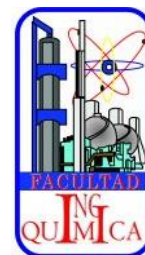




BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**“EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES
DE HONGOS FITOPATÓGENOS AISLADOS DE VAINAS DE
VAINILLA VERDE (*Vanilla planifolia Andrews*) DE LA REGIÓN DE
PAPANTLA, VERACRUZ”**

TESIS PROFESIONAL

Tesis presentada para obtener el título de:
Licenciatura en Ingeniería en Alimentos

Presenta:

Alma Karina León Teutli

Asesor de Tesis:

Dra. María Elena Ramos Cassellis



H. Puebla de Z., a Marzo de 2016



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/1104/2015
Asunto: Registro de Tema de Tesis

**C. ALMA KARINA LEÓN TEUTLI
PASANTE DE LA LICENCIATURA
EN INGENIERÍA EN ALIMENTOS
P R E S E N T E:**

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería en Alimentos cuyo título es el siguiente:

“EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE HONGOS FITOPATÓGENOS AISLADOS DE VAINAS DE VAINILLA VERDE (*Vanilla planifolia Andrews*) DE LA REGIÓN DE PAPANTLA, VERACRUZ”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: Dra. María Elena Ramos Cassellis

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO.**

ATENTAMENTE
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., 07 de octubre del 2015

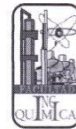

**M.L.C. MA. GPE. TITA YÁÑEZ E. DE LOS MONTEROS
SECRETARIA ACADÉMICA**



C.c.p Director de Tesis: Dra. María Elena Ramos Cassellis
Minutario Facultad de Ingeniería Química

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251



**Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla**
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

C.P. José Juan Morales Rodríguez
Director de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería en Alimentos:

Alma Karina León Teutli

Quién presenta como tema de tesis:

**EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE
HONGOS FITOPATÓGENOS AISLADOS DE VAINAS DE VAINILLA VERDE
(*Vanilla planifolia Andrews*) DE LA REGIÓN DE PAPANTLA, VERACRUZ**

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE

“Pensar Bien, para Vivir Mejor”

H. Puebla de Z., a 07 de Marzo de 2016

Director de Tesis
Dra. María Elena Ramos Cassellis

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
III. OBJETIVOS.....	5
a. OBJETIVO GENERAL.....	5
b. OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
IV. HIPÓTESIS.....	6
CAPÍTULO I.....	7
1.1. Antecedentes.....	8
CAPÍTULO II. Marco Teórico.....	11
2.1. Vainilla (<i>Vanilla planifolia Andrews</i>).....	12
2.1.1. Descripción.....	12
2.1.2. Enfermedades fitopatógenas de la Vainilla (<i>Vanilla planifolia Andrews</i>).....	13
2.2. Definición de enzima.....	15
2.2.1. Tipos de enzimas.....	15
2.2.1.1. Enzimas extracelulares producidas por hongos fitopatógenos.....	16
2.2.1.1.1. Celulasas.....	16
2.2.1.1.2. Hemicelulasas.....	17
2.2.1.1.3. Pectinasas.....	18
2.2.2. Aplicación biotecnológica de enzimas microbianas.....	20
2.2.3. Métodos de producción enzimática.....	21
2.2.3.1. Fermentación.....	21
2.2.3.1.1. Fermentación sólida.....	22
2.2.3.1.2. Fermentación líquida.....	22
2.2.3.2. Factores que afectan la producción de enzimas.....	22
2.3. Actividad enzimática.....	24
2.4. Actividad enzimática específica.....	24
CAPÍTULO III. Metodología.....	25
3.1. Esquema de trabajo.....	26
3.2. Materiales.....	27
3.3. Etapa 1: Aislamiento de microorganismos micóticos en medio sólido.....	27
3.4. Etapa 2: Preparación del medio líquido.....	28
3.4.1. Fermentación líquida.....	28
3.5. Etapa 3: Determinación cuantitativa de la actividad enzimática.....	29
3.5.1. Fundamento.....	29
3.5.1.1. Actividad celulolítica.....	30
3.5.1.2. Actividad xilanasa.....	30



3.5.1.3. Actividad pectinolítica.....	30
3.6. Etapa 4: Determinación cuantitativa de la actividad enzimática específica.....	31
3.6.1. Fundamento.....	31
3.6.2. Procedimiento.....	31
3.7. Diseño experimental.....	32
3.8. Análisis de correlación entre el contenido proteico y actividad enzimática específica.....	33
CAPÍTULO IV. Resultados y discusión.....	34
4.1. Fermentación líquida.....	35
4.1.1. Evaluación del desarrollo micelial.....	35
4.1.2. Volumen remanente y peso de biomasa.....	39
4.2. Cuantificación de actividad enzimática.....	41
4.2.1. Actividad celulolítica.....	42
4.2.2. Actividad xilanasa.....	44
4.2.3. Actividad pectinolítica.....	46
4.3. Cuantificación de actividad enzimática específica.....	47
4.3.1. Efecto de la relación proteína/actividad enzimática específica.....	50
CAPÍTULO V. Conclusiones.....	52
6. BIBLIOGRAFÍA.....	54
7. ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II. Marco Teórico

Figura 2.1 Corte longitudinal de una flor de Vainilla.....	12
Figura 2.2 Pudrición de tallo (izquierda) y una planta enferma (derecha) que presenta síntomas por el hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	13
Figura 2.3 Daño por antracnosis en hoja y tallo.....	14
Figura 2.4 Manchas foliares causadas por <i>Cladosporium</i> sp.....	14
Figura 2.5 Estructura morfológica de <i>Aspergillus wentii</i>	15
Figura 2.6 Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	17
Figura 2.7 Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa.....	18
Figura 2.8 Modo de acción de pectinasas: (a) $R = H$ para PG y CH_3 de PMG; (b) PE; y (c) $R = H$ para PGL y CH_3 para PL. La flecha indica el lugar donde la pectinasa reacciona con las sustancias pécticas. PMG, polimetilgalacturonas; PG, poligalacturonas (EC 3.2.1.15); PE, pectinesterasa (EC 3.1.1.11); PL, pectin liasa (EC-4.2.2.10).....	19
Figura 2.9 Aplicación biotecnológica de las enzimas en diversos sectores industriales.....	21
Figura 2.10 Actividad enzimática y actividad específica: se representan como bolas, las moléculas de cualquier proteína aislada; y como bolas rojas, las unidades de actividad. En ambos casos el número de unidades de actividad es el mismo pero el tubo de la derecha tiene una mayor actividad específica debido a que las bolas rojas constituyen una mayor fracción del total preparado.....	24

CAPÍTULO III. Metodología

Figura 3.1 Diagrama de extracción y evaluación de enzimas extracelulares de hongos fitopatógenos aislados de vainas de Vainilla verde (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews).....	26
Figura 3.2 Preparación de medio de cultivo (PDA) y solidificación del medio.....	27
Figura 3.3 (a) Hongo inoculado por picadura en agar PDA. (b) Incubación a 28°C en estufa bacteriológica.....	27
Figura 3.4 (a) Preparación de medio líquido de Papa y Dextrosa. (b) Reactivos principales a utilizar para el enriquecimiento del medio. (c) Esterilización de medio líquido.....	28
Figura 3.5 Inoculación de los fragmentos miceliares en matraces con caldo nutritivo Papa Dextrosa y su posterior incubación a 25°C a 55 rpm durante 15 días.....	29
Figura 3.6 Metodología para la determinación de actividad enzimática: (a) Preparación de muestras y blancos, (b) incubación de muestras a 50°C/5 min, (c) agregar reactivo DNS, (d) hervir muestras por 5 min y (e) leer absorbancia de las muestras en espectrofotómetro.....	31

CAPÍTULO IV. Resultados y discusión

Figura 4.1 Cepas puras de hongos aislados de vainas de Vainilla verde (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews): (a) <i>Fusarium oxysporum</i> , (b) <i>Colletotrichum</i> sp., (c) <i>Cladosporium</i> sp. y (d) <i>Aspergillus wentii</i>	35
---	----

Figura 4.2 Crecimiento micelial del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> en medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa después de 15 días de incubación.....	36
Figura 4.3 Crecimiento micelial del hongo <i>Colletotrichum sp.</i> en medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa después de 15 días de incubación.....	36
Figura 4.4 Crecimiento micelial del hongo <i>Cladosporium sp.</i> en medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa después de 15 días de incubación.....	37
Figura 4.5 Crecimiento micelial del hongo <i>Aspergillus wentii</i> en medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa después de 15 días de incubación.....	37
Figura 4.6 Desarrollo en forma de pellet de <i>Aspergillus wentii</i>	38
Figura 4.7 Separación del micelio por filtración del extracto enzimático.....	39
ANEXOS.	
Figura 7.1 Curva patrón para el cálculo de actividad celulolítica.....	60
Figura 7.2 Curva patrón para el cálculo de actividad xilanasa.....	60
Figura 7.3 Curva patrón para el cálculo de actividad pectinolítica.....	61
Figura 7.4 Curva patrón para el cálculo de actividad enzimática específica.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO III. Metodología

Tabla 3.1 Diagrama de diseño experimental.....	32
---	----

CAPÍTULO IV. Resultados y discusión

Tabla 4.1 Diámetro de los pellets desarrollados en <i>Aspergillus wentii</i> durante el proceso de fermentación líquida.....	38
Tabla 4.2 Biomasa en gramos, obtenida en los cuatro hongos desarrollados en fermentación líquida a distintas concentraciones de sustrato y pH.....	40
Tabla 4.3 Actividad celulolítica (UI/L).....	42
Tabla 4.4 Actividad xilanasa (UI/L).....	44
Tabla 4.5 Actividad pectinolítica (UI/L).....	46
Tabla 4.6 Actividad enzimática específica determinada a distintos sustratos y pH.....	48
Tabla 4.7 Análisis de correlación de Pearson aplicado a la relación contenido proteico/actividad enzimática específica utilizando CMC, Xilano y Pectina cítrica como sustrato.....	51

ANEXOS.

Tabla 7.1 Actividad enzimática por peso de materia seca (UI/g) a diferentes sustratos y pH.....	62
--	----



LISTA DE SÍMBOLOS

FEL Fermentación en estado líquido

FES Fermentación en estado sólido

UI/L Unidad Internacional de actividad enzimática por litro

UI/g Unidad Internacional de actividad enzimática por peso de materia seca

UI/mg de proteína Unidad internacional de actividad enzimática por miligramo de proteína

CMC Carboximetilcelulosa

DNS Ácido 3, 5-dinitrosalicílico

rpm Revoluciones por minuto

I. RESUMEN

Las enzimas tienen una importancia creciente en el desarrollo industrial sostenible; ya que en efecto pueden sustituir en algunos procesos, productos químicos tóxicos o corrosivos. Teniendo la ventaja de que se utilizan, inactivan y descomponen en productos más simples totalmente biodegradables; obteniendo un proceso menos contaminante, respetuoso con el medio ambiente y barato.

Es por ello que en el presente trabajo se realizó la extracción y evaluación de enzimas extracelulares producidas por hongos, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Aspergillus wentii*, aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia Andrews*) de la región Papantla, Veracruz.

La extracción enzimática se realizó mediante una fermentación sumergida bajo parámetros controlados de pH (5 y 7), temperatura (25°C), agitación (55 rpm), tiempo de incubación (15 días) y concentraciones de sustrato (0.1, 0.5 y 1.0% p/v); utilizando como sustrato específico carboximetilcelulosa, xilano y pectina cítrica para la determinación de actividad celulolítica, xilanasa y pectinolítica, respectivamente. Evaluándose como parámetros de crecimiento y desarrollo del hongo: la masa seca del micelio y el volumen remanente de extracto enzimático; y como parámetros fisiológicos: las actividades celulolítica, xilanasa y pectinolítica, las cuales se determinaron mediante el método colorimétrico de Miller (1959) y la actividad específica excretada al medio mediante el método de Lowry (1951).

Después de los 15 días de incubación, al realizar la filtración del extracto enzimático para la obtención del micelio, se obtuvo un volumen final de 75 mL. Del mismo modo, se observó que el desarrollo micelial fue mayor en *Fusarium oxysporum* (0.286 g) y *Cladosporium sp.* (1.889 g) a pH 5 y una concentración de CMC y pectina cítrica del 0.5% p/v, respectivamente; mientras que el hongo *Colletotrichum sp.* (0.587 g) se desarrolló bajo condiciones de pH 7 y concentración de 1.0% p/v de xilano. Por otro lado, el crecimiento micelial de *Aspergillus wentii* fue característico, ya que presentó formación de pellets, obteniendo un diámetro mayor a pH 5 y una concentración de 1.0% p/v de pectina cítrica, de 0.7 cm. Estadísticamente, se observaron diferencias significativas en peso de biomasa ($p \leq 0.05$) en el hongo *Fusarium oxysporum* al variar el pH y en *Colletotrichum sp.* al utilizar xilano como sustrato. Por otro lado, se observaron diferencias significativas en *Cladosporium sp.* y en *Aspergillus wentii* al variar el pH al utilizar como sustrato, pectina cítrica.

En cuanto a la evaluación cuantitativa de la actividad enzimática, se obtuvo una actividad celulolítica y xilanasa alta en *Cladosporium sp.* a 0.5 y 1.0% p/v de concentración de CMC y xilano, respectivamente y pH 7; mientras que la actividad pectinolítica fue mayor en *Colletotrichum sp.* a pH 5 y concentración de 0.5% p/v de pectina cítrica. Observándose que las enzimas celulasas y xilanasas se vieron favorecidas a un pH neutro, a diferencia de las pectinasas que se desarrollaron mejor a un pH ácido.

El análisis estadístico aplicado a la actividad enzimática y realizado con el software Minitab 17, demostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre concentraciones al utilizar como sustrato CMC en los hongos *Colletotrichum sp.* y *Fusarium oxysporum*, mientras que los hongos *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii* presentaron diferencias significativas a pH 5 y 7. Así mismo, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a pH 5 y 7 en los hongos *Colletotrichum sp.*, *Cladosporium sp.* y *Fusarium oxysporum* al utilizar como sustrato xilano. Y finalmente, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a pH 5 y 7 en los hongos *Aspergillus wentii*, *Cladosporium sp.* y *Fusarium oxysporum*, siendo *Aspergillus wentii* el único en presentar diferencia significativa entre concentraciones al utilizar pectina cítrica como sustrato.

Por lo que se refiere a la actividad enzimática específica, el máximo valor se obtuvo en los hongos *Cladosporium sp.* (15563.15 UI/mg) y *Fusarium oxysporum* (105867.78 UI/mg) a un pH 7 y una concentración de CMC y xilano de 1.0% p/v, respectivamente; y el hongo *Cladosporium sp.* (1035.87 UI/mg) a un pH 5 y una concentración de 0.5% p/v utilizando como sustrato pectina cítrica.

El análisis estadístico aplicado a la actividad enzimática específica demostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los hongos *Cladosporium sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Fusarium oxysporum* entre concentraciones, mientras que *Fusarium oxysporum* fue el único en mostrar diferencias significativas a pH 5 y 7, utilizando CMC como sustrato. Por otra parte, *Colletotrichum sp.*, *Cladosporium sp.* y *Fusarium oxysporum* mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a pH 5 y 7 al utilizar como sustrato xilano. Finalmente, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en *Cladosporium sp.*, *Aspergillus wentii* y *Fusarium oxysporum*, al variar el pH utilizando como sustrato pectina cítrica.

Así mismo, el factor de correlación de Pearson demostró que existe una relación inversa significativa del contenido proteico/actividad enzimática específica en los hongos *Cladosporium sp.* al utilizar como sustrato CMC y pectina cítrica, *Colletotrichum sp.* en sustrato de CMC y xilano, y *Fusarium oxysporum* en xilano como sustrato; y ya que no toda la proteína tiene actividad celulolítica, xilanasa y pectinolítica, se sugiere la existencia de grupos de enzimas accesorias que deben ser purificadas y caracterizadas para su estudio posterior.

II. INTRODUCCIÓN

El cultivo de vainilla es una actividad agroindustrial promisoriosa, de alto valor agregado para el sector rural, donde México ocupa el 5to lugar como productor de vainilla en el mundo, con el 4.0% del volumen obtenido en el 2012; siendo la más importante de las entidades productoras, Veracruz, que concentró el 57.4% del volumen y 59.3% del valor obtenido; siguiéndole en importancia Oaxaca (17.9% y 28.9%), San Luis Potosí (16.2% y 7.1%) y finalmente Puebla (8.5% y 4.7%). Ocupando los primeros lugares a nivel mundial: Madagascar (35.7%), Indonesia (34.5%), China (13.7%) y Papúa Nueva Guinea (4.1%) (SHPC, 2014).

La vainilla es considerada como una aportación de México para el mundo cuya producción alcanza cerca de 10 mil toneladas en verde; siendo la parte útil de ésta, el fruto, del cual se obtiene un valioso extracto vegetal que se utiliza para añadir sabor y aroma a diversos alimentos y bebidas (Sánchez et al., 2001). El extracto de vainilla tiene su aplicación en las industrias de helados, chocolates, cremas, perfumes, refrescos, licores, cigarrillos y repostería; también se utiliza en artesanía, ya que con el fruto beneficiado se elaboran figuras (Naturland, 2000). Es por ello, que la vainilla es considerada un cultivo alternativo muy atractivo desde el punto de vista económico, a pesar de ser una especie frágil, ya que su producto puede alcanzar entre 20 y 50 dólares por kilo de vainilla en el mercado europeo y estadounidense, siendo apreciado por las industrias refresqueras y de confitería.

El cultivo de vainilla es una fuente de empleo rural importante, durante su ciclo productivo; principalmente en etapa de floración, ya que la polinización se realiza manualmente, donde el 90% de los productores realiza ésta actividad de forma tradicional, produciendo 200 kg de vainilla verde por hectárea (SAGARPA, Plan Rector Sistema Producto Vainilla, 2012)

Desafortunadamente, debido a que la vaina de Vainilla posee tejidos ricos en nutrientes, su producción se ve limitada por problemas fitosanitarios como pudrición de raíz (*Fusarium oxysporum* sp.), antracnosis (*Colletotrichum* sp.), fumagina (*Cladosporium*) y aspergilosis (*Aspergillus wentii*) (Kelso et al., 2012); los cuales segregan una amplia variedad de enzimas extracelulares degradadoras del tejido vegetal del cultivo, provocando pérdidas a nivel económico.

En México, se ha estimado que la micosis, puede impedir el desarrollo de hasta un 67.4% de plantas a los cuatro años de su plantación (Hernández, 2011). Debido a su vulnerabilidad se tuvieron pérdidas cercanas al 80% en los ciclos productivos 2010-2011 y 2011-2012. De manera que bajo las condiciones actuales, la producción de vainilla en México no puede competir en volumen y costos de producción con los países que se encuentran entre los cuatro primeros lugares (SAGARPA, Mejoramiento de la productividad integral del cultivo de la vainilla en México que fortalezca su competitividad, 2012).

Actualmente, la tecnología enzimática ocupa un lugar preponderante dentro de la biotecnología, ya que, se utilizan en procesos de extracción, clarificación y licuefacción de zumos,



que contribuyen a mejorar la calidad del producto sin afectar sus características sensoriales, evitando el aspecto turbio que a menudo no es deseado por los consumidores. Así también, las enzimas tienen otras aplicaciones biotecnológicas en la industria textil, producción de papel, extracción de aceite y fermentación de algunas bebidas. Por lo que, resulta importante realizar una clasificación de las enzimas obtenidas de microorganismos, para su posible aprovechamiento a nivel industrial o protección de la misma Vainilla; sustituyendo procesos químicos de bajo rendimiento, baja especificidad y alto costo energético.

III. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GENERAL

- Realizar la extracción y evaluación de enzimas extracelulares producidas por hongos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* sp., *Colletotrichum* sp., *Cladosporium* sp. y *Aspergillus wentii* aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia* Andrews) de la región de Papantla, Veracruz, mediante una fermentación sumergida.

b. OBJETIVOS PARTICULARES

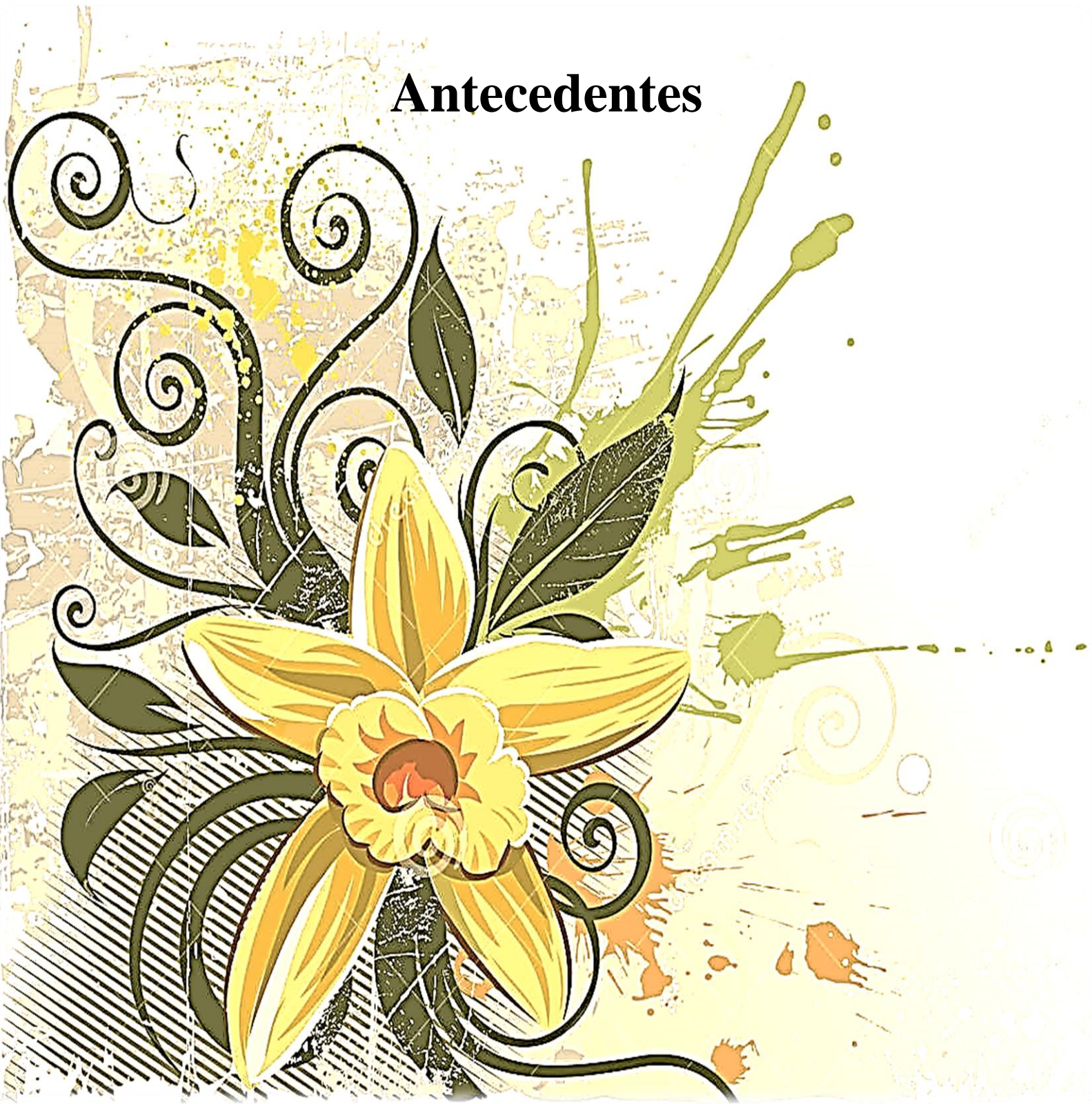
- Establecer las condiciones para el desarrollo de hongos deterioradores de cultivos de Vainilla verde (*Vanilla planifolia* Andrews), en un medio líquido de papa dextrosa.
- Evaluar los parámetros de crecimiento y desarrollo micelial de los hongos fitopatógenos, mediante el peso de biomasa y volumen remanente de los extractos enzimáticos.
- Evaluar la actividad enzimática celulolítica, xilanasa y pectinolítica de los extractos a diferentes condiciones de pH y concentración de sustrato.
- Evaluar la actividad enzimática específica de los extractos obtenidos, mediante una técnica colorimétrica.
- Realizar un análisis de correlación para observar el grado de dependencia que existe entre el contenido proteico de los extractos y la actividad enzimática específica.

IV. HIPÓTESIS

Los extractos enzimáticos producidos por los hongos *Fusarium oxysporum sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii* aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia Andrews*), experimentarán diferencias en las actividades enzimáticas celulolítica, xilanasa, pectinolítica y específica, al variar las concentraciones de sustrato y pH del medio líquido.

CAPÍTULO I.

Antecedentes



1.1. Antecedentes

Una enzima es una proteína que actúa como catalizador biológico, llevando a cabo reacciones bioquímicas a muy altas velocidades, no se consume durante la reacción y en general presenta un elevado grado de especificidad. Su nombre proviene del griego y significa “en levadura”, ya que a mediados del siglo XIX, cuando se acuñó el término, se pensaba que estos compuestos solo actuaban en el interior de las células.

Todas las células, incluyendo microorganismos y organismos superiores, producen enzimas celulasas, xilanasas y pectinasas principalmente. Su acción está estrechamente ligada a las reacciones metabólicas, y la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas a las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían si no estuvieran presentes las enzimas. Su estudio en el campo biotecnológico es de primordial interés debido a que son responsables de algunos cambios químicos, cambios que pueden resultar benéficos o perjudiciales (Badui, 2006) en diversas industrias, como la textil, alimentaria, papelera, cervecera, entre otras.

Hoy en día son varios los desarrollos científicos que han incidido en la enzimología y que permiten prever una expansión importante en los próximos años. Se ha afirmado que las enzimas son una solución en busca de problemas, ya que se pueden utilizar para mejorar productos existentes o bien lograr el aprovechamiento integral de materias primas, sin destacar la producción de nuevas materias primas o la sustitución de procesos químicos actuales de bajo rendimiento, baja especificidad y alto costo energético. Es por ello que a continuación se mencionan algunos estudios recientes sobre enzimas celulasas, xilanasas y pectinasas que han sido trascendentes para la realización de este trabajo.

En el año 2005, Gómez & Tulia estudiaron por ensayos in vitro la posible participación de las enzimas poligalacturonasas, consideradas factores de virulencia en el proceso de infección del clavel por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* (FOD). Los resultados mostraron la inducción de la expresión de la enzima poligalacturonasa en presencia de inductores artificiales, ácido poligalacturónico y pectina, y un nivel de expresión bajo en cultivos con pared celular de clavel de variedad resistente y susceptible. También, se evaluó la evolución de crecimiento micelial del hongo FOD y pH del cultivo, observándose un aumento en el crecimiento del hongo estabilizándose al día 7. El pH del cultivo inicialmente era ácido y a medida que el tiempo avanzaba se basificó, alcanzando un valor de 8; siendo que no coincide con el pH óptimo de desarrollo de la enzima (pH 5), ellos sugieren que la enzima se secreta al medio para luego actuar dentro de la planta donde tendría un pH adecuado para su acción.

Por otro lado, Grebechova & Prieto (2006) evaluaron la biosíntesis de las enzimas pectolíticas de las cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* de la Colección Nacional de Rusia para su aplicación en alimentos. Se realizó un proceso de fermentación sumergida con 12

diferentes medios de cultivo orgánico sintético a pequeña escala y a 6 litros en un biorreactor New Brunswick. Los resultados se obtuvieron con medios de cultivo que tenían pectinas de fruta y pectina de verduras. La actividad polimetilgalacturonasa fue de 95-99 UI/mL. Y se obtuvieron los siguientes parámetros para la biosíntesis de las enzimas: inóculo de 1×10^6 conidias/mL, pH 4.5-5.5; temperatura de 28-30°C y velocidad de aireación de 180-200 rpm. Los sustratos cítricos, zanahoria y remolacha fueron excelentes para la producción de polimetilgalacturonasa.

Así mismo Dinu et al. (2007), llevaron a cabo la purificación y caracterización de enzimas pectolíticas producidas por *Aspergillus niger* MIUG 16 bajo una fermentación sólida, utilizando técnicas cromatográficas. Siendo reportada por primera vez la capacidad de este hongo para producir enzimas pectato liasas a un pH óptimo ácido.

En el 2010, Ramos et al. investigaron la producción in vitro de enzimas pectinolíticas, en un medio sintético con pectina como fuente de carbono, de diez aislamientos de *Colletotrichum truncatum*. Observando que todas las cepas crecieron en dicho medio, detectándose actividades polimetilgalacturonasa, poligalacturonasa y pectin liasa. La cepa BAFC 3097 (originaria de la Provincia de Santa Fe) produjo altos títulos de las tres enzimas tras 7-10 días: 1.08 U/mL PG, 1.05 U/mL PMG, 156 U/mL PL.

En cuanto a Martínez et al. (2012), realizaron un ensayo in vitro de enzimas xilanasas producidas por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*, las cuales fueron inducidas por pared celular de tallo y raíz de clavel de variedades tolerantes y susceptibles. Observaron un comportamiento diferencial según el órgano y la variedad, que demuestra la influencia en la inducción de las características del hospedero. La enzima se purificó parcialmente utilizando cromatografías de intercambio catiónico, aniónico y tamiz molecular, obteniendo valores de actividad específica al realizar una purificación con Sephadex G-75, de 115.741 UI/mg. Los resultados permitieron considerar la xilanasas como una de las primeras enzimas secretadas por el patógeno en el proceso de infección, y es por tanto, importante para la colonización del hospedero.

A su vez Martínez (2012), evaluó la secreción in vitro de enzimas pectinolíticas por el hongo *Colletotrichum acutatum*, en presencia de exocarpo o pared celular del fruto de lulo (*Solanum quitoense* Lam) en diferentes estados de maduración (verde, pintón y maduro). Las condiciones seleccionadas para el desarrollo enzimático fueron: a una concentración de 0.3% de ácido poligalacturónico como sustrato, pH 5, 37°C y un tiempo de incubación de 90 min. Observando que el estado de maduración del fruto, pintón, generó la inducción de la enzima poligalacturonasa, mientras que la presencia de inductores en el fruto verde produjo la disminución de la actividad enzimática.

En el año 2013, Mushimiyimana & Tallapragada describieron la optimización de los parámetros para la producción de enzimas celulasas por *Cladosporium cladosporoides*. La producción enzimática se llevó a cabo mediante fermentación líquida utilizando diferentes residuos agrícolas como sustrato (piel de papa, cáscara de cebolla, cáscara de zanahoria y cáscara de remolacha). La mayor actividad celulasa se obtuvo en cáscara de papa en el sexto día y para la

cáscara de cebolla al séptimo día de incubación, en remolacha se obtuvo la mayor actividad a un pH de 5.5 (1.56 UI/L) a una temperatura de 30°C.

De igual manera en el 2013, Zimbardi et al. optimizaron la Metodología de Superficie de Respuesta para la producción enzimática de β -glucosidasa, β -xilosidasa y xilanasa por *Colletotrichum graminicola*. Donde la producción máxima se obtuvo en salvado de trigo, a un pH de 5 y una temperatura de 65°C, obteniendo valores de actividad β -glucosidasa, β -xilosidasa y xilanasa, de 159.3 U/g, 128.1 U/g y 378.1 U/g, respectivamente.

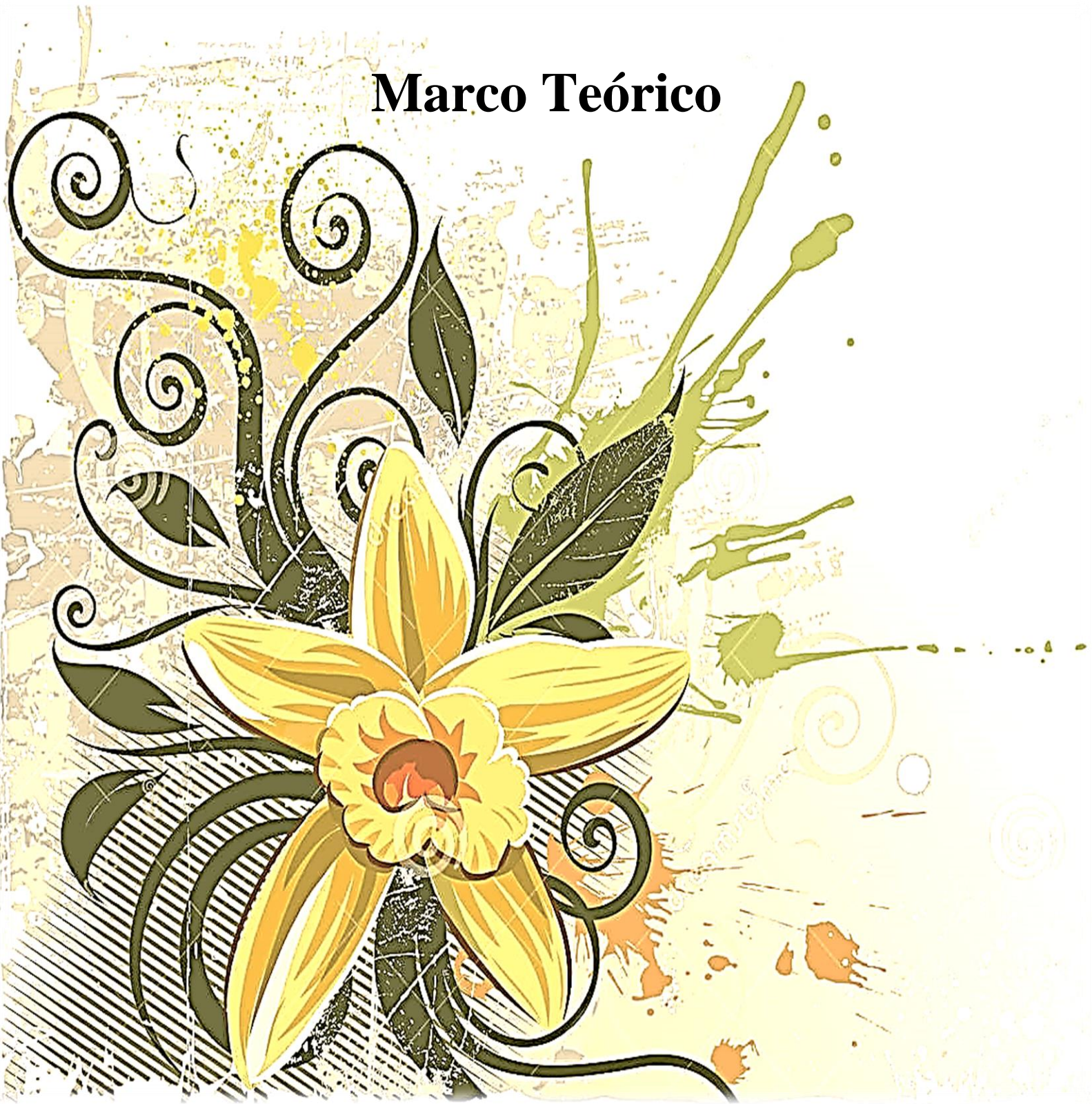
Mientras tanto Rengifo et al. (2013), caracterizaron parcialmente las proteínas de la fracción acuosa y micelial del cultivo sumergido de una cepa de *Cladosporium sp.* por el método de Lowry, determinando la concentración proteica con el patrón electroforético en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS). En el micelio se encontró un contenido proteico de 5.88 Ug/mL, bandas de electroforesis entre 11 y 74 kDa, mientras que las pruebas realizadas con el extracto acuoso fueron negativas.

Con respecto a Patel & Prajapati (2014), realizaron el aislamiento, identificación y caracterización de hongos productores de enzimas xilanasas utilizando desechos agrícolas lignocelulósicos como sustrato, a través de una fermentación en estado sólido. La mayor actividad xilanasa se observó en salvado de arroz de 25 UI/mL a una temperatura de 28°C durante 10 días en condiciones estáticas.

Recientemente en el año 2016 Desai & Iyer, evaluaron la actividad celulolítica de *Aspergillus niger* DX-23 para el destintado de pasta ONP. Esto se realizó en un medio de Mandel suplementado con madera de abedul a una concentración de 0.5 y 1.0% p/v, inoculado con 10^6 esporas e incubado durante 48 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm. La actividad máxima fue de 48.9 U/mL.

CAPÍTULO II.

Marco Teórico



2.1. Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews)

2.1.1. Descripción

La vainilla pertenece a la familia de las Orchidaceas y forma parte del género *Vanilla*, en el que se incluyen aproximadamente 155 especies.

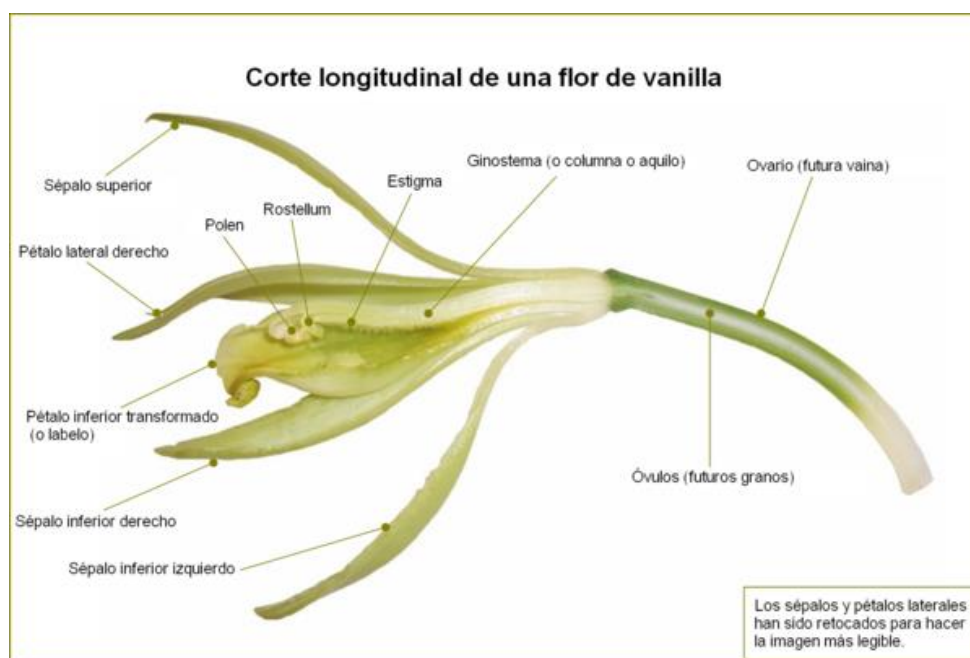


Figura 2.1 Corte longitudinal de una flor de Vainilla (Agvik, 2011).

La planta de vainilla es una orquídea perenne, terrestre, trepadora, de tallo flexible y cilíndrico, simple o ramificado, de color verde brillante, está constituido de 10 a 15 cm de longitud, de 1 a 2 cm de diámetro, con hojas alternas, dispuestas en zigzag y las guías pueden llegar a medir hasta 50 cm de longitud.

Las hojas son flexibles, subsésiles, elípticas, laureadas y suculentas, como el tallo y se disponen de manera alterna a lo largo del tallo acompañados de una yema, la cual no se desarrolla y por la raíz adventicia en el lado opuesto de la hoja. La hoja es una estructura importante, dado que su morfología es útil para la identificación de la especie y la variedad de la planta vainilla.

Las flores se presentan en inflorescencia o racimos conocidos como “macetas” y brotan de las axilas de las hojas; por lo general, son simples de 5 a 8 cm de longitud y agrupadas. La planta llega a tener de 10 a 15 racimos de flores, compuesto cada uno de ellos por más de 10 flores individuales, las cuales son de color aperlado, blanco-amarillento, cuyos brotes florales abren de uno a tres cada mañana en la primavera, pero mueren por las tardes, y cuando son polinizadas dan lugar a un fruto carnoso y alargado de 15 a 25 cm de longitud.

El fruto es una cápsula dehiscente, que presenta tres costados cóncavos, en forma cilíndrica, de color verde brillante cuando inmaduro y el cual se torna verde a amarillo, a café a medida que madura. Su longitud varía de 13 a 25 cm y su diámetro de 10 y 15 mm (SAGARPA, Producción de vainilla en tres sistemas de producción de la Sierra Huasteca Potosina, 2014).

