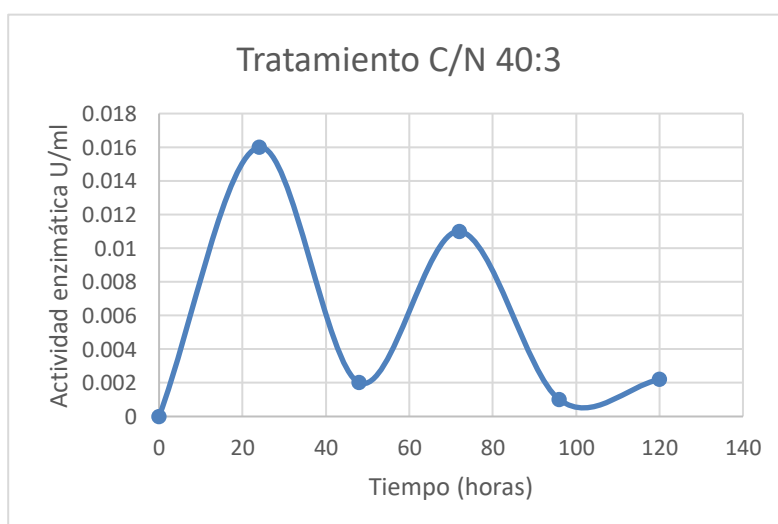
Fig 89. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 40:2 (11 g/L ; 0.55 g/L) en la tercera réplica



Tabla 85. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, tratamiento 40:3 en la tercera réplica

Muestra	40 a 3
Tiempo (hrs)	Actividad enzimática U/ml
0	0
24	0.016
48	0.002
72	0.011
96	0.001
120	0.0022

Fig 90. Actividad de la enzima Manganese Peroxidasa en la degradación del colorante Orange II, relación 40:3 (11 g/L ; 0.825 g/L) en la tercera réplica



ANEXO IV

Fig 91. Datos ingresados en el programa ANOVA

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Glucosa (L)	46.080	1	46.0800	0.403915	0.531630
Glucosa (Q)	412.234	1	412.2341	3.613445	0.070495
(2)Sulfato de amonio(L)	501.389	1	501.3889	4.394933	0.047765
Sulfato de amonio(Q)	126.347	1	126.3474	1.107500	0.304048
Error	2509.835	22	114.0834		
Total SS	3595.885	26			

ANOVA; Var.:Porcentaje de biodegradación; R-sqr=.30203; Adj.:17512 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs ([No active dataset]) in Workbook1) 2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=114.0834 DV: Porcentaje de biodegradación

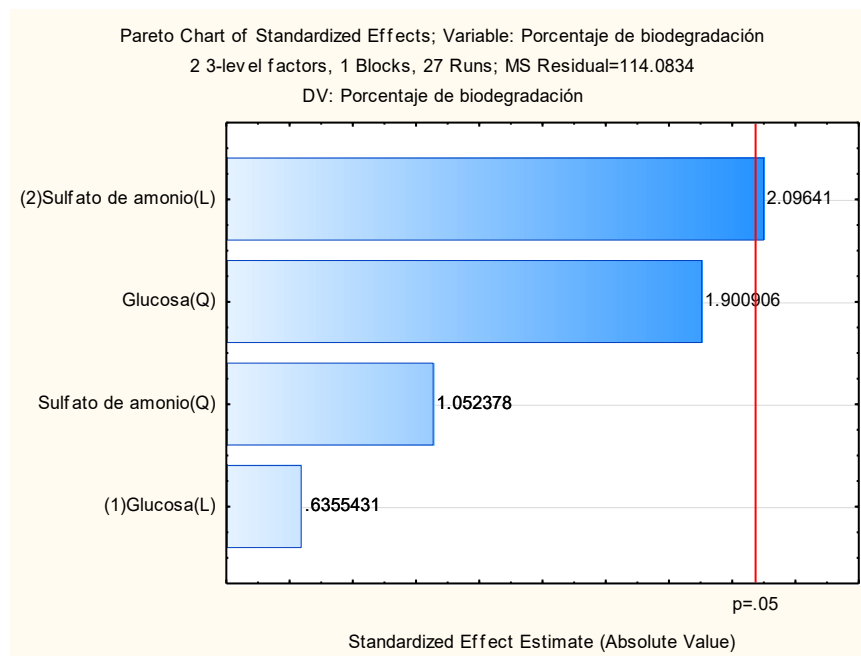


Fig 92. Diagrama de pareto de efecto estimado estándar

Fig 93. Datos ingresados en relación a la degradación de colorante Orange II

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Glucosa (L)	46.080	1	46.0800	0.359209	0.556415
Glucosa (Q)	412.234	1	412.2341	3.213503	0.089856
(2)Sulfato de amonio(L)	501.389	1	501.3889	3.908494	0.063566
Sulfato de amonio(Q)	126.347	1	126.3474	0.984920	0.334142
Lack of Fit	200.761	4	50.1904	0.391251	0.812155
Pure Error	2309.073	18	128.2819		
Total SS	3595.885	26			

ANOVA; Var.:Porcentaje de biodegradación; R-sqr=.30203; Adj.:17512 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs ([No active dataset]) in Workbook1) 2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Pure Error=128.2819 DV: Porcentaje de biodegradación

