
Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Crecimiento de hongos filamentosos y actividad
enzimática de esterasas cutinolíticas en
fermentación sólida

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a
Victoria Conde Avila

Comité Tutorial

Director de Tesis
Dr. Rubén Díaz Godínez

Tutores
Dra. María del Carmen Sánchez Hernández
Dr. Octavio Loera Corral

Tlaxcala, Tlx.

Diciembre, 2016



La Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala está registrada en el padrón del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El CONACYT otorgó una beca para la realización de estudios de maestría de Victoria Conde Avila con núm. de registro 631735.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
 Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



POSGRADO EN CIENCIAS
 BIOLÓGICAS

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
 CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
 P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Victoria Conde Avila realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: "Crecimiento de hongos filamentosos y actividad enzimática de esterases cutinoliticas en fermentación sólida".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
 TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 22 DE 2016

DR. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ

DR. JORGE GARCÍA DAVILA

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

DR. SAUL FLECHNER BERISTAIN

Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
 ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradocbucat@gmail.com
 Tlaxcala, Tlax.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por aceptar mi ingreso a la Maestría en Ciencias Biológicas y con ello darme la oportunidad de continuar con mi formación académica en un programa de calidad.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con núm. de registro 631735.

Al Dr. Rubén Díaz Godínez por aceptar ser mi director de tesis, por todo su ayuda en la realización de este trabajo de investigación, por su paciencia, sus consejos y por impulsarme para seguir con mi preparación.

A la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández por abrirme las puertas de su laboratorio, por confiar en mí, por su respaldo incondicional y por compartir sus conocimientos conmigo. Gracias por ser un gran ejemplo no solo como investigadora sino también como ser humano y por contagiarme cada día de su amor por la investigación.

Al Dr. Octavio Loera Cortal por sus recomendaciones, enseñanzas, su tiempo y su valioso apoyo para la mejora y desarrollo de este trabajo.

A los doctores Jorge García Dávila y Saúl Tlécuitl Beristain por su disposición y por los atinados comentarios y sugerencias que recibí de su parte.

Agradecimientos a título personal

A Dios por todas las bendiciones que me ha dado, por cada momento de vida y por las personas que ha puesto en mi camino.

A mis padres que me han dado la vida y más, quienes me enseñaron a hacer todo con dedicación, son mi ejemplo e inspiración.

A mi esposo por su cariño y confianza, por siempre motivarme y hacerme creer en mi misma y por ser realmente un compañero de vida.

A mi hijo, quien ha sido mi mayor motivación y alegría desde el primer momento, y sobre todo, porque ha sido el principal testigo del esfuerzo dedicado a la realización de este objetivo.

A mis hermanos por alentarme y por su ayuda incondicional en cada etapa de mi vida.

A mis suegros y a mis cuñadas por brindarme todo su apoyo y respaldo.

A mis compañeros de laboratorio por su sincera amistad, por su ayuda, sus enseñanzas y risas durante el tiempo que he tenido la fortuna de conocerlos. Sin ustedes mi estancia en el laboratorio no sería la misma.

Las esterasas cutinolíticas (EC 3.1.1.73) son enzimas que catalizan la síntesis e hidrólisis de los enlaces éster de la cutina, de esteres carboxílicos, triglicéridos y alcoholes primarios. Dichas enzimas son empleadas en la síntesis orgánica, en la industria alimentaria, en la producción de biocombustibles y en procesos de biorremediación. La demanda de enzimas cutinolíticas requiere del desarrollo de estrategias de cultivo e inductores alternativos frente a los inconvenientes de la obtención y purificación de la cutina natural para evaluar su producción. En el presente trabajo se evaluó el crecimiento y la actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de los hongos filamentosos *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum* y *Neurospora sitophila* en fermentación sólida con espuma de poliuretano como soporte en un medio conteniendo cutina GMS (monoésterato de glicerilo). Se emplearon 4 medios de cultivo: 1) glucosa-extracto de levadura y sales minerales (GEL), 2) GEL + 1 g de cutina/L, 3) GEL + 3 g de cutina/L y 4) GEL + 5 g de cutina/L. Como resultado, la incorporación de 1, 3 y 5 g de cutina/L produjo un aumento significativo en los valores de μ y X_{max} con respecto al medio testigo. De igual modo, el contenido de proteína de *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* incrementó a mayor concentración de cutina de manera congruente con la producción de biomasa, así como la rápida disminución de los azúcares presentes en los medios de cultivo. La mayor producción de esterasas (E_{max}) fue de 433.01, 427.42 y 351.72 UI/L en el medio GEL + 5g de cutina/L para *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* respectivamente. Mientras que en el análisis zimográfico fue posible la detección de bandas de actividad de esterasas de aproximadamente 25 kDa en los cuatro medios de cultivo pero de mayor intensidad en los medios con cutina. Además otras dos isoenzimas con pesos moleculares de 40 y 150 kDa fueron detectadas a partir de las 48h de cultivo de *T. harzianum* y de 60 y 150 kDa a las 72h de cultivo de *F. culmorum*. Por otro lado, *N. sitophila* demostró producir enzimas cutinolíticas que fueron detectadas en los gels con una banda de actividad de aproximadamente 150 kDa de mayor intensidad en respuesta al aumento en la concentración de cutina. Finalmente, tanto *T. harzianum*, como *F. culmorum* y *N. sitophila* presentaron actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de forma constitutiva e inducible y su actividad no se vio reprimida por la glucosa en el medio. Además, la cutina GMS puede ser empleada como fuente de carbono y como inductor en la producción de esterasas cutinolíticas.

Resumen

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Hongos filamentosos.....	8
1.1.1 Ascomicetos.....	8
1.2 Enzimas.....	14
1.2.1 Esterasas.....	14
1.2.2 Cutina.....	19
1.3 Fermentación.....	21
1.3.1 Fermentación sólida.....	22
2. ANTECEDENTES.....	25
3. JUSTIFICACION.....	29
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS.....	29
5.1 Objetivo general.....	29
5.2 Objetivos específicos.....	29
6. METODOLOGÍA.....	30
6.1 Microorganismos de estudio.....	30
6.2 Condiciones de cultivo.....	30
6.3 Evaluación de la biomasa, obtención del extracto enzimático extracelular.....	31
6.4 Evaluación de la velocidad específica de crecimiento.....	32
6.5 Medición de pH.....	33
6.6 Actividad enzimática de esterazas.....	33

6.7 Cálculo de rendimientos enzimáticos 34

6.8 Determinación del consumo de glucosa 34

6.9 Determinación del contenido de proteína 35

6.10 Análisis zimográfico 36

6.11 Análisis estadístico 37

7. RESULTADOS 38

7.1 *T. harzianum* 38

7.1.1 Producción de biomasa 38

7.1.2 Medición de pH 39

7.1.3 Consumo de glucosa 39

7.1.4 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas 41

7.1.5 Contenido de proteína 43

7.1.6 Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos 44

7.1.7 Zimografía de esterasas cutinolíticas 45

7.2 *F. culmorum* 48

7.2.1 Producción de biomasa 48

7.2.2 Medición de pH 49

7.2.3 Consumo de glucosa 50

7.2.4 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas 51

7.2.5 Contenido de proteína 53

7.2.6 Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos 54

7.2.7 Zimografía de esterasas cutinolíticas 55

7.3 *N. sitophila* 58

7.3.1 Producción de biomasa 58

7.3.2 Medición de pH..... 59

7.3.3 Consumo de glucosa..... 60

7.3.4 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas..... 61

7.3.5 Contenido de proteína..... 63

7.3.7 Zimografía de esterasas cutinolíticas..... 65

8. DISCUSIÓN..... 68

9. CONCLUSIONES..... 74

10. PERSPECTIVAS..... 75

11. REFERENCIAS..... 76

Índice de tablas

Tabla 1. Actividad enzimática de esterasas (UI/L) de <i>T. harzianum</i> en FS.....	42
Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de <i>T. harzianum</i> crecido en diferentes concentraciones de cutina GMS en FS.....	44
Tabla 3. Actividad enzimática de esterasas (UI/L) de <i>F. culmorum</i> en FS.....	52
Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de <i>F. culmorum</i> crecido en diferentes concentraciones de cutina GMS en FS.....	54
Tabla 5. Actividad enzimática de esterasas (UI/L) de <i>N. sitophila</i> en FS.....	62
Tabla 6. Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de <i>N. sitophila</i> crecido en diferentes concentraciones de cutina GMS en FS.....	64

Índice de figuras

11	Fig 1 Ciclo de vida de un ascomiceto.....
15	Fig 2 Reacción de hidrólisis de un éster.....
15	Fig 3 Presentación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa.....
16	Fig 4 Mecanismo catalítico de las esterasas.....
20	Fig 5 Cutícula vegetal y sus componentes principales.....
21	Fig 6 Fórmula estructural del monoestearato de glicerilo.....
30	Fig 7 Microorganismos de estudio a) <i>T. harzianum</i> , b) <i>F. culmorum</i> y c) <i>N. sitophila</i> en caja petri.....
31	Fig 8 Espuma de poliuretano cortada en cubos.....
31	Fig 9 <i>F. culmorum</i> en FS en matraces Erlenmeyer.....
32	Fig 10 Obtención del EEE por filtración y retención de la biomasa.....
33	Fig 11 Determinación del pH de los sobrenadantes por potenciometría.....
34	Fig 12 Tubos de ensayo con la mezcla de reacción para determinar actividad de esterasas cutinohíticas.....
35	Fig 13 Tubos de ensayo con la mezcla de reacción para determinar el contenido de glucosa del EEE por el método de DNS.....
35	Fig 14 Tubos de ensayo con la mezcla de reacción para determinar el contenido de proteína del EEE por el método de Bradford.....
36	Fig 15 Muestras cargadas en gels de poliacrilamida en un sistema de electroforesis Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad).....
38	Fig 16 Crecimiento de <i>T. harzianum</i> en FS con medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+ 5g cutina/L (○).....
39	Fig 17 pH de crecimiento de <i>T. harzianum</i> en FS en medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+ 5g cutina/L (○).....
40	Fig 18 Consumo de glucosa de <i>T. harzianum</i> en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+ 5g cutina/L (○).....

Fig 19 Actividad enzimática de esterazas cutinólíticas de *T. harzianum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (Δ) y GEL+3g cutina/L (□).....41

Fig 20 Contenido de proteína de los sobrenadantes del crecimiento de *T. harzianum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+5g cutina/L (○).....43

Fig 21 Zimograma de esterazas cutinólíticas de *T. harzianum* crecido en FS en medio GEL 45

Fig 22 Zimograma de esterazas cutinólíticas de *T. harzianum* crecido en FS en medio GEL + 3 g de cutina/L.....46

Fig 23 Zimograma de esterazas cutinólíticas de *T. harzianum* crecido en FS en medio GEL + 5 g de cutina/L.....47

Fig 25 Crecimiento de *F. culmorum* en FS con medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+5g cutina/L (○).....48

Fig 26 pH del crecimiento de *F. culmorum* en FS en medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+5g cutina/L (○).....49

Fig 27 Consumo de glucosa de *F. culmorum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+5g cutina/L (○).....50

Fig 28 Actividad enzimática de esterazas cutinólíticas de *F. culmorum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+5g cutina/L (○).....51

Fig 29 Contenido de proteína de los sobrenadantes del crecimiento de *F. culmorum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+5g cutina/L (○).....53

Fig 30 Zimograma de esterazas cutinólíticas de *F. culmorum* crecido en FS en medio GEL 55

Fig 31 Zimograma de esterazas cutinólíticas de *F. culmorum* crecido en FS en medio GEL + 3 g de cutina/L.....56

Fig 32 Zimograma de esterazas cutinólíticas de *F. culmorum* crecido en FS en medio GEL+ 3 g de cutina/L.....56

Fig 33 Zimograma de esterazas cutinólíticas de *F. culmorum* crecido en FS en medio GEL + 5 g de cutina/L.....57

Fig 34 Crecimiento de *N. sitophila* en FS con medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+5g cutina/L (○).....58

Fig: 35 pH del crecimiento de *N. stophila* en FS en medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+ 5g cutina/L (○)..... 59

Fig: 36 Consumo de glucosa de *N. stophila* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+ 5g cutina/L (○)..... 60

Fig: 37 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de *N. stophila* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+ 5g cutina/L (○)..... 61

Fig: 38 Contenido de proteína de los sobrenadantes del crecimiento de *N. stophila* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (Δ) y GEL+ 5g cutina/L (○)..... 63

Fig: 39 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *N. stophila* en FS en medio GEL..... 65

Fig: 40 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *N. stophila* en FS en medio GEL + 1 g de cutina/L..... 66

Fig: 41 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *N. stophila* en FS en medio GEL + 3 g de cutina/L..... 66

Fig: 42 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *N. stophila* en FS en medio GEL + 5 g de cutina/L..... 67

1. INTRODUCCIÓN

La biocatálisis ha surgido como un área fundamental dentro de la biotecnología puesto que ha permitido la aplicación de enzimas microbianas en un amplio número de industrias reemplazando muchos de los procesos químicos tradicionales. En la actualidad, son numerosos los procesos biotecnológicos que se llevan a cabo mediante la utilización de enzimas microbianas aisladas principalmente de hongos filamentosos, siendo un campo con grandes perspectivas debido a que el empleo de sus metabolitos y/o enzimas representan una alternativa menos agresiva con el ambiente, son rentables económicamente, son de fácil manejo y poseen una gran eficiencia catalítica (Ward y cols. 2006). Por lo anterior numerosas investigaciones se han centrado en la búsqueda de hongos adaptados a distintas condiciones de crecimiento con el objetivo de obtener enzimas cuyas características fisicoquímicas sean aptas para su manejo y uso a escala industrial. En este sentido, las esterasas en particular, son consideradas de los biocatalizadores de mayor relevancia biotecnológica en la síntesis orgánica (Koeller y Wong 2011) pese a que han sido menos exploradas en comparación con las lipasas, por lo que el alcance futuro de la investigación de tales enzimas es valioso (Sayali y cols. 2013).

1.1 Hongos filamentosos

1.1.1 Ascomycetos

Se estima que hay más de 65,000 especies descritas de ascomycetos (Deacon 2006). Son por ello el grupo más abundante de hongos. Los hongos de este phylum pueden producir dos o más tipos de esporas tanto asexuales como sexuales, las segundas son llamadas ascosporas. A tales etapas sexuales se les nombra teleomorfas y son reconocidas taxonómicamente como parte de los ascomycetos. En cuanto a las esporas asexuales, generalmente llamadas conidios o clamidiosporas en las etapas denominadas anamorfas, se les han clasificado en el phylum independiente Deuteromycetes (Chaverri y Samuels 2003).

Estos hongos poseen micelios compartimentalizados (hifas septadas), un estado dicariótico en algún momento de su ciclo de vida, falsos tejidos (plectenquima), que están asociados a la producción de esporas sexuales y complejos sistemas de dispersión y producción

El carácter esencial de estos hongos se debe a la formación de esporangios especiales característicos de su estado reproductivo sexual, llamados ascas o ascos, en cuyo interior se generan esporas denominadas ascosporas. Su talo puede ser unicelular aunque generalmente esta constituido por un micelio bien desarrollado, con hifas ramificadas y septadas, cuyas células poseen de uno a varios núcleos. El micelio esta formado por hifas septadas, delgadas o gruesas, simples o muy ramificadas, cortas o largas, las que por lo general se extienden en todos sentidos constituyendo micelios amorfos o con una forma regular y definida. El cierre del tabique no es completo, pues en el centro queda un pequeño orificio de estructura sencilla, a través del cual generalmente se comunica el protoplasma de las células contiguas. En ciertos casos, el poro esta

1.1.1.1 Morfología y estructura

(Schwarze y cols. 2000).

Generalmente los ascomicetos causan pudrición blanda, ya que emplean un ataque similar a los hongos causantes de la pudrición marrón. Degradan preferentemente la celulosa de las paredes celulares y forman a menudo cavidades microscópicas en la pared secundaria celular

Estos hongos ocupan una gran cantidad de habitats y poseen diversos nichos ecológicos, pues los hay fitoparásitos, formadores de líquenes y micorrizas, endófitos, saprófitos, coprófilos, micoparásitos, acuáticos e incluso hipógeos (Alexopoulos y cols. 1996).

de esporas asexuales (conidias). Los septos del micelio poseen poros simples. Su característica mas distintiva, sin embargo, es el asco, lugar de producción de las ascosporas. Todas pueden ser de una a varios miles por individuo, pero regularmente son ocho en cada asco. Las células poseen pared celular, membrana celular, protoplasma y de uno a varios núcleos. La pared celular es delgada o gruesa y esta constituida fundamentalmente por quitina, aunque presenta menores cantidades de celulosa, compuestos peptídicos, proteínas, lípidos y sales minerales. El protoplasma por lo común es hialino y transparente. Contiene vacuolas y reservas de grasa y glucógeno (Herrera y Ulloa 2004).

Los ascomicetos poseen dos fases reproductivas en su ciclo de vida, una sexual o ascogéno y una asexual o conidial, siendo la primera caracterizada por la presencia de ascos y ascosporas, mientras que la segunda se caracteriza por la producción de esporas asexuales (conidios) en diferentes momentos en el mismo micelio. Dado que en muchas especies sólo se ha encontrado la fase asexual, ha sido costumbre ubicar tales anamorfos en el grupo de los Deuteromicetos u hongos imperfectos (Herrera y Ulloa 2004). Durante la fase dicaríota, las hifas continúan creciendo hasta formar un micelio dicaríotico; cuando las condiciones son adecuadas, en la célula terminal de una hifa se produce la cariogamia (la fusión de dos núcleos haploides) formándose entonces el cigoto que será la célula madre del asco (Cartillo 2003).

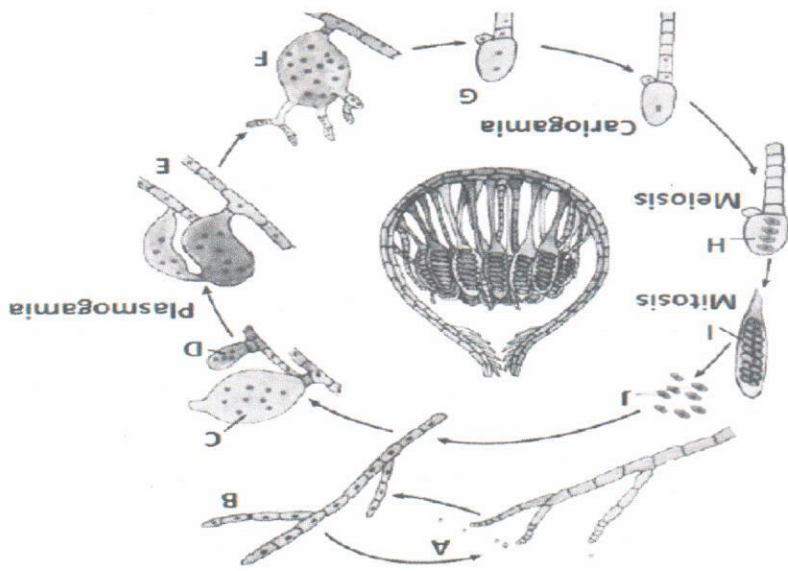
El ciclo vital de los ascomicetos (Fig. 1) corresponde a un patrón general en el que los ascos producen ascosporas, mismas que se liberan y al germinar producen la formación de un micelio. Comienza con la formación de tubos de germinación de las esporas al que migra el núcleo y que junto con sus descendientes se van repartiendo por las hifas en crecimiento que origina el tubo al igual que se forman los septos. Durante el crecimiento, si las condiciones lo favorecen, se puede reproducir asexualmente mediante la formación de conidios, que producen a su vez una gran cantidad de conidiosporas que al dispersarse originan micelios idénticos al generado por la ascospora inicial.

1.1.1.2. Ciclo de vida y reproducción

obstruido por un tapón formado por corpúsculos, los que a su vez se originan en los cuerpos de woronin (cuerpos esféricos cristalinos, situados cerca de los septos) (Gooday 1995).

La reproducción asexual en los ascomicetos es quizá su principal forma de propagación en la naturaleza. Normalmente la formación de clamidiosporas, el desarrollo de conidias, la fragmentación y la fisión, son los métodos de reproducción asexual en estos hongos. Las clamidiosporas se forman por formación y engrosamiento de septos que dan lugar a una célula melanizada y más grande que el resto de la hifa en la que se forma. Cuando la hifa parental se desintegra las clamidiosporas son liberadas, en un tipo de desarrollo talico, como se explica para las conidias. Por su parte, las conidias representan el método más común de reproducción asexual y pueden ser muy variables en forma y tamaño (Deacon 2006). Se originan de una hifa especializada denominada conidióforo, la cual puede ser individual y estar dispersa en el micelio o agruparse formando complejas estructuras reproductivas.

Fig. 1 Ciclo de vida de un ascomiceto.
 A) La fase asexual se basa en la producción de esporas llamadas conidias, B) hifas haploides que producen más conidias. C) Ascogonio, estructura reproductiva femenina que emite un tricoginio que busca el anteridio, D) anteridio, estructura reproductiva masculina, E) fusión de citoplasmas y el anteridio arroja sus núcleos en el ascogonio, F) desarrollo de hifas dicarióticas en el ascogonio que dan lugar a los ascos, G) gancho (uncinulo) fibula en comestibles (*crozier*), que conforma la célula madre del ascos en la cual se da la cariogamia, H) meiosis dentro del ascos en proceso de crecimiento que produce 4 células haploides, las cuales experimentan mitosis y generan 8 ascosporas dentro del ascos maduro (I). Las esporas son liberadas (J), para luego germinar formando hifas (B).



Trichoderma/Hypocrea con base en exclusiva en sus características morfológicas (Samuels

Anteriormente se llevó a cabo la identificación a nivel de especie de los aislamientos redondeados. La esporulación da sobre la colonia parches verdosos (Guzmán 1977). cortos que se hallan a lado y lado de la hifa, mostrando por su parte terminal pequeños conidios sobre el medio. El micelio está formado por hifas septadas. Los conidióforos por segmentos *Trichoderma harzianum* crece formando colonias blancas que simulan una película por su agradable olor y sabor (Bayona y Villanueva 1999).

factonas que se usan ampliamente en la industria como saborizantes, ya que están caracterizados transgénicas, para separar isómeros ópticos en la producción de mentol y para la producción de biorremediación de ambientes contaminados, como fuente de genes para la obtención de plantas 2003), otras para la producción de enzimas y antibióticos (Schomoll y cols. 2010), en la Algunas de ellas son usadas como agentes de biocontrol contra enfermedades de plantas (Howell 2012). El género *Trichoderma* contiene especies que son de importancia biotecnológica. metabólica, habilidades competitivas y reproductivas en la naturaleza (Cardoso-Lopes y cols. supervivencia en distintos hábitats biogeográficos puede estar relacionado con su diversidad en distintos ecosistemas en amplios rangos de zonas climáticas (Kubicek y cols. 2008). La Los miembros del género *Trichoderma* son microorganismos cosmopolitas ya que se encuentran

1.1.1.3 *Trichoderma harzianum*

así originado, es un organismo genéticamente idéntico a su parental. separe del cuerpo original y continúen su crecimiento independientemente. El nuevo individuo hongos, pues implica que un trozo del micelio, a veces constituido sólo por unas pocas hifas, se La fragmentación es quizá el método más sencillo de propagación asexual entre los

prefijos holo y entero, respectivamente.

ha sido también usada para clasificarlas en exógenas y endógenas, para lo que se usan los desarrollo se denominan talicas o blasticas. La manera en que se forma la pared de las conidias conidiógenas especiales situadas en los conidióforos más complejos y según el modo de Las conidias pueden originarse directamente de las hifas somáticas o de células

Es un tipo de hongo ascomiceto que crece de forma saprofito en el ambiente. El género *Neurospora* presenta colonias de rápido crecimiento con abundante producción de ascomas. Pueden crecer en materia orgánica muerta o en medios constituidos por agua, sales minerales, glucosa o agar. Las ascosporas son ampliamente fusiformes, elipsoidales, casi esféricas, unicelulares, hialinas de color a marrón amarillento o marrón oliva, convirtiéndose en oscuras y opacas en la madurez. Anamorfos de este género son conocidos en solamente un número relativamente pequeño de especies, que pertenecen a los hongos imperfectos género *Chrysomya* De acuerdo a su tipo de reproducción se clasifican en heterotálicos (reproducción sexual) y homotálicos (reproducción asexual). La especie tipo del género es *Neurospora sitophila* (García y cols. 2004).

