



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

“Actividad enzimática de esterasas de hongos filamentosos desarrollados en presencia de dibutil ftalato en fermentación líquida”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

Biol. Angel González Márquez

Comité Tutorial

Directora de Tesis

Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández

Tutores

Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Dr. Rubén Díaz Godínez



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



Maestría 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

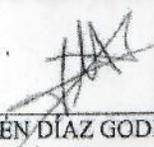
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Ángel González Márquez realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: "Actividad enzimática de esterasas de hongos filamentosos desarrollados en presencia de *Dibutyl ftalato* en fermentación líquida".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., SEPTIEMBRE 29 DE 2015



DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ



DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPÚLVEDA



DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE



DR. SAÚL TLECUÍTL 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

a Dios.

Por darme una segunda oportunidad de vida
y poder cursar y esta etapa de mi educación.

A mis padres

A mi mamá y papá por apoyarme siempre en
El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental
(Morfogénesis de Hongos) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala bajo la
Dirección de la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, a quien le agradezco
todo su apoyo brindado y en el Departamento de Biotecnología de la Universidad
Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, México, bajo el asesoramiento de la Dra.
Tania L. Volke Sepúlveda, a quién le agradezco todo su apoyo brindado.

Yesenia González Márquez a quien agradezco por convertirse en más que mi
hermana, una amiga y también apoyarme en todo momento.

A la Dr. María del Carmen Sánchez Hernández

Por ser mi directora de tesis pero más que eso una amiga que me brindó su amistad,
y que le agradezco sus consejos, comprensión, conocimientos, por
haberme aceptado en su grupo de trabajo y por todo el apoyo que me brindó para
poder realizar una tesis de maestría.

AGRADECIMIENTOS

Maestra Miriam Alvarado Pérez, Fernando Palacios, Victoria Cordero, Jarín
a Dios, José Luis Torres, Nancy Peña, Daniel Fernanda y Yanil Nataly por su

Por darme una segunda oportunidad de vida
y poder concluir esta etapa de mi educación.

Por su gran apoyo como asesora de esta investigación, por aceptarme en su
laboratorio y brindarme sus conocimientos en lo experimental y teórico que me

A mis padres

Angel González Hernández y Tulia Márquez Sánchez por apoyarme siempre en
todo momento, por brindarme el mayor regalo que se pueda dar que es la
educación y por todo su amor de padres. Por enseñarme a no darse por vencidos
y siempre alcanzar todas mis metas y más que nada por ser mis mejores ejemplos
a seguir.

A mi hermana

Yesenia González Márquez a quien agradezco por convertirse en más que mi
hermana, una amiga y también apoyarme en todo momento.

A la Dr. María del Carmen Sánchez Hernández

Por ser mi directora de tesis pero más que eso una amiga que me brindo su amistad,
y que le agradezco todas sus enseñanzas, comprensión, conocimientos, por
haberme aceptado en su grupo de trabajo y por todo el apoyo que me brindo para
poder realizar una tesis de maestría.

A mis amigos

Grupo de trabajo

Maestra Miriam Ahuactzin Pérez, Fernando Palacios, Victoria Conde, Jarim Saavedra, José Luis Torres, Nancy Peña, Dania Fernanda y Yeimi Nataly por su amistad y compañerismo.

A la Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Por su gran apoyo como asesora de esta investigación, por aceptarme en su laboratorio y brindarme sus conocimientos en lo experimental y teórico que me ayudaron a concluir este trabajo.

Al Dr. Rubén Díaz Godínez

Por su gran apoyo como asesor de esta investigación y brindarme sus conocimientos en lo experimental y teórico que me ayudaron a concluir este trabajo.

Al CONACyT

Por el financiamiento de esta investigación y otorgarme una beca con No. 555469
para la realización de esta tesis.

Andy

Por tu apoyo, comprensión y cariño que desde que te conocí hasta el día de hoy me has brindado, gracias por estar a mi lado en las buenas y en las malas. TKM.