2.1.2. Enfermedades fitopatógenas de la Vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews)

La producción de vainilla en México presenta una problemática compleja, ya que el cultivo tiene una baja rentabilidad debido entre otras cosas, a diversos factores que limitan su producción (SAGARPA, Mejoramiento de la productividad integral del cultivo de la vainilla en México que fortalezca su competitividad, 2012). A continuación se mencionan algunos de mayor importancia:

- **Pudrición de raíz y tallo**

Fusarium oxysporum sp., es el hongo más dañino, que causa pudrición blanca de raíces, tallos y frutos y en consecuencia provoca la muerte de las plantas. Este hongo, se encuentra causando daños en menor o mayor grado a todas las plantaciones de vainilla, principalmente en aquellas, que tiene un manejo de cultivo deficiente y en plantas en producción. En México, se ha estimado que puede matar hasta un 67.4% de plantas a los cuatro años de la plantación (Hernández, 2011).



Figura 2.2 Pudrición de tallo (izquierda) y una planta enferma (derecha) que presenta síntomas por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (Havkin & Belanger, 2011).

- **Antracnosis**

Colletotrichum sp., es un hongo que ataca a hojas, frutos, tallos y flores; se identifica por la aparición de pequeñas manchas hundidas, irregulares, de color café oscuro. La antracnosis es favorecida por la presencia de aire frío y lloviznas (“época de “nortes”) puede presentarse desde octubre a abril, pero con mayor severidad durante enero y febrero. El daño se aprecia en las primeras cinco hojas jóvenes de la parte apical (puntas), sin infectar las hojas maduras. Los frutos infectados

se caen prematuramente antes de alcanzar su madurez comercial y en consecuencia el rendimiento disminuye significativamente hasta en 50% (Hernández, 2011).



Figura 2.3 Daño por antracnosis en hoja y tallo (Hernández, 2011).

- **Fumagina**

Cladosporium sp., es un hongo saprófito de plantas en descomposición, además es parásito de Gramíneas, sus esporas en general son de tamaño aproximado de 10 μm de largo y 4 μm de ancho, de forma elipsoidal y de color hialino a marrón amarillento. También produce conidióforos largos y oscuros que crecen en posición vertical, sus conidios son ovalados, irregulares o cilíndricos de color marrón oscuro o negro, y puede consistir de una a tres células, y dan al hongo una apariencia aterciopelada oscura. La germinación de los conidios es favorecida por una alta humedad ambiental y pueden causar lesiones en hojas, ramas o frutos (Delgado et al., 2013).

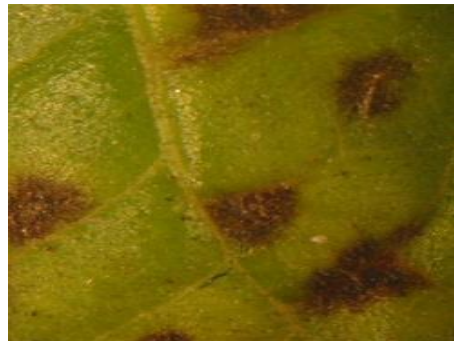


Figura 2.4 Manchas foliares causadas por *Cladosporium sp.* (OIRSA, 2012).

- **Aspergilosis**

Aspergillus wentii, es un hongo filamentoso saprófito que desempeña un papel esencial en la degradación de la materia orgánica, este inhibe la germinación de la semilla y producen cambios de color, temperatura, enmohecimiento, apelmazamiento y pudrición de plantas. Una de las particularidades de las especies *Aspergillus* es su capacidad para producir micotoxinas, entre las más conocidas se encuentran las aflatoxinas (AF), sustancias carcinogénicas que afectan principalmente el hígado y el pulmón en seres vivos (Cárdenas et al., 2005).

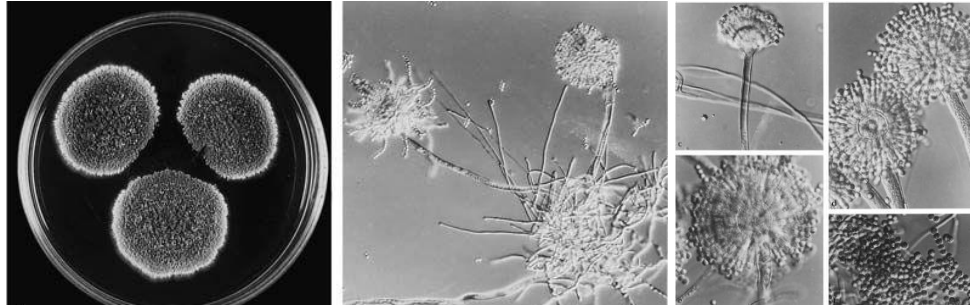


Figura 2.5 Estructura morfológica de *Aspergillus wentii* (Samson et al., 2004).

Las enfermedades son el resultado de la acción individual o combinada de diferentes mecanismos de patogénesis del hongo, como la producción y liberación de enzimas extracelulares que degradan los principales constituyentes de la pared celular y permiten la colonización de los tejidos (Kikot, 2012).

2.2. Definición de enzima

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que tienen la capacidad de facilitar y acelerar reacciones químicas. El empleo de enzimas presenta una serie de ventajas como son: no propician reacciones secundarias indeseables debido a su gran especificidad al sustrato y actividad catalítica. Además, actúan a bajas concentraciones, en condiciones experimentales poco agresivas (Sánchez & Martínez, 2014).

2.2.1. Tipos de enzimas

Aunque la síntesis de toda enzima tiene lugar en el interior de la célula, algunas se excretan a través de la pared celular y pueden funcionar fuera de la misma. Por esto se consideran dos tipos de enzimas:

1. *Enzimas extracelulares, exocelulares o exoenzimas.* Son producidas dentro de la célula, pero funcionan o tienen su acción catalítica fuera de la célula. Su función principal consiste en efectuar cambios precisos en los nutrientes del ambiente externo, para que dichos nutrientes puedan ser transportados al interior de la célula.
2. *Enzimas intracelulares, endocelulares o endoenzimas.* Cuya acción catalítica se limita al interior de la célula. Estas sintetizan el material celular y degradan nutrientes, que penetran en la célula gracias a la acción de las enzimas extracelulares, para proporcionarle sus requerimientos energéticos (Montoya, 2008).

2.2.1.1. Enzimas extracelulares producidas por hongos fitopatógenos

Todas las células incluyendo microorganismos y organismos superiores, producen enzimas degradadoras de la pared celular que refleja el grado de complejidad que tiene la estructura de la pared, entre las cuales se encuentran las enzimas celulasas, xilanasas y pectinolíticas (Kikot, 2012).

2.2.1.1.1. Celulasas

La celulosa es un polímero lineal compuesto de cadenas largas de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces β 1-4, con un alto grado de polimerización (10,000 unidades), con regiones amorfas (no cristalinas y fácilmente hidrolizables) y altamente cristalinas que lo hacen altamente resistente a la hidrólisis y conversión a azúcares fermentables. Se ha demostrado que este polímero puede ser hidrolizado por diversos métodos fisicoquímicos y térmicos, así como por procesos enzimáticos, donde la bioconversión de celulosa es llevada a cabo por celulasas, que son un conjunto de hidrolasas que pueden convertir la celulosa en β -glucosa.

Las celulasas son producidas principalmente por hongos aeróbicos tales como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Fusarium solani*, etcétera. Su acción implica una operación secuencial y sinérgica de un grupo de enzimas que incluye: endoglucanasas (endo- β -1,4-glucanasa, 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), exoglucanasas (celobiohidrolasas, exo- β -1,4-glucanasa, 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y β -glucosidasas (celobiasa, β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21), las cuales actúan para obtener una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa (Figura 2.6).

La endoglucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces internos β -1,4 glucosídicos presentes entre las unidades de glucosa de la celulosa. Su acción es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de exoglucanasas. Las exo β -1,4 glucanasas fragmentan la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, generando celobiosa o glucosa. Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente la β -1,4 glucosidasa convierte los fragmentos de celobiosa a glucosa para evitar la inhibición por celobiasa.

En los ensayos de laboratorio para valorar la actividad del complejo celulolítico, es decir la actividad celulasa total (FPasa), se utiliza como sustrato papel filtro. La actividad de endoglucanasas (CMCasa) se utiliza carboximetilcelulosa como sustrato, en ambas determinaciones se cuantifica la liberación de azúcares reductores. La actividad β -1,4 glucosidasa se puede medir adicionando como sustratos celobiosa o salicina, cuantificando la liberación de azúcares reductores, o *p*-nitrofenil- β -D-

glucopiranosido (*p*-NPG), midiendo espectrofotométricamente la liberación de *p*-nitrofenol (Sánchez & Martínez, 2014).

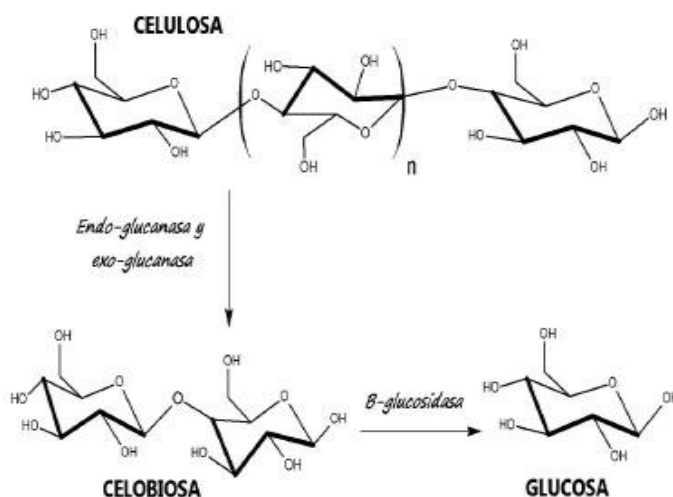


Figura 2.6 Hidrólisis enzimática de la celulosa (Sánchez & Martínez, 2014).

2.2.1.1.2. Hemicelulasas

La hemicelulosa está formada por polímeros constituidos de azúcares como: pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares ácidos (ácido galacturónico y glucorónico). Su función principal es proporcionar la unión entre la celulosa y la lignina. Es fácilmente hidrolizable ya que no presenta estructura cristalina. Puede ser hidrolizada a azúcares monoméricos y ácido acético. Las hemicelulasas son hidrolasas o esterases y se clasifican de acuerdo a su acción sobre sustratos distintos.

La biodegradación de hemicelulosa requiere la acción sinérgica de xilanasas y de algunas enzimas accesorias. Las xilanasas degradan la hemicelulosa para producir xilosa y/o arabinosa (Figura 2.7). Las endo-b-D-xilanasas, rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula. La arabinofuranosidasa hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, la glucoronidasa remueve las cadenas laterales de ácido glucorónico a partir de unidades de xilosa y las b-xilosidasas actúan sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces b-1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa (Sánchez & Martínez, 2014).

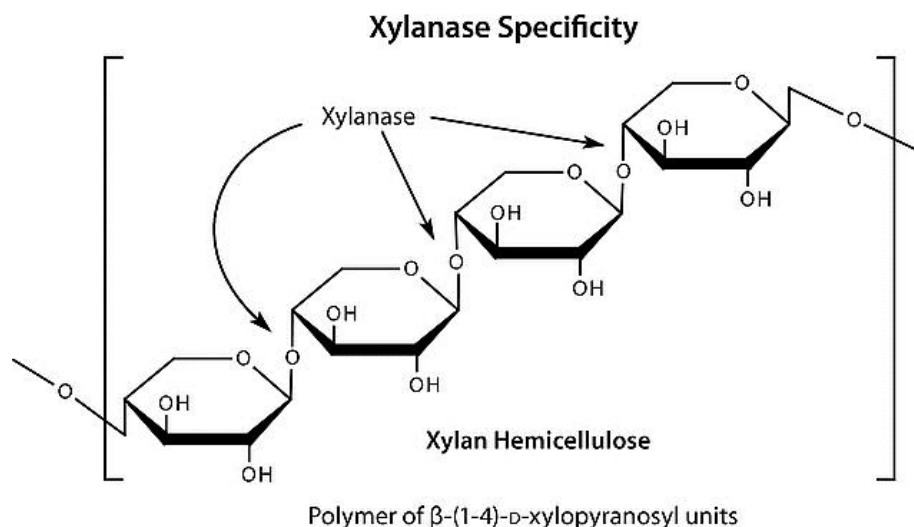


Figura 2.7 Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa (SIGMA-ALDRICH, 2016).

2.2.1.1.3. Pectinasas

Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos ácidos de origen vegetal. Estructuralmente la pectina está constituida por un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (AG) unidos entre sí por enlaces α -1,4, los cuales pueden estar esterificados con metanol. A esta región se la denomina Homogalacturonano (HG), la cual normalmente equivale a un 70% - 80% de la masa total de la pectina. A su vez el esqueleto estructural de HG puede estar interrumpido por moléculas de ramnosa unidas por enlaces α -1,2, a partir de los cuales se forman cadenas laterales de azúcares, principalmente L-arabinosa y D-galactosa, generando de esta manera la región denominada Ramnogalacturonano (RG) (Zapata et al., 2009).

Las sustancias pécticas son naturalmente degradadas por enzimas pectinolíticas. La clasificación de estas enzimas está basada en el ataque sobre la estructura del galacturonano de las moléculas de pectina. Básicamente se dividen en tres grupos:

1. *Protopectinasas*. Degrada la protopectina insoluble y da lugar a la pectina polimerizada altamente soluble.
2. *Esterasas*. Cataliza la d-esterificación de la pectina por eliminación de ésteres metoxi.
3. *Depolimerasas*. Cataliza la escisión hidrolítica de α -(1 \rightarrow 4)-lazos glicosídicos en los restos de ácido D-galacturónico de las sustancias pécticas.

Las protopectinasas (PPasas), son las enzimas capaces de hidrolizar la protopectina convirtiéndola en pectina altamente polimerizada y soluble. Estas son clasificadas a su vez en dos tipos: las tipo A hidrolizan la región de ácidos poligalacturónicos de la protopectina y las tipo B

hidrolizan las cadenas de polisacáridos que conectan las cadenas de ácido poligalacturónico y los constituyentes de la pared celular.

Las pectinestearasas a menudo referidas como pectinmetilestearasa, es una estearasa de ácido carboxílico y pertenece al grupo de las enzimas hidrolasas. Cataliza la desesterificación de enlaces metil éster de la columna vertebral de galacturonano de las sustancias pécticas para liberar pectinas ácidas y metanol. La pectina resultante es atacada por poligalacturonasas y liasas.

Las depolimerasas actúan en las sustancias pécticas bajo dos mecanismos diferentes, por hidrólisis (hidrolasas) o por β -eliminación (liasas). Las hidrolasas han sido divididas en cuatro grupos: aquellas que prefieren al pectato fueron denominadas poligalacturonasas, mientras que las que prefieren degradar la pectina fueron denominadas polimetilgalacturonasas. Los prefijos endo- y exo utilizados en conjunto con cualquiera de estos nombres denotan una acción aleatoria o desde los extremos sobre las moléculas, respectivamente.

Las endo-poligalacturonasas (endo-PGAs) son producidas por una amplia variedad de organismos, entre ellos, numerosos hongos y bacterias, algunas levaduras, plantas superiores y algunos parásitos de plantas. Y las exo-poligalacturonasas (exo-PGAs) han sido encontradas en diferentes frutas y vegetales, así como también en hongos y algunas bacterias.

Las liasas, que son también denominadas trans-eliminadas, rompen los enlaces glicosídicos tanto del pectato (endo- y exo-poligalacturonatoliasa) como de la pectina (endopolimetilgalacturonatoliasa o pectin liasa). Las pectinliasas (endo-) son las únicas pectinasas que hidrolizan la pectina altamente metilada (Figura 2.8) (Singh et al., 2005).

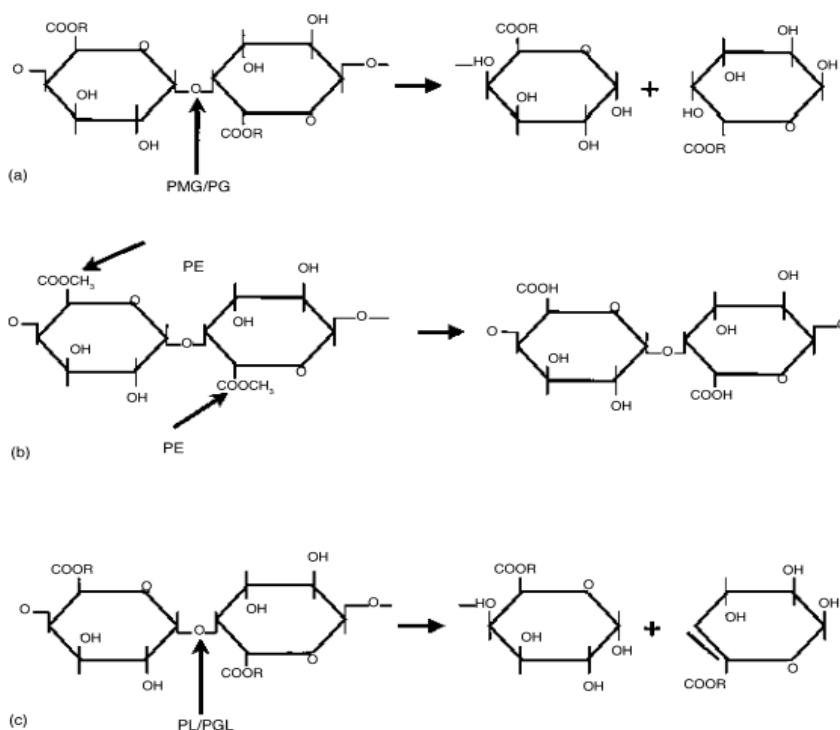


Figura 2.8 Modo de acción de pectinasas: (a) $R = H$ para PG y CH_3 de PMG; (b) PE; y (c) $R = H$ para PGL y CH_3 para PL. La flecha indica el lugar donde la pectinasa reacciona con las sustancias pécticas. PMG, polimetilgalacturonasas; PG, poligalacturonasas; PE, pectinestearasa; PL, pectin liasa (Singh et al., 2005).

2.2.2. Aplicación biotecnológica de enzimas microbianas

Las enzimas extracelulares son utilizadas en la industria cervecera, vitivinícola, alimentación animal, textil, elaboración de detergentes, papelera, etcétera. Esta gran gama de aplicaciones hacen a las enzimas atractivas y demuestran su valor comercial en la industria biotecnológica (Marín, 2007).

Actualmente, las celulasas son ampliamente utilizadas en la industria textil para el ablandamiento de algodón y desteñido de mezclilla, en el mercado de los detergentes para el cuidado del color y anti-deposición. Dentro de la industria alimentaria, son empleadas para favorecer la extracción y filtración de jugos y en la industria de la pasta kraft y de papel se usan para la eliminación de tinta.

Las celulasas han adquirido notable importancia en la industria bioenergética para hidrolizar biomasa lignocelulósica con la finalidad de emplearse en la producción de etanol celulósico, por lo que ha aumentado la demanda de celulasas con altas actividades y estabilidad en diferentes condiciones de temperatura, pH, etcétera. Para aumentar su estabilidad, las celulasas pueden ser inmovilizadas sobre sustratos sólidos, que además permiten su reutilización o uso continuo, haciendo que el proceso sea económicamente viable (Sánchez & Martínez, 2014).

Por otro lado, las xilanasas se han aplicado en diversos procesos industriales: destintado y pretratamiento de la pulpa, clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos y en la industria de la panificación (Ponce & Pérez, 2002).

A través de los años, las pectinasas se han utilizado en varios procesos industriales convencionales, tales como textil, procesamiento de fibras vegetales, té, café, extracción de aceites, en tratamiento de aguas residuales facilitando la eliminación de material proteico, etcétera.

La aplicación industrial más grande de pectinasas, es en la extracción y clarificación de jugos de fruta. Ya que la pectina contribuye a la viscosidad y turbidez del jugo, se realiza una mezcla de pectinasas y amilasas para aclarar los jugos de fruta, disminuyendo el tiempo de filtración hasta el 50% y por lo tanto su turbidez. Éstas, en combinación con otras enzimas, celulasas, xilanasas y arabinosas, se han utilizado para aumentar la eficiencia de prensado de las frutas para la extracción de jugo. La infusión al vacío de pectinasas tiene una aplicación comercial para ablandar la cáscara de los cítricos para su eliminación.