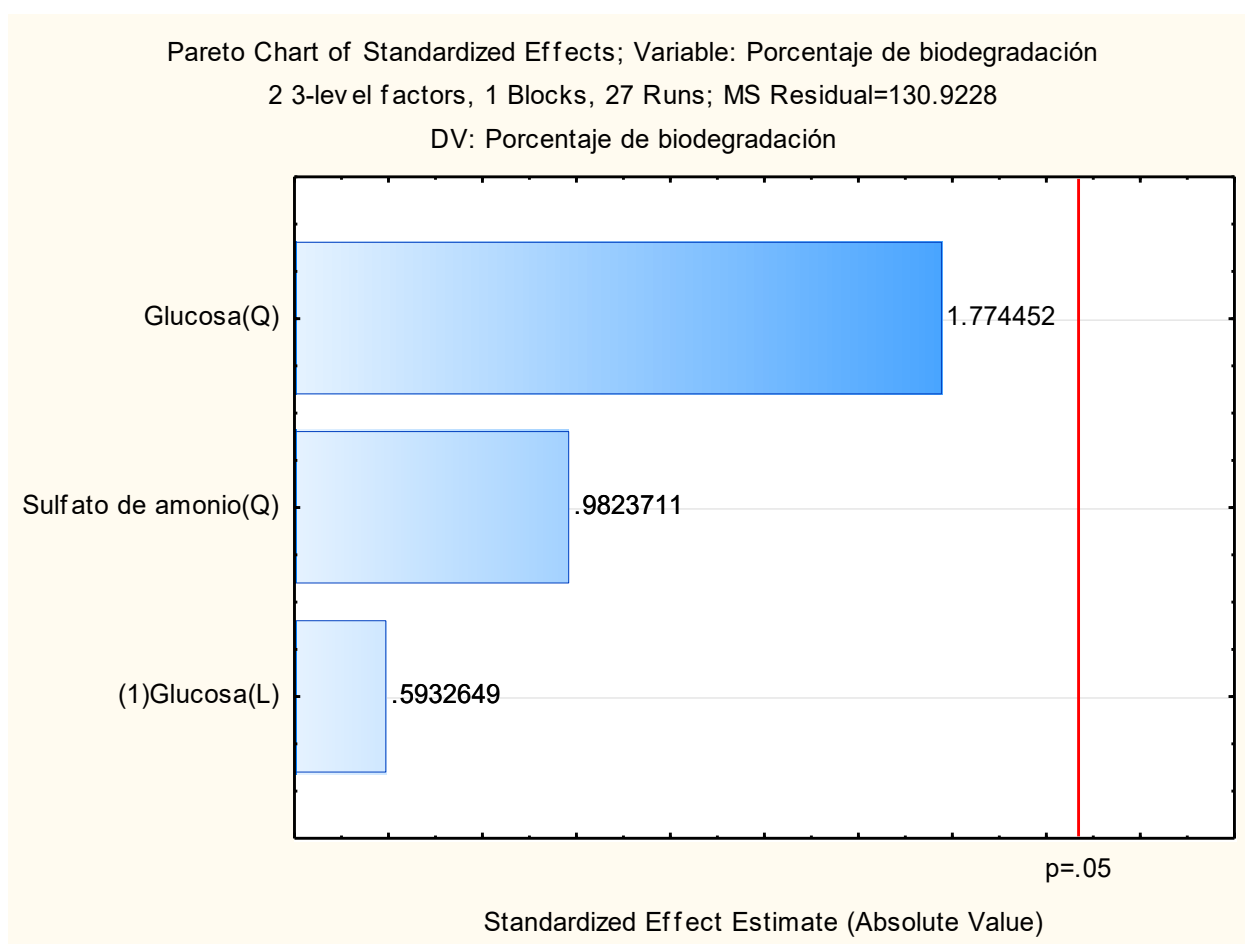


Fig 94. Diagrama de Pareto en relación a la degradación de colorante Orange II

Fig 95. Datos ingresados en el ANOVA con respecto al porcentaje de degradación de colorante Orange II

Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Glucosa (L)	46.080	1	46.0800	0.351963	0.558793
Glucosa (Q)	412.234	1	412.2341	3.148681	0.089228
Sulfato de amonio(Q)	126.347	1	126.3474	0.965053	0.336139
Error	3011.224	23	130.9228		
Total SS	3595.885	26			

ANOVA; Var.:Porcentaje de biodegradación; R-sqr=.16259; Adj:.05336 (3**(2-0) full factorial design, 1 block , 9 runs ([No active dataset]) in Workbook1) 2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=130.9228 DV: Porcentaje de biodegradación