A mis amigos

Pablo, Marlen, Rosabel, Gabriela, Sandra, Maribel, Alfredo Aldhai, Idalid, Gloria, Yeimi Mar, Jennifer (Colombis), Verito, porque son grandes amigos de esos que nunca vas a olvidar y siempre estarán presentes en tu vida por la bella amistad que vivimos.

El papá

Eduardo González Darón porque siempre fuiste un ejemplo seguro y mi gran motivación para seguir siempre esforzándome y ser alguien en la vida y no fallarte a mi papá, por qué aquí cumplo una de mis promesas que te hice al ser un profesionalista. ¡

El abuelita

Severina Sánchez Plata por qué siempre me dijiste lo bonito de abuelita y siempre confiaste en mí en que yo siempre les responderé a mis papás por todo su esfuerzo que me han brindado una educación. ¡

INDICE

Dedicatorias

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Objetivos y justificación	4
1.2. Metodología	6
1.2.1. Metodología y estructura de los trabajos académicos	7
1.2.2. Ciclo de vida, reproducción sexual y asexual de hongos micomicetos	7
1.3. Cálculos	8
1.3.1. Cálculos	10
Mi abuelito	
Erasmus González Durán porque siempre fuiste un ejemplo seguir y mi gran inspiración para seguir siempre esforzándome y ser alguien en la vida y no fallarles a mis papás, por qué aquí cumplo una de mis promesas que te hice el ser un profesionalista †.	11
1.3.2. Cálculos	15
2. METODOLOGÍA	16
Mi abuelita	
Severina Sánchez Plata por qué siempre me diste tu cariño de abuelita y siempre confiaste en mí en que yo siempre les respondería a mis papás por todo su esfuerzo que hacen al brindarme una educación †.	18
2.1. Organización del estudio	18
2.2. Preparación de inóculo y condiciones de cultivo	19
2.3. Inoculación del medio fermentador en fermentación líquida	20
2.4. Medición de pH	20
2.5. Ajuste de la temperatura	20
2.6. Controlación de la fermentación	20
2.7. Análisis estadísticos de resultados	21

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Dibutil ftalato (DBF)	4
1.2 Hongos Ascomicetos.....	6
1.2.1 Morfología y estructura de los hongos ascomicetos.....	7
1.2.2. Ciclo de vida, reproducción sexual y asexual de hongos ascomicetos.....	7
1.3 <i>Fusarium culmorum</i>	9
1.4 <i>Neurospora sitophila</i>	10
1.5 <i>Fusarium oxysporum</i>	11
1.6 Enzimas esterases	12
1.7 Mecanismo de acción de esterases.....	13
1.8 Respirimetría como método de estimación del crecimiento microbiano.....	15
1.9 Fermentación líquida.....	15
2. ANTECEDENTES.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVO GENERAL	18
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
7. METODOLOGÍA.....	19
7.1 Organismos de estudio.....	19
7.2 Preparación de inóculo y condiciones de cultivo	19
7.3 Incubación del microorganismo en fermentación líquida	20
7.4 Medición de pH	20
7.5 Obtención del sobrenadante.....	20
7.6 Cuantificación de la biomasa.....	20
7.7. Actividad enzimática de esterases.....	21

7.8	Respirometría	22
7.9	Consumo de glucosa.....	22
7.10	Análisis estadístico.....	22
8.	RESULTADOS	22
8.1	<i>Fusarium culmorum</i>	22
8.1.1.	Crecimiento	22
8.1.2.	pH.....	24
8.1.3.	Actividad enzimática de esterasas	25
8.1.4.	Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de esterasas	26
8.1.5.	Cuantificación de azúcares residuales.....	27
8.1.6.	Consumo de O ₂	27
8.1.7.	Producción de CO ₂	28
8.1.8	Parámetros cinéticos de producción de CO ₂ y consumo de O ₂	29
8.2.	<i>Neurospora sitophila</i>	30
8.2.1.	Crecimiento	30
8.2.2.	pH.....	31
8.2.3.	Actividad enzimática de esterasas	32
8.2.4.	Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de esterasas	33
8.2.5.	Cuantificación de azúcares residuales de <i>N. sitophila</i>	34
8.3.	<i>Fusarium oxysporum</i>	35
8.3.1.	Crecimiento	35
8.3.2	pH.....	37
8.3.3.	Actividad enzimática de esterasas	38
8.3.4.	Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de esterasas	39
8.3.5.	Cuantificación de azúcares residuales.....	40
8.4	Comparación entre cepas	41
9.	DISCUSIÓN	42
10.	CONCLUSIONES	46
11.	REFERENCIAS.....	47