También aceleran la fermentación del té y destruyen la espuma característica de polvos de té instantáneos. En el café se utiliza para eliminar la capa mucilaginosa de los granos.

Durante la fabricación del papel, las pectinasas pueden depolimerizar pectinas y posteriormente, reducir la demanda catiónica de soluciones de pectina y el filtrado de blanqueo con peróxido.

Además, las enzimas pectinolíticas al ser añadidas a las frutas maceradas antes de la adición de levadura en el proceso de producción de vino tinto mejora las características visuales (color y turbidez) y estabilidad en comparación con vinos tratados (Singh et al., 2005).

La acción de estas enzimas sobre protopectina permite su aplicación para la extracción de pectina de los demás componentes del tejido vegetal, para la posterior purificación del producto, el cual es un aditivo alimenticio altamente utilizado como gelificante y estabilizante. Además, esta acción permite la maceración de los tejidos vegetales, cuyo objetivo es producir pulpas de frutas y vegetales para ser utilizadas como ingredientes en alimentos, fundamentalmente para bebés y ancianos (Franchi et al. 2014).



Figura 2.9 Aplicación biotecnológica de las enzimas en diversos sectores industriales.

2.2.3. Métodos de producción enzimática

Para la producción de enzimas de microorganismos, las células se desintegran por frotamiento, agitación, ultrasonidos, etcétera, en un medio extractor, que es una solución salina tamponada, con fuerza iónica y pH adecuados. El producto desintegrado se centrifuga para separar los residuos celulares (Primo, 2007). A continuación se describen dos métodos de producción enzimática:

2.2.3.1. Fermentación

Desde el punto de vista biotecnológico, la fermentación se entiende como el proceso en que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias

orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno. La descomposición de los sustratos es llevada a cabo por enzimas producidas para tal fin por los microorganismos (Suárez & Nieto, 2013). Los productos comercialmente importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a cuatro categorías principales: células microbianas, moléculas grandes como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento celular. La producción comercial de productos de fermentación ha empleado principalmente diversas especies de bacterias, hongos y levaduras.

En cualquier proceso de fermentación que sea objeto de estudio, se deben evaluar una serie de variables para conocer, controlar y manipular el curso de la fermentación; estas variables se suelen dividir entre las que se pueden medir continuamente (temperatura, velocidad de agitación, presión, oxígeno disuelto y pH principalmente) y las que típicamente se miden a ciertos intervalos de tiempo (formación de biomasa y producto, y consumo de sustrato) (Cruz, 2007).

2.2.3.1.1. Fermentación Sólida

El cultivo sólido se define como el proceso donde los microorganismos crecen sobre la superficie de materiales sólidos porosos y humedecidos con niveles de actividad de agua de 0.4 a 0.9, el material sólido puede ser natural o inerte, siendo el primero, el más usado como sustrato para el crecimiento de los microorganismos (Vásquez, 2013). Sin embargo, el sustrato debe tener la humedad suficiente para permitir el crecimiento del microorganismo y que lleve a cabo sus procesos metabólicos (Cruz, 2007).

2.2.3.1.2. Fermentación Líquida

La fermentación líquida o sumergida es definida como la técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, este es el método más utilizado por la industria biotecnológica.

En comparación con la fermentación sólida, presenta las siguientes ventajas: se obtiene un producto más homogéneo, es más sencillo el control de los factores de fermentación como temperatura, aireación, agitación y pH, presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema, y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa (Cruz, 2007).

2.2.3.2. Factores que afectan la producción de enzimas

Para que dicho proceso se lleve a cabo adecuadamente, se deben establecer inicialmente el medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos especialmente de hongos, esto incluye

la determinación de parámetros como pH, temperatura, oxígeno disuelto y concentración de nutrientes; con el fin de que el microorganismo, desarrolle apropiadamente su metabolismo y obtener de esta manera la base de un producto de interés comercial (Cruz, 2007).

- **Temperatura.** La temperatura ambiente es uno de los factores físicos más importantes que afectan directamente el funcionamiento de las enzimas, mismas que se inactivan por debajo de la mínima y por encima de la máxima.

La temperatura óptima de crecimiento de un microorganismo es la temperatura a la cual se multiplica a su máxima velocidad (Olivas & Alarcón, 2004). La mayoría de los hongos pueden ser considerados mesófilos, con temperaturas óptimas entre 22 y 30°C.

- **Concentración de solutos.** Los hongos en su mayoría, pueden crecer en medios cuya concentración de azúcar (o de sal) sería inhibitoria para bacterias. Los hongos poseen la capacidad de utilizar una gran variedad de materiales orgánicos, tanto sencillos como complejos, pues son heterótrofos, por lo que el carbono debe provenir de compuestos orgánicos.

Los carbohidratos simples, como la glucosa, son una fuente de carbono apropiada para la mayoría de los hongos, así como la sacarosa y la maltosa. Otros compuestos más complejos, como el almidón y la celulosa.

Además, los hongos tienen la capacidad de utilizar nitrógeno orgánico, aunque algunas especies pueden utilizar nitrógeno inorgánico tal como las sales de amonio.

En cuanto al requerimiento de agua, la mayoría necesita menos humedad para desarrollarse que las bacterias.

- **pH.** Los hongos, en general, tienen un rango muy amplio de tolerancia al pH. Pueden crecer en concentraciones relativamente altas de ácido, así como en medios bastante alcalinos. El rango de pH para una gran mayoría es de 2-9, pero casi todos crecen mejor en un pH ácido. El pH óptimo se encuentra alrededor de 5.6
- **Oxígeno.** Los hongos son aerobios estrictos, es decir que necesitan oxígeno para desarrollarse. Su crecimiento se ve favorecido cuando hay abundante suministro de oxígeno (García V. , 2004).

2.2.4. Actividad enzimática

La potencia o actividad de una enzima no puede medirse en términos de su concentración, ya que puede estar presente pero en forma desnaturalizada y sin funcionalidad; por esta razón se utiliza la Unidad de Actividad Enzimática (Badui, 2006), la cual se expresa habitualmente en micromoles (μmol) de sustrato, convertidos en producto por minuto, en determinadas condiciones óptimas de ensayo especificadas. Una unidad estándar de actividad enzimática (U) es aquella actividad que cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato por min (Feduchi et al., 2011).

2.2.5. Actividad enzimática específica

Cuando se quiere saber la proporción de enzima con respecto a todas las proteínas que pueden estar presentes en una preparación se utiliza la actividad específica, definida como las unidades de actividad de la enzima en relación con la cantidad total de proteína en miligramos; cuanto más pura sea, mayor será la relación de actividad por miligramo de proteína. Esta forma de expresar la actividad enzimática es de gran utilidad para seguir el grado de purificación de una enzima durante los distintos pasos de su obtención (Badui, 2006).

La actividad específica de una preparación enzimática se define como el número de unidades de enzima por miligramo de proteína ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ o U/mg de proteína) (Feduchi et al., 2011).

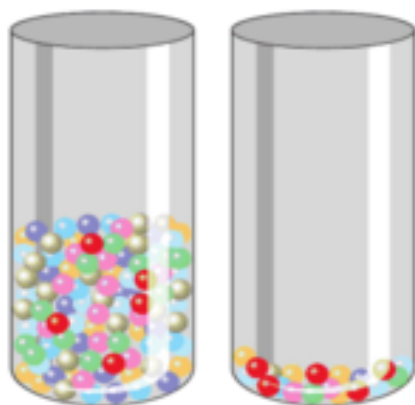
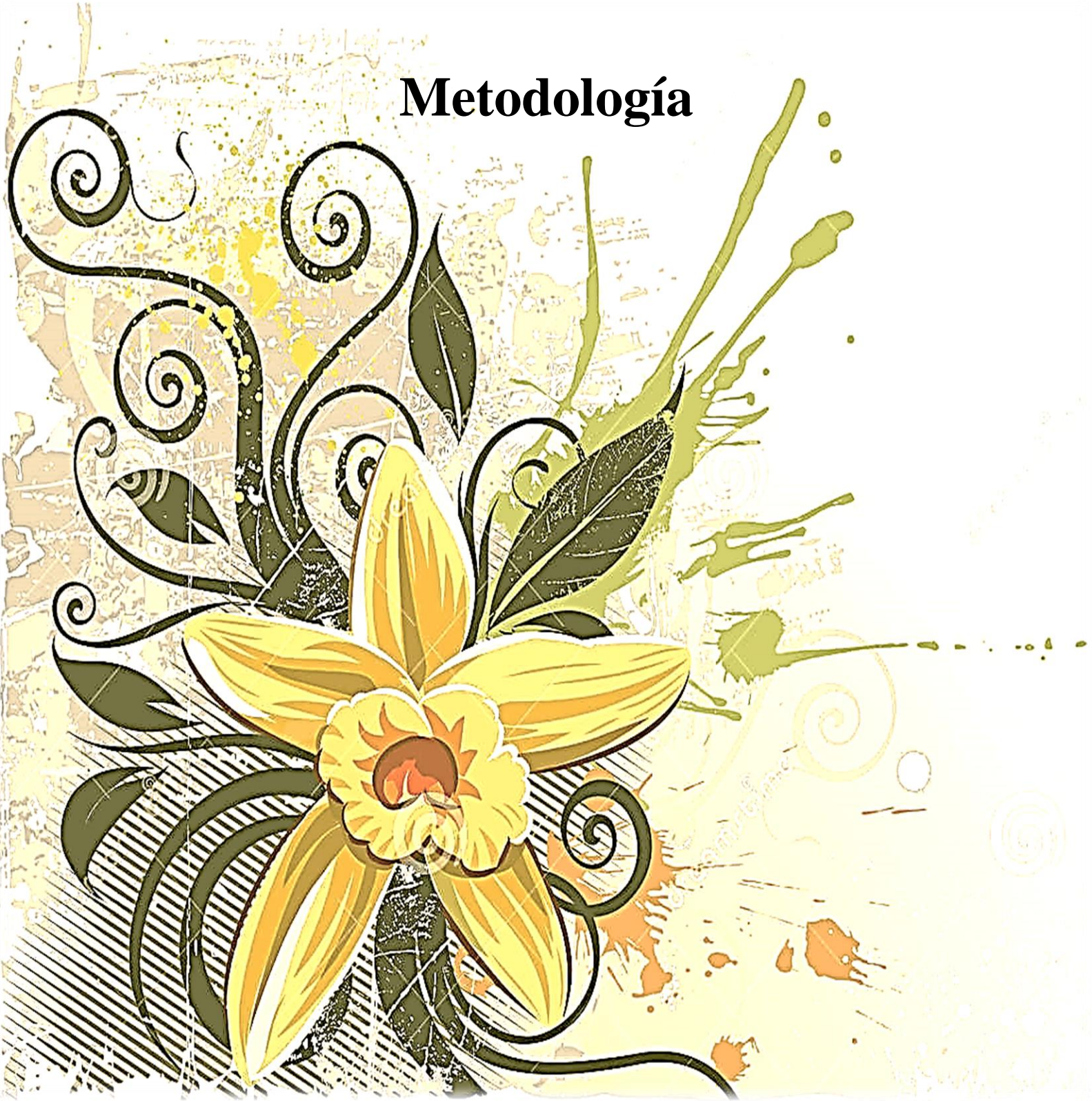


Figura 2.10 Actividad enzimática y actividad específica: se representan como bolas, las moléculas de cualquier proteína aislada; y como bolas rojas, las unidades de actividad. En ambos casos el número de unidades de actividad es el mismo pero el tubo de la derecha tiene una mayor actividad específica debido a que las bolas rojas constituyen una mayor fracción del total preparado (Feduchi et al., 2011).

CAPÍTULO III.

Metodología



3.1. Esquema de trabajo

El diagrama de trabajo se presenta a continuación en la Figura 3.1.

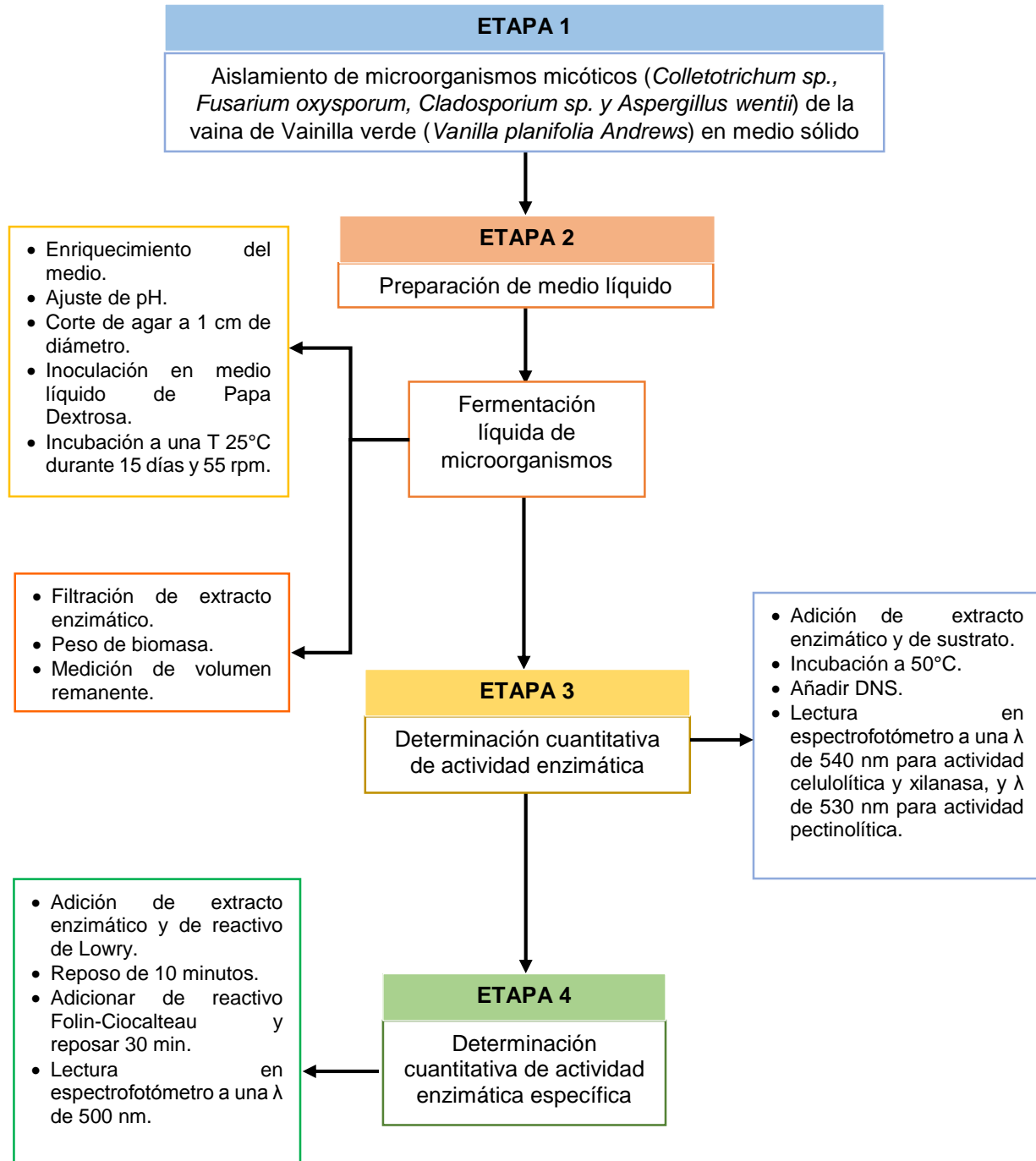


Figura 3.1 Diagrama de extracción y evaluación de enzimas extracelulares de hongos fitopatógenos aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia Andrews*).

3.2. Materiales

Se utilizaron cuatro cepas de hongos aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia* Andrews) de la región de Papantla, Veracruz, *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium* sp. y *Aspergillus wentii*; que para la extracción enzimática, se realizó la preparación de un cultivo líquido nutritivo de papa dextrosa constituido por sales minerales para el desarrollo de cada tipo de enzima requerida en esta investigación y su posterior cuantificación analítica.

3.3. Etapa 1: Aislamiento de microorganismos micóticos en medio sólido

Los microorganismos aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia* Andrews) fueron sembrados por estría en un medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa BD Bioxon Lote 2069184, como se muestra en la Figura 3.3.

Posteriormente, se realizó la incubación a 28°C por 5 días en una estufa bacteriológica RIOSSA Serie E-33 hasta conseguir el desarrollo de los microorganismos.

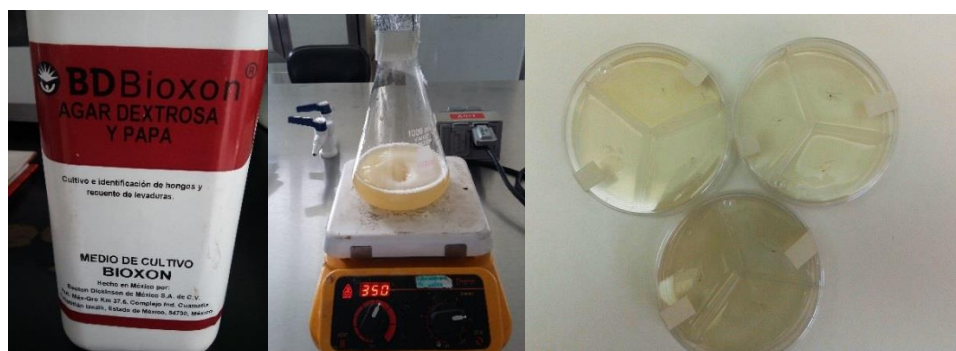


Figura 3.2 Preparación de medio de cultivo (PDA) y solidificación del medio.



Figura 3.3 (a) Hongo inoculado por picadura en agar PDA. (b) Incubación a 28°C en estufa bacteriológica.

3.4. Etapa 2: Preparación del medio líquido

La preparación del medio líquido se realizó según Echandi (1967), colocando a ebullición 200 g de papas peladas y partidas con 20 g de dextrosa en 1 L de agua destilada durante 1 hora.

El medio se enriqueció con 0.1% p/v de extracto de levadura, 0.1% p/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se variaron las proporciones a 0.1% p/v, 0.5% p/v y 1.0% p/v de carboximetilcelulosa (Reactivo MEYER Lote TG1210336), xilano (SIGMA Life Science Lote BCBG9854V) y pectina cítrica (Reactivo MEYER Lote TG0909257) como sustrato para la producción de enzimas celulasas, xilanasas y pectinasas, respectivamente.

Se esterilizó el medio a 15 lb de presión por 15 min en una autoclave modelo CV300. Finalmente, se ajustó el pH del medio con soluciones de sales de fosfato Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 , ambas al 0.1 M; a pH de 5 y 7.



Figura 3.4 (a) Preparación de medio líquido de Papa y Dextrosa. (b) Reactivos principales a utilizar para el enriquecimiento del medio. (c) Esterilización de medio líquido.

3.4.1. Fermentación líquida

De las cepas aisladas de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii*, en medio sólido PDA, se extrajeron fragmentos de micelio de 1 cm de diámetro

en condiciones asépticas (Mier et al., 2002), para después ser inoculados en matraces con 100 mL de medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa y posteriormente incubar a 25°C con una agitación de 55 rpm durante 15 días (360 horas) en Incubadora Orbital SEV-PREND0 modelo INO 650V-7, para promover la segregación de las enzimas.



Figura 3.5 Inoculación de los fragmentos miceliares en matraces con caldo nutritivo Papa Dextrosa y su posterior incubación a 25°C a 55 rpm durante 15 días.

Los cultivos se examinaron diariamente para visualizar el desarrollo adecuado del hongo y detectar posibles contaminaciones.

Al final del proceso de fermentación, se separó el micelio de los hongos, por filtración del extracto enzimático en un papel filtro, midiendo el volumen remanente y posteriormente, se llevó la biomasa a la estufa de secado (ECOSHEL 9025H) para retirar cualquier humedad y así, determinar la cantidad de biomasa por peso seco.

3.5. Etapa 3: Determinación cuantitativa de la actividad enzimática

3.5.1. Fundamento

La determinación de la actividad enzimática (celulolítica, xilanas y pectinolítica) en el extracto obtenido luego de la biotransformación, fue evaluado por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (color amarillo) por la glucosa al ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico de color rojo, previo a un calentamiento durante 5 min a 50°C (Miller, 1959), cuya presencia se detectó mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro JENWAY modelo 6405 UV/Vis; realizándose las pruebas por triplicado en los extractos obtenidos de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii*, aislados de las vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia* Andrews).