Fig 96. Observación de Predicciones

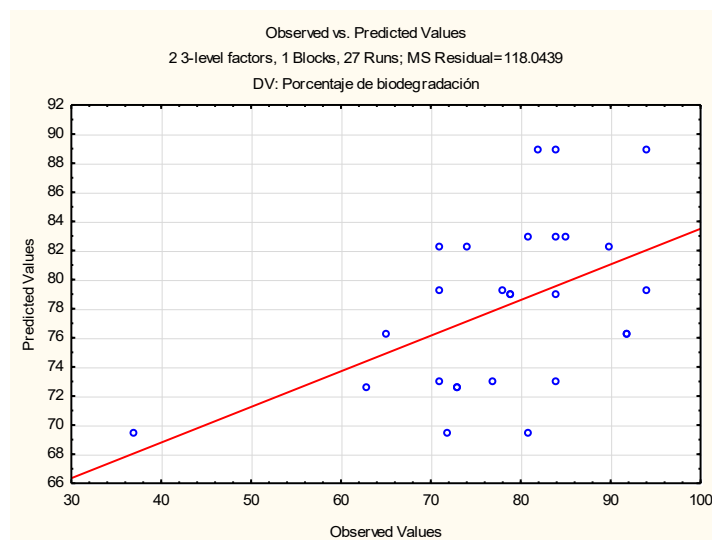
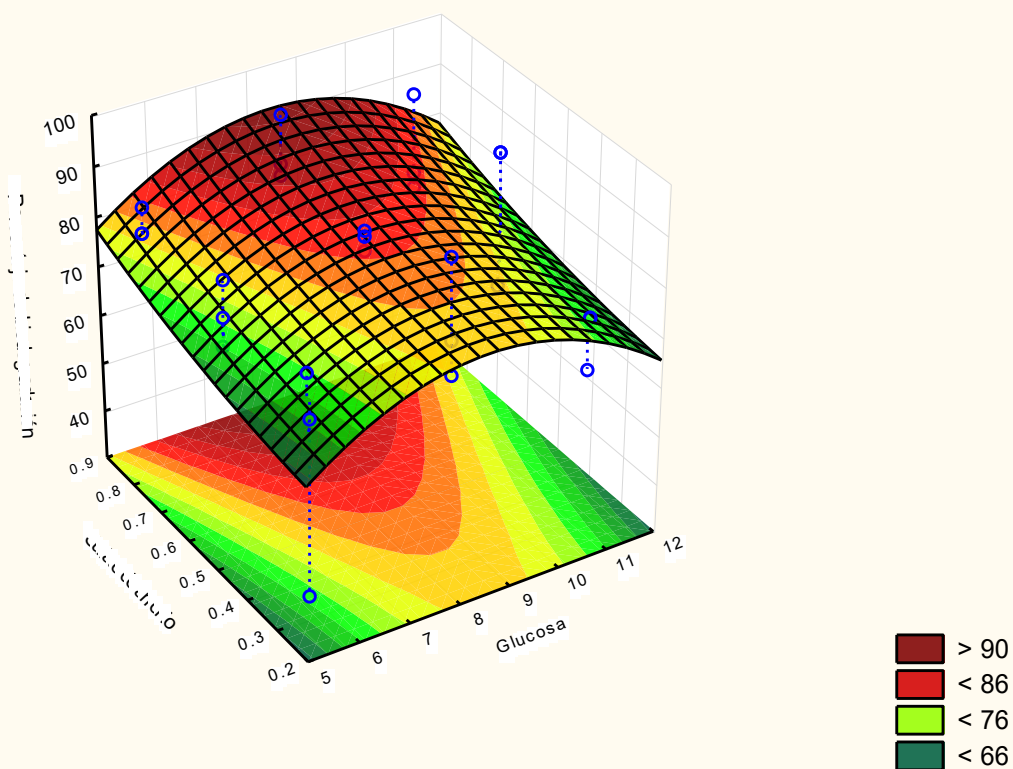


Fig 97. Diagrama de método de superficie de respuesta en porcentaje de biodegradación de colorante Orange II

Fitted Surface; Variable: Porcentaje de biodegradación
 2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=118.0439
 DV: Porcentaje de biodegradación



Fitted Surface; Variable: Porcentaje de biodegradación
2 3-level factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=118.0439
DV: Porcentaje de biodegradación