1.1.1.5. *Neurospora sitophila*

Las colonias crecen rápidamente en agar. El micelio aéreo es de color blanquecino a amarillo anaranjado, marrón claro o pálido, pero se vuelve marrón a rojo-marrón con la maduración de la colonia. En condiciones de luz y temperatura alterna, anillos de masas de esporas se pueden formar por algunos aislados (Wiase 1987, Leslie y Summerell 2006).

F. culmorum es un hongo fitopatógeno, agente causal de la roya de los granos, la pudrición de la raíz común y otras enfermedades de los cereales, hierbas, y una amplia variedad de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Presenta conidióforos simples, cortos, tabicados que terminan con varios macroconidios, alargados y estrechos, curvados y con extremos afilados (de 4-6 x 40-60 µm), con cinco a ocho septos transversales y pared fina y lisa, los microconidios en esta especie se encuentran ausentes (Smith 2002).

1.1.1.4 *Fusarium culmorum*

hartzianum es el estado anamorto de *Hipocrea lixii* (Chaverri y Samuels 2003).
2006). Posteriormente, gracias a técnicas de secuenciación de ADN se ha determinado que T.

1.2 Enzimas

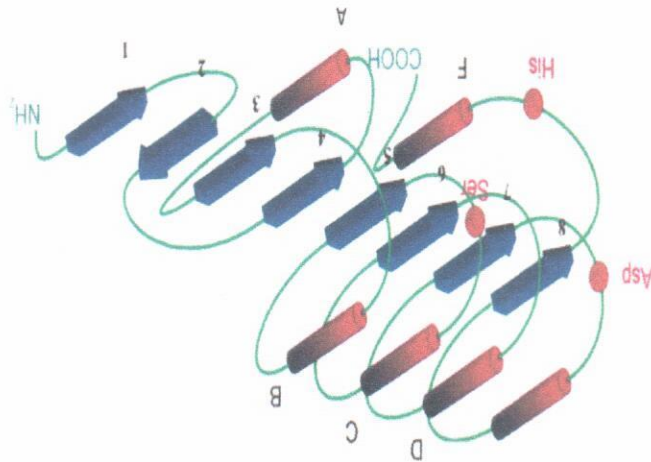
Desde finales del siglo XVII las enzimas eran conocidas por la humanidad. El término enzima (en griego, *enzyme* = en levadura) fue utilizado por primera vez por el fisiólogo alemán Wilhelm Kühne. Más tarde en 1897, Eduard Buchner, demostró que la fermentación alcohólica se debe a la acción de unas enzimas a las que llamó "zymasas" y no a la simple acción fisiológica de las células de la levadura. Siguiendo el ejemplo de Buchner, las enzimas usualmente se nombran según las reacciones que llevan a cabo. En la actualidad, se sabe que las enzimas son catalizadores biológicos, en su mayoría de naturaleza proteica, que funcionan disminuyendo la energía de activación de una reacción. La presencia de enzima acelera sustancialmente la tasa de reacción y no alteran el balance energético de las reacciones en las que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la reacción, pero consiguen acelerar el proceso incluso en escalas de millones de veces. Al igual que ocurre con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas en las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas, lo que posibilita su empleo en una gran variedad de reacciones.

1.2.1 Esterasas

Las esterazas son un grupo versátil de hidrolasas que catalizan la hidrólisis o síntesis de enlaces éster (Fig. 2). Muestran alta especificidad, lo que las hace atractivos biocatalizadores para la producción de compuestos puros en la síntesis de productos químicos (Faber 2000). De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular las esterazas se clasifican en el grupo E.C 3.1.1.x donde x depende del sustrato que hidrolizan (Bornscheuer 2002). E.C.3.1, se refiere a las hidrolasas con acción en enlaces éster. A la vez, dichas enzimas se subdividen en varios grupos, entre ellas las carboxilesterasas (E.C 3.1.1.1.) que actúan sobre esteres carboxílicos de cadenas acilo liberando ácidos; las cutinasas (E.C 3.1.1.74) que hidrolizan el polímero cutina a monómeros de cutina (EMBL-EBI 2015), entre otras.

Su mecanismo de acción da inicio una vez que el sustrato se une a la Ser activa originando una conformación tetraédrica que es estabilizada por la His y los residuos de Asp. A continuación el alcohol del éster carboxílico es liberado y se forma un complejo enzima-acilo (resultado de la liberación del grupo OH del éster carboxílico, debido al enlace covalente entre el resto ácido del sustrato y el resto de serina). Posteriormente, por un ataque nucleofílico (agua en hidrólisis, alcohol o éster en transesterificación) se forma nuevamente la conformación tetraédrica

Fig. 3 Presentación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa. Las posiciones relativas de los aminoácidos de la triada catalítica se indican como círculos rojos. Las β plegadas (1 - 8) se muestran como flechas azules, las α hélices (A-F) como columnas anaranjadas (Bornscheuer 2002).



Las esterasas pertenecen a la familia de las serin hidrolasas, poseen un plegamiento α/β característico integrado por 8 β plegadas y 6 α hélices. Su triada catalítica se conforma de los aminoácidos Serina (Ser), Histidina (His) y Ácido Aspártico (Asp) (Fig. 3).

1.2.1.1 Estructura y mecanismo catalítico

Fig. 2 Reacción de hidrólisis de un éster.

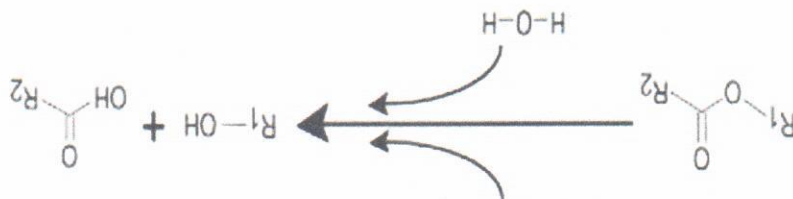
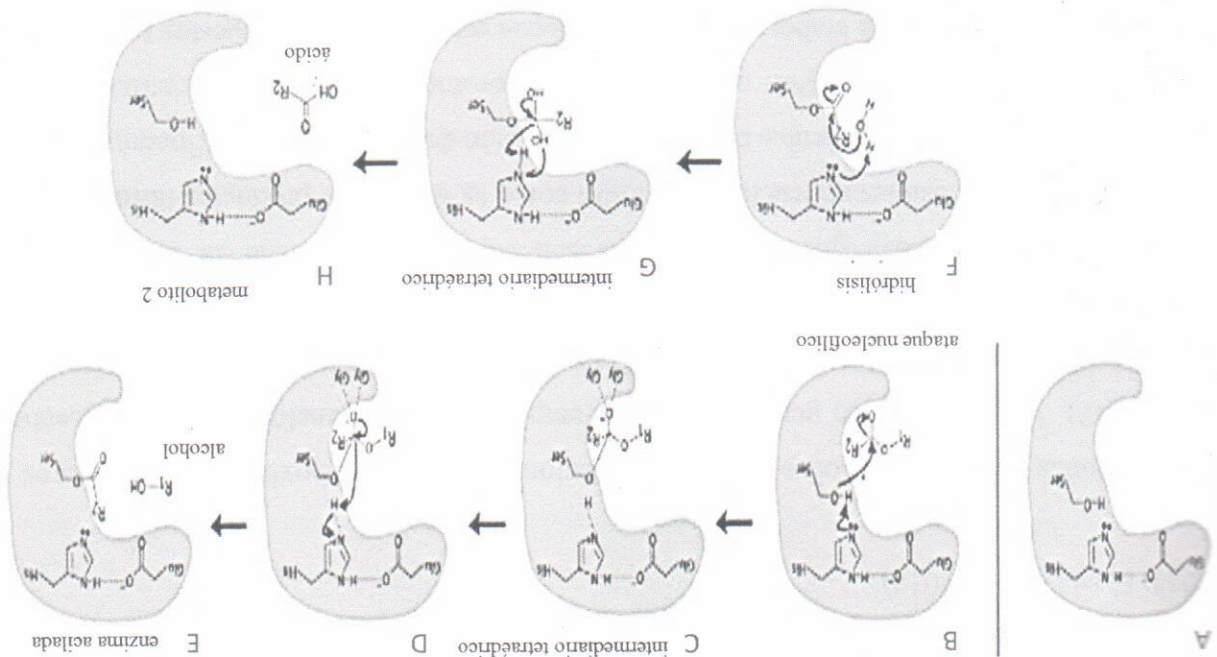


Fig. 4 Mecanismo catalítico de las esterasas. A: representación de la enzima y su sitio catalítico; B: ataque nucleofílico por el hidroxilo de la serina catalítica en el carbono carbonilo del enlace éster; C: intermediario tetraédrico, dos residuos de glicina (Gly) son importantes en la estabilización de la reacción para mantener el sustrato en su sitio; D, E: el alcohol se libera y la enzima toma una forma acilada, F-H: Una molécula de agua es necesaria para la liberación del ácido y la enzima vuelve a su forma inicial (Montella y cols. 2012).



intermediaria. La afinidad del residuo de histidina con las moléculas de agua permite que la enzima regrese a su estado activo y libere la molécula de ácido (Russell y cols. 2011). Esta etapa de hidrólisis de la reacción es un proceso común entre las hidrolasas y corresponde a un ataque nucleofílico de agua sobre la enzima acilada y liberación del resto ácido del éster carboxílico y la enzima activa libre (Bornscheuer 2002). Dos glicinas y otros residuos pequeños alrededor del agujero de oxianión son importantes para estabilizar la transición entre etapas y para mantener el sustrato en su lugar (Montella y cols. 2012).

Las esterasas son capaces de catalizar reacciones tanto de síntesis como de hidrólisis. Participan en reacciones como la esterificación, transesterificación e interesterificación (Sayali y cols. 2013). Este perfil de actividad les confiere una serie de aplicaciones importantes en la industria (Treichel y cols. 2009). Por otro lado, sus propiedades y su versatilidad resultan interesantes de estudiar para mejorar su aplicación o incluso conocer mejor sus mecanismos de acción y regulación. Tales aplicaciones a menudo implican el uso de disolventes orgánicos; por lo tanto enzimas que exhiben tolerancia a estos disolventes son de gran interés. Además, no requieren de cofactores por lo que resultan catalizadores activos para su uso a gran escala (Godinho y cols. 2011, Gupta y cols. 2012).

Entre algunas de sus aplicaciones están la producción de cadenas carboxílicas cortas (Barros y cols. 2012). Las esterasas en general, han sido empleadas en la transformación de desechos agroindustriales (Panda y Gowrishankar 2005). De igual modo, se han aplicado con éxito en la producción de compuestos aromáticos (Dutta y Dasu 2011, Barros y cols. 2009). Además, trabajos recientes indican que estas enzimas son capaces de catalizar la separación de enantiómeros, con posibles aplicaciones en áreas como la síntesis de productos farmacéuticos puros y en la industria de alimentos para la transformación de aceites a grasas (Speranza y cols. 2011, Fraga y cols. 2012). Por otro lado, se ha promovido su uso en distintas áreas biotecnológicas como en la elaboración de bebidas con esteres como compuestos saborizantes (Mc Klay 1993), en la elaboración de detergentes biológicos para la remoción de manchas (Dutta y cols. 2009), en la producción de biocombustibles (Bakera y cols. 2010) como es el caso de *Neurospora crassa*, cuyos estudios reportan su uso en la hidrólisis enzimática de la celulosa para la obtención de bioetanol (Gutiérrez-Rojas y cols. 2014) y finalmente la degradación de polímeros y sustancias tóxicas, (Kim y cols. 2002, Kim y cols. 2005, Kim y cols. 2007), así como en la degradación de plásticos (Shan y cols. 2008).

Las esterases se encuentran distribuidas en una amplia diversidad de organismos, desde animales y plantas, hasta microorganismos, principalmente en bacterias, hongos y actinomicetos. Estos microorganismos pueden producirlos tanto de forma constitutiva como inducible (Bornscheuer 2002, Degani 2015). Muchas de ellas muestran una tolerancia de sustrato amplia que condujo a la hipótesis de que han evolucionado para permitir el acceso a las fuentes de carbono o de participar en las vías catabólicas (Fan y cols. 2012). Diferentes fuentes microbianas para la producción de esterasa se encuentran generalmente a partir de colecciones de cultivo o pueden ser aisladas de ambientes variados como la superficie de alimentos como el queso (Gandolfi y cols. 2005), áreas contaminadas con desechos citadinos (Gupta y cols. 2012), o incluso en aguas residuales del reciclado de papel (Aguilar-Alvarado y cols. 2015).

Los hongos filamentosos, fitopatógenos y endófitos principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Trichoderma*, se consideran los principales productores de esterases (Castro-Ochoa y cols. 2010, Fortes y cols. 2010). Por otro lado, se ha demostrado la participación de dichas enzimas en la degradación de compuestos de la pared celular de las plantas (Metcalf 2001, Vera 2005, Gottschalk y cols. 2010). En las últimas décadas, las esterases que ha despertado mayor interés en años recientes son aquellas que presentan actividad cutinoltica o cutinasas. Las enzimas cutinolticas secretadas por hongos fitopatógenos juegan un papel crucial en los procesos de infección de tejidos vegetales (Kolattukudy 1984). Las esterases cutinolticas son producidas predominantemente por hongos fitopatógenos con la capacidad de crecer en cutina como su única fuente de carbono (Purdy y Kolattukudy 1975). Pueden ser inducidas por cutina, sus componentes principales e incluso alcoholes primarios (Pio y Macedo 2007, Degani 2015). Al respecto, una de las más estudiadas es la cutinasa de *Fusarium solani*, convirtiéndose en una enzima modelo para la evaluación de su estructura, función y reactividad (Carvalho y cols. 1998), aunque paulatinamente ha crecido el interés por la búsqueda de esterases con actividad cutinoltica con nuevas propiedades provenientes de otras fuentes fúngicas.

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) catalizan la hidrólisis del polímero lipídico cutina a monómeros de cutina. Estas enzimas poseen propiedades catalíticas tanto de esterases como de lipasas, puesto que la preferencia a sustratos frecuentemente se traslapa entre las clases definidas.

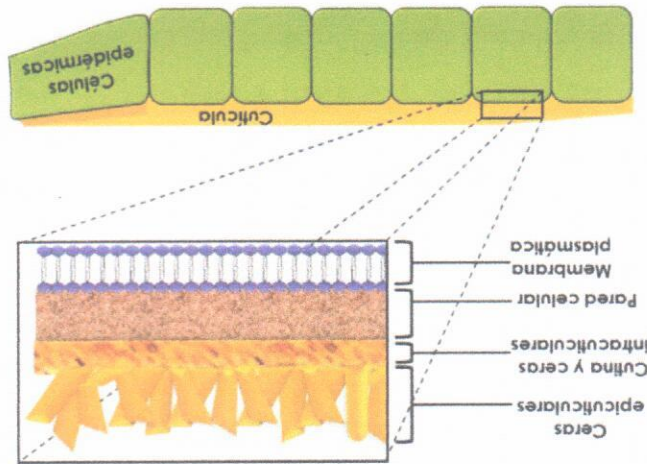
Las cutinasas también pueden catalizar la síntesis e hidrólisis de ésteres sintéticos de cadena corta, triglicéridos alcoholes primarios y poliésteres (Carvalho 1999, Pío y Macedo 2005, Degani 2015). Por tal motivo la identificación y medición de la actividad de cutinólítica en mezclas y/o extractos crudos es difícil, ya que comúnmente los sustratos empleados muestran reactividad frente a otras esterases, aunque trabajos recientes han empleado sustratos alternativos específicos para la medición de dichas enzimas (Degani y cols. 2006, Degani 2015), así como la medición de la actividad de cutinasas espectrofotométricamente usando ésteres de cadena corta como ésteres de *p*-nitrofenil como sustratos modelo (Kolattukudy y cols. 1975) y técnicas electroforéticas para la detección de estas enzimas (Karpushova y cols. 2005), además de análisis moleculares para lograr su identificación posterior (Rubio y cols. 2008).

Respecto a los mecanismos de producción, las cutinasas están fuertemente reguladas por las condiciones de crecimiento, el sistema de fermentación y las fuentes de carbono (Fraga y cols. 2012).

1.2.2 Cutina

La cutina es el componente estructural de la cutícula vegetal (Fig. 5). Es un polímero lipídico que es una malla relativamente rígida de ácidos grasos interesterificados, embebidos en una capa de lípidos no polares llamadas ceras epicuticulares (Degani y cols. 2006). Constituye una proporción que varía desde 40 a 80 % del peso. Según la especie vegetal, la cantidad de cutina puede variar de pocos microgramos a más de 1000 $\mu\text{g cm}^{-2}$ y su grosor puede variar desde menos de 1 hasta 10 μm o más (Dominguez y cols. 2011, Yeats y cols. 2012). La cutina es un polímero constituido principalmente por ácidos grasos de cadena media, los cuales se encuentran formando enlaces tipo éster entre sí, así como también glicerol (Suh y cols. 2005, Panikashvili y cols. 2007, Lee y cols. 2009). Debido a los enlaces covalentes entre sus

Fig. 5 Cutícula vegetal y sus componentes principales



Por otro lado, la cutina juega un papel fundamental en la protección contra patógenos y su degradación enzimática es uno de los primeros pasos para la infección (Kolattukudy y cols. 1995). Algunos microorganismos patógenos han demostrado crecer en medios con cutina como su única fuente de carbono (Purdy y Kolattukudy 1975) y producir enzimas cutinolíticas extracelulares (Lin y Kolattukudy 1980). Lo anterior debido a que la cutina como sustrato de crecimiento ha demostrado inducir la producción de enzimas cutinolíticas, pese a que comercialmente resulta poco viable su uso como inductor para evaluar su producción por sus bajos rendimientos y dificultad de extracción (Degani 2015). En este sentido se ha promovido el uso de inductores alternativos a la cutina natural (Pío y Macedo 2007).

estar presentes como componentes minoritarios en algunas cutinas (Heredia 2003).

monómeros, la cutina resiste daños mecánicos y forma la estructura básica de la cutícula (Stark y Tian 2006, Samuels y cols. 2008). La cutina está formada casi exclusivamente por ácidos grasos de 16 carbonos, entre los cuales el ácido 10, 16-dihidroxihexadecanoico y su isómero posicional 9, 16-dihidroxihexadecanoico, constituyen los principales componentes (Bessire y cols. 2007). Solamente una pequeña fracción de la cutina está formada por ácidos grasos de 18 carbonos, entre ellos los ácidos 9, 10-epoxi-18-hidroxioctadecanoico y 9, 10, 18-trihidroxioctadecanoico, los más abundantes, aunque algunos derivados insaturados pueden

La cutina GMS o monoesterato de glicerilo es una molécula orgánica empleada como emulsionante oleofílico. Este emulsionante está hecho a base de ácido esteárico y ácido palmítico (Lauridsen y cols. 1976). Se presenta en forma de hojuelas blancas tipo cera y tiene un ligero olor a grasa. Es insoluble en agua, pero al aplicar un surfactante, puede formar dispersión. Es uno de los emulsionantes más utilizados en la industria alimentaria y en la preparación de emulsiones cosméticas y farmacéuticas. Es utilizado como espesante, emulsionante, anti-apelmazamiento y agente conservante; un agente emulsificante aceites, ceras y disolventes; una capa protectora para los polvos higroscópicos. También se utiliza en cosméticos y productos de cuidado del cabello.

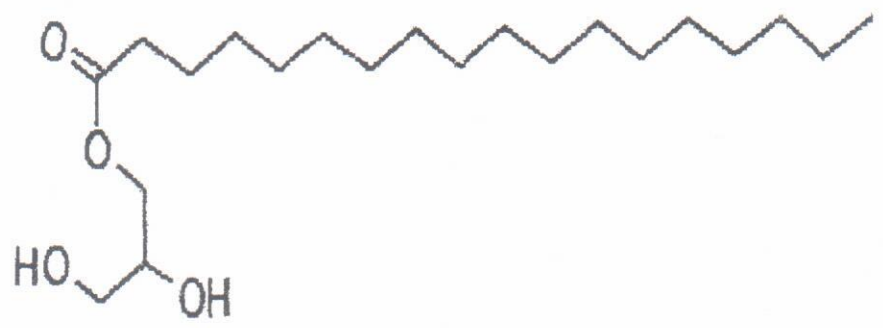


Fig. 6 Fórmula estructural del monoesterato de glicerilo

1.3 Fermentación

El término fermentación, desde el punto de vista bioquímico, se refiere al conjunto de reacciones catabólicas productoras de ATP en las que las moléculas orgánicas actúan tanto como donadores como aceptores finales de electrones (Cavalieri y cols. 2003). Por otro lado, el término fermentación, también es utilizado para referirse al crecimiento de microorganismos con el objetivo de obtener un producto químico específico. En el ámbito industrial, se considera un proceso para la producción de metabolitos y enzimas a partir de un cambio metabólico causado por microorganismos que actúan sobre materiales orgánicos (Bailey y Bailey 1995).

Las especies de hongos filamentosos se cultivan fácilmente en este sistema debido a la forma de crecimiento micelial que desarrollan y a que están naturalmente adaptados a condiciones de crecimiento con bajas actividades de agua. La optimización de la producción de enzimas esterazas a partir de microorganismos como son los hongos filamentosos, depende de una serie de factores interrelacionados, lo que significa que pueden sintetizarse durante parte de su ciclo de crecimiento (Ramírez y Coha 2003). En tal sentido, diferentes condiciones de crecimiento son cruciales en la regulación de la producción de esterazas cutimolíticas (Fraga y cols. 2012).