RESUMEN

El dibutil-ftalato (DBF) es un contaminante del medio ambiente, tóxico para diversos organismos. En la actualidad existen escasos estudios sobre la degradación de este plastificante utilizando hongos. Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue evaluar el crecimiento de *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* y *Neurospora sitophila* en presencia de DBF para determinar si estos hongos utilizan el compuesto como fuente de carbono y energía para su crecimiento, además de determinar su capacidad para la producción de esterasas. Para realizar esta investigación, se utilizaron tres medios de cultivo diferentes 1) medio sin adición de DBF (SAF), 2) medio con 1500 mg de DBF/L y 3) medio con 2000 mg de DBF/L. Las tres cepas de hongos fueron capaces de crecer en los medios que contenían DBF, se observó que las tres cepas presentaron la mayor producción de biomasa (X_{max}) y la mayor tasa específica de crecimiento (μ) en los medios que contenían DBF en comparación con el medio SAF. Para las tres cepas se observó una disminución del pH durante los primeros días de incubación, pero conforme transcurrían los días de fermentación, el pH aumentó llegando a valores de 7.2. En cuanto a las actividades enzimáticas las cepas de *F. culmorum* y *F. oxysporum*, secretaron mayor cantidad de enzimas esterasas en los medios que contienen el DBF. Se encontró que todos los hongos utilizaron por completo la fuente de carbono inicial (glucosa) para su crecimiento y producción de biomasa. Los resultados sugieren que los tres hongos consumieron el DBF como fuente de carbono para continuar con su crecimiento y como un posible inductor en la producción de enzimas esterasas. El hongo *F. culmorum* presentó mayor consumo de O_2 y mayor producción de CO_2 en el medio con 1500 mg de DBF. En general, el DBF no inhibió el crecimiento fúngico y favoreció la producción de enzimas esterasas.

1. INTRODUCCIÓN

Los ftalatos son diésteres aromáticos derivados del ácido *orto*-ftálico o del ácido *tere*-ftálico, que son ampliamente utilizados como plastificantes (Liang *et al.* 2008). Presentan dos cadenas laterales, generalmente alifáticas lineales, aunque también pueden presentar grupos alifáticos ramificados, cicloalifáticos o aromáticos. Estos compuestos fueron sintetizados por primera vez en la década de 1920; no obstante, su venta a gran escala se dio hasta 1950 con la aparición de la industria del cloruro de polivinilo (PVC) por sus siglas en inglés (Kemi, 2000), provocando su conversión de plástico duro a otro flexible (Hwang *et al.* 2008; Chai *et al.* 2008). Son incoloros e inodoros producidos por la reacción del anhídrido ftálico con un alcohol apropiado (alcoholes de entre 6 y 13 carbonos) (Chai *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2008). Los ftalatos más empleados son el Di (2- etilhexil) ftalato (DEHF), dibutil ftalato (DBF), Dietil ftalato (DEF) y Dimetil ftalato (DMF). Los ftalatos son usados como plastificantes para producir materiales poliméricos y una gran variedad de productos de uso personal, están entre el volumen más alto de sustancias químicas producidas con aproximadamente 2-8 millones de toneladas por año (OMS, 1992). La contaminación ambiental por ftalatos ocurre como consecuencia de la fabricación, el empleo y disposición de productos plásticos o directamente por uno de los numerosos productos de consumo personal (cosméticos, productos farmacéuticos, etc.) (Zheng *et al.* 2007).