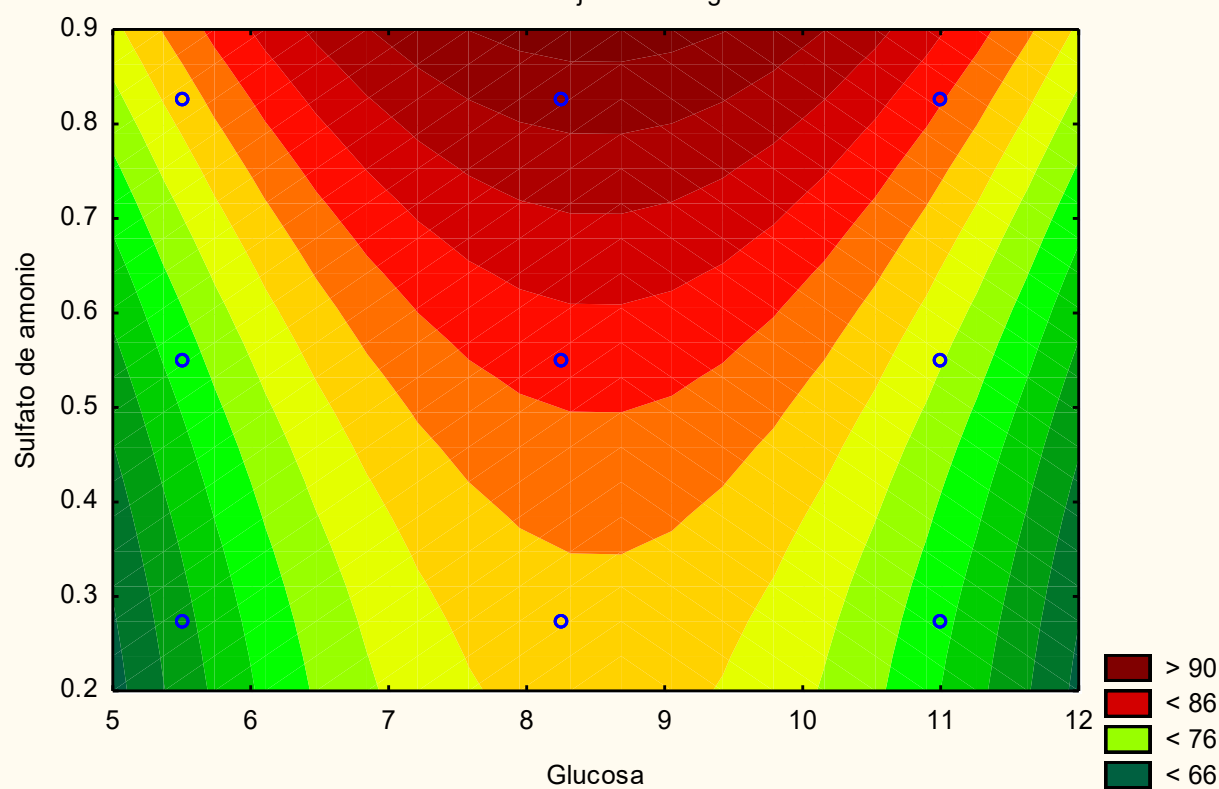


Fig 98. Diagrama de método de superficie de respuesta en relación al porcentaje de degradación del colorante Orange II

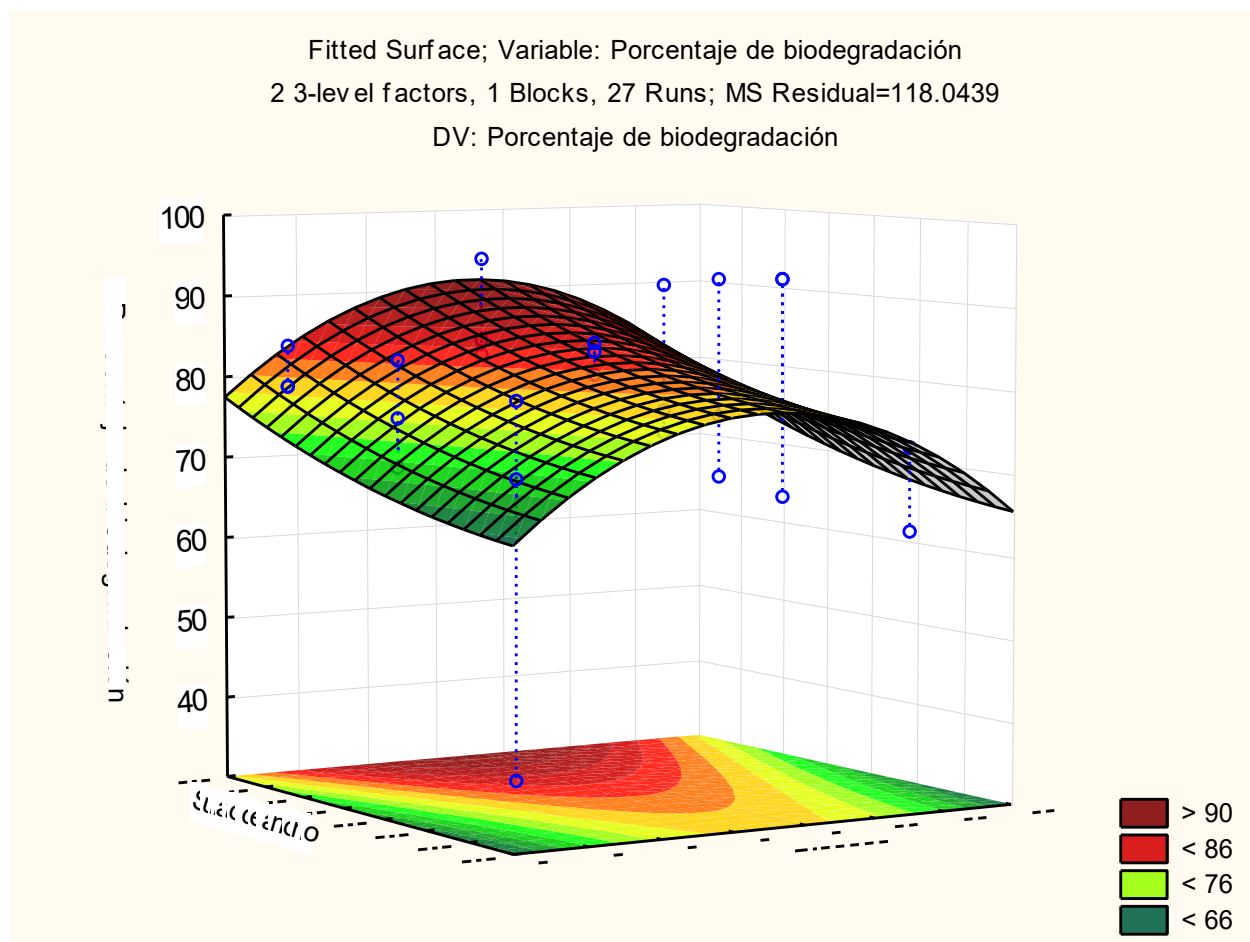


Fig 99. Diagrama de metodo de superficie de respuesta en la degradación de colorante orange II