En los últimos años, ha habido un interés renovado en los procesos de fermentación sólida (FS) debido a su alta productividad de compuestos bioactivos en comparación con la fermentación en medio líquido para la obtención de isoenzimas. En especial en aquellos procesos en los que el extracto crudo es empleado como fuente directa de enzimas (Ruiz-Leza y cols. 2007, Téllez-Téllez y cols. 2008, Velázquez-López y cols. 2011, Speranza y cols. 2011)

La fermentación sólida (FS) se define como un proceso de transformación microbiana en el cual los microorganismos crecen en materiales sólidos sin la presencia de líquido libre (Cammel y Moo-Young 1980, Vinięgra-González 1997). En esta técnica de cultivo, la humedad necesaria para el crecimiento microbiano existe en un estado absorbido dentro de la matriz sólida, es decir que no excede el nivel de retención máxima de agua. Aunque la mayoría consideran esencialmente la fermentación en estado sólido y en sustrato sólido en un mismo sentido, Pandey y cols. (2001) han distinguido estos dos como procesos separados. Según ellos, la fermentación de sustrato sólido incluye aquellos procesos en los que el sustrato es la fuente de carbono y que ocurre en ausencia o casi ausencia de agua libre, mientras que la fermentación en estado sólido se define como cualquier proceso de fermentación que ocurre en ausencia o casi ausencia de agua libre, empleando un sustrato natural o un sustrato inerte como soporte sólido. El nivel de humedad más bajo al que puede producirse FS es de aproximadamente 12%, porque por debajo de este nivel cesan todas las actividades biológicas.

13.1 Fermentación sólida

De esta manera, la FS tiene un gran potencial en la producción de enzimas fúngicas sobre los procesos de fermentación sumergidos de uso común, ya que ofrece algunas ventajas como la similitud con el ambiente de crecimiento natural de los hongos, productividades más altas, menor costo de inversión y producción, menor efecto de la represión del carbono y especialmente por su potencial uso en áreas biotecnológicas o procesos industriales en los que se requiere baja actividad hídrica (Vinięgra-González y cols. 2003, Macedo y Fraga 2007).

Durante el crecimiento microbiano, el medio sólido se desintegra, provocando cambios en las características geométricas y físicas del medio, y consecuentemente se puede reducir el calor y la transferencia de masa. Esto se puede superar mediante el uso de un soporte inerte con una estructura física más o menos constante durante todo el proceso, lo que permite un control mejorado de la transferencia de calor y masa (Ooijkaas y cols. 2000). Otra ventaja de usar un soporte inerte es su recuperación de producto menos complicada. Además, permite el diseño de medios de producción adecuados y los balances de masas para mejorar el procesamiento avanzado y el control del proceso. Se han desarrollado muchos procesos que utilizan estos materiales para la producción de alimentos, enzimas y productos químicos, productos de valor agregado como el etanol, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios biológicamente activos, entre otros (Paredes y cols. 2010).

Se pueden distinguir dos tipos de sistemas de FS dependiendo de la naturaleza del sustrato. El sistema más comúnmente utilizado implica el cultivo sobre un material natural y el otro implica el cultivo sobre un soporte inerte impregnado con un medio líquido (Ooijkaas y cols. 2000). El primer sistema utiliza materiales naturales que sirven tanto como soporte como fuente de nutrientes, y estos materiales son típicamente productos agrícolas basados en almidón, lignocelulosa o fuentes agroindustriales. Los sustratos naturales tienen, sin embargo, una desventaja mayor, ya que los carbonos son componentes de la estructura. Por otro lado, el soporte sólido del segundo sistema, que también puede ser de origen natural, sirve solamente como punto de anclaje para los organismos. Tales soportes pueden ser, la perlita, la espuma de poliuretano (PUF) y la vermiculita, por mencionar algunos.

Por todo lo anterior, existe interés en la caracterización de cepas de hongos filamentosos con actividad cutinolitica. La caracterización de nuevas cepas de hongos productoras de enzimas extracelulares, así como los métodos de crecimiento e inducción son importantes, ya que estas pueden proveer de enzimas con distintas características de afinidad por sustrato, o con una actividad óptima en un rango amplio de pH y temperatura (Pizzarro y Park 2003, Speranza y cols. 2013). Esto permitiría optimizar las aplicaciones industriales de dichas enzimas o generar nuevos procesos biotecnológicos.

2 ANTECEDENTES

A continuación se describen algunos trabajos en los que se han evaluado la actividad de esterazas cutinolíticas en hongos filamentosos.

Hawthorne y cols. (2001) evaluaron la actividad cutinolítica de dos cepas de *F. solani*, dicha actividad fue inducida por cutina de las frutas *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* y manzana "Granny smith". La actividad de cutinasas fue inducida a diferentes niveles por las tres cutinas. Respecto a las concentraciones de cutina de manzana (0.1, 0.5, 2.5 y 5 g/L) los autores observaron un incremento en la actividad enzimática de esterazas a mayor concentración de cutina hasta los 2.5 g de cutina/L.

Crepin y cols. (2003) demostraron que la cepa *Neurospora crassa* presenta múltiples actividades carboxilesterazas dependiendo de la duración de la fermentación en medios sólidos, ya sea con la pulpa de remolacha azucarera o de sustratos de salvado de trigo.

Macedo y Pío (2005) aislaron microorganismos de plantas, frutas, hojas y corteza de árboles y realizaron una preselección de las cepas con capacidad de producir esterazas. Las cepas seleccionadas se sometieron posteriormente a la fermentación en un medio líquido con cutina vegetal (0.2, 0.4, 0.8 y 1%). Las actividades lipolíticas y cutinolíticas del sobrenadante se determinaron con el fin de diferenciar los productores de lipasa de cepas productoras de cutinasa. La actividad cutinolítica detectada de los sobrenadantes fue determinada espectrofotométricamente siguiendo la hidrólisis del *p*-nitrofenilbutirato (PNPB). Cuyos resultados fueron que la cepa seleccionada como la mejor productora de esterazas fue identificada como *F. oxysporum*, misma que obtuvo un aumento en la actividad cutinolítica a mayor concentración de cutina y su actividad cutinolítica se vio reprimida al desarrollarla en un medio con glucosa como única fuente de carbono.

Pio y Macedo (2007) evaluaron la producción de esterasas cutinolticas empleando del hongo *Fusarium oxysporum*. Midieron la producción de enzima en presencia de varias fuentes de carbono (glúcidos, ácidos grasos y aceites) y distintas fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas, con el fin de encontrar un sustituto rentable para cutina como inductor en el medio de cultivo. Los mayores valores de actividad cutinoltica fueron obtenidas en un medio mineral líquido suplementado con aceite de linaza al 1% (15.62 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) y con cutina al 0.5% (11.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) después de 48 h de fermentación.

Por otro lado, Rubio y cols. (2008) evaluaron la actividad esterasas cutinolticas de *Trichoderma harzianum* T34 en un medio líquido, dicha actividad fue inducida por aceite de olivo (1%) y el monómero de cutina 16-hidroxí-ácido hexadecanoico en el medio (0.05% y 0.2%). El monómero de cutina obtuvo los más altos valores de actividad enzimática 9.8 y 7.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ respectivamente, usando p-nitrofenil butirato como sustrato. Finalmente la enzima purificada Thec1 resultó ser una cutinasa con un PM de 26 kDa.

Speranza y cols. (2011) identificaron los efectos de diferentes sustratos en FS sobre las propiedades bioquímicas y actividades cutinolticas de la esterasa de *Fusarium* sp. Como resultado la esterasa producida fue mayor usando p-nitrofenil butirato en salvado de arroz, mientras para los medios: cáscara de soja, salvado de trigo, y semillas de *Jatropha curcas* mostraron mayor actividad en presencia de p-nitrofenil caprilato. Con lo que concluyeron que las fuentes de carbono y los sustratos empleados regulan la actividad cutinoltica de *Fusarium* sp.

Castro-Ochoa y cols. (2012) evaluaron la actividad carboxilesterasa de *Aspergillus nidulans*, usando aceite de oliva (0.1%) y ácidos grasos como inductores entre ellos el ácido estérico (0.1%). Los resultados posteriores indicaron que el aceite de oliva indujo la mayor actividad de esterasas (72.76 UI/mg). Finalmente se confirmó la naturalidad de la enzima al degradar a la cutina natural en una prueba de actividad cutinasa por cromatografía, con la que se confirmó que se trataba de una cutinasa, mientras el análisis de la secuencia del genoma del organismo modelo *A. nidulans* reveló cuatro genes que codifican para cutinasas constitutivas.

Además de que lograron identificar por primera vez la cutinasa (ANCUT2) producida por *A. nidulans* por SDS-PAGE como una proteína de 29 kDa.

Fraga y cols., (2012) evaluaron la producción de esterasas cutinolíticas de *F. oxysporum* por FS usando salvado de trigo, salvado de arroz y cáscara de soja, siendo el primero el que presentó la mayor actividad (21.7 U/mL), mientras con salvado de trigo y cáscara de soja obtuvieron 19.5 U/μL y 17.5 U/μL respectivamente. Los resultados de este trabajo demostraron que esta enzima puede ser producida en medios sólidos mostrando diferentes isoformas de la enzima en cada medio de cultivo.

Fávero y cols. (2013) evaluaron la actividad de esterasas producidas por hongos endófitos mediante un indicador de pH (azul de bromotímol) espectrofotométricamente, con el objetivo de obtener una fuente potencial de esterasa para la biotransformación de ésteres de cadena corta, usando compuestos como etil butirato, etil acetato y metil propionato como sustratos, los cuales fueron hidrolizados por la enzima extracelular de los hongos endófitos (entre ellos *Trichoderma viridae*) para la producción de ácidos carboxílicos; cuyos resultados indicaron presencia de enzimas esterasas en distinto niveles de actividad de acuerdo al sustrato.

Por último, Degani (2015), evaluó la producción y purificación de una cutinasa extracelular del hongo *F. oxysporum* en un medio de cultivo con inductores y empleando sustratos específicos para la evaluación de la actividad enzimática tanto de esterasas como de cutinasas mediante los sustratos p-nitrofenil butirato y 4-nitrofenil (16-metil éster de sulfuro) hexadecanoato (pNMSSEH) respectivamente. La adición de cutina de manzana o su hidrolizado en el medio de crecimiento (1-Hexadecanol) dio como resultado un aumento de la secreción de esterasas cutinolíticas en el líquido extracelular mientras que el uso de 1-hexadecanol como una alternativa a la cutina natural para inducir la producción de cutinasa resultó en un alto rendimiento (de 1.3 a 7.4 U/ml). La proteína purificada resultó corresponder a una cutinasa con un peso molecular de 20 kDa.

De acuerdo con los estudios anteriormente mencionados, se tienen evidencias de la producción de enzimas esterases por hongos filamentosos de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Neurospora*. Además de que es posible potenciar la actividad de cutinasas empleando inductores en el medio de cultivo y que dependiendo de la síntesis de producción de enzimas, se presentan isofomas en general. Sin embargo, las diferencias sustanciales en la estructura y función entre esterases cutinolíticas hacen que la extracción y caracterización de dichas enzimas de otras fuentes fungicas sea una estrategia para descubrir nuevos biocatalizadores con distintas características importantes para su optimización en procesos biotecnológicos múltiples (Chen y cols. 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

La demanda de enzimas cutinolíticas ha llevado a centrar nuevas investigaciones en el desarrollo de estrategias de cultivo e inductores alternativos frente a los inconvenientes de la obtención de la cutina natural para evaluar su producción. En tal sentido, la presente investigación pretende aportar información relevante para contribuir con el conocimiento sobre la producción de esterasas cutinolíticas por hongos filamentosos, al emplear cutina sintética en el medio de cultivo en fermentación sólida.

4. HIPÓTESIS

T. harzianum, *F. culmorum* y *N. sitophila* presentarán actividad enzimática de esterasas cutinolíticas en fermentación sólida.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento y la actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de los hongos filamentosos *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* en fermentación sólida.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento, pH, consumo de glucosa y contenido de proteína extracelular de *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* desarrollados en FS.
- Determinar la actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila*.
- Evaluar los patrones zimográficos de esterasas cutinolíticas de las cepas *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila*.

5.1 Microorganismos de estudio

Las cepas *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* fueron tomadas del cepario del laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, mismas que previamente fueron obtenidas de aislamientos de una industria recicladora de papel (Aguilar-Alvarado y cols. 2015). Las cepas se cultivaron en agar extracto de papa (PDA) a 22°C por 5 días y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4°C. Los cultivos se propagaron en medio fresco periódicamente para su conservación.

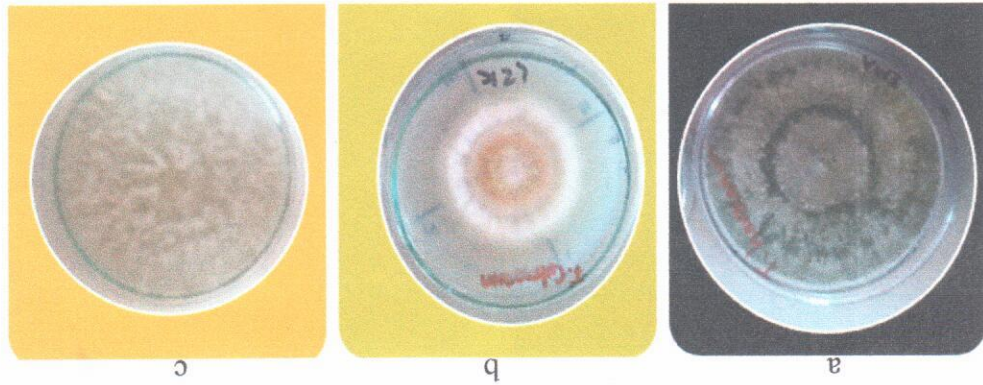


Fig. 7 Microorganismos de estudio a) *T. harzianum*, b) *F. culmorum* y c) *N. sitophila* en caja petri.

6.2 Condiciones de cultivo

Para cada fermentación se preparó un medio mineral con glucosa, extracto de levadura y sales minerales (GEL) con la siguiente composición (en g/L): glucosa, 10; extracto de levadura, 5; sales minerales: KH_2PO_4 , 0.6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; K_2HPO_4 , 0.4; CuSO_4 , 0.25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{ZnPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5) (González-Márquez y cols. 2014) como medio testigo, y tres más, adicionados con cutina GMS (monoésterato de glicerilo) en tres diferentes concentraciones a) GEL + 1 g cutina/L, b) GEL + 3 g cutina/L y c) GEL + 5 g cutina/L.

El pH inicial del medio de cultivo se ajustó con NaOH 1M o HCl 1M a 7.5, 8.5 y 6.5 para *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* respectivamente. Los valores de pH inicial de crecimiento en FS anteriormente descritos, fueron tomados con base en una prueba piloto previa

(datos no mostrados), en la que se evaluó el pH óptimo inicial de crecimiento entre 6,5, 7,5 y

8,5 para cada uno de los hongos.

El inóculo para cada matraz de fermentación fueron tres fragmentos de micelio de 4mm de diámetro tomados de la periferia de una colonia crecida sobre PDA a 20 °C durante 5 días.

La FS se concentró en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 0,5 g de PUF (17 kg m⁻³), cortada en cubos (0,5 x 0,5 x 0,5 cm) (Velázquez-López y cols. 2011) como soporte inerte embebido en 15 ml del medio de cultivo estéril. Los cubos se lavaron previamente dos veces con agua destilada. Fueron neutralizados en una solución de NaOH y HCl, ambas al 0,1 N por 24 h en cada solución, secados en horno a 40 °C y esterilizados a 120 °C por 15 min en autoclave. Los cultivos se incubaron por 5 días a 22 °C.

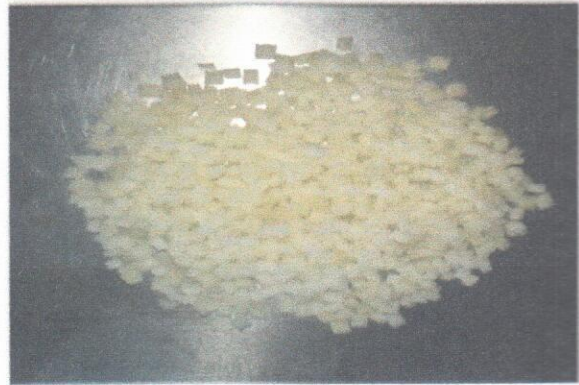


Fig. 8 Espuma de poliuretano cortada en cubos.



Fig. 9 *F. culmorum* en FS en matraces Erlenmeyer

6.3 Evaluación de la biomasa, obtención del extracto enzimático extracelular

Del desarrollo de los hongos en los cuatro medios de cultivo (1) GEL, (2) GEL+ 1g cutina/L, (3) GEL+ 3g cutina/L y (4) GEL+ 5 g cutina/L en FS, se obtuvo el extracto enzimático extracelular (EEB) cada 8 h por filtración y retención de la biomasa a través de papel filtro Whatman No. 4 por triplicado. Una vez retenida la biomasa sobre el papel, se secó a 60°C por 48h hasta llegar a peso constante para su cuantificación por diferencia de peso seco (Suarez-Segundo y cols. 2013).

La estimación de los parámetros cinéticos en las ecuaciones anteriores se realizó con el programa Solver de Microsoft Excel (Viniestra-González y cols. 2003, Córdoba-Sosa, 2014a).

$$C = (X_{max} - X_0) / X_0$$

C = Valor que representa la relación entre la diferencia de X_{max} y X_0 (g/L):

X_0 = Valor de la biomasa inicial (g/L)

t = Tiempo transcurrido en la fermentación (h)

X_{max} = Valor de la biomasa máxima o de equilibrio (g/L) cuando $dX/dt = 0$ para $X > 0$.

μ = Máxima velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

Donde:

$$X = X_{max} / (1 + Ce^{-\mu t})$$

La solución a la ecuación resulta la siguiente:

$$dX/dt = \mu (1 - X/X_{max}) X$$

$X = X(t)$ se ajustó mediante la ecuación logística de Verhulst-Pearl:

Respecto a la velocidad específica de crecimiento, el avance de la biomasa en función del tiempo

6.4 Evaluación de la velocidad específica de crecimiento

Fig. 10 Obtención del EBE por filtración y retención de la biomasa.



6.5 Medición de pH

Las mediciones de pH se realizaron en el sobrenadante del crecimiento de los hongos *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* diariamente por 5 días cada 8 h por triplicado con un potenciómetro Conductronic Pc 45.

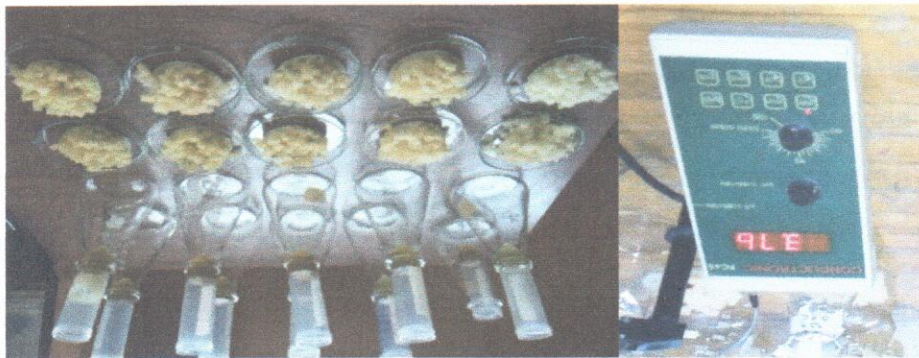


Fig. 11 Determinación del pH de los sobrenadantes por potenciometría.

6.6 Actividad enzimática de esterasas

La actividad enzimática de esterasas se obtuvo midiendo la concentración de *p*-nitrofenol producido por la hidrólisis de *p*-nitrofenilbutirato (pNPB) (Kim y cols. 2005). La mezcla de reacción contenía 100 μ l de EEE y 900 μ l de una solución preparada de la siguiente manera: 10 μ l de pNPB (1.76 % (v/v) en acetnitrilo), 790 μ l de buffer de fosfatos 50mM pH 7.5, y 100 μ l de Tritón X-100 0.04%. Posteriormente la mezcla de reacción se incubó durante cinco minutos a 37 °C y se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis. El resultado se expresó en UI/L, en el entendido de que una unidad de actividad enzimática convierte un micromol de pNPB en un micromol de *p*-nitrofenol por minuto (Davies y cols. 2000, Speranza y cols. 2013). La actividad enzimática específica (E_{esp}) se obtuvo mediante la estimación de las UI de enzima por miligramo de proteína total (UI/mg).

Se midió el consumo de glucosa mediante la determinación de la concentración de azúcares reductores en el EBE mediante el método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Miller 1959, González-Marquez y cols. 2014). A 80 μL del EBE se le agregaron 2 mL de DNS y 920 μL de agua destilada. La mezcla de reacción se llevó a ebullición en baño maría por 5 min. Posteriormente se detuvo la reacción con un baño de hielo. Finalmente se leyó la absorbancia a 575 nm de cada muestra por triplicado y se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de glucosa.

6.8 Determinación del consumo de glucosa

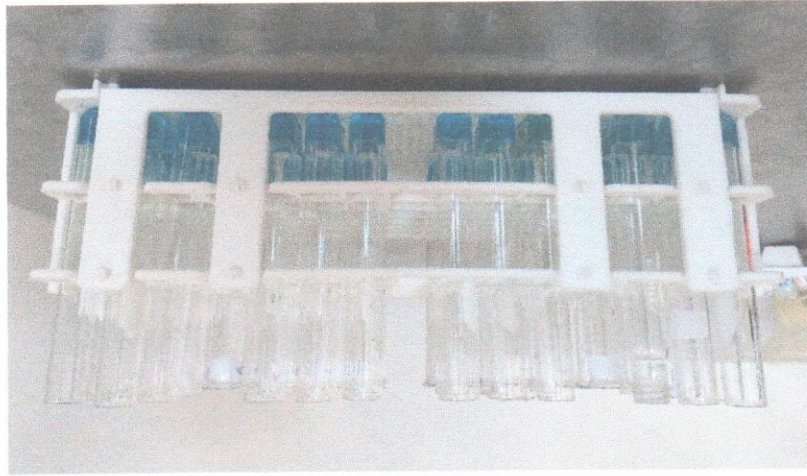
El rendimiento teórico de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) se estimó como la relación entre la actividad máxima obtenida durante el crecimiento exponencial (E_{max}) en U/L y la X_{max} (g/L). Se calculó la productividad en el pico máximo de actividad ($P_{\text{RO}} = E_{\text{max}} / \text{tiempo de fermentación}$) y la tasa específica de formación de la enzima ($q_p = \mu Y_{E/X}$) (Córdoba-Sosa y cols. 2014a).

6.7 Cálculo de rendimientos enzimáticos

Fig. 12 Tubos de ensayo con la mezcla de reacción para determinar actividad de esterasas cutinoliticas



Fig. 14 Tubos de ensayo con la mezcla de reacción para determinar el contenido de proteína del EEE por el método de Bradford.



Se determinó la cantidad de proteína soluble en el EEE por el método de Bradford (1976) que consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible de un colorante (Coomassie Blue G-250). A 100 μ l de EEE diluidos en 860 μ l de agua, se le agregaron 40 μ l del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se leyó la absorbancia a 595 nm y se empleó albúmina sérica bovina (BSA, SIGMA) como proteína estándar para la cuantificación.

6.9 Determinación del contenido de proteína

Fig. 13 Tubos de ensayo con la mezcla de reacción para determinar el contenido de glucosa del EEE por el método de DNS.