Los ftalatos han sido encontrados en sedimentos, agua, aire y alimentos, ya que pueden migrar del material de empaque debido a su empleo (Hashizume *et al.* 2002). Durante los últimos años, los ftalatos de uso más común incluyendo el DBF, fueron clasificados como contaminantes y compuestos interruptores endocrinos (EDCs) (Perwack *et al.* 1981).

1.1. Dibutil ftalato (DBF)

El DBF pertenece a la familia de los ésteres de ácido ftálico, es un líquido inodoro de color amarillo cuyo peso molecular es 278.34 g/mol. Presenta baja solubilidad en agua pero alta en octanol. El DBF no forma enlaces covalentes con el plástico por lo tanto se

libera al ambiente con el tiempo y el uso (Lee *et al.* 2007). En consecuencia, este contaminante tiende a acumularse en sedimentos, en el suelo, el agua, el aire y en la biota (Aurela *et al.* 1999; Bove *et al.* 1978; Giam *et al.* 1980; Petersen y Breindahl, 2000; Hashizume *et al.* 2002).

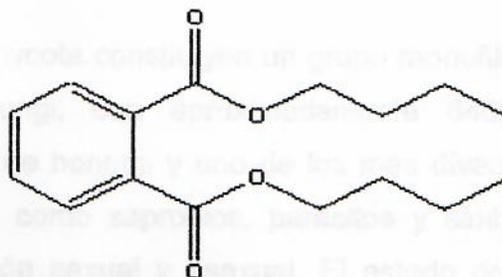


Fig.1. Estructura química del Dibutil ftalato (Fuente: www.chemicaland21.com).

Seis ftalatos se han designado como contaminantes por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (US EPA): DBF, DMF, DEF, butil bencil ftalato (BBzF), di-n-octil ftalato (DnOF) y DEHF (Furtmann, 1994). Algunos estudios han demostrado que los plastificantes con cadenas cortas como el DMF, Difenilftalato (DFF), Butilbencilftalato (BBF) y DBF pueden ser rápidamente degradados y mineralizados en comparación con los de cadenas largas como el DEHF (Wang *et al.* 2006). Existen reportes de hepatotoxicidad, atrofia testicular, teratogénesis y carcinogénesis que están relacionados con los ftalatos en general (Huber *et al.* 1996; Hashizume *et al.* 2002). Las fuentes de exposición a ftalatos son por ingesta de alimentos y por exposición dérmica, esto probablemente por la alta migración de los ftalatos contenidos en los envases de plástico (Bustamante *et al.* 2001).

Se producen cerca de veintiséis mil toneladas al año de DBF desde hace más de 40 años en la Unión Europea (CERHR, 2006) y es empleado principalmente en productos de cuidado personal como desodorantes, perfumes, lociones de afeitar, champús y geles (ECB, 2003). Este plastificante se acumula en invertebrados, peces y plantas. No obstante, existen investigaciones que demuestran la degradación del DBF de manera biológica (Hashizume *et al.* 2002). Se ha observado la efectividad del sistema ligninocelulósico de los hongos de pudrición blanca para mineralizar el DBF hasta CO₂.

libera al ambiente con el tiempo y el uso (Lee *et al.* 2007). En consecuencia, este contaminante tiende a acumularse en sedimentos, en el suelo, el agua, el aire y en la biota (Aurela *et al.* 1999; Bove *et al.* 1978; Giam *et al.* 1980; Petersen y Breindahl, 2000; Hashizume *et al.* 2002).

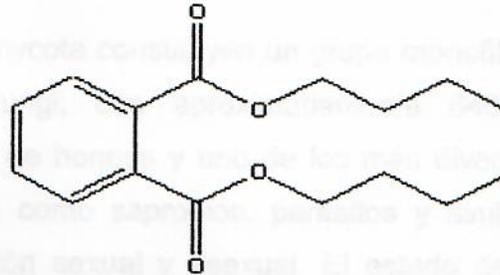


Fig.1. Estructura química del Dibutil ftalato (Fuente: www.chemicalland21.com).