Nota: Se sugiere que la gráfica de método de superficie de respuesta en relación de degradación de colorante Orange II obtuvo mayor degradación por sobre 90 % de de degradación lo cual es óptimo, indicando que la concentración de C/N en relación 30:1 es clave para obtener mejor degradación de colorante Orange II

Fig 100. Curva de Calibrado de Concentración de colorante Orange II

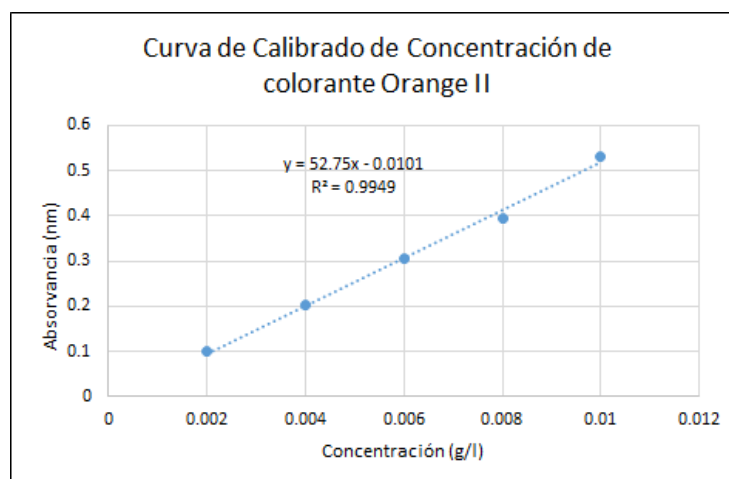


Fig 101. Aislamiento de hongo *Phanerochaete sp* en medio Kirk (A) parte frontal de la placa (B) parte posterior de la placa

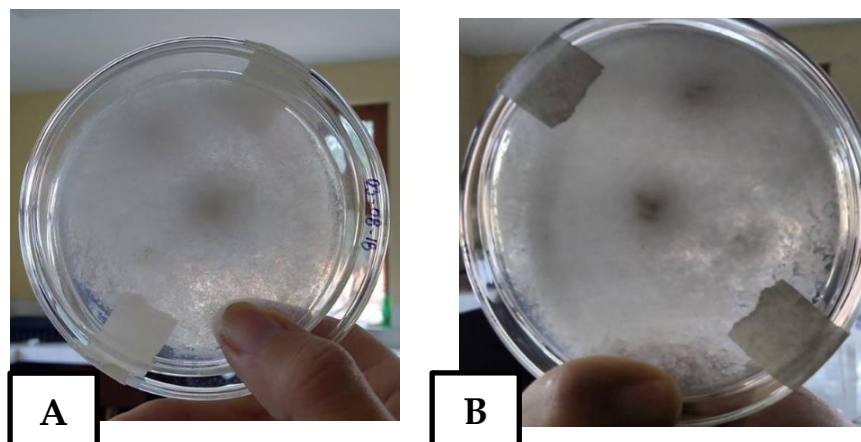


Fig 102. Curva de Calibración de Glucosa

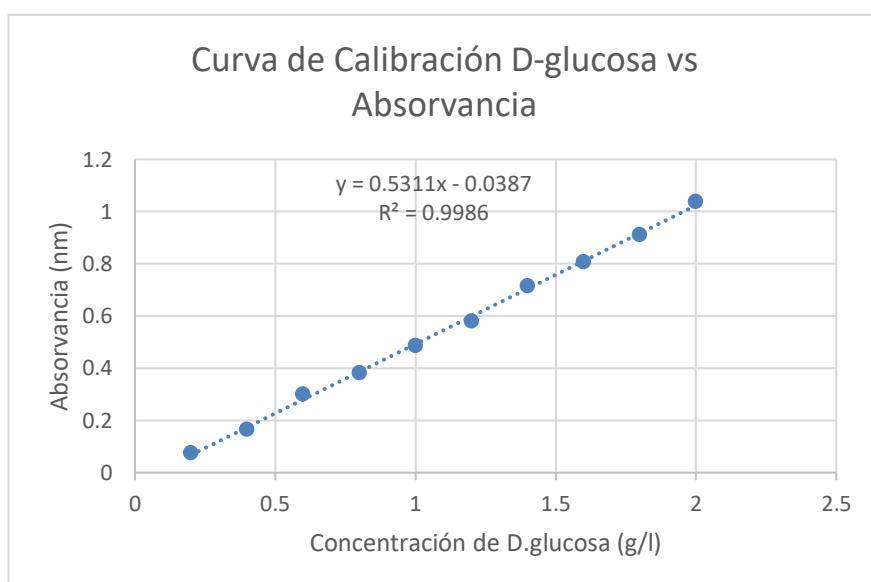


Tabla 86. Curva de calibración de Glucosa

D-glucosa g/l	Absorbancia
0.2	0.074
0.4	0.164
0.6	0.3
0.8	0.382
1	0.485
1.2	0.58
1.4	0.715
1.6	0.807
1.8	0.911
2	1.037