3.5.1.1. Actividad celulolítica

Se utilizó como sustrato carboximetilcelulosa (Reactivo MEYER Lote TG1210336) al 2% p/v en una solución tampón de ácido cítrico pH 4.8. Se colocó 0.1 mL de extracto enzimático y 0.9 mL de la solución sustrato, y se incubó a 50°C durante 5 min. Posteriormente, se agregó 1.5 mL de DNS y se colocó en agua en ebullición por 5 min. Después de hervir las muestras, se trasladaron a un baño de agua fría durante 1 min.

Se homogeneizaron las mezclas en un vortex orbital Science Med MX-S. Finalmente, se midió la absorbancia con longitud de onda a 540 nm según Meraz et al. (2012), se ajustó a cero con la solución blanco y se midió la absorbancia de los tubos clasificados, desde la solución menos concentrada, 0.1% p/v, a la más concentrada, 1.0% p/v de CMC.

La actividad celulolítica se calculó mediante la ecuación de regresión lineal $y = 1.0019x + 0.0494$ ($r^2 = 0.9855$), obtenida de una curva patrón con D-glucosa anhidra (1% p/v) (Reactivo MEYER Lote 90809341) como solución estándar, **ANEXO I** (Miller, 1959).

3.5.1.2. Actividad xilanasa

Se utilizó como sustrato xilano (SIGMA Life Science Lote BCBG9854V) al 2% p/v en una solución tampón de ácido cítrico pH 5.3. Se colocó 0.1 mL de extracto enzimático y 0.9 mL de la solución sustrato, y se incubó a 50°C durante 5 min. Posteriormente, se agregó 1.5 mL de DNS y se colocó en agua en ebullición por 5 min. Después de hervir las muestras, se trasladaron a un baño de agua fría durante 1 min.

Se homogeneizaron las mezclas en un vortex orbital Science Med MX-S. Finalmente, se midió la absorbancia con longitud de onda a 540 nm según Meraz et al. (2012), se ajustó a cero con la solución blanco y se midió la absorbancia de los tubos clasificados, desde la solución menos concentrada, 0.1% p/v, a la más concentrada, 1.0% p/v de xilano.

La actividad xilanasa se calculó mediante la ecuación de regresión lineal $y = 0.1073x + 0.0176$ ($r^2 = 0.9194$), obtenida de una curva patrón con D-xilosa (1% p/v) (Reactivo MEYER Lote G1009396) como solución estándar, **ANEXO I** (Miller, 1959).

3.5.1.3. Actividad pectinolítica

Se utilizó como sustrato ácido poligalacturónico (SIGMA Life Science Lote BCBM2019V) al 2% m/v en una solución tampón de acetatos pH 4.8. Se colocó 0.1 mL de extracto enzimático y 0.9 mL de la solución sustrato, y se incubó a 50°C durante 5 min. Posteriormente, se agregó 1.5 mL de DNS y se colocó en agua en ebullición por 5 min. Después de hervir las muestras, se trasladaron a un baño de agua fría durante 1 min.

Se homogeneizaron las mezclas en un vortex orbital Science Med MX-S. Finalmente, se midió la absorbancia con longitud de onda a 530 nm según Kashyap et al. (2000), se ajustó a cero con la solución blanco y se midió la absorbancia de los tubos clasificados, desde la solución menos concentrada, 0.1% p/v, a la más concentrada, 1.0% p/v de pectina cítrica.

La actividad pectinolítica se calculó mediante la ecuación de regresión lineal $y = 3.7625x - 0.0241$ ($r^2 = 0.9939$), obtenida de una curva patrón con ácido D-galacturónico (1% p/v) (Fluka Analytical Lote BCBL5832V) como solución estándar, **ANEXO I** (Miller, 1959).



Figura 3.6 Metodología para la determinación de actividad enzimática: (a) Preparación de muestras y blancos, (b) incubación de muestras a 50°C/5 min, (c) agregar reactivo DNS, (d) hervir muestras por 5 min y (e) leer absorbancia de las muestras en espectrofotómetro.

3.6. Etapa 4: Determinación cuantitativa de la actividad enzimática específica

3.6.1. Fundamento

La determinación de actividad enzimática específica se realizó mediante el método colorimétrico de Lowry (1951), el cual realiza una valoración cuantitativa de las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer.

3.6.2. Procedimiento

Se colocó 0.1 mL de extracto enzimático y se adicionó 1 mL de reactivo de Lowry, el cual se prepara con Na_2CO_3 al 2%, NaOH 0.1 N, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% y $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ al 2% en proporciones 50:0.5:0.5; las muestras se mezclaron durante 2 segundos en un vortex orbital Science Med MX-S y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (HYCEL Lote 295889), se mezcló durante 2 segundos y se dejó reposar durante 30 min.

Inmediatamente, se dispuso a leer las muestras preparadas en un espectrofotómetro JENWAY modelo 6405 UV/Vis con las siguientes condiciones. Se midió a una longitud de onda de 500 nm según García & Vázquez (1998), se ajustó a cero con la solución blanco y se midió la absorbancia de los tubos clasificados, desde la solución menos concentrada, 0.1% p/v, a la más concentrada, 1.0% p/v, al como sustrato CMC, xilano o pectina cítrica.

Finalmente, la actividad específica se calculó mediante la ecuación de regresión lineal $y = 0.5071x + 0.1144$ ($r^2 = 0.9752$), obtenida de una curva patrón con Albúmina de suero bovino (1% p/v) como solución estándar, **ANEXO I**.

3.7. Diseño experimental

El modelo a utilizar fue un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, donde se utilizaron extractos enzimáticos obtenidos de cuatro hongos fitopatógenos, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii*, aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia Andrews*) a pH y concentraciones de s (Grebechova & Prieto, 2006)ustrato diferentes, para promover el desarrollo metabólico fúngico (Tabla 3.1). Las variables de respuesta fueron, la actividad enzimática celulolítica, xilanasa, pectinolítica y específica.

El análisis de datos se realizó mediante un ANOVA con un $\alpha=0.05$ con la ayuda del programa estadístico Minitab 17 Statistical Software, realizando las pruebas de medias de Tukey.

Tabla 3.1 Diagrama de diseño experimental.

Variables Independientes				Niveles	Variables Dependientes
Condición	pH	Variables	Concentración de sustrato		
<i>Fusarium oxysporum</i>				pH	Concentración de sustrato
<i>Cladosporium sp.</i>	0.5%	Actividad xilanasa			
<i>Colletotrichum sp.</i>	0.5%	Actividad pectinolítica			
<i>Aspergillus wentii</i>	1.0%	Actividad enzimática específica			

3.8. Análisis de correlación entre el contenido proteico y actividad enzimática específica

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para estudiar el grado de asociación que existe entre el contenido proteico y la actividad enzimática específica de los extractos fúngicos aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia Andrews*), para ello se utilizó el software MiniTab 17 Statistical Software.

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Para la presente investigación, las cepas de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii* (Figura 4.1), aisladas de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia Andrews*) de la región de Papantla, Veracruz se inocularon en medio líquido de Papa Dextrosa y se colocaron bajo las siguientes condiciones de temperatura, agitación y tiempo: 25°C a 55 rpm durante 15 días; evaluándose como parámetros de crecimiento y desarrollo: la masa seca del micelio y el volumen remanente de extracto enzimático; y como parámetros fisiológicos: las actividades enzimáticas celulolítica, xilanasa, pectinolítica y específica excretadas al medio; describiéndose a continuación cada parámetro evaluado.

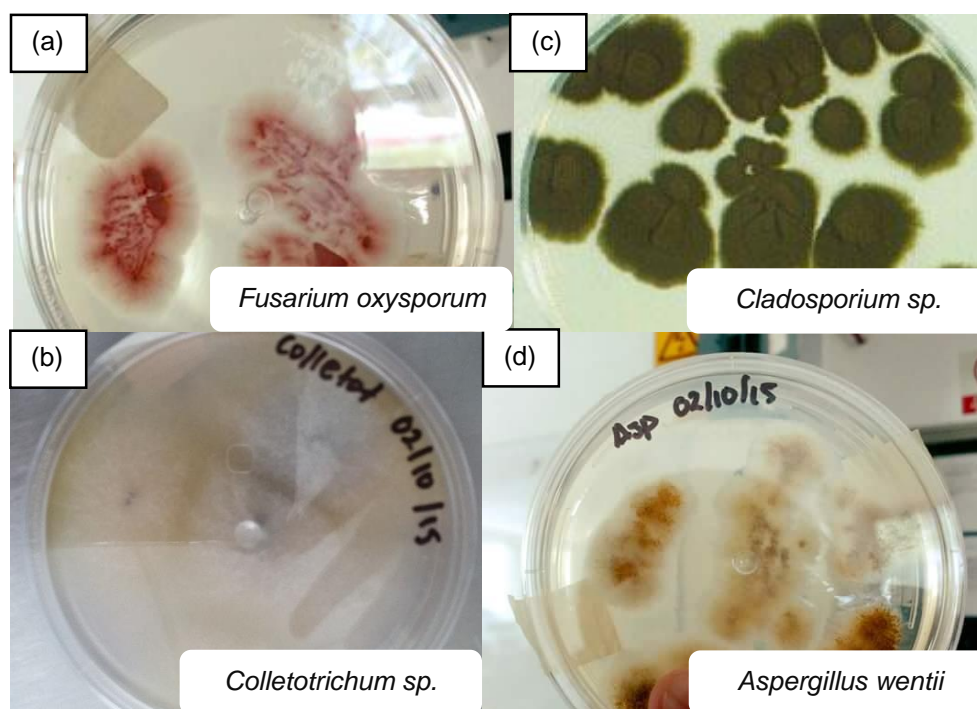


Figura 4.1 Cepas puras de hongos aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia Andrews*): (a) *Fusarium oxysporum*, (b) *Colletotrichum sp.*, (c) *Cladosporium sp.* y (d) *Aspergillus wentii*.

4.1. Fermentación líquida

4.1.1. Evaluación de desarrollo micelial

Al día 15, se observó el desarrollo micelial de los hongos (*Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii*), en el medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa.

Como se observa en la Figura 4.2, *Fusarium oxysporum* presentó a pH 5 un micelio de color blanco y a pH 7 un color rosado durazno con tinte púrpura.

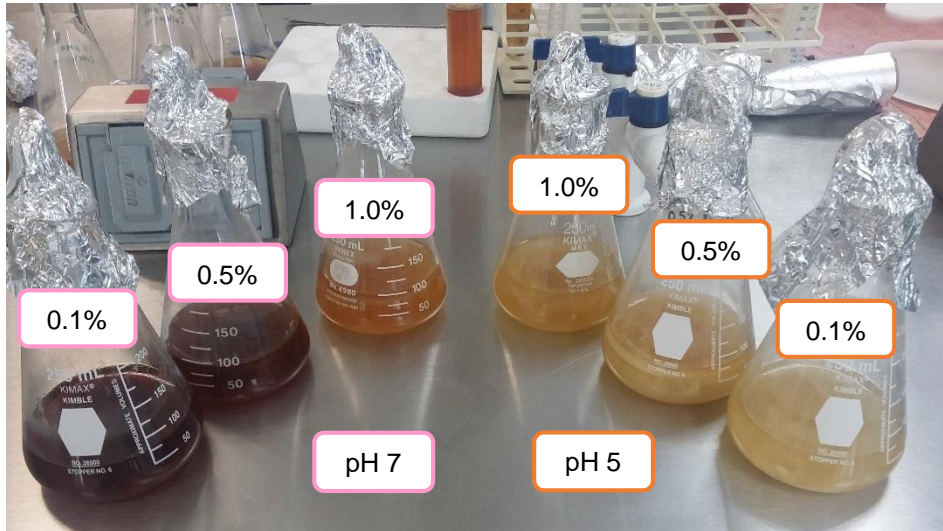


Figura 4.2 Crecimiento micelial del hongo *Fusarium oxysporum* en medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa después de 15 días de incubación.

El micelio en *Colletotrichum sp.* a pH 5, se caracterizó por ser denso y algodonoso, presentándose una variación de blanco a café (Figura 4.3).

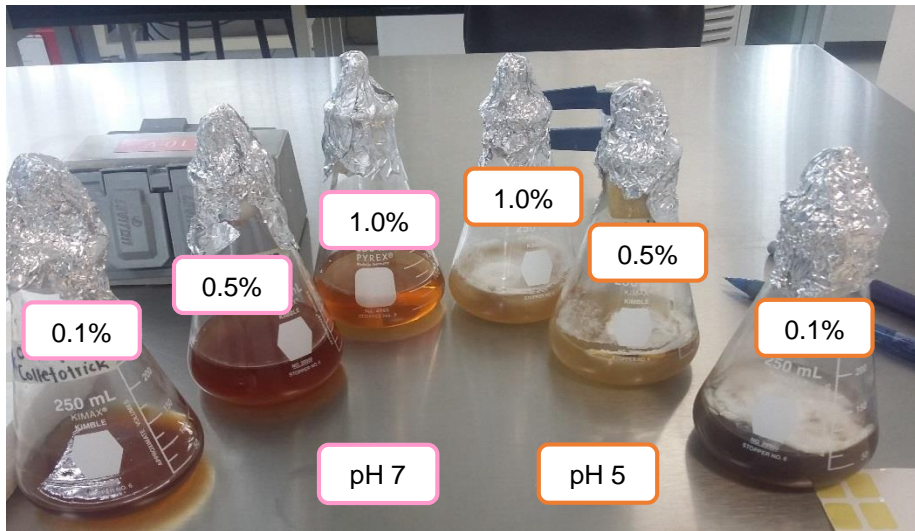


Figura 4.3 Crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum sp.* en medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa después de 15 días de incubación.

El hongo *Cladosporium sp.* a pH 5 y 7, tuvo formación de colonias aterciopeladas y pulverulentas de color verde oliva hasta un gris verdoso (Figura 4.4).

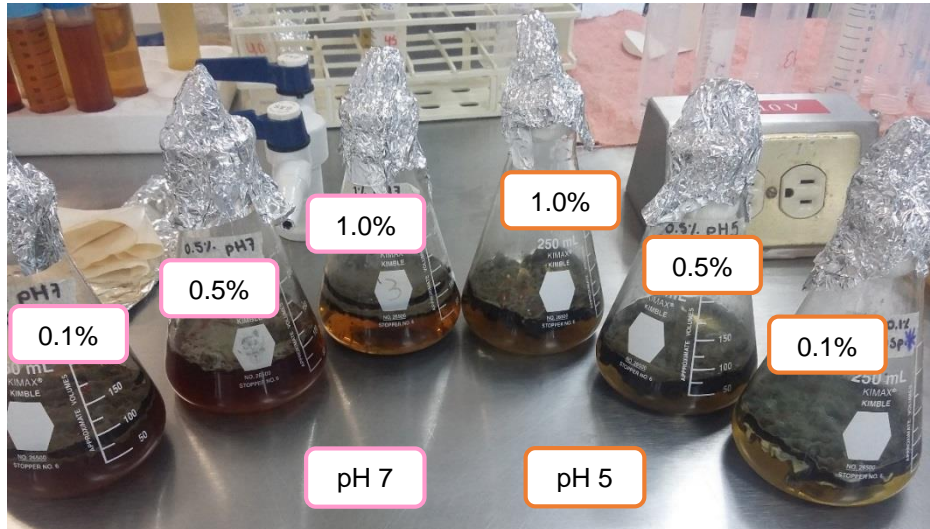


Figura 4.4 Crecimiento micelial del hongo *Cladosporium* sp. en medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa después de 15 días de incubación.

Finalmente, el crecimiento micelial de *Aspergillus wentii* a pH 5 y 7, presentó colonias blancas, polvorosas y algodonosas que, con el crecimiento y envejecimiento del hongo se pigmentaban a color café (Figura 4.5).

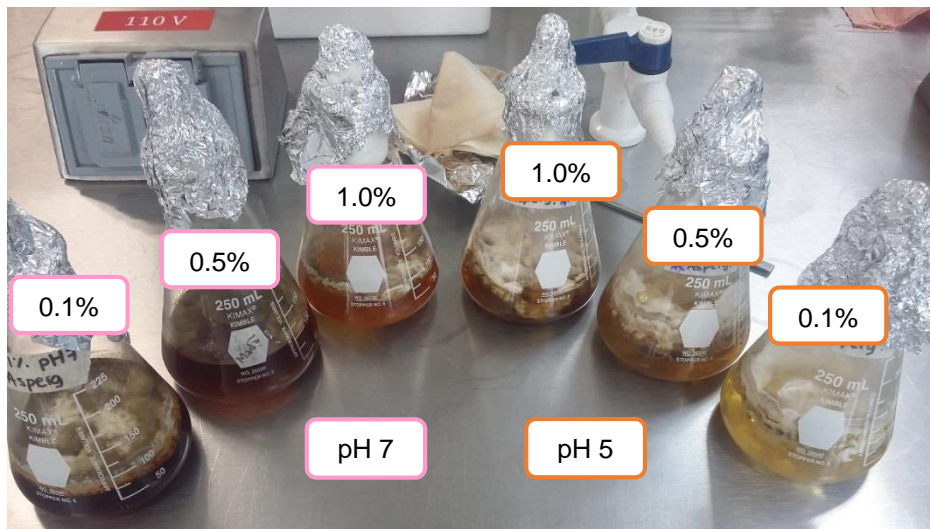


Figura 4.5 Crecimiento micelial del hongo *Aspergillus wentii* en medio líquido nutritivo de Papa Dextrosa después de 15 días de incubación.

Así mismo, *Aspergillus wentii* se caracterizó por su desarrollo en forma de pellet de color claro y diámetro variable en los medios como se muestra en la Figura 4.6; esto concuerda con lo obtenido por Grebechova & Prieto (2006). Ellos realizaron una fermentación sumergida de las cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* con 12 medios diferentes de cultivo orgánico sintético a

pequeña escala y en un biorreactor New Brunswicken a un pH de 4.5-5.5 y velocidad de aireación de 180-200 rpm durante 26-120 horas; desarrollándose pellets a concentraciones de conidias de 1×10^6 /mL. Asumiendo, la formación de pellet a una mejora en la biosíntesis de las enzimas, la transferencia de oxígeno y de nutrientes del medio.



Figura 4.6 Desarrollo en forma de pellet de *Aspergillus wentii*.

Por otro lado, en la investigación realizada se colocó 1 cm de diámetro de inóculo, suponiendo que la distribución de esporas es lo más homogénea posible, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 4.1 Diámetro de los pellets desarrollados en *Aspergillus wentii* durante el proceso de fermentación líquida.

pH	Concentración de Pectina cítrica (%)	Diámetro del pellet (cm)
5	1.0	0.7
	0.1	0.4
7	0.5	0.1
	1.0	0.4

En la tabla 4.1 se muestran los diámetros de los pellets desarrollados en *A. wentii*, observándose un valor máximo a pH 5 y una concentración de pectina cítrica de 1.0% p/v, de 0.7 cm. Se infiere que, el tamaño de los pellets se da por el equilibrio termodinámico que existe entre la superficie del pellet y el medio; la alta hidrofobicidad de las esporas rompe la tensión superficial del medio dando lugar al crecimiento en forma de pellet, mientras mayor sea el inóculo, menor será la tensión superficial del medio y más pequeños los pellets formados (Izarra et al., 2010).

4.1.2. Volumen remanente y peso de biomasa

La biomasa se determinó por diferencia de peso seco, filtrándose el extracto y obteniendo un volumen final de 75 mL.

En la Figura 4.7, se observa el desarrollo micelial de los hongos *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii*.