Seis ftalatos se han designado como contaminantes por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (US EPA): DBF, DMF, DEF, butil bencil ftalato (BBzF), di-n-octil ftalato (DnOF) y DEHF (Furtmann, 1994). Algunos estudios han demostrado que los plastificantes con cadenas cortas como el DMF, Difenilftalato (DFF), Butilbencilftalato (BBF) y DBF pueden ser rápidamente degradados y mineralizados en comparación con los de cadenas largas como el DEHF (Wang *et al.* 2006). Existen reportes de hepatotoxicidad, atrofia testicular, teratogénesis y carcinogénesis que están relacionados con los ftalatos en general (Huber *et al.* 1996; Hashizume *et al.* 2002). Las fuentes de exposición a ftalatos son por ingesta de alimentos y por exposición dérmica, esto probablemente por la alta migración de los ftalatos contenidos en los envases de plástico (Bustamante *et al.* 2001).

Se producen cerca de veintiséis mil toneladas al año de DBF desde hace más de 40 años en la Unión Europea (CERHR, 2006) y es empleado principalmente en productos de cuidado personal como desodorantes, perfumes, lociones de afeitar, champús y geles (ECB, 2003). Este plastificante se acumula en invertebrados, peces y plantas. No obstante, existen investigaciones que demuestran la degradación del DBF de manera biológica (Hashizume *et al.* 2002). Se ha observado la efectividad del sistema ligninocelulósico de los hongos de pudrición blanca para mineralizar el DBF hasta CO₂.

Los hongos filamentosos en general poseen gran potencial para la biodegradación de compuestos tóxicos, por su capacidad para mineralizarlos, para oxidar sustratos insolubles y debido a la secreción de enzimas (Lee *et al.* 2007).

1.2 Hongos Ascomicetos

Los ascomicetos o Ascomycota constituyen un grupo monofilético dentro de la división Eumicetes del reino Fungi, con aproximadamente 64000 especies conocidas. Representa el mayor filo de hongos y uno de los más diversos (Conrad *et al.* 2009). Habitan medios diversos como saprobios, parásitos y simbioses. Los ascomicetos llevan a cabo reproducción sexual y asexual. El estado de reproducción asexual o conidial se denomina anamorfo y al sexual o ascógeno se le denomina teleomorfo (Herrera y Ulloa 1998). Estos hongos forman 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 está constituido por un micelio bien desarrollado, con hifas ramificadas y septadas, cuyas células poseen de uno a varios núcleos (Moreno, 2000).

Las especies de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Neurospora sitophila* pertenecen a la división Ascomycota. Los hongos ascomicetos producen dos o más tipos de esporas, unas de las cuales pueden ser meióticas, es decir, esporas sexuales llamadas ascosporas. Los mismos hongos pueden producir uno o más tipos de esporas asexuales, generalmente conidios o clamidiosporas en las etapas denominadas anamorfos (Chaverri *et al.* 2003).

En general, los hongos de la familia de los ascomicetos causan pudrición blanda. Los hongos causantes de la pudrición blanda utilizan un ataque similar al utilizado por los causantes de la pudrición marrón (atacan preferentemente la celulosa de las plantas) (Akar y Divriklioglu, 2010). Este tipo de hongos (ascomicetos) atacan preferentemente la celulosa de las paredes celulares y forman a menudo cavidades microscópicas en la pared secundaria celular (Schwarze *et al.* 2000).

1.2.1 Morfología y estructura de los hongos ascomicetos

El micelio está 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 micelio amorfo o con forma regular y definida. Los septos de las hifas son discoidales y se forman a expensas de la pared lateral que se va cerrando hacia el centro. 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 está 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) (Ingraham *et al.* 1995).