Las perfiles polipeptídicos de las muestras con actividad de esterasas se analizaron por electroforesis en gels de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) al 0.1% (Laemmli 1970). El gel de separación y de empaquetamiento contenía 12 y 4% de acrilamida, respectivamente. Se utilizó un marcador de peso molecular de amplio espectro (2-250 kDa, BIO-RAD). El buffer de la muestra contuvo: 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 35% de glicerol, 0.01% de azul de bromofenol y 10% de SDS. Las muestras se separaron en gels de 0.75 mm de espesor en un sistema de electroforesis Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad) a 100 voltios durante 90 minutos. Después de la corrida, los gels fueron lavados en buffer Tris-HCl 100Mm a pH 6.5 con 0.05% de Triton X-100 durante dos intervalos de 5 minutos a 4°C. Posteriormente, los gels fueron incubados por 3 horas a temperatura ambiente en una solución con 3 mM de α -naftil acetato, 1 mM de Fast Red TR (Sigma) y buffer de fosfatos 100 mM a pH 7.5 (Karpushova y cols. 2005). Finalmente la actividad de esterasas cutinoliticas fue detectada por la aparición de bandas de color rojo en los gels y se colocaron en una placa de acetatos para su análisis



Fig. 15 Muestras cargadas en gels de poliacrilamida en un sistema de electroforesis Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad).

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo aplicando un Análisis de Varianza factorial (ANOVA) con una prueba post hoc de Tukey de múltiples comparaciones, con un nivel de significancia $p < 0.05$ utilizando el programa estadístico SigmaPlot® versión 12.0.

2. RESULTADOS

2.1 *T. harzianum*

2.1.1 Producción de biomasa

La producción de biomasa (X) durante la FS de *T. harzianum* desarrollado en los medios GEL+ 1g cutina/L, GEL+ 3g cutina/L y GEL+ 5g cutina/L a pH inicial de 7.5 se muestra en la Fig. 16.

Respecto a la cinética de crecimiento podemos apreciar con claridad dos fases, la exponencial y estacionaria debido a la velocidad con la que se desarrolló el cultivo. La μ no cambio significativamente en los tratamientos con cutina, excepto con respecto al medio testigo con 0.06 h^{-1} (Tabla 2). La producción de biomasa se vio afectada por la concentración de cutina en el medio de cultivo obteniendo una mayor producción de biomasa a mayor concentración de cutina teniendo una X_{max} de 10.6 g/L a las 48h en el medio GEL+5g cutina/L, X_{max} de 9.8 g/L a las 56h en GEL+ 3g cutina/L, X_{max} de 8.8g/L en el medio GEL+1g de cutina/L a las 56h y una X_{max} de 7.6 g/L a las 80h en el medio GEL resultado diferir significativamente ($p = 0.02$) (Tabla 2).

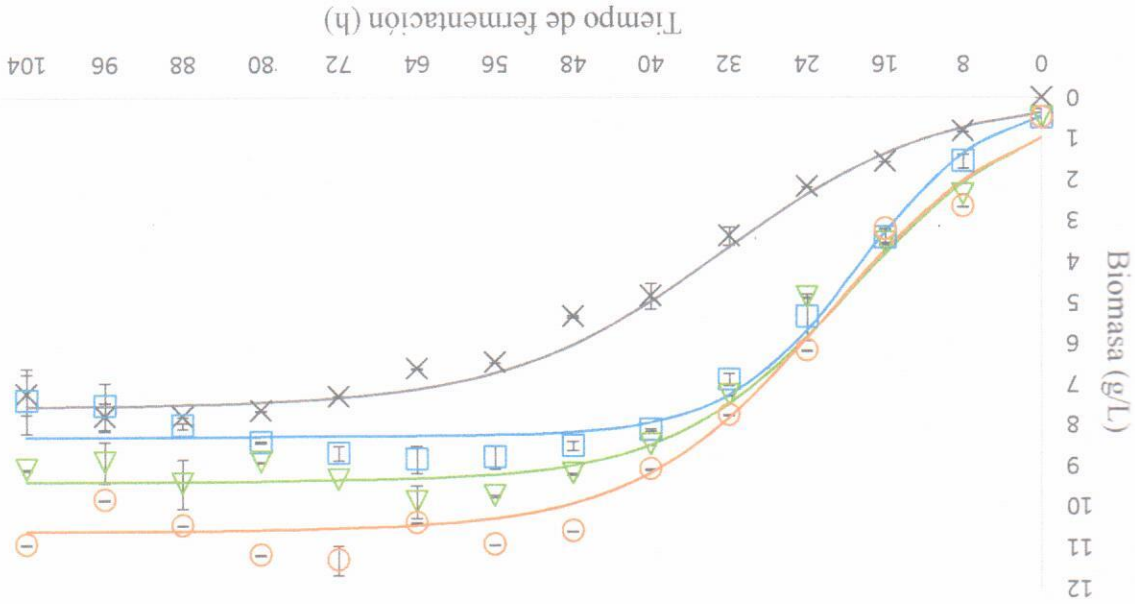


Fig. 16 Crecimiento de *T. harzianum* en FS con medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+ 5g cutina/L (○).

La Fig. 17 muestra el perfil de pH a través del tiempo de la FS de *T. harzianum* en los medios GEL, GEL+ 1g cutina/L, GEL+ 3g cutina/L y GEL+ 5g/L a pH inicial de crecimiento de 7.5. En la figura se observa una disminución en el pH desde las primeras horas de crecimiento que coinciden con las fases de crecimiento exponencial llegando a valores cercanos a 3.5 en el medio GEL, 4.4 en GEL+1g de cutina/L, 5.18 en Gel + 3g de cutina/L y 5.95 en el medio GEL+ 5g de cutina/L a las 24 h de la fermentación, para posteriormente incrementar paulatinamente hasta valores alcalinos entre 7.5 y 8.5 al final de la fermentación.

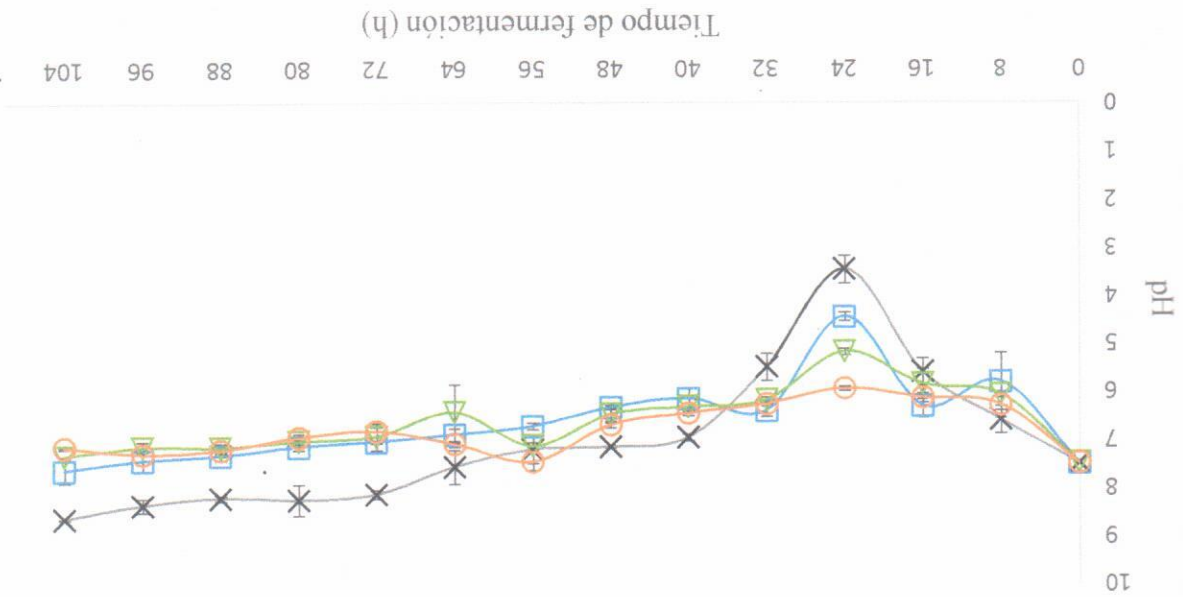


Fig. 17 pH de crecimiento de *T. harzianum* en FS en medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+ 5g cutina/L (○).

7.1.3 Consumo de glucosa

El consumo de glucosa a lo largo de la fermentación de *T. harzianum* en los medios GEL, GEL+ 1g cutina/L, GEL+ 3g cutina/L y GEL+ 5g cutina/L se presentan en la Fig. 18. En ella se observa una rápida disminución de los azúcares presentes en los medios de cultivo, que coincide con las fases exponenciales de crecimiento y culmina con la fase estacionaria, siendo el día 4 el punto en el que ya se han consumido casi en su totalidad los azúcares para los cuatro tratamientos. El

... estadístico arrojó un valor de $p=0.06$ por lo que la diferencia en los valores no es suficiente para excluir la posibilidad de que la diferencia se deba a la variabilidad del muestreo.

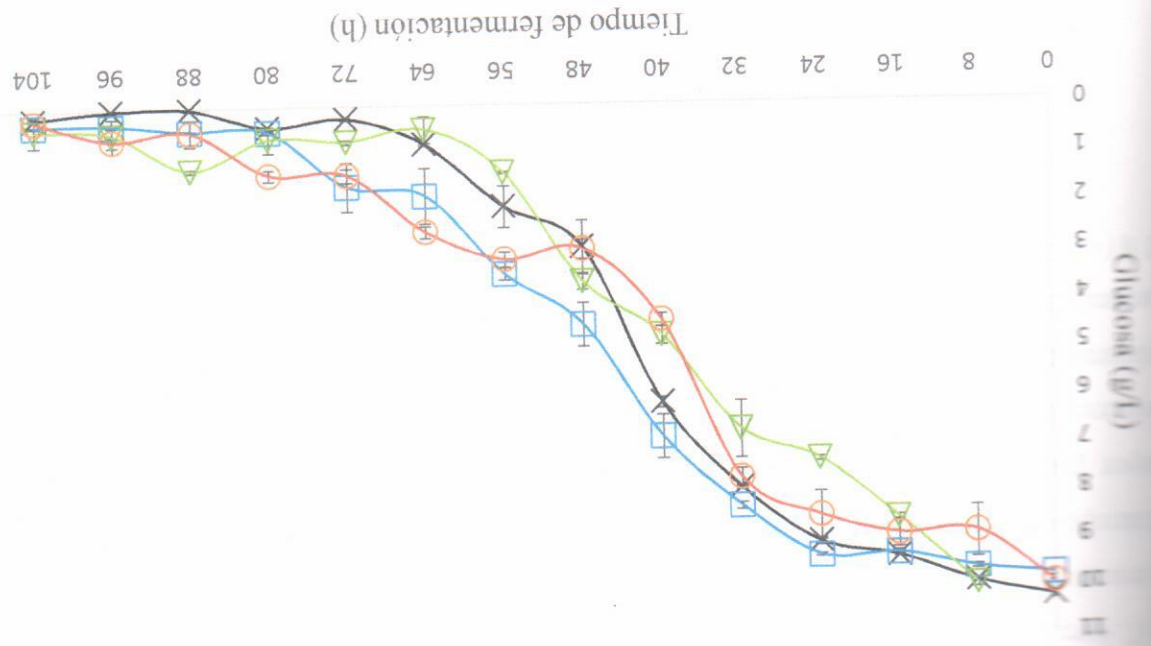


Fig 18 Consumo de glucosa de *T. harzianum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+5g cutina/L (○).

21.4 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas

La actividad de esterasas cutinolíticas detectadas del EEB de los sobrenadantes del crecimiento de *T. harzianum* en FS en los medios GEL, GEL+ 1g cutina/L, GEL+ 3g cutina/L y GEL+ 5g/L muestra a continuación en la Fig. 19. En ella se observa producción de esterasas durante todo el tiempo de fermentación en los cuatro medios de cultivo, presentando de forma significativa mayor producción en el medio GEL+5g de cutina/L (Tabla 1) particularmente durante las primeras horas de cultivo cuando se encontraba en fase exponencial de crecimiento y los azúcares presentes en el medio de cultivo aún no se han agotado. Dicha producción fue en aumento durante el tiempo de muestreo; obteniendo la mayor actividad esterasa a partir de las 72 h (433 UI/L en el medio GEL + 5g cutina/L).

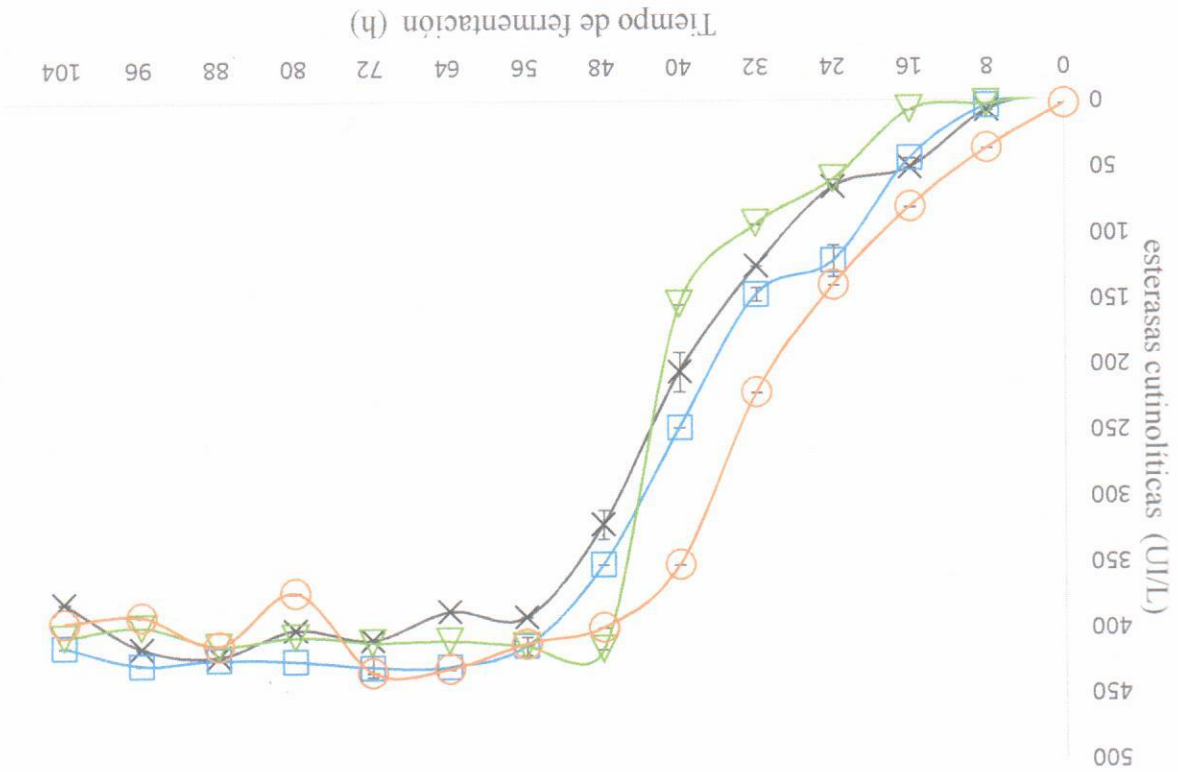


Fig. 19 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de *T. harzianum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+ 5g cutina/L (○).

Tabla 1. Actividad enzimática de esterases (U/L) de *T. harzianum* en FS.

TIEMPO DE FERMENTACIÓN (h)	MEDIO DE CULTIVO		
	GEL	GEL+1g cutina/L	GEL + 3g cutina/L
8	7.5 ^b (0.03)	6.16 ^b (0.03)	2.93 ^c (0.02)
16	51.13 ^b (0.13)	44.03 ^b (0.03)	7.41 ^c (0.04)
24	65.65 ^c (0.80)	121.44 ^b (0.08)	60.03 ^c (0.02)
32	90.47 ^c (0.07)	146.8 ^b (0.10)	93.5 ^d (0.25)
40	205.5 ^c (0.15)	256.97 ^b (5.01)	154.1 ^d (0.12)
48	320.23 ^c (11)	351.5 ^b (0.14)	415.86 ^a (0.02)
56	390.95 ^a (0.32)	413.06 ^a (0.10)	413.57 ^a (0.01)
64	386.7 ^c (0.04)	428.9 ^a (0.7)	409.45 ^b (0.02)
72	418.22 ^b (0.14)	419.22 ^b (0.05)	420.11 ^b (0.03)
80	400.30 ^a (0.15)	424.08 ^a (0.07)	405.76 ^a (0.05)
88	420.23 ^a (0.09)	422.45 ^a (0.03)	412.19 ^a (0.02)
96	413.68 ^a (0.13)	426.40 ^a (0.06)	397.45 ^b (0.04)
104	378.92 ^b (0.28)	412.41 ^a (0.14)	405.06 ^a (0.02)

Las medias con la misma letra en la misma fila no difieren significativamente. Los números en paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.1.5 Contenido de proteína

La concentración de proteína soluble de *T. harzianum* en FS los medios GEL(X), GEL+1g cutina/L, GEL+3g cutina/L y GEL+5g cutina/L muestran en la Figura 20; en la que se observa un incremento en el contenido de proteína a lo largo del tiempo de fermentación mientras el cultivo se encontraba en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Los valores más altos se obtuvieron a mayores concentraciones de cutina en el medio. Se detectó un mayor contenido de proteína en el medio GEL + 5g de cutina/L a partir de las 48h, lo cual coincide con el tiempo al que se alcanzó X_{max} . El contenido de proteína máximo alcanzado fue de 26, 28, 17 y 14 µg/mL en los medios GEL+5g cutina/L, GEL + 3 g cutina/L, GEL + 1g cutina/L y GEL

respectivamente.

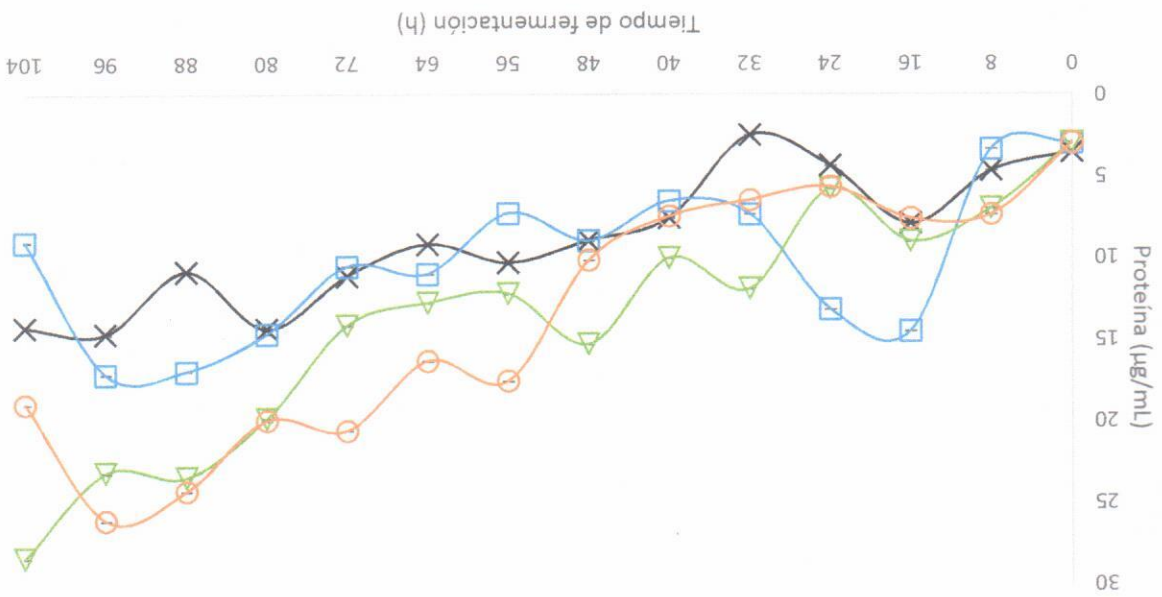


Fig: 20 Contenido de proteína de los sobrenadantes del crecimiento de *T. harzianum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+ 5g cutina/L (○).

7.1.6 Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos

En la Tabla 2. Se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de esterasas cutinolíticas producidas por *T. harzianum*. La μ y X_{max} presentaron valores significativamente mayores en los medios que contenían cutina, particularmente en el medio adicionado con 5g de cutina/L con el que se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento, producción de biomasa y E_{max} (433.01 U/L). En cuanto al rendimiento de la enzima producida con respecto a la producción de biomasa ($Y_{E/X}$), el medio testigo presentó un rendimiento mayor en comparación con los medios que contenían cutina en el medio. Finalmente, la actividad específica por miligramo de proteína (E_{sp}), la productividad de la enzima (PRO) y la tasa específica de formación de la enzima (qp) fueron mayores en el medio Gel+1 g cutina/L.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de *T. harzianum* crecido en diferentes concentraciones de cutina GMS en FS.

PARÁMETRO		MEDIO DE CULTIVO		
	GEL	GEL+1g cutina/L	GEL + 3g cutina/L	GEL + 5g cutina/L
μ (h ⁻¹)	0.06 ^b	0.11 ^a	0.10 ^a	0.10 ^a
X_{max} (g/L)	7.6 ^d	8.8 ^c	9.8 ^b	10.6 ^a
E_{max} (U/L)	420.23 ^c	428.9 ^b	420.11 ^c	433.01 ^a
E_{sp} (U/mg)	49.59 ^b	56.47 ^a	33.81 ^c	46.80 ^b
$Y_{E/X}$ (U/gX)	(0.08)	(0.04)	(0.03)	(0.03)
PRO (U/L·h ⁻¹)	4.78 ^c	6.70 ^a	5.83 ^b	6.01 ^b
qp (U h ⁻¹ gX ⁻¹)	3.32 ^c	5.36 ^a	4.28 ^b	4.08 ^b

Las medias con la misma letra en la misma fila no difieren significativamente. Los números en paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En el zimograma realizado para detectar la presencia de esterasas cutinolticas a partir de los sobrenadantes del crecimiento de *T. harzianum* desarrollado en el medio GEL, se presento una banda de actividad a partir de las 32h de cultivo, misma que fue en aumento con el tiempo de fermentación de forma coincidente con la actividad enzimática detectada por espectrofotometría. La banda detectada corresponde a un peso molecular (PM) de aproximadamente 25 kDa como se aprecia en la Fig. 21.

Por otro lado, en la Fig. 22, se aprecia el zimograma de la fermentación del medio GEL + 1g de cutina/L en el que se distingue la misma banda con un PM de 25 kDa a partir de las 24h de cultivo y se mantiene en aumento hasta el final del tiempo de fermentación. Además, es posible apreciar dos bandas más de actividad con un PM aproximado de 60 y 100 kDa respectivamente a partir de las 56h mientras el cultivo ya había alcanzado la X_{max} .

De igual modo, en los zimogramas de *T. harzianum* desarrollado en los medios GEL + 3g de cutina/L (Fig. 23) y Gel + 5 g de cutina/L (Fig. 24), podemos observar el mismo patrón de bandas de actividad que en el medio con 1 g de cutina/L pero de mayor intensidad a mayor concentración de cutina en el medio durante el tiempo de fermentación.