Fig 103. Curva de Calibrado de Método Bradford

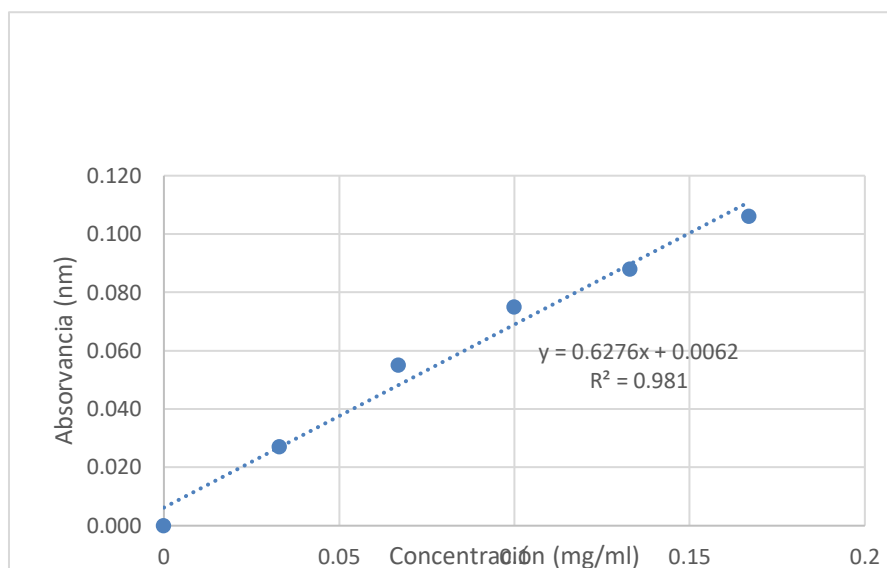


Tabla 87. Curva de calibrado de método Bradford

Concentración mg/ml	Absorbancia
0	0
0.033	0.027
0.067	0.065
0.1	0.075
0.133	0.088
0.167	0.106

Fig 104. Proceso de medición en superficie en relación a los tratamientos de C/N
(A) 40:3, (B) 40:1, (C) 40:3, (D) 30:1, (E) 30:2, (F) 30:3, (G) 20:1, (H) 20:2, (I) 20:3

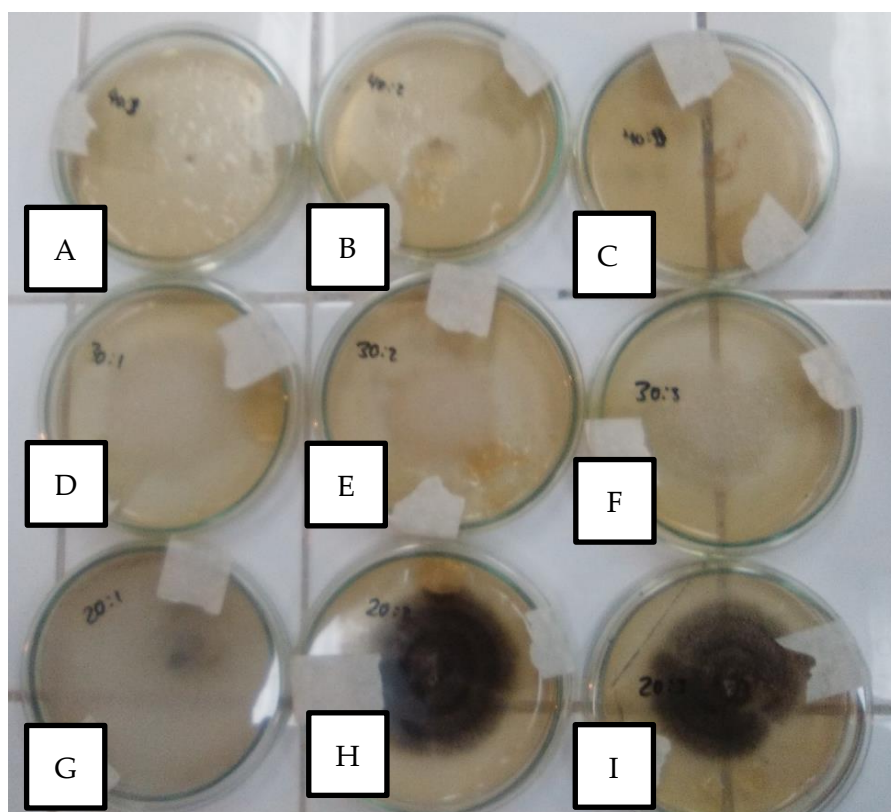
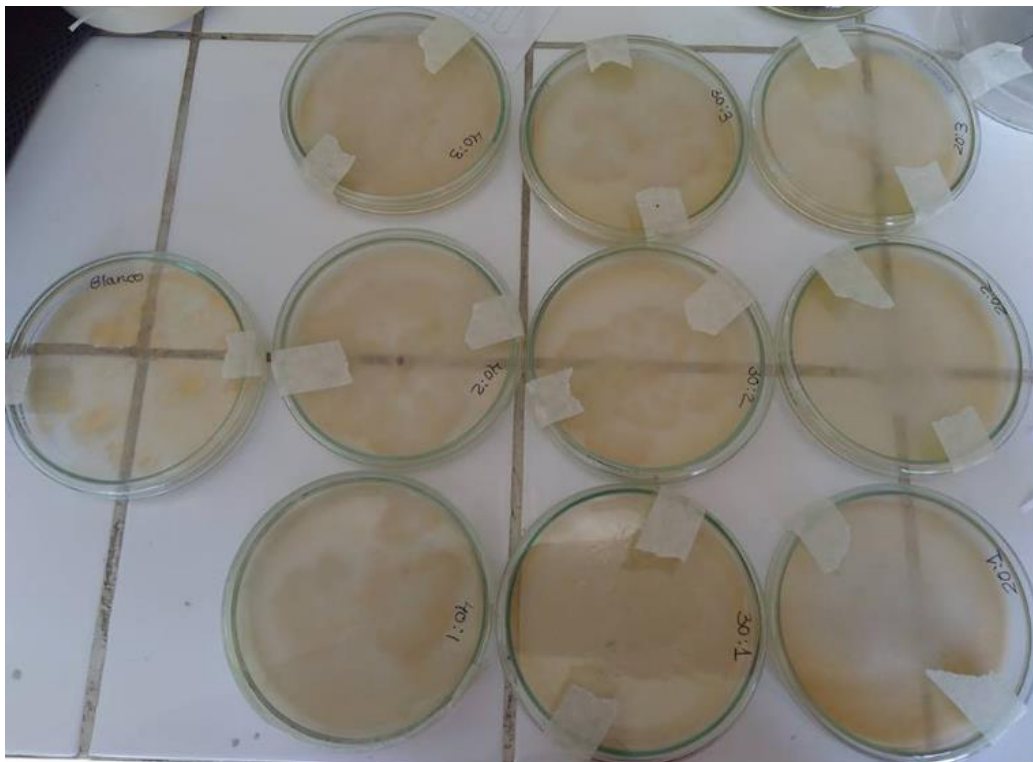