En la gran mayoría de los ascomicetos, las hifas están estrechamente unidas formando prosénquimas o pseudoparénquimas, es decir, estructuras que se observan en los cuerpos fructíferos, en los estromas y esclerocios (Ingraham *et al.* 1995). Todas las células poseen pared celular, membrana celular, protoplasma y de uno a varios núcleos. La pared celular es delgada o gruesa y está 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, 1998).

1.2.2. Ciclo de vida, reproducción sexual y asexual de hongos ascomicetos

Los hongos ascomicetos representan el 75% de las especies fúngicas descritas hasta el momento. Sin embargo, las fases sexuales o teleomorfas han sido poco estudiadas debido a que solo se han podido recuperar en cultivo puro el diez por ciento de las especies. La principal dificultad en el estudio de estos organismos es que se necesita interrumpir el estado de latencia de las ascosporas. Con este fin se aplican diferentes métodos de aislamiento y de activación de ascosporas (Ingraham *et al.* 1995).

El ciclo de vida de los ascomicetos, comprende la formación de hifas dicarióticas que tiene lugar como consecuencia de diversos procesos de reproducción sexual que llevan al apareamiento de núcleos. Tales procesos de reproducción pueden ser: contacto

gametangial, espermatización y somatogamia. Una vez que el ascogonio está fecundado se empiezan a originar divertículos que pronto reciben copias de los núcleos paternos y maternos y los organizan en hifas dicarióticas, con un núcleo de cada tipo por célula. Estas células suelen crecer y ramificarse dentro de los tejidos del futuro ascoma, integrados por hifas monocarióticas. En las células situadas en el extremo de las numerosas ramificaciones de las hifas ascógenas donde tendrá lugar la cariogamia. Debido a la ramificación de las hifas dicarióticas, una sola fecundación inicial producirá un extenso número de cigotos, cada uno de los cuales actúa como una célula madre de un asca. El crecimiento de las hifas ascógenas se produce por uncinulación. Este es un proceso exclusivo de los ascomicetos en donde la primera célula dicariótica se curva apicalmente en forma de gancho (uncinulo) que se desarrolla en sentido opuesto al crecimiento. A la vez, se dividen ambos núcleos y uno de ellos emigra al uncinulo. Posteriormente, se separa por tabiques transversales el par apical de núcleos. Mientras tanto, el par apical del uncinulo se fusiona con la célula originada e introduce en ella el núcleo recibido. Este sistema de división celular se repite en cada célula apical hasta la formación del asco. Este mecanismo asegura que los núcleos hermanos se separen en dos células, y por lo tanto se mantiene el carácter dicariótico de dichas células. Las células apicales binucleadas (primordio del asco) completan la reproducción sexual con la cariogamia. Sus dos núcleos se fusionan para dar el núcleo cigótico y se convierte en un esporangio claviforme. A la célula diploide formada se le conoce como célula madre del asca. Éstas sufren meiosis para originar cuatro núcleos haploides que se dividen por mitosis originando de esta forma los ocho núcleos haploides (Ingraham *et al.* 1995).

Cada núcleo se delimita en una porción del citoplasma y el retículo endoplasmático llamado vesícula ascal que se va invaginando para formar las ascosporas. En los ascomicetos, las ascas se forman protegidas por hifas monocarióticas derivadas de las que rodean el ascogonio, constituyendo los cuerpos fructíferos llamados ascomas o ascocarpos. En el proceso de formación de las ascosporas, los ascomicetos suelen expulsar a las esporas de forma activa por una abertura apical. Estas ascosporas pueden ser elipsoidales o fusiformes, a veces alargadas, unicelulares o pluricelulares, hialinas o con melanina. Cuando las ascosporas caen sobre un medio adecuado,