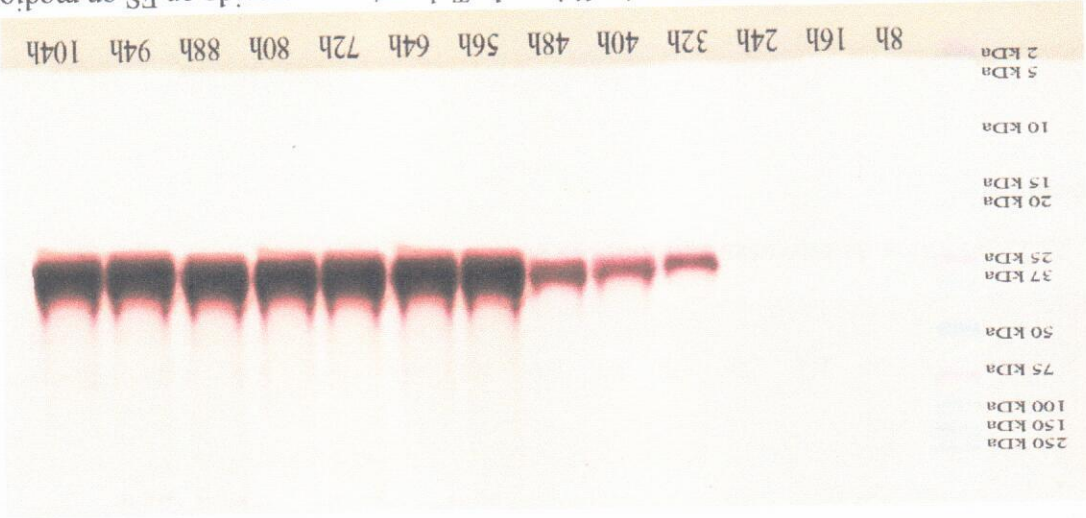


Fig. 21 Zimograma de esterasas cutinolticas de *T. harzianum* crecido en FS en medio GEL.

g de cutina/L.

Fig. 23 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *T. harzianum* crecido en FS en medio GEL + 3

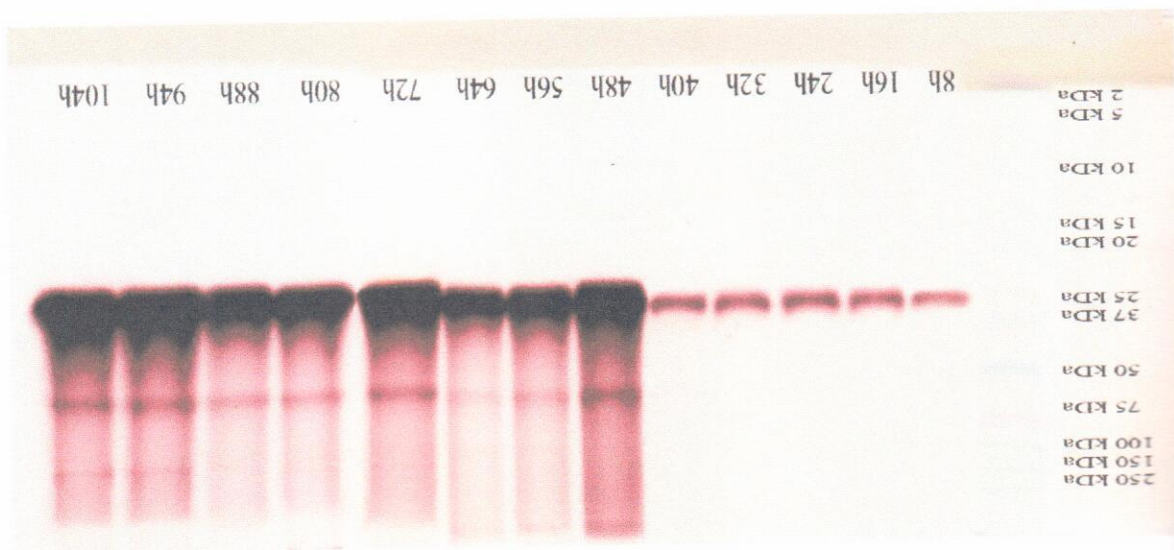


Fig de cutina/L.

Fig. 22 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *T. harzianum* crecido en FS en medio GEL +

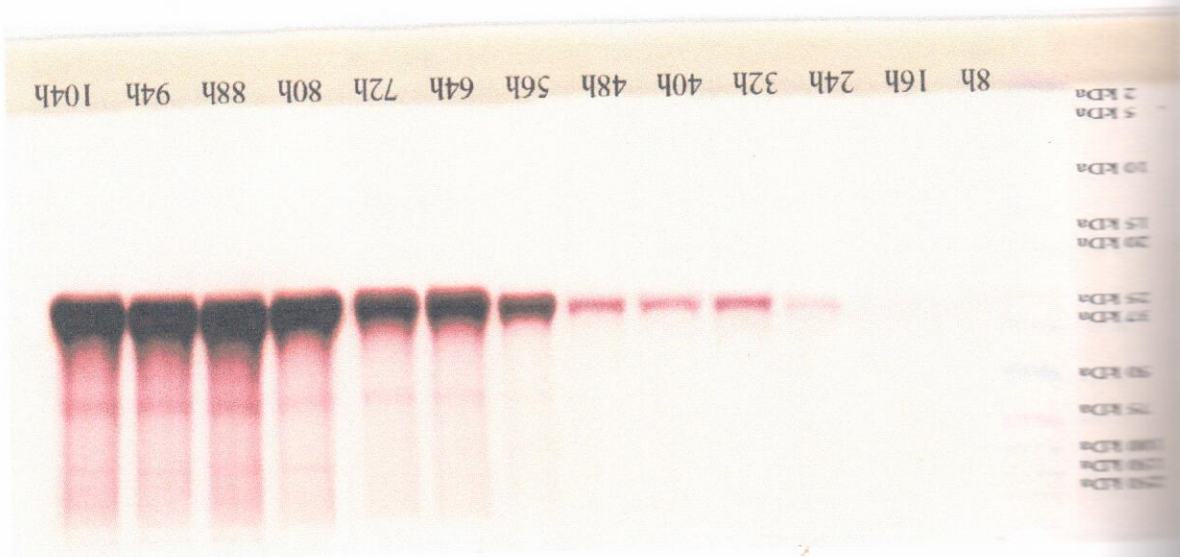
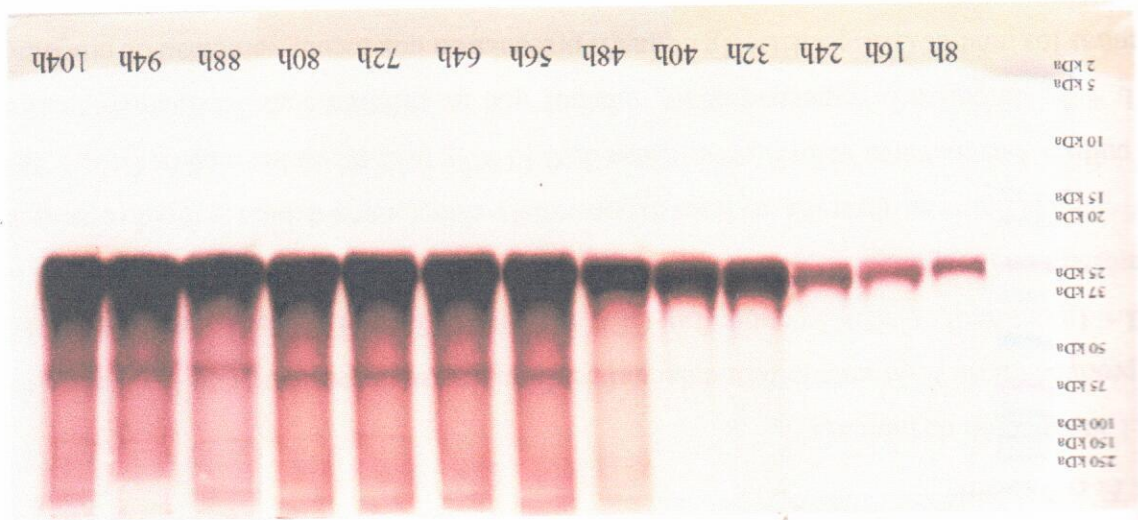


Fig. 24 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *T. harzianum* crecido en FS en medio GEL + 5 g de cutina/L.



La producción de X durante la fermentación de *F. culmorum* desarrollado en los medios GEL, GEL+1g cutina/L, GEL+3g cutina/L y GEL+5g cutina/L a pH inicial de crecimiento de 8.5 muestra en la Fig. 25.

En la figura se observan las fases exponencial y estacionaria debido al rápido crecimiento del cultivo. Los mayores valores de μ fueron de 0.13 h^{-1} y 0.12 h^{-1} en los medios GEL+3g/L y GEL+5g de cutina/L respectivamente, mismos que no difieren significativamente entre sí, mientras los medios GEL y GEL+1g cutina/L presentaron una menor velocidad de crecimiento la producción de biomasa fue significativamente mayor al incrementar la concentración de cutina en el medio ($p=0.03$). La X_{max} obtenida fue de 10.92 g/L a las 48h, 9.32 g/L a las 48h, 8.8 g/L a las 56h y 7.6 g/L a las 72h en los medios GEL+5g cutina/L, GEL+3g cutina/L, GEL+1g cutina/L y GEL respectivamente.

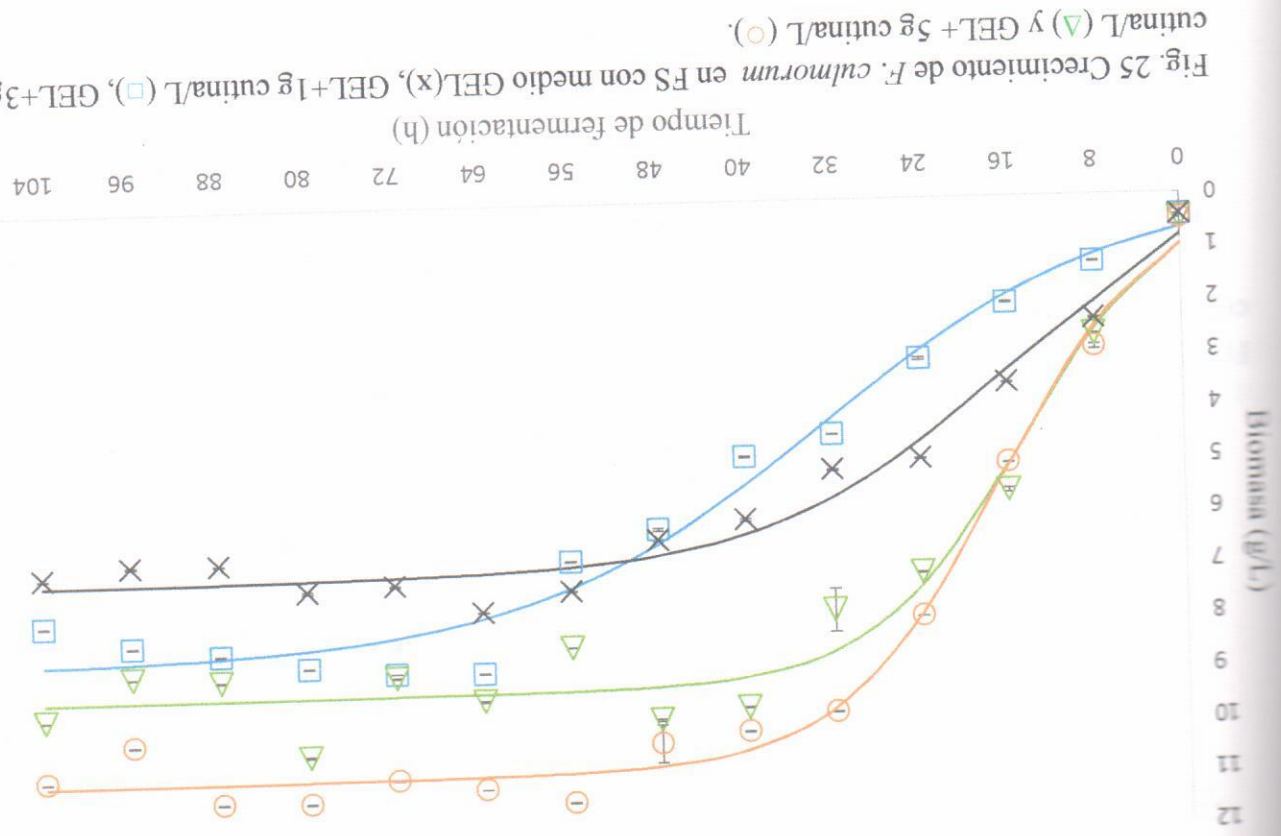


Fig. 25 Crecimiento de *F. culmorum* en FS con medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (square), GEL+3g cutina/L (triangle) y GEL+5g cutina/L (circle).

La Fig. 26 muestra el pH a través del tiempo de la FS de *F. culmorum* en los medios GEL, GEL+ 3g cutina/L, GEL+ 5g/L a pH inicial de crecimiento de 8.5. Durante la fermentación hubo fluctuaciones en los niveles de pH en los cuatro medios de cultivo de forma consistente. Al inicio de la fermentación se ven disminuidos considerablemente los valores de pH mientras se desarrollaba en fase exponencial hasta las 48h cuando se alcanza la fase estacionaria y el pH comienza a incrementarse hasta llegar a valores de pH entre 7.5 y 8.2.

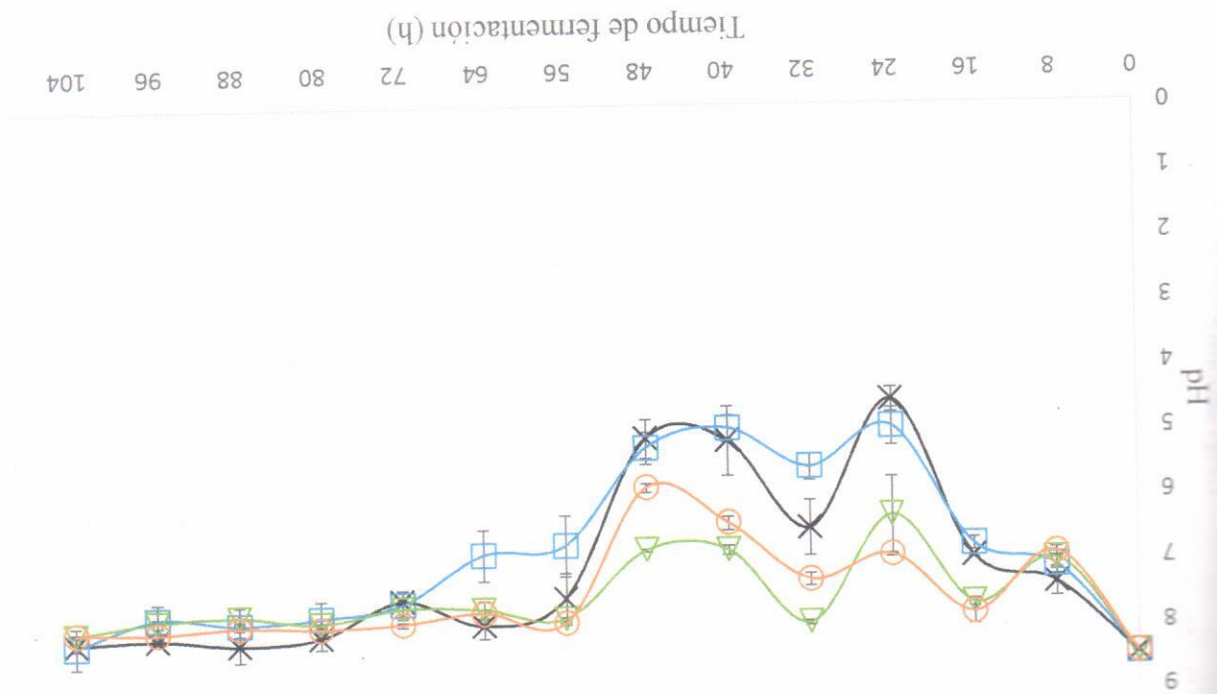


Fig. 26 pH del crecimiento de *F. culmorum* en FS en medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+ 5g cutina/L (○).

7.2.3 Consumo de glucosa

El consumo de glucosa lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en los medios GEL, GEL+1g cutina/L, GEL+3g cutina/L y GEL+5g/L se presenta en la Fig. 27. En ella se observa una rápida disminución de los azúcares en el medio de cultivo, ligeramente mayor en los medios con 3 y 5 g de cutina/L. La glucosa se agotó a las 72h (día 3 de fermentación) en los cuatro medios de cultivo, mismos que no presentaron diferencias significativas en el análisis ($p=0.07$).

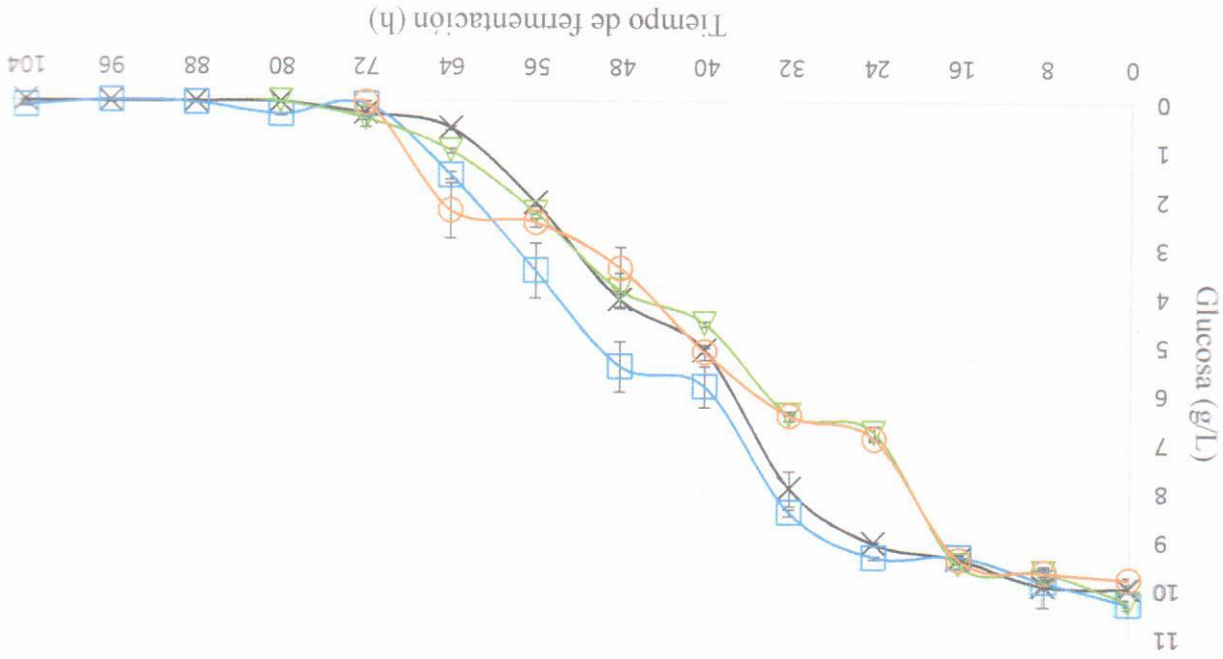


Fig. 27 Consumo de glucosa de *F. culmorum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (○) y GEL+5g cutina/L (△).

La actividad de esterasas detectadas del BEE de los sobrenadantes del crecimiento de *F. culmorum* en FS en los medios GEL, GEL+ 1g cutina/L, GEL+ 3g cutina/L y GEL+ 5g/L se muestra a continuación en la Fig. 28. En la figura se observa la producción de esterasas cutinolíticas durante todos los puntos de muestreo en los cuatro medios de cultivo. El medio GEL+5g de cutina/L presentó la mayor producción de esterasas cutinolíticas, seguido del medio GEL+3g cutina/L, especialmente entre las 8 y 48h, mientras el cultivo se encontraba en fase exponencial y la glucosa en el medio de cultivo tenía una concentración de 4g/L aproximadamente. La mayor actividad esterasa fue de 427 U/L obtenida a las 104h de cultivo, misma que no difirió significativamente con respecto al medio GEL y GEL+1g de cutina/L

(Tabla 3).

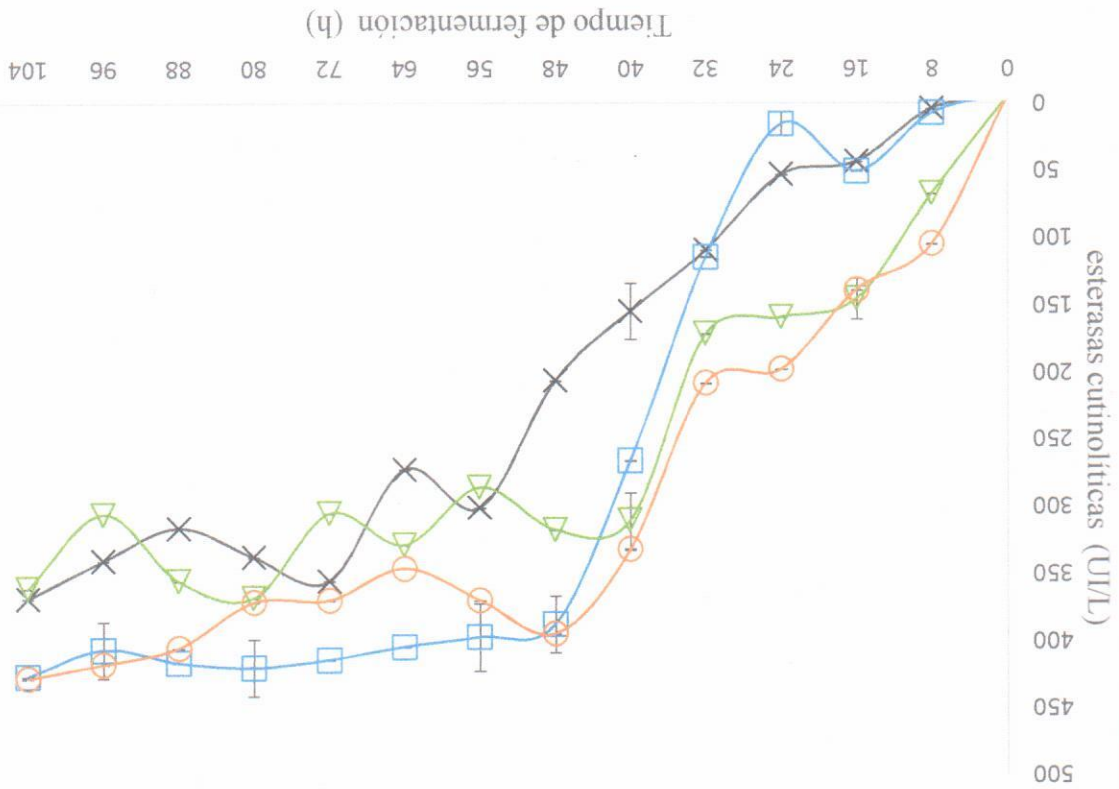


Fig. 28 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de *F. culmorum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+ 5g cutina/L (○).