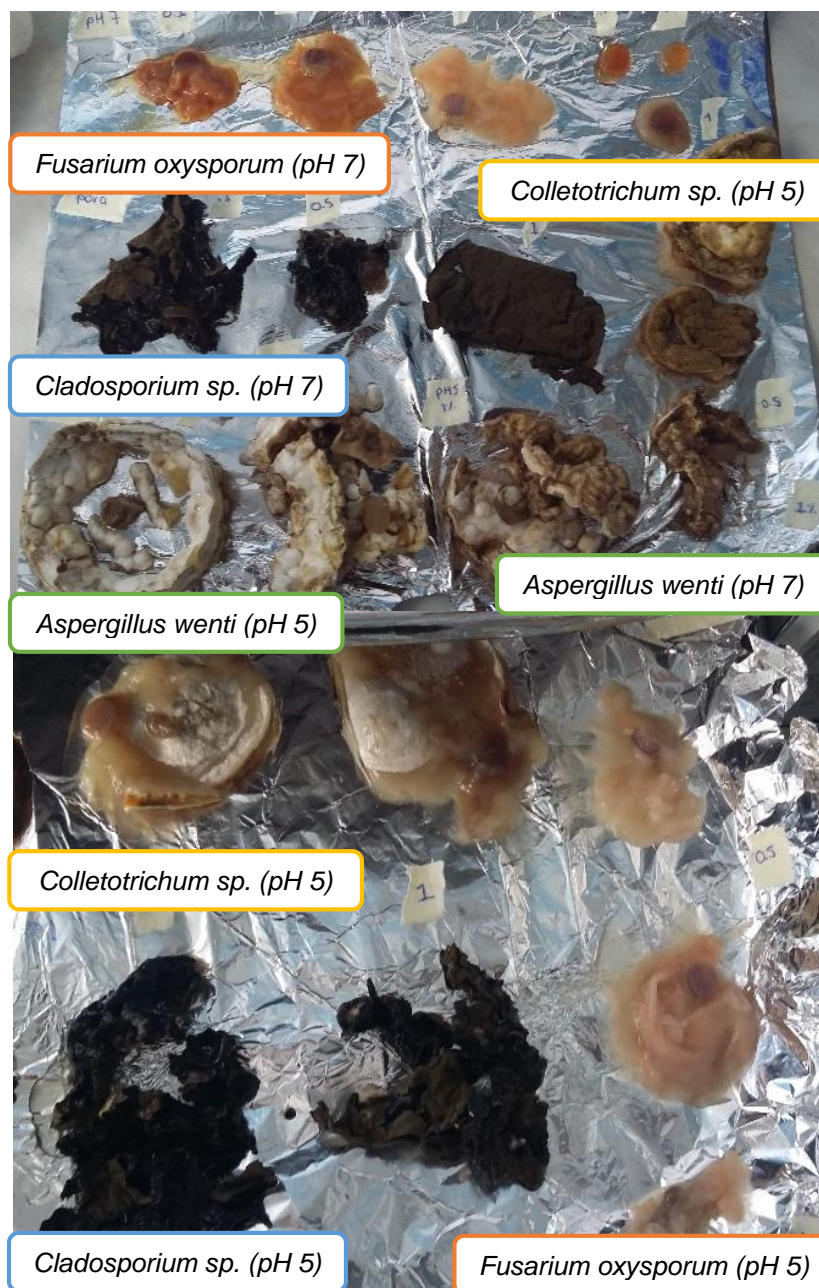


Figura 4.7 Obtención de biomasa de los hongos *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii* por filtración del extracto enzimático.

Tabla 4.2 Biomasa en gramos, obtenida en los cuatro hongos desarrollados en fermentación líquida a distintas concentraciones de sustrato y pH.

Hongo	pH	Concentración de sustrato (%)	Biomasa (g)		
			Sustrato		
			CMC	Xilano	Pectina cítrica
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	0.1	0.261 ^{aa}	0.267 ^{aa}	0.226 ^{aa}
		0.5	0.286 ^{aa}	0.254 ^{aa}	0.306 ^{aa}
		1.0	0.173 ^{aa}	0.298 ^{aa}	0.139 ^{aa}
	7	0.1	0.233 ^{aa}	0.219 ^{ba}	0.304 ^{aa}
		0.5	0.198 ^{aa}	0.235 ^{ba}	0.203 ^{aa}
		1.0	0.276 ^{aa}	0.231 ^{ba}	0.109 ^{aa}
<i>Cladosporium sp.</i>	5	0.1	0.110 ^{aa}	0.104 ^{aa}	1.468 ^{aa}
		0.5	0.116 ^{aa}	0.171 ^{aa}	1.889 ^{aa}
		1.0	0.046 ^{aa}	0.091 ^{aa}	1.714 ^{aa}
	7	0.1	0.021 ^{aa}	0.030 ^{aa}	1.130 ^{ba}
		0.5	0.037 ^{aa}	0.037 ^{aa}	0.562 ^{ba}
		1.0	0.183 ^{aa}	0.230 ^{aa}	0.524 ^{ba}
<i>Colletotrichum sp.</i>	5	0.1	0.035 ^{aa}	0.033 ^{ab}	1.336 ^{aa}
		0.5	0.077 ^{aa}	0.112 ^{ab}	0.385 ^{aa}
		1.0	0.050 ^{aa}	0.377 ^{aa}	0.469 ^{aa}
	7	0.1	0.095 ^{aa}	0.043 ^{ab}	0.060 ^{aa}
		0.5	0.060 ^{aa}	0.053 ^{ab}	0.047 ^{aa}
		1.0	0.217 ^{aa}	0.587 ^{aa}	0.036 ^{aa}
<i>Aspergillus wentii</i>	5	0.1	0.014 ^{aa}	0.022 ^{aa}	1.320 ^{aa}
		0.5	0.019 ^{aa}	0.222 ^{aa}	1.475 ^{aa}
		1.0	0.015 ^{aa}	0.198 ^{aa}	1.489 ^{aa}
	7	0.1	0.013 ^{aa}	0.151 ^{aa}	1.042 ^{ba}
		0.5	0.144 ^{aa}	0.044 ^{aa}	0.828 ^{ba}
		1.0	0.025 ^{aa}	0.034 ^{aa}	0.360 ^{ba}

* Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones independientes que son estadísticamente diferentes si $p \leq 0.05$ después de aplicar un análisis de medias de Tukey.

En la tabla 4.2, se muestran los pesos biomásicos de los micelios obtenidos al variar las concentraciones de sustrato (carboximetilcelulosa, xilano y pectina cítrica) y pH.

Observándose así que, el peso de biomasa máximo en sustrato de carboximetilcelulosa se dio en *Fusarium oxysporum* a pH 5 y concentración de 0.5% p/v, de 0.286 g. Asimismo, el mínimo valor se obtuvo en *Aspergillus wentii* a pH 7 y concentración de 0.1% p/v, de 0.013 g.

El peso de biomasa máximo al utilizar xilano como sustrato se observó en *Colletotrichum sp.* a pH 7 y concentración de 1.0% p/v, de 0.587 g. El mínimo valor fue de *Aspergillus wentii* a pH 5 y concentración de 0.1% p/v, de 0.022 g.

Mientras que, el peso de biomasa máximo obtenido al utilizar pectina cítrica como sustrato fue de *Cladosporium sp.* a pH 5 y concentración de 0.5 % p/v, de 1.889 g. El mínimo valor se observó en *Colletotrichum sp.* a pH 7 y concentración de 1.0% p/v, de 0.036 g.

Tal como mencionan Suárez & Nieto (2013), cuando el pH es bajo se incentiva la producción de biomasa y el consumo de glucosa, mientras que un pH básico puede estimular la producción de exopolisacáridos; observando en esta investigación un mejor desarrollo biomásico a pH 5.

Por otra parte, al emplearse una temperatura de incubación de 25°C que entra dentro del rango para fermentaciones líquidas, ésta influye de forma benéfica en el metabolismo de los hongos *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii*, ya que existe un aumento de la solubilidad del oxígeno disuelto en el medio, lo que conlleva a que la disponibilidad de este sea mayor en el interior del medio de cultivo y por consiguiente el crecimiento y metabolismo son mejores.

La aireación fue otro factor importante, ya que influyó directamente en la oxigenación y la homogeneización del medio de cultivo durante la fermentación. La aireación que se dio por agitación a 55 rpm en los caldos, permitió que el oxígeno del ambiente se disolviera en el medio. Suárez & Nieto, establecieron que una agitación muy fuerte puede llevar al rompimiento del micelio por las fuerzas de agitación y por lo tanto la formación de pellets y en consecuencia, la producción de biomasa se ve reducida, así como la producción de exopolisacáridos.

A su vez, la composición del medio de cultivo empleado para la fermentación líquida es importante, ya que de este depende el crecimiento micelial, y por ende la biosíntesis de metabolitos. También es importante definir la relación carbón-nitrógeno ya que puede influir en la eficiencia de producción de biomasa y metabolitos (Suárez & Nieto, 2013). En la investigación realizada, se ocupó como medio de crecimiento Papa Dextrosa, el cual es muy utilizado para el crecimiento de hongos; utilizando extracto de levadura (0.1% p/v) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.1% p/v) como fuente de nitrógeno y carboximetilcelulosa, xilano o pectina cítrica como fuente de carbono y para la producción de enzimas específicas; lo cual favoreció el desarrollo micelial de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii*.

4.2. Cuantificación de actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática es una forma de medir la cantidad de enzima que se forma durante la fermentación líquida en un sustrato determinado (Paredes et al., 2010); la cual se evaluó en dicho trabajo experimental, mediante el método de Miller (1959).

4.2.1. Actividad celulolítica

Las celulasas son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, las cuales involucran un complejo enzimático que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa (Manjarrés et al., 2011).

Tabla 4.3 Actividad celulolítica (UI/L).

Hongo	pH	Concentración de sustrato CMC (%)	Actividad enzimática (UI/L)
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	0.1	393.92 ^{ab}
		0.5	470.44 ^{aab}
		1.0	327.38 ^{aa}
	7	0.1	0 ^{ab}
		0.5	355.66 ^{aab}
		1.0	590.21 ^{aa}
<i>Cladosporium sp.</i>	5	0.1	13206.57 ^{ba}
		0.5	10969.16 ^{ba}
		1.0	10977.48 ^{ba}
	7	0.1	10653.09 ^{aa}
		0.5	17548.32 ^{aa}
		1.0	15793.33 ^{aa}
<i>Colletotrichum sp.</i>	5	0.1	473.77 ^{ab}
		0.5	708.32 ^{ab}
		1.0	1380.38 ^{aa}
	7	0.1	651.76 ^{ab}
		0.5	603.52 ^{ab}
		1.0	2848.92 ^{aa}
<i>Aspergillus wentii</i>	5	0.1	77.85 ^{ba}
		0.5	94.49 ^{ba}
		1.0	566.92 ^{ba}
	7	0.1	0 ^{aa}
		0.5	1536.75 ^{aa}
		1.0	2402.10 ^{aa}

* Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones independientes que son estadísticamente diferentes si $p \leq 0.05$ después de aplicar un análisis de medias de Tukey.

En la tabla 4.3 se puede apreciar la actividad celulolítica determinada a pH 5 y 7 y concentraciones de carboximetilcelulosa (CMC) de 0.1, 0.5 y 1.0% p/v; observándose la actividad máxima en el hongo *Cladosporium sp.* a pH 7 y concentración de 0.5% p/v, de 17548.32 UI/L; y la mínima actividad en *Aspergillus wentii* a pH 5 y concentración de 0.1%, de 77.85 UI/L. De igual manera, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en *Cladosporium sp.* y *Aspergillus wentii*

al variar el pH, mientras que en *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum sp.* existen diferencias significativas entre concentraciones de sustrato de CMC.

La máxima actividad se refiere a una alta concentración de sustrato, es decir, que a mayor concentración de sustrato la actividad enzimática es mayor. Mientras que el descenso dramático de actividad se atribuye a una disminución en la concentración de sustrato disponible (Harvey & Ferrier, 2011).

Por otro lado, Paredes et al. (2010), resaltan la importancia de la temperatura y el pH para la obtención de enzimas, determinando que a temperaturas superiores a la óptima, la enzima produce menor cantidad de azúcares; por lo que se debe trabajar en un intervalo de temperatura en el que la enzima sea estable y retenga su capacidad catalítica. También observaron que la hidrólisis de la celulosa por acción de las celulasas se ve influenciada por la concentración de iones hidrógeno del medio, debido a que se afecta el grado de ionización de los aminoácidos del complejo enzima-sustrato. A un pH menor a 5.3; la actividad de la enzima disminuye, y por ende la formación de glucosa es baja, lo mismo ocurre a un pH superior a 7. Todo ello ocurre, debido a que se lleva a cabo un proceso de desnaturalización de la enzima que provoca la disminución de la velocidad de reacción. Por lo cual, la efectividad y reproducibilidad del tratamiento dependerá del control de estas dos variables. Cabe señalar que la actividad celulasa en dicha investigación se vio favorecida a una concentración de 1.0% p/v de CMC, una temperatura de 25°C y pH neutro 7.

Del mismo modo Mushimiyimana & Tallapragada (2013), evaluaron la actividad celulolítica de *Cladosporium cladosporioides* en cuatro sustratos vegetales, los cuales se sometieron a una incubación a 28°C durante 7 días. Finalmente, la actividad enzimática se midió mediante el método de DNS, obteniendo un valor máximo de 32300 UI/L en cáscara de zanahoria, 25100 UI/L en cebolla y 23300 UI/L en cáscara de remolacha, siendo similares al reportado en este estudio en *Cladosporium sp.* (17548.32 UI/L), en donde se utilizó como sustrato CMC y se tuvo un control de pH, agitación (55 rpm) y un periodo de incubación de 15 días; estimulando así la secreción de las celulasas al medio extracelular.

Por el contrario, Desai & Iyer (2016) recientemente evaluaron la actividad celulolítica de *Aspergillus niger* DX-23 en medio de Mandels suplementado con madera de abedul a una concentración de 0.5 y 1.0% p/v, inoculado con 10^6 esporas e incubado durante 48 horas a una temperatura de 30°C y 150 rpm. La actividad se evaluó mediante el método de DNS; obteniendo un valor máximo de 400 UI/L, siendo un valor semejante al de nosotros en *Aspergillus wentii* (566.92 UI/L de) a un pH 5 y concentración de CMC de 1.0% p/v.

De manera que a pesar de utilizarse una agitación más baja en este trabajo, se obtuvo una producción favorable de enzimas, esto puede ser debido a la temperatura de 25°C y pH de 5, siendo los óptimos para permitir un buen desarrollo metabólico del hongo y aumentar la velocidad de reacción.

4.2.2. Actividad xilanasa

La xilanasa, componente mayoritario de un complejo sistema enzimático, actúa en la naturaleza depolimerizando las moléculas de xilano en unidades de pentosas monoméricas, que son usadas por hongos como fuente principal de carbono (Paz & Hernández, 2000).

Tabla 4.4 Actividad xilanasa (UI/L).

Hongo	pH	Concentración de sustrato Xilano (%)	Actividad enzimática (UI/L)
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	0.1	0 ^{ba}
		0.5	0 ^{ba}
		1.0	0 ^{ba}
	7	0.1	4927.00 ^{aa}
		0.5	8903.39 ^{aa}
		1.0	13205.96 ^{aa}
<i>Cladosporium sp.</i>	5	0.1	48322.46 ^{ba}
		0.5	34420.63 ^{ba}
		1.0	34886.61 ^{ba}
	7	0.1	40090.09 ^{aa}
		0.5	84125.50 ^{aa}
		1.0	102687.17 ^{aa}
<i>Colletotrichum sp.</i>	5	0.1	0 ^{ba}
		0.5	1882.57 ^{ba}
		1.0	2938.80 ^{ba}
	7	0.1	12407.58 ^{aa}
		0.5	11994.41 ^{aa}
		1.0	16321.84 ^{aa}
<i>Aspergillus wentii</i>	5	0.1	0 ^{aa}
		0.5	0 ^{aa}
		1.0	0 ^{aa}
	7	0.1	0 ^{aa}
		0.5	0 ^{aa}
		1.0	0 ^{aa}

* Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones independientes que son estadísticamente diferentes si $p \leq 0.05$ después de aplicar un análisis de medias de Tukey.

Como se observa en la tabla 4.4, la actividad xilanasa máxima se obtuvo en el hongo *Cladosporium sp.* a pH 7 y concentración de xilano de 1.0% p/v, de 102687.17 UI/L; y donde la mínima actividad fue de *Colletotrichum sp.* a pH 5 y concentración de xilano de 0.5% p/v, de 1882.57 UI/L. De igual manera, se observaron diferencias significativas en *Cladosporium sp.* *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum sp.* al evaluar la variación de pH ($p \leq 0.05$).

Para evaluar la actividad xilanasa es importante resaltar que una máxima actividad se refiere a altas concentraciones de xilano, debido a que se produce una activación proporcional. Además, de que a una concentración de 1.0% p/v de xilano, una temperatura óptima de incubación de 25°C, agitación de 55 rpm y un pH 7 se favorece el desarrollo de enzimas, semejante a lo observado con las celulasas.

Así mismo, Patel & Prajapati (2014) realizaron la fermentación sólida de *Cladosporium sp.* utilizando como sustrato desechos agrícolas lignocelulósicos y para enriquecer el medio se utilizó carboximetilcelulosa. Las muestras se incubaron a 28°C durante 10 días bajo condiciones estáticas, midiendo la actividad xilanasa por el método de DNS cada 24 horas; obteniendo un valor máximo de 51000 UI/L. Siendo 2 veces menor que el valor observado en este estudio en *Cladosporium sp.* (102687.17 UI/L); esto puede ser debido a que se trabajó como sustrato específico para la producción de xilanasas, el xilano, además de estar bajo condiciones de agitación, control de pH y fermentación sumergida, los cuales mejoran sustancialmente la actividad xilanasa del hongo y estimulan la secreción de las xilanasas al medio extracelular.

En contraste con Zimbardi et al. (2013), quienes realizaron la fermentación sólida de *Colletotrichum graminicola* utilizando como sustrato residuos agroindustriales. Las muestras se incubaron a 25°C durante 8 días. La actividad xilanasa se evaluó mediante el método de DNS, obteniendo un valor máximo 378.1 UI/g. Siendo un valor similar a la actividad xilanasa reportada en el **Anexo II** de *Colletotrichum sp.* que fue de 444.67 UI/g a un pH 7 y concentración de 1.0% p/v de xilano, siendo que este se trabajó en fermentación sumergida durante 15 días de incubación, lo cual permite una mejor oxigenación, homogeneización del medio y por ende se tiene mayor control de los parámetros: temperatura, pH y agitación.

A pesar de ser valores similares, la diferencia radica en el tipo de fermentación utilizada, Suárez & Nieto (2013) mencionan que la principal diferencia entre la fermentación líquida (FEL) y la fermentación sólida (FES), radica en que el crecimiento de los hongos filamentosos en esta última se efectúa en sustrato sólido cercano a la ausencia de agua. Sin embargo, a pesar de muchas investigaciones que se han realizado, se siguen presentando problemas como son la baja ratio de transferencia de O₂, CO₂, remoción de calor y contaminación bacteriana. Por otro lado, es un proceso lento para el cual muy pocos organismos se presentan debido a su baja actividad de agua, siendo además un proceso difícil de monitorizar, controlar y escalar; siendo la FEL un proceso mejor controlado y de mejor homogeneización del cultivo.

4.2.3. Actividad pectinolítica

Las pectinasas son un grupo de enzimas utilizadas para la degradación de sustancias pécticas, las cuales juegan un papel importante en la industria de zumos de fruta y vino; mejorando la licuefacción, clarificación y filtración, liberando compuestos de color y sabor de las pieles de frutas (Merín et al., 2011).

Tabla 4.5 Actividad pectinolítica (UI/L).

Hongo	pH	Concentración de sustrato Pectina cítrica (%)	Actividad enzimática (UI/L)
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	0.1	335.90 ^{aa}
		0.5	752.74 ^{aa}
		1.0	788.62 ^{aa}
	7	0.1	327.93 ^{ba}
		0.5	138.78 ^{ba}
		1.0	0 ^{ba}
<i>Cladosporium sp.</i>	5	0.1	1048.19 ^{aa}
		0.5	1247.97 ^{aa}
		1.0	1272.78 ^{aa}
	7	0.1	371.34 ^{ba}
		0.5	361.15 ^{ba}
		1.0	0 ^{ba}
<i>Colletotrichum sp.</i>	5	0.1	0 ^{aa}
		0.5	2370.54 ^{aa}
		1.0	193.36 ^{aa}
	7	0.1	412.62 ^{aa}
		0.5	0 ^{aa}
		1.0	412.98 ^{aa}
<i>Aspergillus wentii</i>	5	0.1	734.57 ^{aa}
		0.5	396.15 ^{aab}
		1.0	290.72 ^{ab}
	7	0.1	270.34 ^{ba}
		0.5	0 ^{bab}
		1.0	0 ^{bb}

* Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones independientes que son estadísticamente diferentes si $p \leq 0.05$ después de aplicar un análisis de medias de Tukey.