absorben agua, se hinchan y germinan. Esto ocurre por la acción del material sintetizado en el retículo endoplásmico como la quitina y los glucanos (necesarios para la formación de la pared). Estos compuestos son enviados a los dictiosomas a través de vesículas. En los dictiosomas ocurre la transformación del material a membrana plasmática, enzimas de síntesis de la pared o ablandamiento. Posteriormente, estas vesículas son transportadas al tubo de germinación en donde se unen a la membrana donde liberan su contenido, aumentando la pared. La elongación sufrida en el ápice del tubo de germinación se debe a la presión ejercida por el protoplasto o presión osmótica interna. Por esta razón, las hifas solo crecen en longitud, pero no poseen preferencia de dirección, lo que da lugar a colonias radiales o esféricas dependiendo del sustrato en el que se encuentre el hongo. De esta manera, comienza el crecimiento del micelio haploide (Ingraham *et al.* 1995; Madigan *et al.* 2005).

La forma de reproducción asexual en los ascomicetos se da por conidios. Éstos suelen formarse en las etapas más favorables de su ciclo vital, dando lugar a la fase anamórfica. El proceso de formación de los conidios puede ocurrir por diferentes mecanismos. El mecanismo más frecuente ocurre por la existencia de células especializadas llamadas conidiógenas que suelen ser sostenidas por conidióforos. En ellos, se produce conidiogénesis blástica, que implica la formación de nueva pared, de tal forma que el talo crece con la punta de forma redondeada. Los conidios pueden ser uni o pluricelulares, hialinos u oscuros, de pared lisa u ornamental. Los conidióforos se pueden formar directamente sobre el micelio o agrupados (Ingraham *et al.* 1995; Kendrick, 1985).

1.3 *Fusarium culmorum*

Es un hongo filamentoso que 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).

Presenta colonias de crecimiento rápido, vellosas, algodonosas, inicialmente blancas, y, en algunos medios de cultivo, con una pigmentación rosa en el centro que difunde a todo el cultivo (Fig. 2) (Smith, 2002). Las colonias pigmentadas tienen el centro rosa naranja intenso, con zona marginal rosa pálido y bordes blancos. Reverso de color rosa-naranja intenso.

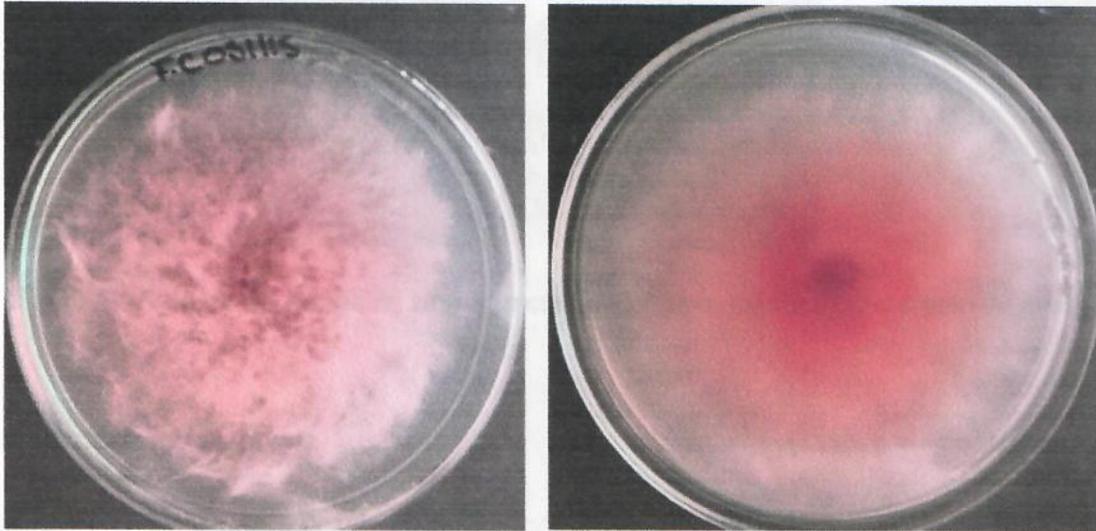


Fig.2. Morfología del hongo *F. culmorum* creciendo sobre medio agar extracto de malta.