Tabla 3. Actividad enzimática de esterasas (U/L) de *F. culmorum* en FS

TIEMPO DE FERMENTACIÓN	MEDIO DE CULTIVO		
	GEL	GEL+1g cutina/L	GEL+3g cutina/L
8	4.17 ^c	7.57 ^c	67.86 ^b
16	44.03 ^b	51.13 ^b	145.93 ^a
24	53.78 ^c	15.75 ^d	159.62 ^b
32	110.04 ^c	115.06 ^c	172.14 ^b
40	155.20 ^c	266.76 ^b	311.39 ^a
48	206.83 ^c	387.79 ^b	318.30 ^c
56	301.77 ^c	397.60 ^a	286.62 ^d
64	273.26 ^d	404.82 ^a	329.46 ^c
72	355.94 ^b	414.36 ^a	306.05 ^c
80	338.34 ^c	420.11 ^a	358.40 ^b
88	316.66 ^c	416.24 ^a	355.85 ^b
96	340.65 ^b	406.45 ^a	306.29 ^c
104	368.57 ^b	426.24 ^a	361.29 ^b

Las medias con la misma letra en la misma fila no difieren significativamente. Los números en paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.2.5 Contenido de proteína

La concentración de proteína producida durante la FS de *F. culmorum* a diferentes concentraciones de cutina se muestra en la Figura 29, en la que se observa una concentración de proteína en constante aumento desde las primeras horas de fermentación, mientras el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento. Se registró un pico máximo de proteína a las 72h en los medios con 3 y con 5 g de cutina/L cuyos valores corresponden a 18.06 y 16.62 µg/mL respectivamente. El contenido de proteína en el medio GEL fue menor con respecto a los medios que con cutina (14.41 µg/mL).

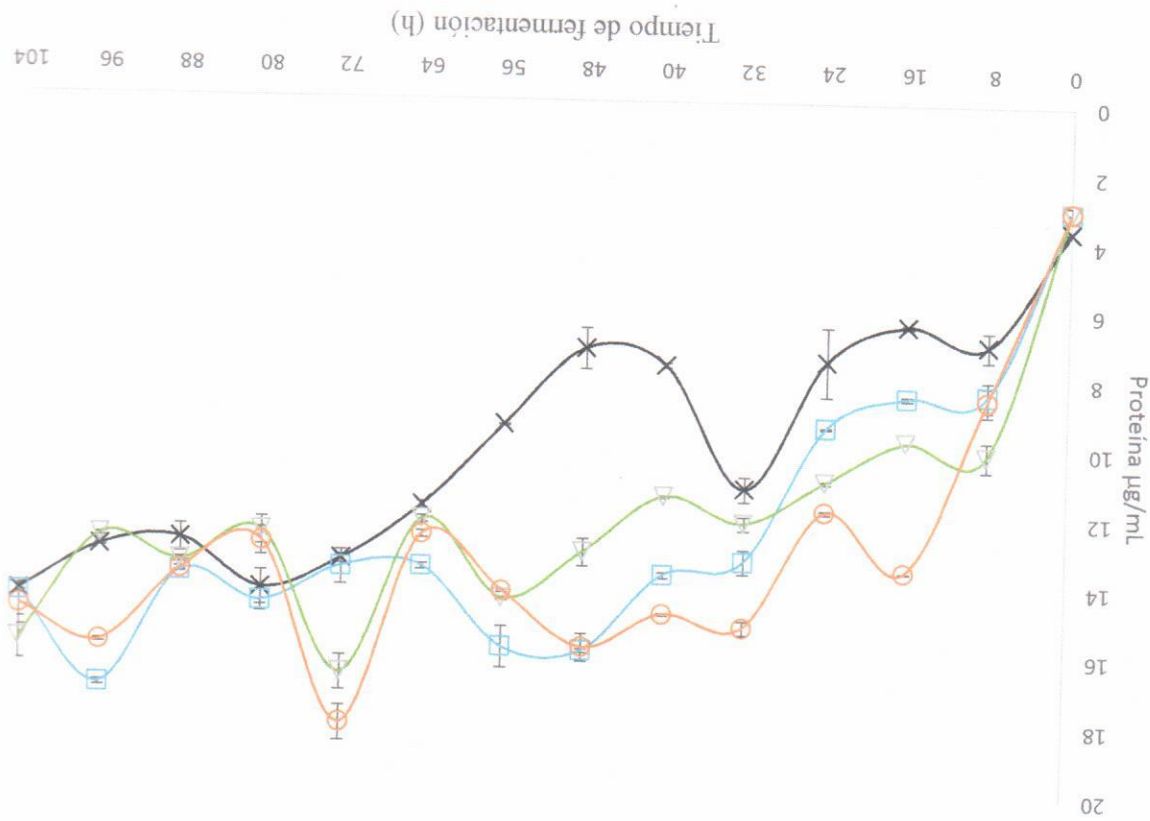


Fig. 29 Contenido de proteína de los sobrenadantes del crecimiento de *F. culmorum* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+5g cutina/L (○).

12.6 Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos

En la Tabla 4 se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de esterasas cutinofíticas producidas por *F. culmorum*. La μ y X_{max} presentaron valores significativamente mayores en los medios que contenían cutina en el medio, en especial en el medio que contenía 5g de cutina/L con el que se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento, producción de biomasa y E_{max} (427.42 U/L). Por otro lado, la actividad específica por miligramo de proteína (E_{esp}) fue mayor en el medio GEL, así como el rendimiento de la enzima producida con respecto a la producción de biomasa ($Y_{E/X}$). Finalmente, la productividad de la enzima (PRO) y la tasa específica de formación de la enzima (QP) fueron ligeramente mayores en el medio Gel+5 g cutina/L.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de *F. culmorum* crecido en diferentes concentraciones de cutina GMS en FS.

PARÁMETRO		MEDIO DE CULTIVO		
	GEL	GEL+1g cutina/L	GEL + 3g cutina/L	GEL + 5g cutina/L
μ (h ⁻¹)	0.09 ^b (0.01)	0.09 ^b (0.01)	0.12 ^a (0.03)	0.13 ^a (0.01)
X_{max} (g/L)	7.1 ^d (0.01)	8.6 ^c (0.03)	9.32 ^b (0.01)	10.92 ^a (0.01)
E_{max} (U/L)	368.6 ^b (0.02)	426.24 ^a (0.28)	361.29 ^b (0.02)	427.42 ^a (0.04)
E_{esp} (U/mg)	35.25 ^a (0.03)	30.55 ^b (0.05)	28.59 ^b (0.05)	29.55 ^b (0.07)
$Y_{E/X}$ (U/gX)	51.9 ^a (0.02)	49.56 ^b (0.03)	38.76 ^c (0.01)	39.14 ^c (0.02)
PRO (U.L ⁻¹ .h ⁻¹)	3.54 ^b (0.01)	4.09 ^a (0.03)	3.47 ^b (0.04)	4.11 ^a (0.01)
qp (U h ⁻¹ gX ⁻¹)	4.67 ^b (0.02)	4.46 ^c (0.04)	4.65 ^b (0.05)	5.09 ^a (0.03)

Las medias con la misma letra en la misma fila no difieren significativamente. Los números en paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.2.7 Zimografía de esterasas cutinolticas

En el zimograma realizado para detectar la presencia de esterasas cutinolticas a partir de los sobrenadantes del crecimiento de *F. culmorum* desarrollado en el medio GEL, se observa una banda de actividad a partir de las 32h de cultivo, misma que aumento en intensidad a medida que aumento el tiempo de fermentación. La banda detectada corresponde a un peso molecular (PM) de aproximadamente 25 kDa como se aprecia en la Fig. 30.

En la Fig. 31, se aprecia el zimograma de la fermentación del medio GEL + 1g de cutina/L en el que se presenta la misma banda con un PM de 25 kDa a las 16h y a partir de las 32h de cultivo se mantiene en aumento hasta el final del tiempo de fermentación, lo cual coincide con la actividad detectada espectrofotométricamente. Además, también aparece otra banda a partir de las 72h cuando el cultivo se encuentra ya en fase estacionaria y cuyo PM se aproxima a los 40 kDa.

De igual modo, en los zimogramas que corresponden a la fermentación en medio GEL + 3g de cutina/L (Fig. 32) y Gel + 5 g de cutina/L (Fig. 33), podemos observar la bandas de 25 kDa a lo largo del tiempo de fermentación al igual que en el medio con 1 g de cutina/L pero de mayor intensidad y a partir de las 72h y 56h de cultivo respectivamente, aparecen dos bandas más de diferente peso molecular (40 kDa y de 100-150 kDa).

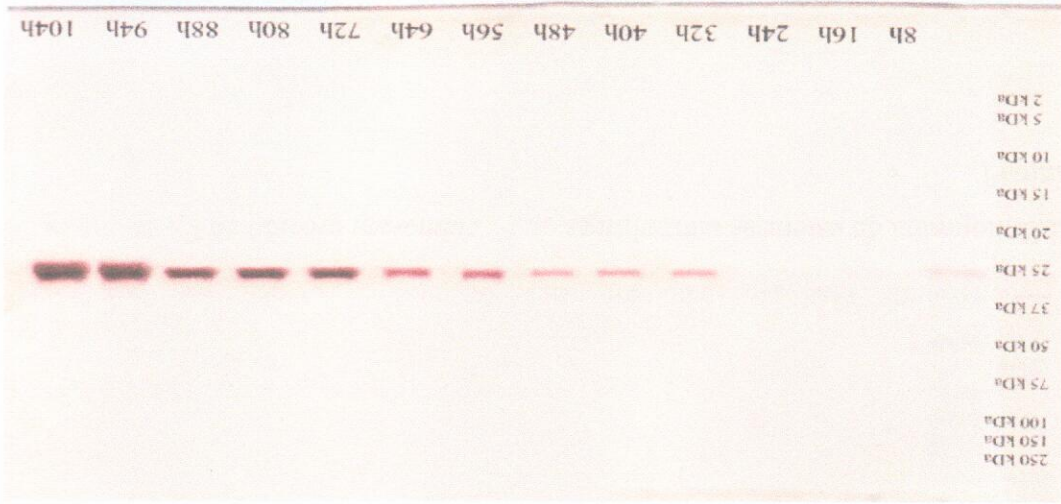


Fig. 30 Zimograma de esterasas cutinolticas de *F. culmorum* crecido en FS en medio GEL.

Fig. 32 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *F. culmorum* crecido en FS en medio GEL+ 3 g de cutina/L.

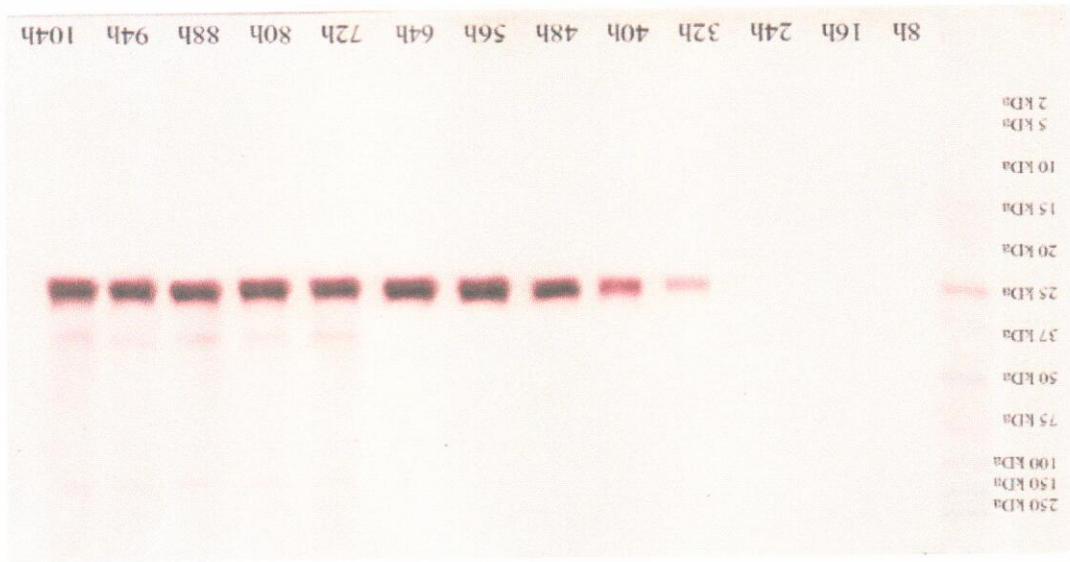


Fig. 31 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *F. culmorum* crecido en FS en medio GEL + Ig cutina/L.

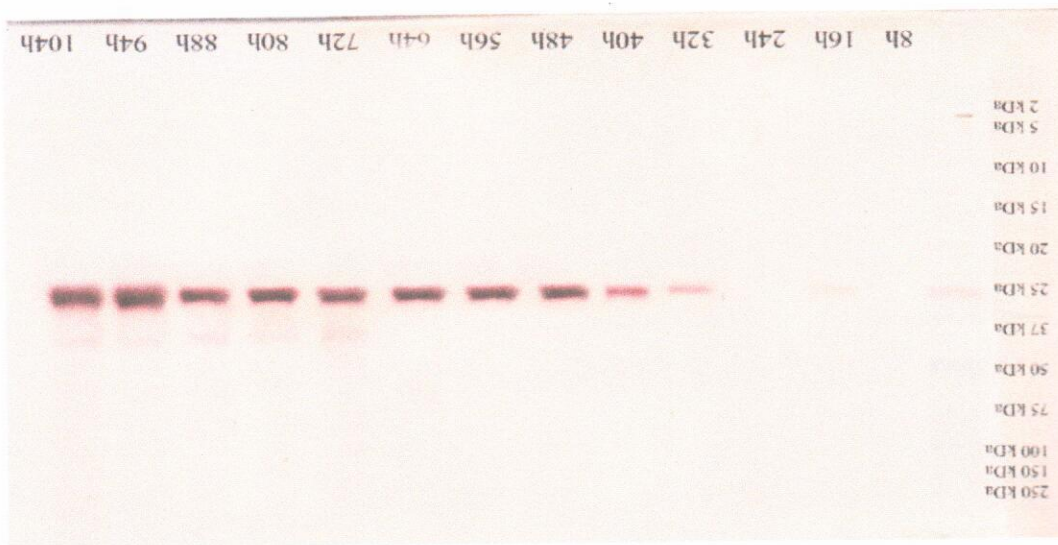
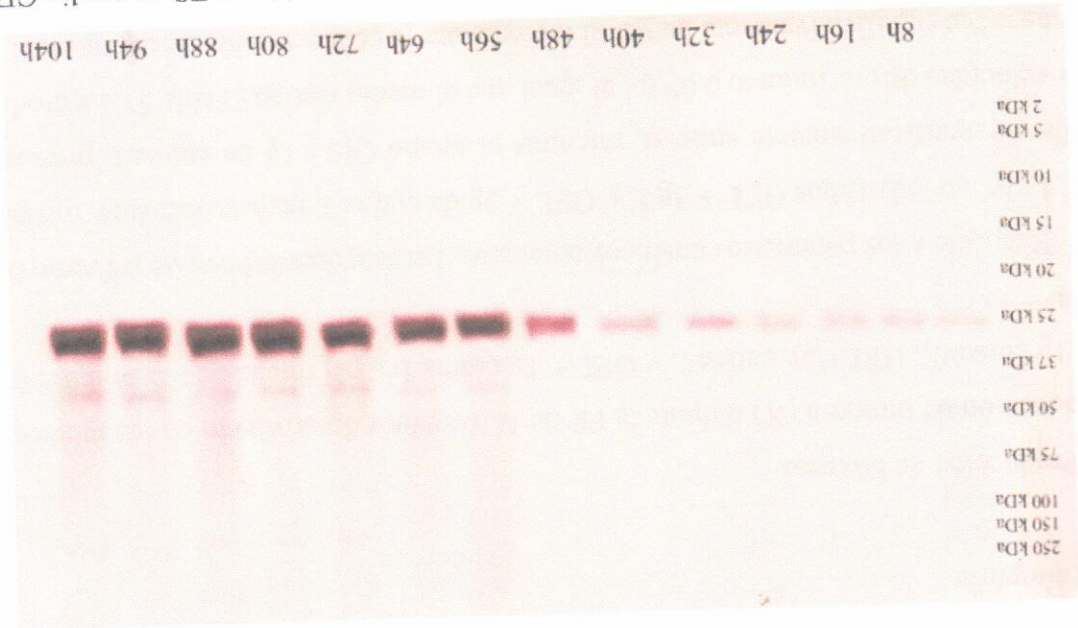


Fig. 33 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *F. culmorum* crecido en FS en medio GEL + 5 g de cutina/L.



7.3.2 Medición de pH

La Fig. 35 muestra el pH a través del tiempo de la FS de *N. sitophila* en los medios GEL, GEL+ 1g cutina/L, GEL+ 3g cutina/L y GEL + 5g/L a pH inicial de crecimiento de 6.5. Durante las primeras horas de fermentación hubo una disminución en los niveles de pH en los medios que contenían cutina, mientras el cultivo se encontraba en fase exponencial a las 24h, resultando con una disminución mayor en el medio GEL+5g cutina/L. Posteriormente, los niveles se incrementaron conforme se alcanzó la fase estacionaria hasta llegar a valores de pH entre 7 y 8 al final de la fermentación.

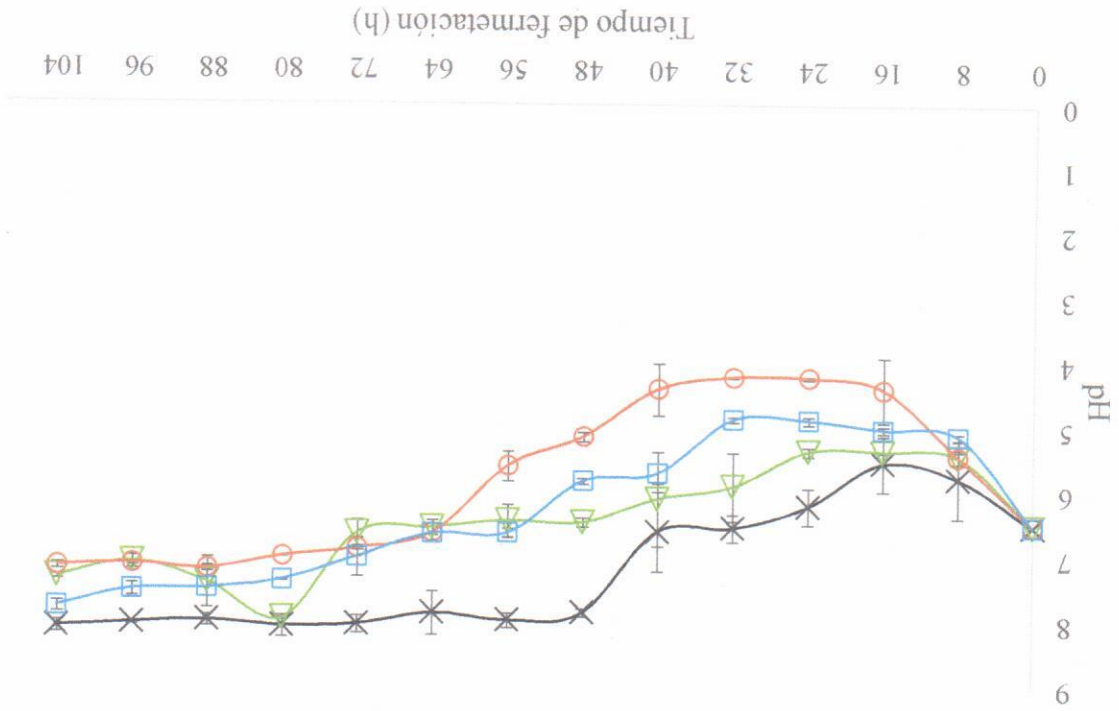


Fig. 35 pH del crecimiento de *N. sitophila* en FS en medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+ 5g cutina/L (○).

Consumo de glucosa lo largo de la fermentación de *N. sitophila* en los medios GEL, GEL+1g de cutina/L, GEL+3g cutina/L y GEL+5g/L se presenta en la Fig. 36.

El consumo de azúcares se llevó a cabo rápidamente en el medio de cultivo, encontrando una menor concentración de glucosa en el medio GEL con respecto a los medios con 1, 3 y 5 g de cutina/L. La glucosa fue consumida en su totalidad alrededor de las 64h (día 3 de fermentación) en los tres medios de cultivo.

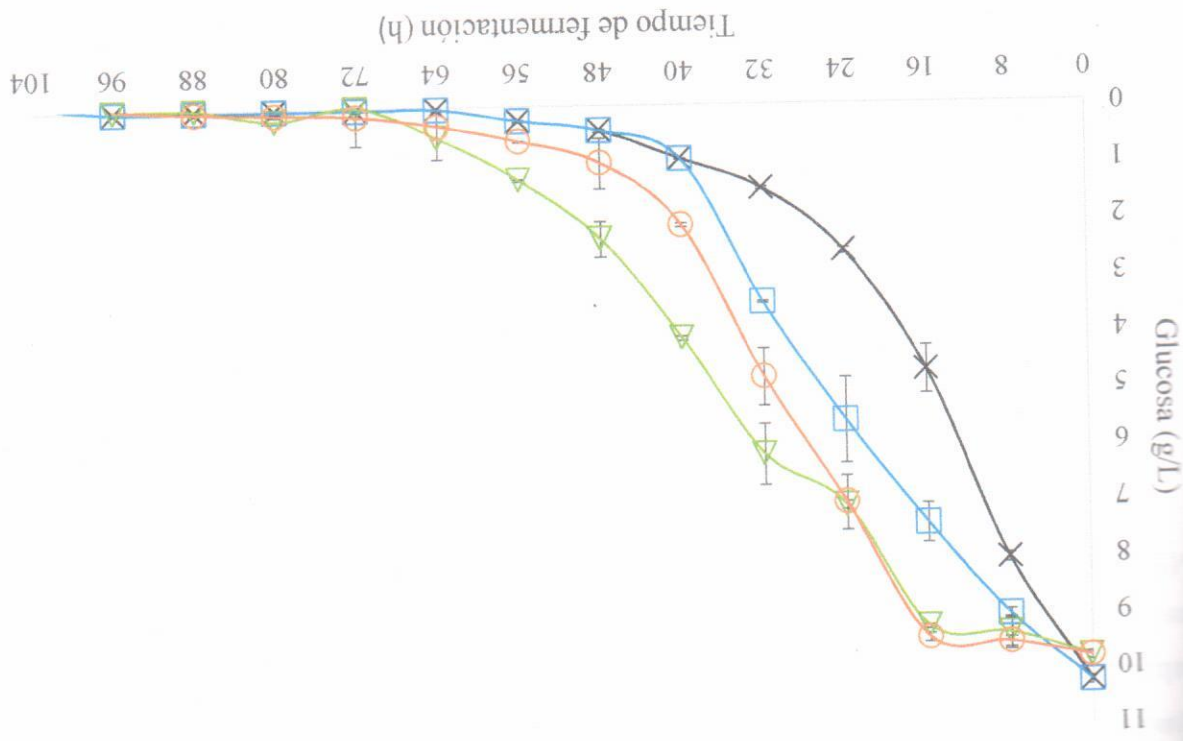


Fig. 36 Consumo de glucosa de *N. sitophila* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+5g cutina/L (○).