Fig 105. Proceso de fermentación en medio líquido definido en relación a los diferentes tratamientos de C/N



Fig 106. Evaluación de crecimiento del hongo *Phanerochaete sp.* cada 24 horas, vista por ambos lados de la placa (A) parte frontal y (B) parte posterior de la placa



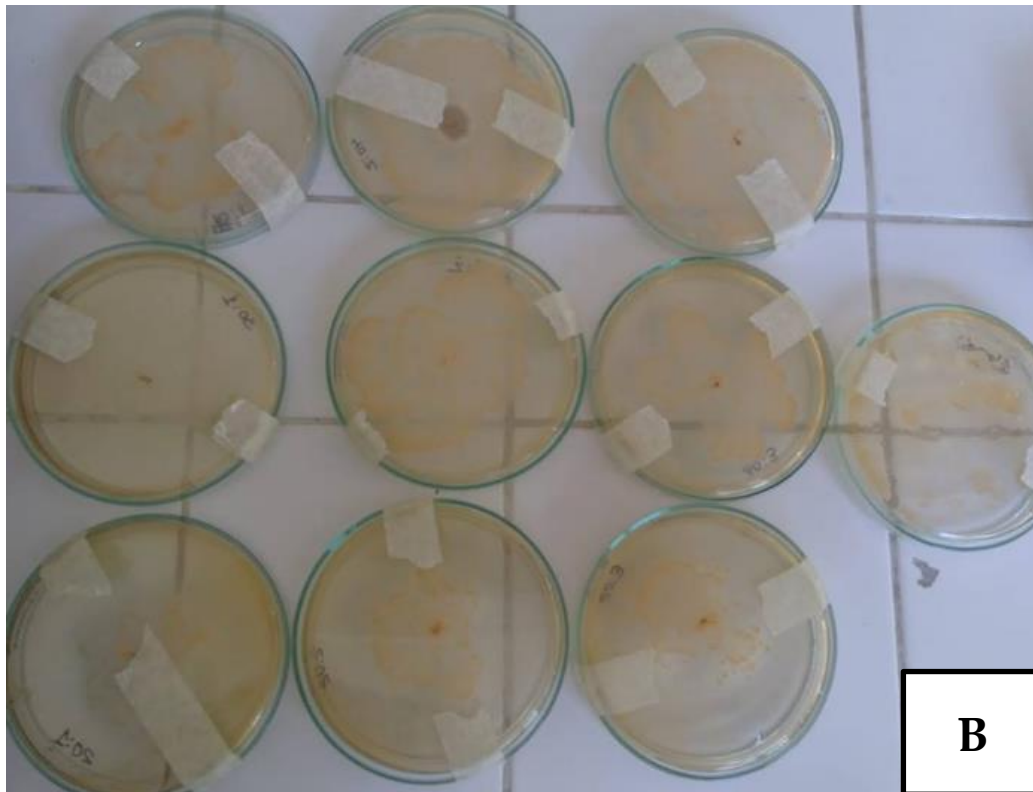


Fig 107. Observación de la decoloración en estado sólido, (B) blanco, (A) placa con la variación de la concentración de 40:3, observando la decoloración al 5 día.



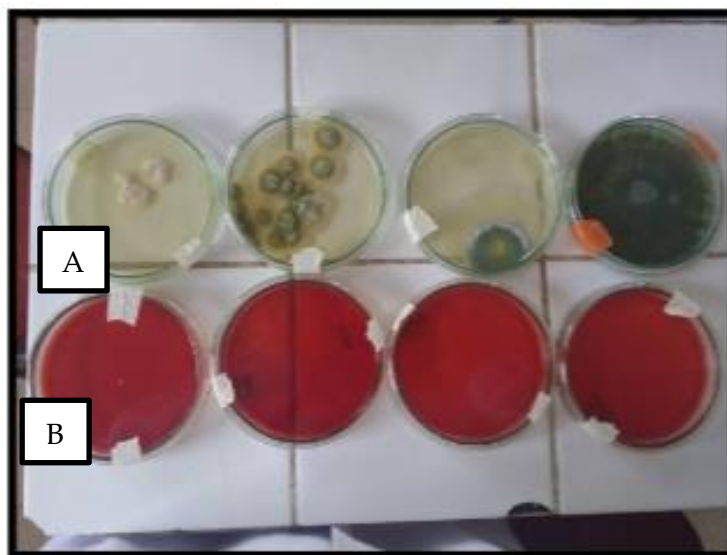
Fig 108. Fermentación en estado líquido, medio de 100ml por matraz a diferentes concentraciones de C:N, para evaluar la degradación del colorante Orange II.