En la tabla 4.5 se puede observar la actividad pectinolítica determinada a concentraciones de pectina cítrica de 0.1, 0.5 y 1.0% p/v y pH 5 y 7; destacando el valor máximo obtenido por el hongo *Colletotrichum sp.* a pH 5 y concentración de 0.5% p/v, de 2370.54 UI/L; y donde la mínima

actividad se obtuvo en el hongo *Fusarium oxysporum* a pH 7 y concentración de 0.5% p/v, de 138.78 UI/L. De igual manera, se observaron diferencias significativas en *Cladosporium sp.*, *Aspergillus wentii* y *Fusarium oxysporum* al variar el pH ($p \leq 0.05$), siendo *Aspergillus wentii* el único en presentar diferencia significativa entre concentraciones al utilizar pectina cítrica como sustrato.

De acuerdo a los resultados anteriores, se debe destacar que la máxima actividad se refiere a altas concentraciones de pectina cítrica, y su desarrollo se vio favorecido a una temperatura de 25°C, agitación de 55 rpm y a diferencia de las enzimas xilanasas y celulasas, la producción de enzimas pectinolíticas es mejor a pH 5 (ácido).

En el caso de Ramos et al. (2010), quienes realizaron la producción in vitro de enzimas pectinolíticas de *Colletotrichum truncatum* en un medio sintético con pectina como fuente de carbono. Incubándose las muestras a 23°C bajo condiciones estáticas. La actividad poligalacturonasa se evaluó mediante el método de Somogyi-Nelson, obteniendo un valor máximo de 1080 UI/L, siendo 2 veces menor que el valor reportado en este estudio en *Colletotrichum sp.* de 2370.54 UI/L, el cual fue sometido a una agitación de 55 rpm y temperatura óptima de 25°C. Esto puede deberse a que existen condiciones de agitación, las cuales permiten una mejor transferencia de oxígeno y homogeneización del medio.

Sin embargo, Gómez & Tulia (2005), evaluaron la actividad poligalacturonasa en *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* (FOD), el cual se incubó a temperatura ambiente en un medio líquido con papa y 0.2% de inductor natural o artificial, Clavel (variedad resistente *Lingt Pink Candy* y susceptible *Rayo di sol*). Trabajando con un pH de 3.5 y 6.8 y se ensayaron concentraciones de APG de 0.1% y 0.5%. La actividad PG se determinó cuantificando los azúcares reductores liberados por la acción de la enzima sobre el APG como sustrato según el método de Somogy. Obteniendo un valor máximo de 125 UI/L a pH 8 y una concentración de 0.3%, siendo similar al valor reportado en la tabla 4.5 en *Fusarium oxysporum* de 138.78 UI/L a pH 7 y una concentración de 0.5% p/v de pectina cítrica.

A pesar de ser valores semejantes a condiciones de pH neutro, la mayor actividad de *Fusarium oxysporum* se dio en un pH ácido y fue de 788.62 UI/L. Esto es, debido a que la actividad pectinolítica se ve favorecida a pH ácidos y al manejar un parámetro de agitación de 55 rpm, se permitió una mejor homogeneización del medio y por lo tanto la segregación de las enzimas extracelulares.

4.3. Cuantificación de la actividad enzimática específica

La actividad enzimática específica se evaluó mediante el método de Lowry y se midió en UI por miligramo de proteína. Ésta se calculó mediante la ecuación de regresión lineal obtenida de una curva patrón con Albúmina de suero bovino (1% p/v) como solución estándar, la gráfica se muestra en el **ANEXO I**.

Tabla 4.6 Actividad enzimática específica determinada a distintos sustratos y pH.

Hongo	pH	Concentración de sustrato (%)	Actividad enzimática específica (UI/mg de proteína) utilizando como sustrato:		
			CMC	Xilano	Pectina cítrica
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	0.1	1157.33 ^{ab}	0 ^{ba}	48.33 ^{aa}
		0.5	3094.16 ^{aa}	0 ^{ba}	306.52 ^{aa}
		1.0	919.23 ^{aab}	0 ^{ba}	296.40 ^{aa}
	7	0.1	0 ^{bb}	105867.78 ^{aa}	67.78 ^{ba}
		0.5	866.67 ^{ba}	24066.67 ^{aa}	33.40 ^{ba}
		1.0	18.00 ^{bab}	26563.84 ^{aa}	0 ^{ba}
<i>Cladosporium sp.</i>	5	0.1	12319.82 ^{ab}	46182.28 ^{ba}	804.23 ^{aa}
		0.5	8452.30 ^{ab}	28035.18 ^{ba}	1035.87 ^{aa}
		1.0	15000.48 ^{aa}	45998.44 ^{ba}	743.92 ^{aa}
	7	0.1	11553.00 ^{ab}	46140.91 ^{aa}	99.46 ^{ba}
		0.5	12747.11 ^{ab}	73035.51 ^{aa}	123.33 ^{ba}
		1.0	15563.15 ^{aa}	95266.49 ^{aa}	0 ^{ba}
<i>Colletotrichum sp.</i>	5	0.1	340.19 ^{aab}	0 ^{ba}	0 ^{aa}
		0.5	1036.32 ^{ab}	2878.93 ^{ba}	884.33 ^{aa}
		1.0	1702.72 ^{aa}	3910.43 ^{ba}	64.04 ^{aa}
	7	0.1	1734.04 ^{aab}	36665.99 ^{aa}	80.50 ^{aa}
		0.5	634.16 ^{ab}	11583.25 ^{aa}	0 ^{aa}
		1.0	5166.98 ^{aa}	27039.54 ^{aa}	268.63 ^{aa}
<i>Aspergillus wentii</i>	5	0.1	286.91 ^{aa}	0 ^{aa}	298.78 ^{aa}
		0.5	15456.27 ^{aa}	0 ^{aa}	147.94 ^{aa}
		1.0	0 ^{aa}	0 ^{aa}	97.48 ^{aa}
	7	0.1	0 ^{aa}	0 ^{aa}	57.85 ^{ba}
		0.5	1701.12 ^{aa}	0 ^{aa}	0 ^{ba}
		1.0	1690.41 ^{aa}	0 ^{aa}	0 ^{ba}

* Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones independientes que son estadísticamente diferentes si $p \leq 0.05$ después de aplicar un análisis de medias de Tukey.

En la tabla 4.6, se pueden observar los resultados de actividad enzimática específica que se obtuvieron a distintos pH y concentración de sustrato (CMC, xilano y pectina cítrica). La actividad específica máxima obtenida utilizando como sustrato CMC fue del hongo *Cladosporium sp.* a pH 7 y concentración de 1.0% p/v, de 15563.15 UI/mg de proteína; y donde la mínima actividad la obtuvo *Fusarium oxysporum* a pH 7 y concentración de 1.0% p/v, de 18 UI/mg de proteína. Así mismo, se observaron diferencias significativas en *Cladosporium sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Fusarium oxysporum* en cuanto a la concentración de sustrato ($p \leq 0.05$), mientras que *Fusarium oxysporum* presentó diferencias significativas al variar el pH.

Con respecto al valor máximo obtenido utilizando como sustrato xilano, se observó en el hongo *Fusarium oxysporum*. a pH 7 y concentración de 1.0% p/v, de 105867.78 UI/mg de proteína. El mínimo valor fue de *Colletotrichum* a pH 5 y concentración de 0.5% p/v, de 2878.93 UI/mg de proteína. Por otro lado, se observan diferencias significativas en los hongos en *Cladosporium sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Fusarium oxysporum* en relación al pH ($p \leq 0.05$).

Y finalmente, al utilizar pectina cítrica como sustrato, la actividad máxima la obtuvo *Cladosporium sp.* a pH 5 y concentración de 0.5% p/v, de 1035.87 UI/mg de proteína; y la actividad mínima se dio en *Fusarium oxysporum* a pH 7 y concentración de 0.5% p/v, de 33.40 UI/mg de proteína. De igual manera, se observaron diferencias significativas en los hongos en *Cladosporium sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus wentii* en relación a la variación de pH ($p \leq 0.05$).

Podemos destacar que la actividad específica fue mayor al utilizar como sustrato xilano y los valores mínimos se dieron en sustrato de pectina cítrica, esto es similar a los valores que se obtienen en la actividad enzimática, siendo que la actividad xilanasa fue mayor que la pectinolítica.

En estudios previos, Rengifo et al. (2013), muestran la inoculación de 1 cm² de fragmento micelial de *Cladosporium sp.* en medio líquido semisintético Czapeck, incubada a 100 rpm a una temperatura ambiente promedio de 25°C, durante tres semanas. El contenido de proteína de los extractos fue estimado por el método de Lowry, observándose un valor de actividad en el extracto micelial de 5.88 ug/mL, mientras que en el extracto acuoso no se encontraron proteínas. Esto lo atribuyen, a que el hongo no excretó proteínas en el medio de cultivo o estas se degradaron al estar expuestas a la temperatura ambiente por un largo periodo de tiempo.

Sin embargo, en esta investigación se obtuvieron valores de actividad enzimática específica en *Cladosporium sp.*, observándose una mayor actividad a pH 7 y una concentración de 1.0% p/v al utilizar xilano como sustrato, de 95266.49 UI/mg. Esta diferencia puede deberse a que se realizó la inoculación en un caldo de Papa Dextrosa y se utilizaron como fuentes de nitrógeno y carbono extracto de levadura y (NH₄)₂SO₄ al 0.1% p/v para enriquecer el medio de cultivo, además de que se controló el pH promoviendo así la segregación enzimática.

Por otro lado, Dinu et al. (2007), realizaron una fermentación en estado sólido que contenía salvado de trigo, remolacha, el cual se enriqueció con sulfato de amonio, fosfato monopotásico y fosfato de magnesio. El pH de la solución se ajustó a 5.5 y se inoculó con fragmentos del hongo *Aspergillus niger* MIUG 16 y las muestras se incubaron durante 5 días a 28°C. La actividad específica poligalacturonasa se determinó mediante el método de Lowry y se obtuvo un valor mayor de 20 UI/mg.

Como se mencionaba en los apartados anteriores, la FES tiene desventajas que pueden evitar un buen desarrollo metabólico del hongo influyendo en su actividad. Es por ello que el valor obtenido por *Aspergillus wentii* (298.78 UI/L) en nuestra investigación, es 14 veces mayor que lo reportado por Dinu et al.

A diferencia de Martínez et al. (2012), que observaron una actividad específica máxima en *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* de 12.797 UI/mg de proteína; al realizar una fermentación líquida

que contenía papa y 0.2% de glucosa incubándose por 5 días con agitación a 25°C. Se utilizaron como inductores de actividad xilanasa, pared celular extraída de raíz y de tallo de esquejes de clavel Delphi y Bright rendez vous lavander bicoloro y xilano de hojuela de avena. La cuantificación de proteína se determinó con el método de Bradford. Al comparar con los valores mostrados en la tabla 4.6, se observa que la mayor producción de actividad específica de xilanasas en *Fusarium oxysporum* (105867.78 UI/mg), fue un 90% mayor; esto puede ser debido a que el pH 7 es el óptimo para su equilibrio y eficiencia productiva, y al incubarse las muestras por un periodo de 15 días; se mejoró la oxigenación y homogeneización del medio para una mayor producción enzimática.

Finalmente, Martínez (2012) realizó la inoculación de *Colletotrichum acutatum* en medio líquido, elaborado con papa y se colocó pared celular o exocarpo de fruto de lulo a distintas concentraciones (0.2, 0.3, 0.4 y 0.5%) a un pH de 5; para posteriormente incubar las muestras a 25°C y agitación constante durante 5 días. La actividad específica poligalacturonasa se determinó por el método de Bradford, obteniendo un valor máximo de 0.383 UI/mg de proteína.

El valor máximo obtenido en *Colletotrichum sp.* en este trabajo, fue de 884.33 UI/mg siendo 95% mayor que el reportado por Martínez, esto puede ser debido a que la incubación se realizó por un periodo más largo (15 días), promoviendo una mejor homogeneización del medio, transferencia de O₂ y desarrollo metabólico del hongo.

4.3.1. Efecto de la relación proteína/actividad enzimática específica

El grado de dependencia que existe entre el contenido proteico y la actividad enzimática específica de los extractos fúngicos aislados de vainas de Vainilla verde (*Vanilla planifolia Andrews*), se evaluó mediante un análisis de correlación de Pearson (r).

Se tomó en cuenta que el coeficiente de correlación varía en el intervalo (-1, 1). En el primer caso la relación es perfecta negativa, indicando una dependencia total entre las dos variables denominada relación inversa, es decir, que cuando una de ellas aumenta, la otra también disminuye en proporción constante; y en el segundo caso se denomina perfecta positiva o relación directa, es decir, cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante.

Tabla 4.7 Análisis de correlación de Pearson aplicado a la relación contenido proteico/actividad enzimática específica utilizando CMC, Xilano y Pectina cítrica como sustrato.

Hongo	Coeficiente de correlación de Pearson		
	Sustrato		
	CMC	Xilano	Pectina cítrica
<i>Fusarium oxysporum</i>	-0.365 (p = 0.477)	-0.530 (p = 0.280)	-0.473 (p = 0.344)
<i>Cladosporium sp.</i>	-0.561 (p = 0.246)	0.120 (p = 0.821)	-0.570 (p = 0.238)
<i>Colletotrichum sp.</i>	-0.566 (p = 0.241)	-0.705 (p = 0.118)	-0.431 (p = 0.393)
<i>Aspergillus wentii</i>	-0.249 (p = 0.635)	---	-0.442 (p = 0.381)

* Siendo $p \leq 0.05$ indica muestras significativamente diferentes.

En la tabla 4.7 se muestran los valores de r obtenidos, cuando la concentración de sustrato es CMC, xilano o pectina cítrica.

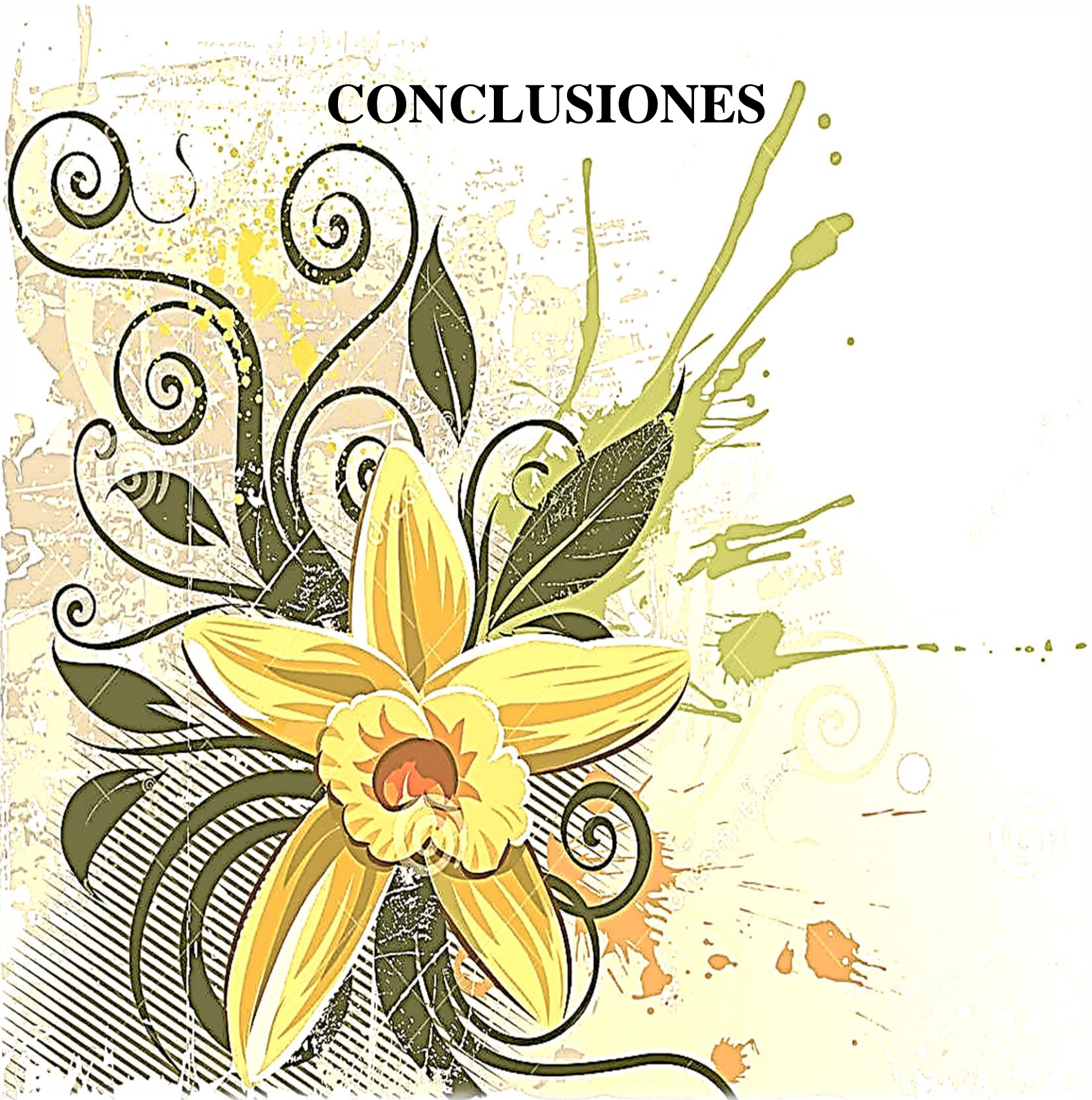
El coeficiente de correlación demuestra una relación inversa significativa del contenido proteico/actividad enzimática específica en los hongos *Cladosporium sp.* al utilizar como sustrato CMC y pectina cítrica, *Colletotrichum sp.* en sustrato de CMC y xilano, y *Fusarium oxysporum* en xilano como sustrato. Además, al obtener una $p > 0.05$, se demostró que no hay diferencias significativas entre las muestras.

Al igual que Galindo et al. (2005), quienes realizaron una cinética de la actividad celulosa en líquido de rumen, se observó que no toda la proteína soluble determinada por el método de Lowry tiene actividad celulolítica, xilanasa y pectinolítica.

Por lo tanto Dinu et al. (2007), quienes realizaron la purificación y caracterización de enzimas pectinolíticas producidas por *Aspergillus niger* MIUG 16 usando una combinación de técnicas cromatográficas, mencionan que debido a la acción sinérgica y la competencia de las enzimas es necesario purificar y caracterizar cada una de ellas. Ya que como bien se mencionó anteriormente la degradación de la celulosa, hemicelulosa y pectina no se da por enzimas individuales, es decir que las enzimas celulasas, hemicelulasas y pectinasas respectivamente, son sistemas multienzimáticos que comprenden de la acción secuencial de un grupo de enzimas accesorias que se encuentran presentes en diferentes cantidades dependiendo del microorganismo del cual provengan.