3.4 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas

La actividad de esterasas detectadas del EBE de los sobrenadantes del crecimiento de *N. sitophila* en FS en los medios GEL, GEL+ 1g cutina/L, GEL+ 3g cutina/L y GEL + 5g/L se muestran a continuación en la Fig. 37.

La producción de esterasas cutinolíticas se presentó durante todos los puntos de muestreo a lo largo de las horas de fermentación en los cuatro medios de cultivo. El medio de GEL+5g de cutina/L presentó la mayor producción de esterasas cutinolíticas (351 UI/L), seguido del medio GEL+3g cutina/L (339.24 UI/L), GEL +1g de cutina/L (301.2 UI/L) y finalmente el medio GEL (179.39 UI/L). A partir de las 24h de fermentación aumentó considerablemente la producción de esterasas cutinolíticas en los medios que contenían cutina GMS en el medio (Tabla 5).

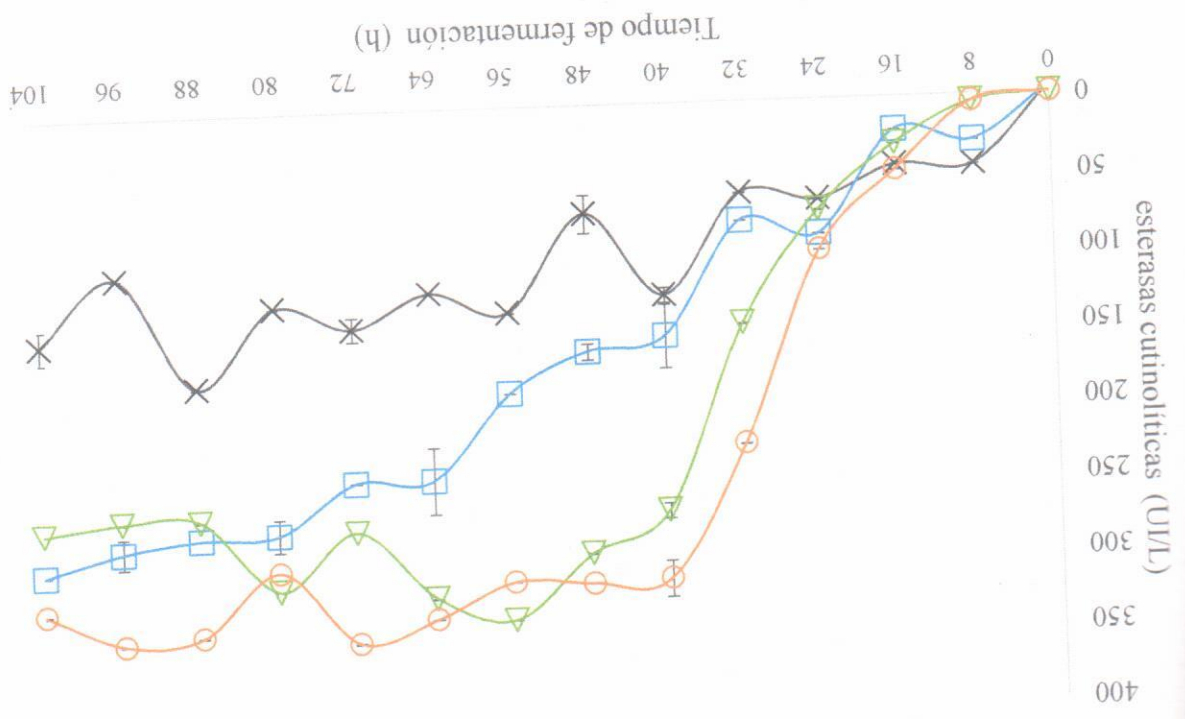


Fig. 37 Actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de *N. sitophila* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (△) y GEL+ 5g cutina/L (○).

Tabla 5. Actividad enzimática de esterasas (UI/L) de *N. sitophila* en FS.

TIEMPO DE FERMENTACIÓN	MEDIO DE CULTIVO		
	GEL	GEL+1g cútna/L	GEL+3g/L cútna
8	45.96 ^a	30.13 ^b	35.18 ^a
16	45.45 ^c	22.29 ^c	73.43 ^b
24	66.29 ^d	89.62 ^c	147.26 ^b
32	60.76 ^c	79.32 ^c	269.20 ^b
40	127.04 ^d	154.41 ^c	296.66 ^b
48	71.59 ^c	163.21 ^b	339.24 ^a
56	136.03 ^c	189.32 ^b	323.50 ^a
64	121.69 ^d	245.22 ^c	278.10 ^b
72	143.92 ^c	246.43 ^b	315.74 ^a
80	128.60 ^c	278.54 ^b	267.78 ^b
88	179.93 ^c	279.98 ^b	267.33 ^b
96	106.19 ^c	287.22 ^b	273.62 ^b
104	120.27 ^c	301.2 ^a	319.32 ^a

Las medias con la misma letra en la misma fila no difieren significativamente. Los números en paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.3.5 Contenido de proteína

La concentración de proteína producida durante la FS de *N. sitophila* a diferentes concentraciones de cutina se muestra en la Figura 38, en la que se observa un aumento en la concentración de proteína desde las primeras horas de fermentación, mientras el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento y continuó en aumento hasta las 104 h en todos los medios. Se registró la mayor cantidad de proteína 14.88 y 13.48 µg/mL a las 96 h en los medios con 5 y 3 g de cutina/L respectivamente. El contenido de proteína en el medio GEL+1 g de cutina/L y el medio testigo fue menor con respecto a los medios que con 3 y 5g de cutina/L especialmente al final de la fermentación (13.01 y 11.01 µg/mL respectivamente).

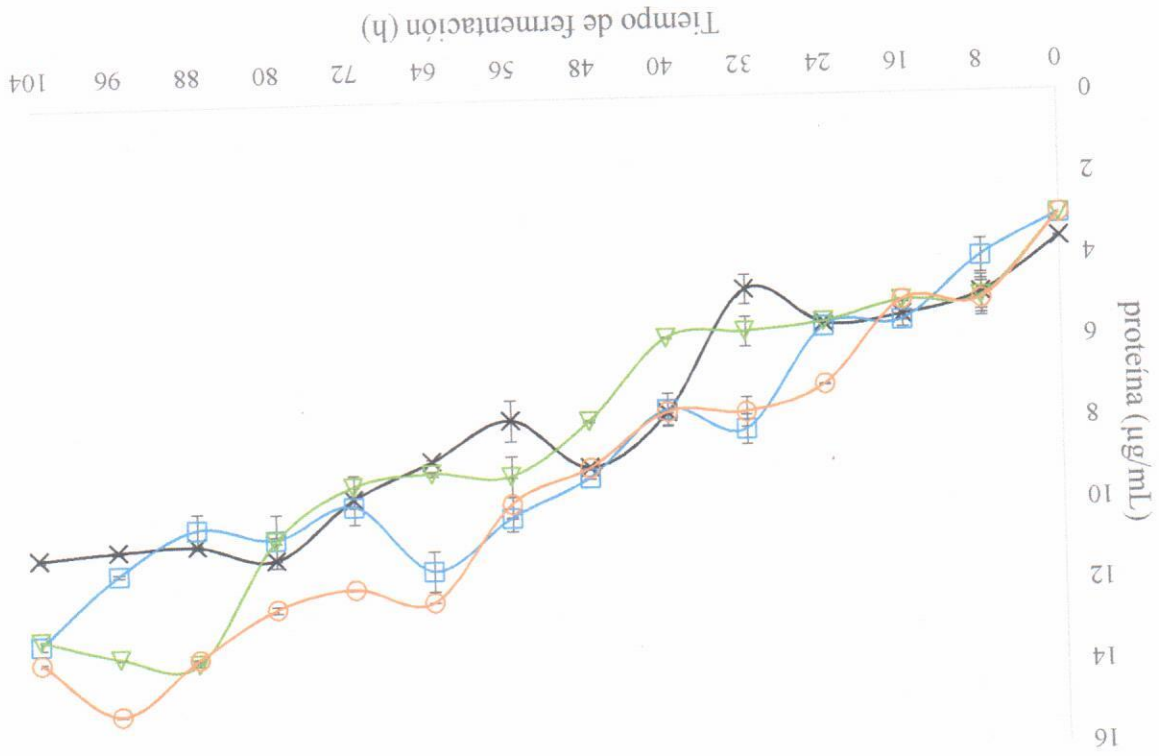


Fig. 38 Contenido de proteína de los sobrenadantes del crecimiento de *N. sitophila* en FS en el medio GEL(x), GEL+1g cutina/L (□), GEL+3g cutina/L (▽) y GEL+5g cutina/L (○).

7.3.6 Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos

En la Tabla 6 se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de esterazas cutinólíticas producidas por *N. stophila*. La μ y X_{max} presentaron valores significativamente mayores a mayor concentración de cutina en el medio. La mayor velocidad de crecimiento, producción de biomasa y E_{max} (351.72 U/L) se obtuvo en el medio GEL+5g de cutina/L. Por otro lado, la actividad específica de proteína (E_{esp}) fue mayor en el medio GEL+3g de cutina/L, seguido del medio con 5g de cutina, al igual que el rendimiento de la enzima producida con respecto a la biomasa producida ($Y^{E/X}$), la productividad de la enzima (P_{RO}) y la tasa específica de formación de la enzima (q_p) fueron mayores en los medios que contenían cutina, particularmente en el medio GEL+ 3 g cutina/L.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de crecimiento y rendimientos enzimáticos de *N. stophila* crecido en diferentes concentraciones de cutina GMS en FS.

PARAMETRO	MEDIO DE CULTIVO		
	GEL	GEL + 1g	GEL + 3g
	cutina/L	cutina/L	cutina/L
μ (h^{-1})	0.09 ^b	0.09 ^b	0.12 ^a
X_{max} (g/L)	6.75 ^c	7.73 ^b	7.66 ^b
E_{max} (U/L)	179.93 ^d	301.2 ^c	339.2 ^b
E_{esp} (U/mg)	19.25 ^d	33.57 ^c	55.05 ^a
$Y^{E/X}$ (U/gX)	26.65 ^d	38.76 ^c	44.28 ^a
P_{RO} (U/L h^{-1})	2.04 ^d	2.89 ^c	7.06 ^a
q_p (U h^{-1} gX ⁻¹)	2.4 ^d	3.49 ^c	5.31 ^a
	(0.01)	(0.03)	(0.02)
	(0.01)	(0.04)	(0.01)
	(0.01)	(0.02)	(0.02)
	(0.09)	(0.03)	(0.02)
	(0.21)	(2.23)	(0.04)
	(0.03)	(0.02)	(0.03)
	(0.01)	(0.02)	(0.01)
	(0.01)	(0.02)	(0.01)
	(0.01)	(0.02)	(0.01)
	(0.01)	(0.02)	(0.01)
	(0.01)	(0.02)	(0.01)
	(0.01)	(0.02)	(0.01)

Las medias con la misma letra en la misma fila no difieren significativamente. Los números en paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.3.7 Zimografía de esterazas cutinólicas

Finalmente, en los zimogramas realizados para detectar la presencia de esterazas cutinólicas a partir de los sobrenadantes del crecimiento de *N. sitophila* desarrollado en el medio GEL, se presentó una banda de actividad a partir de las 48h de cultivo, misma que fue en aumento con el tiempo de fermentación. La banda detectada corresponde a un PM de aproximadamente 150 kDa como se aprecia en la Fig. 39.

Por otro lado, en las Fig. 40 y 41, de las fermentaciones con medio GEL + 1 y 3 g de cutina/L respectivamente, es posible apreciar la misma banda de 150 kDa a partir de las 32 y 40h de fermentación, mientras que el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento y aumenta su intensidad hasta el final del tiempo de fermentación.

De igual manera, en el medio con 5g de cutina/L se logra apreciar en la Fig. 42 la misma banda de actividad con un PM de 150 kDa con mayor intensidad desde las 24h de cultivo y se mantiene en aumento hasta el final del tiempo de fermentación.

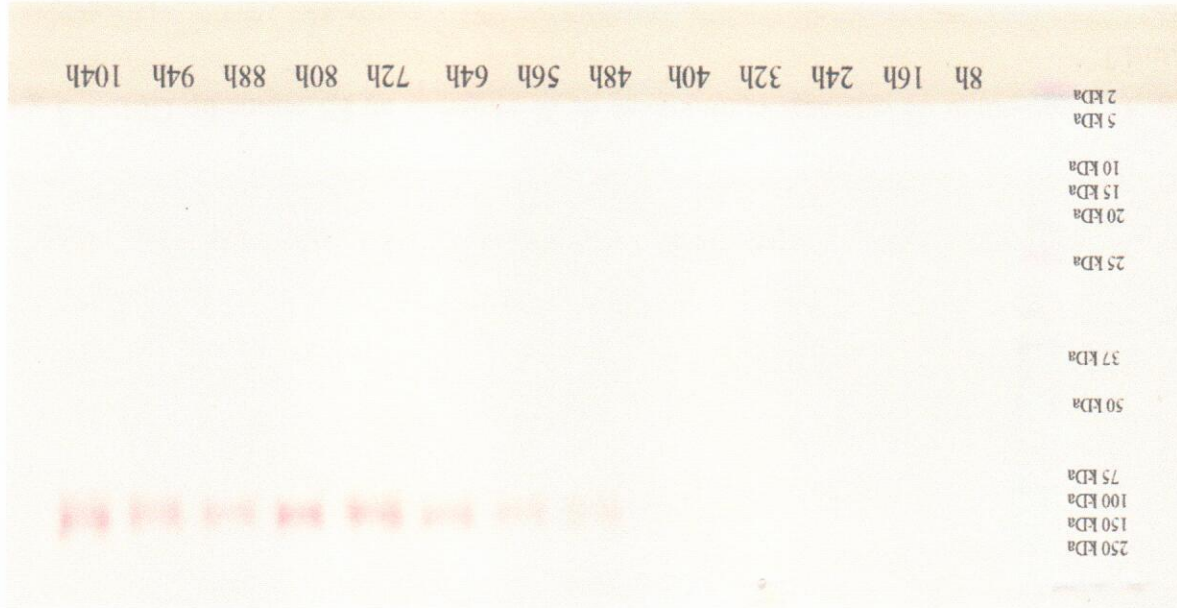
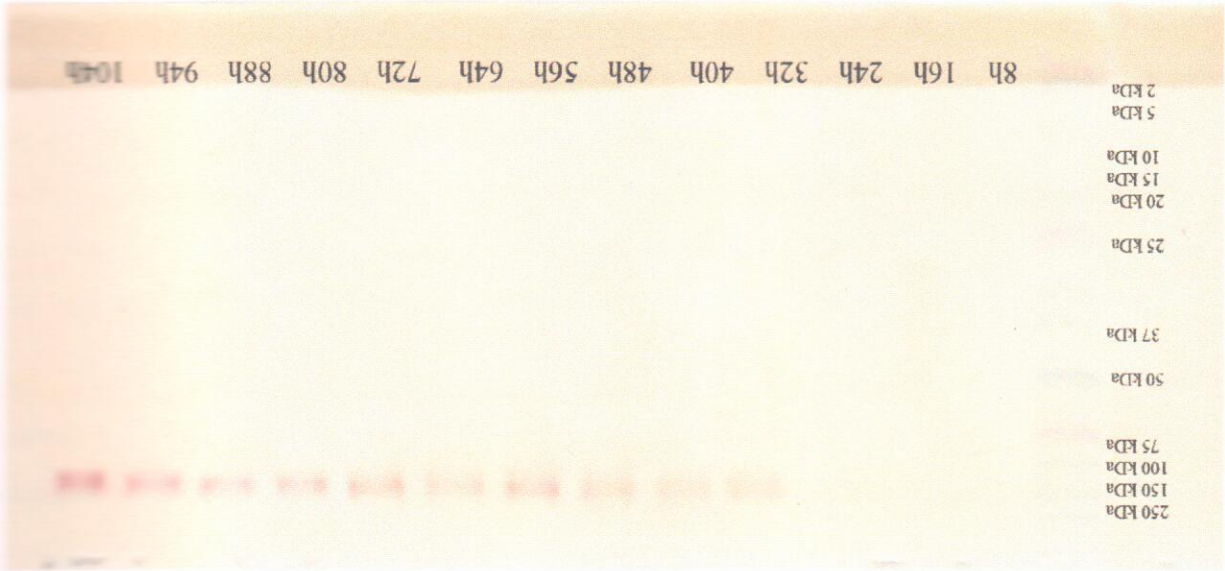


Fig. 39 Zimograma de esterazas cutinólicas de *N. sitophila* en FS en medio GEL.

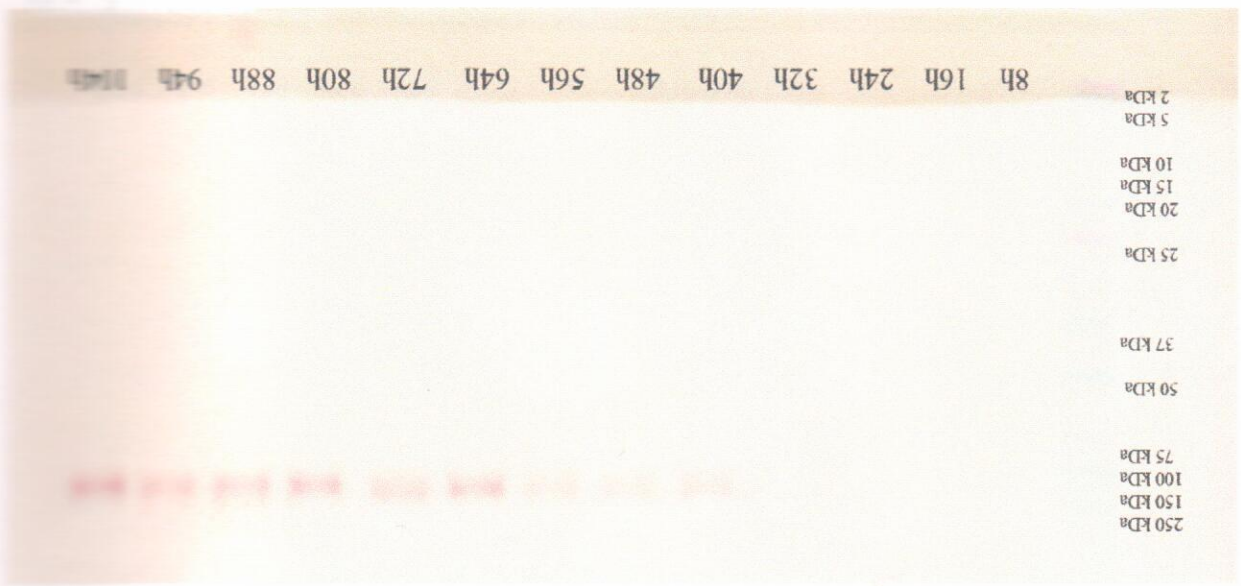
cutina/L.

Fig. 41 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *N. stophila* en FS en medio GEL + 3 g de



cutina/L.

Fig. 40 Zimograma de esterasas cutinolíticas de *N. stophila* en FS en medio GEL + 1 g de



La fermentación en medio sólido es un sistema de cultivo que ha sido empleado para la obtención de enzimas en diversos estudios en los que se ha reportado mayor rendimiento en la producción de biomasa y en la obtención de enzimas fúngicas respecto a otros sistemas, debido a que posee características que simulan las condiciones de crecimiento naturales para el desarrollo de hongos filamentosos (Viniestra-González y cols. 2003, Holker y cols. 2004, Rodríguez y cols. 2006, Macedo y Fraga 2007, Velázquez y cols. 2014).

Por otro lado, la caracterización y producción de cutinasas fúngicas se han convertido en objeto de estudio en la búsqueda por optimizar su uso en variados procesos biotecnológicos (Castro-Ochoa y cols. 2010). Debido a la diversidad de sustratos que hidrolizan y las reacciones que catalizan, se ha discutido el uso de cutina como sustrato de crecimiento para demostrar su identidad (Chen y cols. 2013)

En la presente investigación, se propuso evaluar el crecimiento de hongos filamentosos y su actividad enzimática de esterases cutinolíticas en un sistema de FS con diferentes concentraciones de cutina GMS.

Los resultados obtenidos de este trabajo respecto a los parámetros cinéticos de crecimiento (μ y X_{max}), sugieren que los hongos *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* emplean la cutina GMS como fuente de carbono secundaria a la glucosa al obtener una mayor producción de biomasa a mayor concentración de cutina en el medio de cultivo, dado que la incorporación de 5g de cutina/L GMS en el medio resultó en un aumento significativo en los valores de μ y X_{max} con respecto al medio testigo. Lo anterior es congruente con lo reportado por Pío y Macedo (2007) al encontrar que el hongo *F. oxysporum* es capaz de crecer en un medio con cutina y emplearla como fuente de carbono para su crecimiento. En este sentido, se ha reportado en otros trabajos una mayor producción de biomasa en medios suplementados con otras fuentes de carbono. Por su parte, Aguilar-Alvarado y cols. (2015) en la evaluación del crecimiento de hongos filamentosos, entre ellos *F. culmorum*, *T. harzianum* y *N. sitophila*, en medios que contenían di (2-etil hexil) ftalato (DEHP) como fuente de carbono, reportaron un

Respecto al contenido de proteína de los sobrenadantes del crecimiento de *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila*, el resultado de emplear distintas concentraciones de cutina fue un incremento en el contenido de proteína a mayor concentración de cutina de manera congruente con la producción de biomasa. Lo anterior sugiere que durante la fase de crecimiento exponencial el hongo produce proteínas solubles para metabolizar a la glucosa y posteriormente, podría estar produciendo esterazas cutinólíticas para degradar y poder metabolizar a la cutina

Por otro lado, en los cultivos de *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* con diferentes concentraciones de cutina GMS, se observó una disminución en el pH durante la fase exponencial del cultivo. Lo anterior, probablemente debido a la acumulación de ácidos orgánicos liberados de la degradación de las fuentes de carbono, ya que previamente se ha reportado que los hongos como *T. harzianum* invaden rápidamente el sustrato al tiempo que producen enzimas extracelulares y metabolitos que provocan el descenso en el pH del medio para adaptarse a las condiciones y promover su desarrollo (Romero y cols. 2009). Así mismo, Ahuactzin-Pérez y cols. (2016) reportaron un comportamiento similar al ver reducido el pH del medio de cultivo durante las primeras 36 h de fermentación, tal disminución correspondió a los tiempos de la fase exponencial y posteriormente aumento hasta valores de 7.8 y 8.5 al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Lo anterior sugiere que el incremento en el pH en la fase exponencial puede estar originado por la degradación de fuentes secundarias de crecimiento, por la actividad proteolítica de las proteasas al final de la fermentación y la liberación de productos aminados al medio de cultivo (Córdoba-Sosa y cols. 2014b).

incremento en la producción de biomasa, el cual se vio reflejado en el aumento en los valores de X_{max} en los medios que contenían mayor concentración de DEHP. De igual modo Ahuactzin-Pérez y cols. (2016) demostraron que el hongo *F. culmorum* usa a la glucosa y otros compuestos como el DEHP simultáneamente como fuentes de carbono y energía en los medios con glucosa (1%) y DEHP en los que obtuvieron valores de μ y X_{max} de 0.08 h^{-1} y 5.1 g/L respectivamente en la concentración más alta (1000 mg/L DEHP), pero menores a los registrados en el presente estudio, en especial en el medio con glucosa y 5g de cutina/L en este trabajo para el mismo organismo (μ de 0.12 h^{-1} y X_{max} de 10.92 g/L).

presente en el medio de cultivo, a fin de adaptarse a las condiciones del medio y obtener otra fuente de carbono para su crecimiento.