Fig 109. Evaluación de la degradación del colorante Orange II en medio líquido, con hongos obtenidos de pudrición blanca de pino.



Fig 110. Asilamiento del hongo de *Phanerochaete sp* mediante los métodos de identificación en la fila (A) con método de polifenoloxidasas y fila (B) método de degradación de rojo congo con capacidad ligninolítica.



ANEXO V

COMPOSICION DEL MEDIO KIRK (1978)

COMPONENTES	CANTIDAD (g/L)
pH final	4.5
KH_2PO_4	0.20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1 g
Glucosa	10.09 g
Sulfato de amonio	0.22 g
Dimetil succinato	2.92 g
Solución de minerales	1.00 ML
Solución de vitaminas	0.50 mL
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.5 g
NaCL	1.0 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	100 mg
$CuSO_4$	100 mg
$CaCl_2$	82 mg
$ZnSO_4$	100 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	10 mg
Biotina	2 mg
Acido fólico	2 mg
Tiamina	5 mg
Riboflavina	5 mg
Piridoxina	10 mg
Acido nicotínico	5 mg

ANEXO VI

MEDIO DE AGAR EXTRACTO DE MALTA

INGREDIENTES	CANTIDAD (gr)
Agar bacteriológico	15 gr
Maltosa	12.75 gr
Dextrina	2.75 gr
Glicerol	2.35 gr
Peptona	0.78 gr

PREPARACIÓN

Agregar los ingredientes en 100 mL de agua purificada, mezclar bien, agregar ácido tánico al 1% y calentar mientras se agita constantemente hasta disolver luego hervir durante un minuto y agrega. Luego esterilizar en la autoclave a 118 °C durante 10 minutos, dejar enfriar y verter en placas Petri utilizando dos mecheros para evitar contaminación.

ANEXO VII

OBTENCION DE COLORANTE ORANGE II

El colorante utilizado en este estudio, Orange II, es un colorante azoico comúnmente empleado en la industria textil para el tñido de prendas. Se obtuvo un kilogramo de este colorante de la industria textil “OCRAM”, ubicada en la ciudad de Lima. El Orange II fue seleccionado para este estudio debido a su estructura química, que lo hace un buen sustrato para evaluar la capacidad biodegradativa de *Phanerochaete sp.*, dado que los hongos ligninolíticos son conocidos por su capacidad para degradar compuestos complejos como los colorantes azoicos.

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título: “Biodegradación del colorante Orange II por <i>Phanerochaete sp.</i> a diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio”			
Problema: ¿Qué efecto produce la variación de las concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en la biodegradación del colorante Orange II en condiciones de laboratorio en un medio definido?	Hipótesis: La biodegradación del colorante Orange II utilizando <i>Phanerochaete sp</i> a una concentración de glucosa de 8.25 gr/l y sulfato de amonio de 0.275 gr/l en un medio definido será la más favorable. VARIABLES Variables independientes: Diferentes concentraciones de glucosa y sulfato de amonio (g/L). Variables dependientes: Biodegradación del colorante Orange II.	OBJETIVOS Objetivo General: Evaluar la variación de las concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en la capacidad biodegradativa de <i>Phanerochaete sp</i> sobre el colorante Orange II en condiciones de laboratorio. Objetivo Específico: - Evaluar la velocidad de crecimiento del hongo de podredumbre blanca en medios semisólidos por técnicas medición de superficie. - Determinar la concentración de glucosa y sulfato de amonio más efectiva para la biodegradación del colorante orange II utilizando <i>Phanerochaete sp.</i> - Determinar por técnicas espectrofotométricas el porcentaje biodegradativo y la cantidad de glucosa del colorante Orange II en medios líquidos a diferentes concentraciones con relación a C/N. - Identificar la actividad de la enzima manganoso peroxidasa (MnP) utilizando técnicas espectrofotométricas en medios líquidos fermentativos con relación a C/N. - Cuantificar las proteínas totales para determinar la presencia de enzimas biodegradativas de forma indirecta en los medios líquidos de fermentación. - Evaluar el modelo matemático del porcentaje biodegradativo con del colorante orange II. - Evaluar el Yx/s, Yx/p, Yp/s, Qx, Qp.	Tipo de investigación Por su propósito: Aplicada Por su naturaleza: Experimental Metodología 2.7.1. Recolección de la muestra de <i>Phanerochaete sp.</i> 2.7.2. Aislamiento del hongo <i>Phanerochaete sp.</i> 2.7.3 Curva de calibrado del colorante Orange II 2.7.4. Curva de calibración de glucosa 2.7.5. Medios de cultivo y ajuste de medio de cultivo para crecimiento de <i>Phanerochaete sp.</i> 2.7.6 Recolección de Datos 2.7.7. Modelos Cinéticos de Biomasa 2.7.7.2. Modelos para el Sustrato y el Producto 2.7.7.3. Resumen de Parámetros 2.7.7.4. Análisis estadístico