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES



- El crecimiento micelial se vio favorecido a una temperatura de 25°C y a una agitación de 55 rpm, permitiendo la homogeneización y distribución del O₂ al medio. También se pudo observar que estadísticamente, las actividades se ven favorecidas a una concentración de sustrato de 1.0% p/v. Mientras que la actividad celulolítica y xilanasas se ve favorecida a un pH neutro, a diferencia de la actividad pectinolítica que a un pH ácido es mejor.
- Respecto al peso de biomasa, se obtuvieron valores máximos en *Fusarium oxysporum* y *Cladosporium sp.* aislados de las vainas de Vainilla verde fue significativo a pH 5 y una concentración de CMC y pectina cítrica del 0.5% p/v, respectivamente; a diferencia de *Colletotrichum sp.* que su crecimiento fue a condiciones de pH 7 y concentración de 1.0% p/v de xilano. Mientras que el volumen de extracto enzimático obtenido fue de 75 mL.
- El crecimiento micelial de *Aspergillus wentii* fue característico, ya que presentó formación de pellets de diámetro variable, obteniéndose un valor mayor a pH 5 y una concentración de pectina cítrica de 1.0% p/v, siendo el valor de 0.7 cm; por lo cual se mejora la biosíntesis enzimática, la transferencia de O₂ y de nutrientes al medio.
- La actividad enzimática de los microorganismos se presenta con diferencias significativas debido a que cada uno de ellos requiere de factores diversos para su crecimiento, tales como la concentración de sustrato, pH óptimo del medio (5 o 7), temperatura óptima (25°C) y agitación (55 rpm). Encontrándose una actividad celulolítica y xilanasas alta en *Cladosporium sp.* a 0.5 y 1.0% p/v de concentración de CMC y xilano respectivamente; mientras que la actividad pectinolítica fue mayor en *Colletotrichum sp.* a pH 5 y concentración de 0.5% p/v de pectina cítrica.
- La actividad enzimática específica mayor se obtuvo en los hongos *Cladosporium sp.* y *Fusarium oxysporum* a un pH 7 y una concentración de 1.0% p/v utilizando como sustrato CMC y xilano, respectivamente, y *Cladosporium sp.* a un pH 5 y una concentración de 0.5% p/v utilizando pectina cítrica como sustrato.
- El factor de correlación de Pearson determinó que existe una relación inversa significativa del contenido proteico/actividad enzimática específica en los hongos *Cladosporium sp.* al utilizar como sustrato CMC y pectina cítrica, *Colletotrichum sp.* en sustrato de CMC y xilano, y *Fusarium oxysporum* en xilano como sustrato; y ya que no toda la proteína tiene actividad celulolítica, xilanasas y pectinolítica, se sugiere la existencia de grupos de enzimas accesorias que deben ser purificadas y caracterizadas para su estudio posterior.; y ya que no toda la proteína tiene actividad celulolítica, xilanasas y pectinolítica, se sugiere la existencia de grupos de enzimas accesorias que deben ser purificadas y caracterizadas para su estudio posterior.

6. BIBLIOGRAFÍA



1. Agvik, E. X. (2011). *Enraizamiento y aclimatación de plántulas de Vanilla planifolia Andrews, provenientes de cultivo de tejidos con fines de conservación*. Tesis. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
2. Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (Cuarta ed.). México: Pearson Educación.
3. Cárdenas, N. C., Pérez, S., Zavala, M. A., Aguirre, J. R., & Pérez, C. (2005). Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(3), 21-26.
4. Cruz, L. C. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis. Bogotá, D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
5. Delgado, C. G., Castaño, J., & Villegas, B. (2013). Caracterización del agente causante de la roña del maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEGENER) en Colombia. *Revista Académica Colombia Ciencias*, XXXVIII(143), 215-227.
6. Desai, D. I., & Iyer, B. D. (2016). Biodeinking of old newspaper pulp using a cellulase-free xylanase preparation of *Aspergillus niger* DX-23. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 78-85. Recuperado el 14 de Febrero de 2016
7. Dinu, D., Nechifor, M. T., Stoian, G., Costache, M., & Dinischiotu, A. (2007). Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *Journal of Biotechnology*, 131, 128-137. Recuperado el 15 de Febrero de 2016
8. Echandi, E. (1967). *Manual de laboratorio para fitopatología general* (Primera ed.). Lima: IICA.
9. Feduchi, E., Blasco, I., Yáñez, E., & Romero, C. S. (2011). *Bioquímica: Conceptos esenciales*. Madrid: Médica Panamericana.
10. Franchi, M. L., Pose, G. N., de la Parra, D. F., & Cavalitto, S. F. (2014). Producción nacional de pectinasas de origen fúngico y su aplicación al procesamiento frutihortícola. *SNS Publicación Periódica Científico-Tecnológica*(5-6), 36-42.
11. Galindo, J., González, N., Marrero, Y., & Aldama, A. (2005). Cinética de la actividad de las celulasas microbianas en el líquido de rumen. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39(4), 587-591. Recuperado el 15 de Febrero de 2016
12. García, H., & Vázquez, R. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. *BioTecnología*, 3, 77-88.
13. García, V. (2004). *Introducción a la microbiología* (Segunda ed.). Costa Rica: EUNED.
14. Gómez, L., & Tulia, S. (2005). Inducción de dos enzimas pectolíticas en el modelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*-CLAVEL. *Revista Colombiana de Química*, 34(1), 25-34. Recuperado el 14 de Febrero de 2016
15. Grebechova, R., & Prieto, L. (2006). Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para aplicación en industria de alimentos. *Revista de Investigación*, 6(2), 153-162. Recuperado el 2 de Febrero de 2016
16. Harvey, R., & Ferrier, D. (2011). *Biochemistry* (Fifth ed.). E.U.A.: Lippincott Williams and Wilkins.
17. Havkin, D., & Belanger, F. C. (2011). *Handbook of Vanilla Science and Technology*. New Jersey: Wiley-Blackwell.

18. Hernández, J. (2011). *Paquete Tecnológico Vainilla (Vainilla planifolia Jackson)*. Recuperado el 20 de Abril de 2015
19. Izarra, M. L., Santayana, M. L., Villena, G. K., & Gutiérrez, M. (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanas por *Aspergillus niger*. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 12(2), 139-150. Recuperado el 2 de Febrero de 2016
20. Kashyap, D. R., Chandra, S., Kaul, A., & Tewari, R. (25 de February de 2000). Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 277-282.
21. Kelso, H. A., Bâ, K.-M., Sánchez, S., & Reyes, D. (2012). Estudio experimental para la determinación de los coeficientes de cultivo de la vainilla (*Vainilla* spp.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*(4), 659-663.
22. Kikot, G. (2012). Caracterización bioquímica, genotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad. Tesis Doctoral. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. Recuperado el 20 de Julio de 2015, de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/18266>
23. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry*, 265-275.
24. Manjarrés, K., Piñeros, Y., & Rodríguez, E. (2011). Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*, 23(1), 19-26. Recuperado el 24 de Febrero de 2016
25. Marín, R. M. (2007). Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico. Tesis. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
26. Martínez, S., Martínez, P., González, V. C., & Higuera, B. (2012). Determinación in vitro de los patrones de inducción de una endo-xilanasa (E.C.3.2.1.8) secretada por *Fusarium f. sp. dianthi*. Purificación y caracterización parcial. *Revista Colombiana de Química*, 41(3), 359-376. Recuperado el 15 de Febrero de 2016
27. Martínez, A. P. (2012). *Evaluación de los niveles de expresión in vitro de enzimas pectinolíticas del hongo Colletotrichum acutatum en presencia de inductores naturales provenientes del fruto de lulo (Solanum quitoense Lam.) Avances para determinar sus niveles de transcripción*. Bogotá: Tesis. Universidad Nacional de Colombia.
28. Meraz, E., Loera, O., Mendoza, G. D., Meneses, M., & Cobos, M. A. (Junio de 2012). Efecto del pH y del líquido ruminal clarificado en la estabilidad de un producto enzimático fibrolítico. *Agrociencia*, 46(4). Recuperado el 2015, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000400003
29. Merín, M. G., Mendoza, L., Farías, M., & Morata de Ambrosini, V. I. (2011). Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *International Journal of Microbiology*, 147, 144-148. Recuperado el 24 de Febrero de 2016
30. Mier, T., Toriello, C., & Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio* (Primera ed.). México: Universidad Autónoma Metropolitana.
31. Miller, G. L. (1959). Determination of reducing sugar by DNS method. *Analytical Chemistry*, 426-428.
32. Montoya, H. H. (2008). *Microbiología básica para el área de salud y afines*. (Segunda ed.). Colombia: Universidad de Antioquia.

33. Mushimiyimana, I., & Tallapragada, P. (2013). Optimization of process parameters for biosynthesis of cellulase by *Cladosporium cladosporioides* using agro wastes. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(4), 1129-1138. Recuperado el 14 de Febrero de 2016
34. Naturland. (2000). *Vainilla*. Recuperado el 20 de Abril de 2015, de <http://www.naturland.de/de/>
35. OIRSA. (17 de Noviembre de 2012). *Biblioteca Virtual FUNDESYRAM*. Recuperado el 28 de Enero de 2016, de <http://www.fundesyram.info/biblioteca/displayFicha.php?fichaID=1738>
36. Olivas, E., & Alarcón, L. R. (2004). *Manual de prácticas de microbiología básica y microbiología de alimentos*. (Primera ed.). Ciudad Juárez, Chihuahua: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
37. Paredes, D., Álvarez, M., & Silva, M. (2010). Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica ESPOL-RTE*, 23(1), 81-88. Recuperado el 8 de Febrero de 2016
38. Patel, K., & Prajapati, K. (2014). Xylanase production by *Cladosporium* sp. from agricultural waste. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2(12), 84-90. Recuperado el 14 de Febrero de 2016
39. Paz, D., & Hernández, M. (2000). Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasas a partir del preparado comercial Novoban 240. *Cultivos Tropicales*, 21(2), 27-31. Recuperado el 24 de Febrero de 2016
40. Ponce, T., & Pérez, O. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. *XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería*, 21, 273-277.
41. Primo, E. (2007). *Química orgánica básica y aplicada*. España: Reverté.
42. Ramos, A. M., Gally, M., García, M. C., & Levin, L. (2010). Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4), 186-190. Recuperado el 14 de Febrero de 2016
43. Rengifo, J. I., Cerón, F., & Caicedo, L. D. (2013). Caracterización parcial de proteínas de una cepa de *Cladosporium* sp. *Ingenium*, 7(15), 41-49. Recuperado el 15 de Febrero de 2016
44. SAGARPA. (2012). *Mejoramiento de la productividad integral del cultivo de la vainilla en México que fortalezca su competitividad*. Recuperado el 20 de Abril de 2015
45. SAGARPA. (2012). *Plan Rector Sistema Producto Vainilla*. Recuperado el 20 de Abril de 2015, de http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/estatales/EPT%20COMITE%20SISTEMA%20PRODUCTO%20VAINILLA%20PUEBLA/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_VAINILLA_PUEBLA_%202012.pdf
46. SAGARPA. (2014). *Producción de vainilla en tres sistemas de producción de la Sierra Huasteca Potosina*. Recuperado el 1 de Julio de 2015, de http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/4248/010208327100070899_CIRNE.pdf?sequence=1
47. Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to food and airborne fungi* (7 ed.). CDS. Recuperado el 28 de Enero de 2016, de <http://www.mycobank.org/BioLMICS.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=21834&Fields=All>

48. Sánchez, J., & Martínez, J. L. (Junio de 2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Química Nova*, 37(3). Recuperado el 28 de Enero de 2016, de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422014000300020&script=sci_arttext
49. Sánchez, S., Becerril, A. E., Tijerina, L., & Santizo, J. A. (2001). Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción en Papantla, Veracruz. *Fitotecnia Mexicana*, 24(1), 49-56.
50. SHPC. (Julio de 2014). *Panorama de la Vainilla*. Recuperado el 20 de Abril de 2015, de <http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Vainilla%20%28jul%202014%29.pdf>
51. SIGMA-ALDRICH. (2016). *SIGMA ALDRICH*. Recuperado el 28 de Enero de 2016, de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-ii.html>
52. Singh, R., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40, 2931-2944.
53. Suárez, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1-8. Recuperado el 4 de Febrero de 2016, de <http://www.reviberoammicol.com/2013-30/001008.pdf>
54. Vásquez, A. M. (2013). Producción de xilanasas por *Aspergillus* sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Tesis. México: Universidad Iberoamericana.
55. Zapata, A. D., Escobar, C. A., Carvalitto, S. F., & Hours, R. A. (2009). Evaluación de la capacidad de solubilización de pectina de cáscara de limón usando protopectinasa-SE. *Vitae*, 16(1), 67-74. Recuperado el 28 de Enero de 2016
56. Zimbardi, A., Sehn, C., Meleiro, L., Souza, F., Masui, D., & Nozawa, M. (2013). Optimization of β -Glucosidase, β -Xylosidase and Xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 2875-2902. Recuperado el 14 de Febrero de 2016

7. ANEXOS



ANEXO I. Curvas de calibración para la cuantificación de actividad enzimática celulolítica, xilanasa, pectinolítica y específica

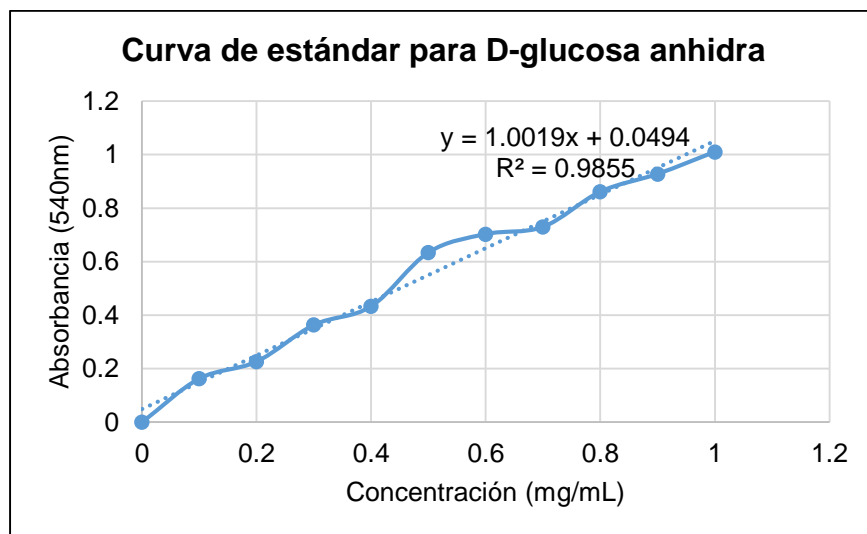


Figura 7.1 Curva patrón con D-glucosa anhidra para el cálculo de actividad celulolítica.

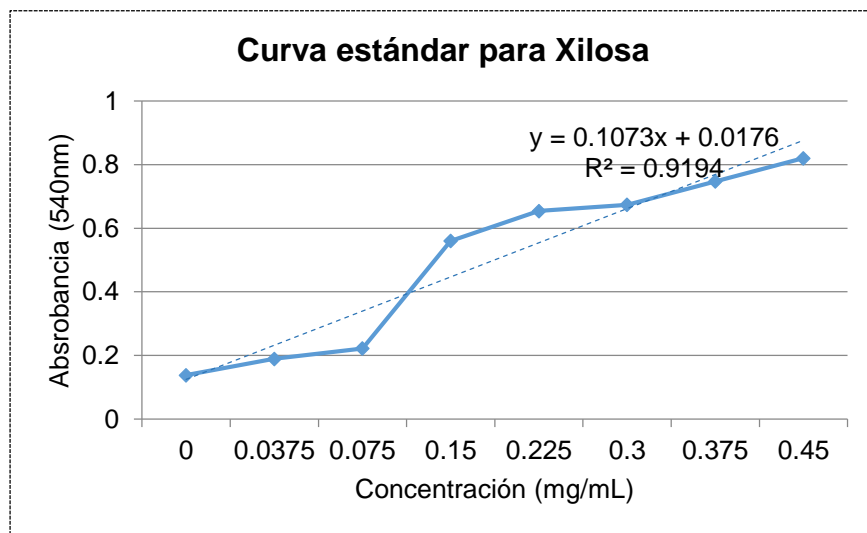


Figura 7.2 Curva patrón con D-xilosa para el cálculo de actividad xilanasa.

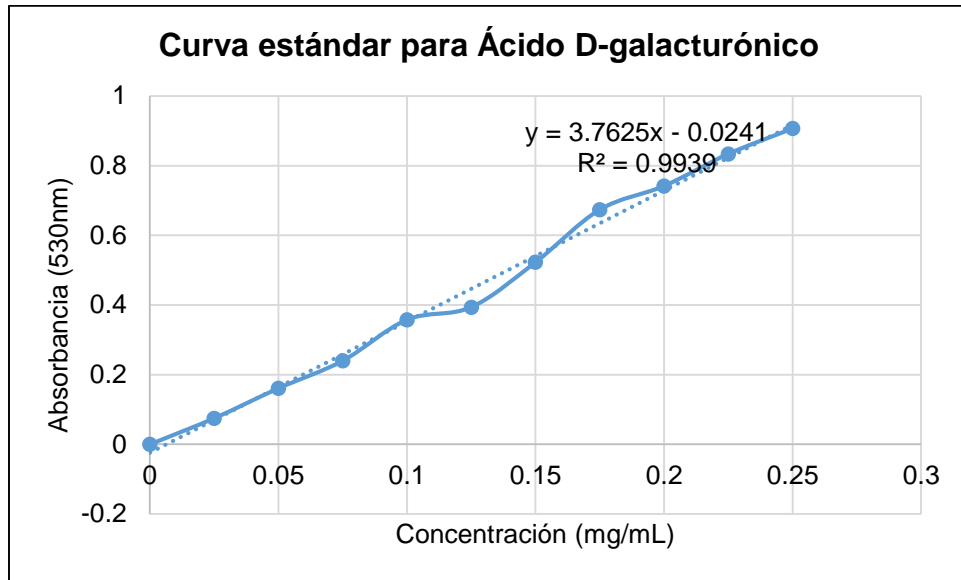


Figura 7.3 Curva patrón con Ácido D-galacturónico para el cálculo de actividad pectinolítica.

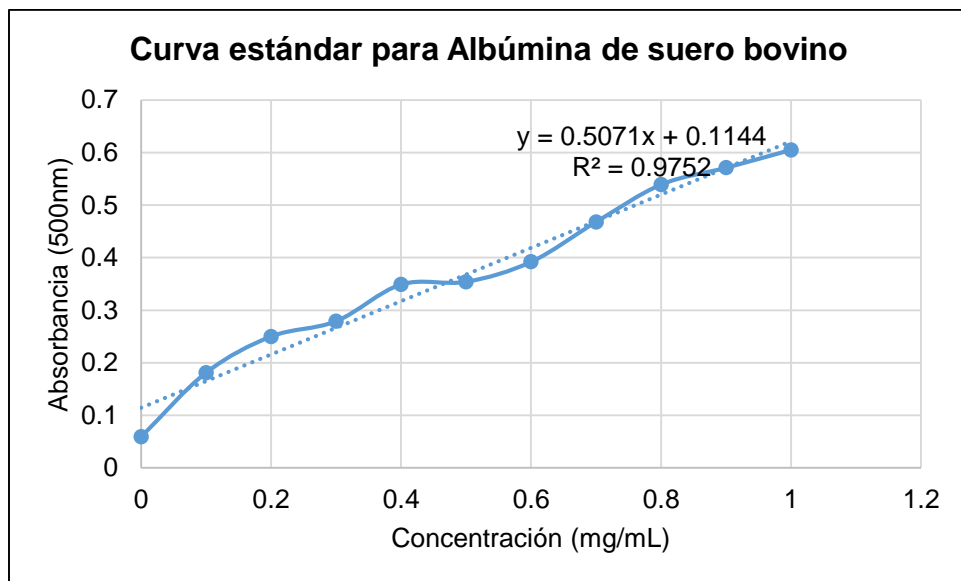


Figura 7.4 Curva patrón con Albúmina de suero bovino para el cálculo de actividad enzimática específica.

ANEXO II. Actividad enzimática expresada en Unidades Internacionales por peso de materia seca (UI/g)

Tabla 7.1 Actividad enzimática por peso de materia seca (UI/g) a diferentes sustratos y pH.

Hongo	pH	Concentración de sustrato (%)	Actividad Celulolítica (UI/g)	Actividad Xilanasa (UI/g)	Actividad Pectinolítica (UI/g)
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	0.1	7.71	0	5.69
		0.5	10.09	0	17.28
		1.0	4.25	0	8.22
	7	0.1	0	80.93	7.48
		0.5	5.28	157.06	2.11
		1.0	12.21	228.30	0
<i>Cladosporium sp.</i>	5	0.1	109.25	375.10	115.41
		0.5	95.10	440.41	176.81
		1.0	38.12	236.79	163.62
	7	0.1	16.78	91.41	31.47
		0.5	48.70	235.97	15.22
		1.0	216.29	1770.58	0
<i>Colletotrichum sp.</i>	5	0.1	1.25	0	0
		0.5	4.09	15.74	68.45
		1.0	5.20	83.01	6.80
	7	0.1	4.65	40.29	1.86
		0.5	2.72	47.41	0
		1.0	46.34	444.67	1.12
<i>Aspergillus wentii</i>	5	0.1	0.08	0	72.72
		0.5	0.13	0	43.82
		1.0	0.64	0	32.47
	7	0.1	0	0	21.13
		0.5	16.60	0	0
		1.0	4.50	0	0