De manera similar a la presente investigación, debido al interés en la producción y caracterización de esterazas cutinolticas derivada de su potencial uso industrial en múltiples aplicaciones biotecnológicas (Pio y Macedo 2009, Castro-Ochoa y cols. 2010), y a partir de estudios pioneros de la evaluación de la actividad de la cutinasa del hongo filamentososo *F. solani* f. sp. *pisi* (Purdy y Kolattukudy 1975) y de otros hongos fitopatogénos y no fitopatogénos, ha sido posible confirmar que dichas enzimas son producidas por hongos filamentosos cuando han sido crecidos en medios con cutina o sus hidrolizados (Purdy y Kolattukudy 1975, Lin y Kolattukudy 1978, Degani 2015), mediante la evaluación de la actividad enzimática de esterazas por espectrofotometría empleando distintos sustratos (Speranza y cols. 2011), principalmente el p-nitrofenil butirato (Sayali y cols. 2013), ya que se ha demostrado que las esterazas cutinolticas pueden hidrolizar una gran variedad de sustratos además de la cutina, como son, polímeros, triacilglicérols y ésteres solubles de cadena corta (Castro-Ochoa y cols. 2012, Chen y cols. 2013).

En cuanto a la producción de enzimas cutinolticas Hawthorne y cols. (2001) demostraron que la cantidad de enzimas puede verse afectada por la fuente y concentración de cutina, lo cual es congruente con los resultados de nuestro trabajo, ya que al emplear cutina de diferentes fuentes naturales en concentraciones similares a las nuestras (0.1, 0.5, 2.5 y 5 g/L), la producción de enzimas cutinolticas fue inducida en diferentes niveles a medida que se aumentó la concentración de cutina, confirmando que las fuentes de carbono y los sustratos regulan la actividad cutinoltica de hongos filamentosos como *Fusarium* sp (Speranza y cols. 2011).

Así mismo, Macedo y Pio (2005) al incorporar cutina vegetal en diferentes concentraciones (0.2, 0.4, 0.8 y 1%) en el crecimiento de *F. oxysporum*, reportaron aumentos en la actividad cutinoltica a mayor concentración de cutina, mientras su actividad se vio reprimida en el medio que contenía glucosa como única fuente de carbono. Por otro lado, respecto a la actividad cutinoltica reportada para hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y

Trichoderma, Fraga y cols. (2012) reportaron actividad cutinoltica por *F. oxysporum* en FS cuya actividad máxima en un medio con salvado de trigo fue de 21.7 U/mL. A pesar de que resultan inferiores a las obtenidas en nuestra investigación, es congruente con los resultados de este trabajo respecto a que estas enzimas pueden ser producidas en medios sólidos mostrando diferentes isoenzimas en cada medio de cultivo. Mientras para el hongo *T. harzianum* T34 se han reportado actividades cutinolticas empleando como inductor un monómero de cutina con el cual obtuvieron valores máximos de actividad enzimática específica de 9.8 y 7.5 U/mg (Rubio y cols. 2008), mismos que resultan inferiores a los alcanzados para el mismo organismo en este trabajo (56.5 U/mg), y son similares a las reportadas por *A. nidulans* (72.76 U/mg) (Castro-Ochoa y cols. 2012).

Por su parte, Degani (2015) demostró que la adición de cutina de manzana, su hidrolizado y particularmente el 1-hexadecanol indujeron la producción de esterazas cutinolticas de *F. oxysporum* desarrollado en fermentación en medio líquido (FML) y posteriormente identificó por zimografía la producción de una cutinasa de 20kDa. Mientras que los resultados mostrados en este trabajo, indican que *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* presentan actividad enzimática de esterazas cutinolticas de forma constitutiva e inducible y su actividad no se vio reprimida por la fuente de carbono en el medio, esto confirmado con los resultados aquí mostrados en los que se obtuvo producción de esterazas durante todos los tiempos de fermentación, aun con un alto contenido de glucosa en el medio, contrario a lo reportado en otros trabajos realizados en FML en los que se había reportado represión catabólica de estas enzimas al tener una fuente de carbono de fácil asimilación en el medio (Lin y Kolattukudy 1978, Hawthorne y cols. 2001, Macedo y Pío 2005). Lo anterior puede ser explicado en términos de que la diferencia en la disponibilidad de azúcares reductores en un sistema de FS es menor a la disponibilidad en un medio líquido ya que se ha reportado que la FS funciona naturalmente como un cultivo con rápida oxigenación pero con un lento suministro de azúcares (Viniestra-González y cols. 2003).

En cuanto a la caracterización de las esterasas cutinólíticas de otros hongos filamentosos se ha reportado su identificación mediante SDS-PAGE como cutinasas con pesos moleculares aproximados a 22 kDa (Castro-Ochoa y cols. 2010). De igual forma, Rubio y cols. (2008) lograron la purificación de una enzima con actividad cutinólítica de *Trichoderma harzianum* T34 logrando la identificación la de la enzima Thcutl como una cutinasa con un PM de 26 kDa. Por su parte, Castro-Ochoa y cols. (2012) analizaron la secuencia del genoma del organismo modelo *A. nidulans* en la que se encontraron cuatro genes que codifican para cutinasas constitutivas. Además de que lograron identificar por primera vez la cutinasa ANCT2 producida por *A. nidulans* mediante SDS-PAGE como una proteína de 29 kDa. Mientras que en el presente trabajo pudimos observar mediante el análisis zimográfico, bandas de actividad de esterasas de aproximadamente 25 kDa, cuyo peso molecular es congruente con los de otras cutinasas purificadas de hongos filamentosos reportadas previamente (Purdy y Kolattukudy 1975, Kolattukudy 1985) y que se hicieron presentes al tiempo que aumento la producción de biomasa y se mantuvieron durante todo el tiempo de fermentación tanto en de desarrollo de *T. harzianum* como de *F. culmorum* en todos los medios de cultivo. Al mismo tiempo, cabe señalar que los zimogramas obtenidos del crecimiento de *T. harzianum* y *F. culmorum* en los medios con cutina (1, 3 y 5 g de cutina/L), además de presentar mayor intensidad en las bandas de actividad, presentaron mayor cantidad de isoenzimas con respecto al medio testigo a partir de las 48h para *T. harzianum* y 72 h para *F. culmorum*, lo cual podría indicar que al aumentar la cantidad de cutina GMS en el medio se induce la aparición de nuevas isoenzimas con mayores pesos moleculares (40, 60 y 150 kDa) en respuesta a la necesidad de degradar una fuente de carbono más compleja como es la cutina GMS en el medio, lo anterior, una vez alcanzada la fase estacionaria y hasta el final de la fermentación.

en el medio (1, 3 y 5 g de cutina/L GMS) en relación al aumento en la actividad enzimática detectada espectrofotométricamente.

Finalmente, podemos afirmar que los hongos filamentosos *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* fueron capaces de crecer en un medio con cutina GMS y emplearla como fuente de carbono y como inductor de la actividad enzimática de esterasas cutinolíticas, teniendo como resultado un aumento significativo en la producción de esterasas cutinolíticas (433UI/L, 427 UI/L y 351 UI/L) con respecto a otros trabajos en los que se empleó cutina natural, representando de este modo, una alternativa a los inconvenientes del uso de la cutina natural para evaluar su producción (Hawthorne y cols. 2001, Macedo y Pío 2005, Pío y Macedo 2007, Rubio y cols. 2008, Castro-Ochoa y cols. 2012, Degani 2015).

9. CONCLUSIONES

- El aumento en la producción de biomasa a mayor concentración de cutina sugiere que *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* emplean a la cutina como fuente de carbono secundaria a la glucosa.
- *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* presentan actividad enzimática de esterasas cutinolíticas de forma constitutiva e inducible.
- El aumento en el contenido de cutina induce la producción de esterasas cutinolíticas de *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* y su actividad no fue reprimida por la concentración de glucosa en el medio de cultivo.
- *T. harzianum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* producen enzimas cutinolíticas cuyos pesos moleculares son similares a los reportados para cutinasas fúngicas.

Realizar la purificación de las enzimas con actividad cutinolítica para su posterior secuenciación e identificación.
Determinar las propiedades químicas y cinéticas de las enzimas identificadas.

10. PERSPECTIVAS

11. REFERENCIAS

- Aguilar AY, Báez SR, Martínez CC, Ahuactzin PM, Cuamatzi MM, Sánchez C. 2015. Mycelial growth and enzymatic activities of fungi isolated from recycled paper wastes grown on Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Polish Journal of Environmental Studies*. 24(5): 1897-1902.
- Ahuactzin-Pérez M, Tlecutit-Beristain S, García-Davila J, González-Pérez M, Gutierrez-Ruiz MC, Sánchez C. 2016. Degradation of di(2-ethyl hexyl) phthalate by *Fusarium culmorum*: Kinetics, enzymatic activities and biodegradation pathway based on quantum chemical modeling pathway based on quantum chemical modeling. *Science of the Total Environment*.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th Ed. John Wiley & sons Inc. New York, NY, E.U.A.
- Bailey SP, Bailey AC. 1995. *Química orgánica, conceptos y aplicaciones*. Quinta edición. Prentice Hall. México D.F. pp 265.
- Bakera PJ, Montclareab JK. 2010. Biotransformations using cutinase. *American Chemical Society*. 11:141-58.
- Bayona M y Villanueva C. 1999. Hongos de Interés Industrial. Editorial PUJ. Bogota D.C.
- Bessire M, Chassot C, Jacquat AC, Humphry M, Borel S, MacDonaldComber J, Pierre J, Nawrath C. 2007. A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO Journal*. 26:2158-2168.
- Bornscheuer UT. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 73-81.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System. Recuperado el 02 de Noviembre de 2016 de <http://www.brenda-enzymes.org/>
- Cannel E y Moo-Young M. 1980. Solid-state fermentation systems. *Process Biochemistry*. 4:2-7.

- Cardoso-Lopes, Stecca SA, Maia GA, Silva BR, Neves MV, Lobo JM, Guedes CA, Uíhoa CJ, Nascimento SR. 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*. Elsevier. 116: 815-824.
- Carrillo L. 2003. Estructuras de los hongos. *Microbiología Agrícola*. Facultad de Ciencias Agrarias. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 4: 1-6.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR, Cabral JMS. 1999. Cutinase: From molecular level to bioprocess development. *Biotechnology Bioengineering*. 66: 17-34.
- Castro-Ochoa D, Peña-Montes C, Farrés A. 2010. Producción y características de cutinasas: alternativa interesante para la biocatálisis a nivel industrial. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 13 (1): 16-25.
- Castro-Ochoa D, Peña-Montes C, Farrés A. 2012. ANCU2, an Extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 13(1):16-25.
- Cavaliere D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R, Polsinelli M. 2003. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of Molecular Evolution*. 57 1:226-232.
- Chaverri P y Samuels GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocerales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Study Mycology*. 48:1-116.
- Chen S, Chen J, Wu J. 2013. Cutinase: Characteristics, preparation and application. *Biotechnology Advances*. DOI:10.1016/j.biotechadv.2013.09.005
- Córdoba-Sosa G, González-Márquez A, Ahuactzin-Pérez M, Torres JL, Díaz-Godínez G, Díaz R. 2014b. Growth of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* on different concentrations of di(2-ethyl hexyl) phthalate in solid and in liquid media. 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, New Delhi, India, pp. 231-237.
- Córdoba-Sosa G, Torres JL, Ahuactzin-Pérez M, Díaz-Godínez G, Díaz R, Sánchez C. 2014a. Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*. 4(5):96-103.

- Crepin V.F, Faulds BC, Connerton F.I. 2003. A non-modular type B feruloyl esterase from *Neurospora crassa* exhibits concentration-dependent substrate inhibition. *Biochemical Journal*. 370: 417-427.
- Davies K, Lorono I, Foster S, Li D, Johnstone K, Ashby A. 2000. Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas. *Physiology Molecular Plant Pathology*. 57: 63-75.
- Deacon JW. 2006. Fungal biology. En: 4th Ed. Blackwell Publishing. Malden. E.U.A.
- Degani O, Salzman H, Geptin S, Dosoretz C. 2006. Synthesis and Characterization of a novel cutinase substrate, 4-nitrophenyl (16-methyl sulfone ester) hexadecanoate. *Journal of Biotechnology*. 121: 346-350.
- Degani O. 2015. Production and Purification of Cutinase from *Fusarium oxysporum* Using Modified Growth Media and a Specific Cutinase Substrate. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6, 245-258
- Dominguez E, Heredia-Guerrero JA, Heredia A. 2011 The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytologist*. 189:938-949.
- Dutta K y Dasu VV. 2011. Synthesis of short chain alkyl esters using cutinase from *Burkholderia cepacia* NRRL B2320. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 72: 150-156.
- Dutta K, Sen S, Dasu V. 2009. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*. 44: 127-134.
- Faber K. 2000. Biotransformations in Organic Chemistry. Springer. Berlin.
- Fan O, Liu X, Huang R, Liu Y. 2012. Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach. *Mycrobiology Cell Factor*. 11(33).
- Favero C, Rabal C, Batista J, Araujo R, Siquiera H, Lopes T, Celso H. 2013. Endophytic fungi producing of esterases: Evaluation in vitro of the enzymatic activity using pH indicator. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44 (3): 923-926.
- Fortes GL, Alves OR, Pinto da Silva BE. 2010. Cellulases, xylanases, B-glucosidases and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* synergistically in the hydrolysis of sugar cane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*. 51: 71-78.

- Fraga P, Carvalho P, Macedo AG. 2012. Production of Cutinase by *Fusarium oxysporum* on Brazilian Agricultural By-products and its enantioselective properties. *Food and Bioprocess Technology*. 5:138-146.
- Gandolfi RF, Gaspari L, Franzetti F, Molinari F. 2005. Hydrolytic and synthetic activities of esterases and lipases of non-starter bacteria isolated from cheese surface. *Annals of Microbiology*. 50:183-189.
- Garcia D, Stehigel AM, Cano J, Guarro J. 2004. A synopsis and re-circumscription of *Neurospora* (syn. *Gelasinospora*) based on ultrastructural and 28S rDNA sequence data. *Mycology Research*. 108 (10): 1119-1142.
- Godinho L, F CR, Reis PG, Tepper GJ. 2011. Discovery of an *Escherichia coli* esterase with high activity and enantioselectivity towards 1, 2-0-Isopropylidene glycerol esters. *Applied Environmental Microbiology*. 77(17).
- González-Marquez A. 2014. Crecimiento y estructura de la hifa y propiedades bioquímicas de hongos comestibles desarrollados sobre DI (2-Etilhexil) Italato. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Goody GW. 1995. The dynamics of hyphal growth. *Mycological Research*. 99: 385-394.
- Gottshalk MF, Alves O, Pinto SB. 2010. Celulasas, xilanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane. *Biochemical Engineering Journal*. 72-78.
- Gupta R, Kumar S, Gomes J, Kuhad RC. 2012. Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. *Biotechnol Biofuels*. 5(1):16.
- Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Montoya D. 2014. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 32(1): 1-12.
- Guzmán M. 1977. Micología médica. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 386.
- Hawthorne BT, Rees-George J, Crowhurst RN. 2001. Induction of cutinolytic esterase activity during saprophytic growth of cucurbit pathogens, *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races one and two (*Nectria haematococca* MPI and MPV, respectively). *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 194: 135-141.

- Heredia A. 2003. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1620:1-7.
- Herrera T y Ulloa M. 2004. El reino de los hongos. En: Micología Básica y Aplicada. Fondo de Cultura Económica-UNAM. México. 552.
- Holker U, Hofer M, Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 175-186.
- Howell CR. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87:4-10.
- Karpushova A, Brummer F, Barth S, Lange S, Schmid RD. 2005. Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. Associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67:59-69.
- Kim HY, Lee J, Ahn JY, Gu MB, Moon SH. 2002. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical, butyl benzyl phthalate, by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(9): 4684-4688.
- Kim YH, Ahn JY, Moon SH, Lee J. 2005. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, Malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Chemosphere*. 60: 1349-1355.
- Kim YH. 2007. Enhanced degradation and toxicity reduction of dihexyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *J. Applied and Environmental Microbiology*. 102: 221-228.
- Koeller KM y Wong C. 2001. Enzymes for chemical synthesis. *Nature*. 409: 232-240.
- Kolattukudy P. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 23: 223-250.
- Kolattukudy PE. 1984. Fungal penetration of defensive barriers of plants. En: Structure, Function and Biosynthesis of plant cell walls. Bartnicki-Garcia (eds.) American Society of Plant Physiologists. University of California, Riverside. pp. 302-343.
- Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhina IS. 2008. Fungal Genus *Hypocrea/Trichoderma* from Barcodes to Biodiversity. *J. Zhejiang University Science*. 9: 753-763.

- Lauridsen JB. 1976. Food emulsifiers: Surface activity, edibility, manufacture, composition, and application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 53(6):400-407. doi:10.1007/BF02605731.
- Leammh UK. 1970. T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lee SB, Go YS, Bae HJ, Park JH, Cho SH, Cho SH, Lee DS, Park OK, Hwang I, Suh MC. 2009. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*. 150:42-54.
- Leslie JF y Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. *Blackwell Publishing*. 400.
- Lin T y Kolattukudy P. 1978. Induction of a Biopolymer Hydrolase (Cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *Pisi*. *Journal of Bacteriology*. 133: 942-951.
- Lin TS y Kolattukudy PE. 1980. Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolazing enzyme from phytopathogenic fungi. *Physiological Plant Pathology*. 17:1-15.
- Macedo G y Fraga L. 2007. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* in solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Journal of Biotechnology*. 131(2): S212.
- Macedo GA y Pio TF. 2005. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36 (4): 388-394.
- Mc Klay AM. 1993. Microbial carboxylic ester hydrolases (EC. 3.1.1) in food biotechnology. Letters in Applied Microbiology. 16(1): 1-6.
- Metcalf D y Wilson C. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningi*. *Plant Pathology*. 50:249-257.
- Miller G. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.
- Montella IR, Shama R, Valle D. 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance – A Review. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 107 (4): 437-449.
- Ooijkaas LP, Weber FJ, Buitelaar R, Tramper J, Kinzema A. 2000. Defined media and inert supports: Their potential as solid state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*. 18: 356-360.

- Panda T y Gowrishankar BS. 2005. Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67:160-169.
- Pandey A, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Nigam P. 2001. Solid-State Fermentation in Biotechnology—Fundamentals and Applications. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi, pp. 100–221.
- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yithar T, Franke RB, Hofer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A. 2007. The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiology*. 145:1345-1360.
- Paredes M, Alvares NM, Silvia OM. 2010. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizados en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banana. *Revista Tecnológica ESPOL-KT*. 23 (1): 81-88.
- Pio TF y Macedo GA. 2007. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme Microbial Technology*. 41: 613-619.
- Pizarro AVL y Park EY. 2003. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*. 38:1077-182.
- Purdy R y Kolattukudy P. 1975. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, aminoacid composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and nonspecific esterase from *Fusarium solani* f. *pisi*. *Biochemistry*. 14: 2824-2831.
- Purdy RE y Kolattukudy PE. 1973. Depolymerization of hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. *pisi* isolation and some properties of the enzyme. *Arch. Biochem and Biophys*. 159: 61-69.
- Ramirez P y Coha J. 2003. "Degradación de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celololítica". *Revista Peruana de Biología*. 1 (1):67-77
- Rodriguez JA, Mateos JC, Nungaray J, Gonzalez V, Bhagnagar T, Roussos S. 2006. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 41: 2264-2269.
- Rubio MB, Cardoza RE, Hermosa R, Gutiérrez S, Monte E. 2008. Cloning and characterization of the Thcut gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Current Genetics*. 54: 301-312.

- Ruiz-Leza HA, Rodríguez-Jasso RM, Rodríguez-Herrera R, Contreras-Esquivel JC, Aguilar CN. 2007. Bio-reactors design for solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6: 33-40.
- Russell RJ, Scott C, Jackson CJ, Pandey G, Taylor MC, Choppin CW, Liu JW, Oakeshott JG. 2011. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications*. 4: 225-248.
- Samuels GJ. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state and ecology. *Phytopathology*. 96:195-206.
- Samuels L, Kunst L, Jetter R. 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:683-707.
- Sayali K, Sadicha P, Surekha S. 2013. Microbial esterases: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2(7):135-146.
- Schomoll M, Esquivel-Naranjo UE, Herrerra-Estrella A. 2010. *Trichoderma* in the light of day: physiology and development. *Fungal Genetics and Evolution*. 47 (11): 909-916.
- Schwarze F, Engels J, Mattheck C. 2000. Fundamental aspects in fungal strategies of wood decay in trees. *Spinger*. 5-31.
- Shan AA, Hasan F, Hameed A, Ahmeds. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 26 (3): 246-245.
- Smith WG. 2002. *Fusarium culmorum*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 31.
- Speranza P y Macedo AG. 2013. Biochemical characterization of highly organic solvent-tolerant cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2:372-376.
- Speranza P, Carvalho P, Macedo AG. 2011. Effects of the different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 72:181-186.
- Stark R, Tian S. 2006 The cutin biopolymer matrix. In: *Biology of the Plant Cuticle*. En: M. Riederer, C Müller (eds). Julius-von-SachsInstitut, für Biowissenschaftlichen Universität Würzburg, Germany. pp:126-141.
- Suárez-Segundo JL, Vázquez-López D, Torres-García JL, Ahuactzin-Pérez M, Montiel-Martínez N, Tlecutli-Beristain S, Sánchez C. 2013. Growth of colonies and hyphal

- ultrastructure of filamentous fungi grown on dibutyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate. *Revista mexicana de ingeniería química* 12(3):499-504.
- Suh MC, Samuels AL, Jetter R, Kunst L, Pollard M, Ohlrogge J, Besisson F. 2005. Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiology*. 139:1649-1665.
- Tellez-Tellez M, Fernández JF, Montiel-González AM, Sánchez C, Díaz-Godínez G. 2008. Growth and lacasse production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81: 675-679.
- Treichel D, Oliveira D, Mazutti MA, Di Lucio M, Oliveira JV. 2009. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1007/s11947-009-0202-2.
- Velazquez-López L. 2011. Efecto del pH inicial de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* sobre la actividad de lacasas obtenidas por fermentación sólida. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Vera R, Moreno B, Acevedo R, Trujillo E. 2005. Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. *Fitopatología Venezolana*. 18: 3-8.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G, Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13:157-167.
- Ward O, Qin W, Dhanjoon J, Ye J, Singh A. 2006. *Advances in Applied Microbiology*. 58: 1-75.
- Wiese MV. 1987. Compendium of wheat diseases. *American Phytopathological Society*. 124.
- Yeats TH, Buda GJ, Wang Z, Chehanovsky N, Moyle LC, Jetter R, Schaffer AA, Rose JKC. 2012. The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. *Plant Journal*. 69:655-666.