1.4 *Neurospora sitophila*

Es un tipo de hongo Ascomiceto que crece de forma saprofita en el ambiente. Las especies de *Neurospora* son aerobios obligados que se producen en el pan, almacenes de madera y fábricas de madera contrachapada; en los registros de vapor, en los rastrojos de los campos de caña de azúcar quemados (Pandit, 1996). Esta especie de hongo presenta colonias de rápido crecimiento con abundante producción de ascomas (Fig. 3). *Neurospora* puede crecer en materia orgánica muerta o en medios constituidos por agua, sales minerales, glucosa o agar.

De acuerdo a su tipo de reproducción se clasifican en heterotáticos (reproducción sexual) y homotáticos (reproducción asexual).

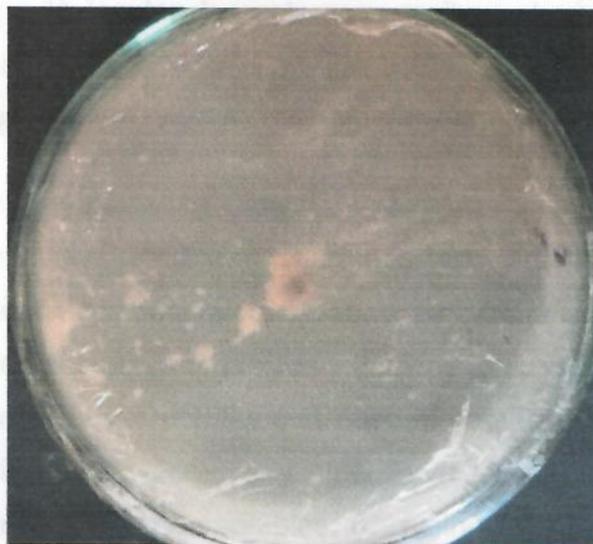


Fig.3. Morfología del hongo *N. sitophila* creciendo sobre medio agar extracto de malta.

1.5 *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patógenas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas, se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento. La morfología de las colonias es muy variable, caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar (Fig. 4) (Bosland, 1988).

contenga un enlace éster. De acuerdo con la nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las esterasas reciben el número de clasificación EC 3.1, el cual las identifica como hidrolasas que actúan sobre enlaces ésteres de ácidos carboxílicos (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>, 1992).

Las esterasas tienen propiedades catalíticas que las hace muy versátiles en varios procesos industriales que implican reacciones de hidrólisis, esterificación, transesterificación (inter-esterificación, alcoholólisis) y aminólisis. Estas enzimas presentan elevada estabilidad en solventes orgánicos y líquidos iónicos (Pio y Macedo, 2009). Las esterasas son enzimas muy versátiles que pueden catalizar, además de la ruptura del enlace éster, reacciones de hidrólisis y síntesis *in vitro* de una amplia variedad de sustratos, como ésteres sintéticos solubles. (Carvalho *et al.* 1999). Estas propiedades catalíticas tienen un uso potencial en diferentes industrias, por ejemplo, en alimentos, detergentes, producción de biodiesel, entre otras aplicaciones (Carvalho *et al.* 1999; Badenes *et al.* 2010) y algunos de los usos potenciales de estas enzimas esterasas incluyen aplicaciones en la degradación de plásticos (Hwang *et al.* 2008; 2012). También este grupo de enzimas ha sido reconocido como uno de los sistemas más importantes en el metabolismo de compuestos xenobióticos (Badenes *et al.* 2010).

Dentro del grupo de las esterasas, las que poseen mayor aplicación industrial son las lipasas. Estas enzimas pueden llevar a cabo un amplio espectro de reacciones de bioconversión tales como hidrólisis, esterificación, alcoholólisis, acidólisis y aminólisis (Sayali *et al.* 2013).

1.7 Mecanismo de acción de esterasas

Las estructuras cristalinas reportadas hasta el momento muestran plegamiento α/β con una triada catalítica de His-Ser-Asp en el sitio activo, triada clásica reportada en serin proteasas, lipasas y otras esterasas. Es lógica la suposición de definir un mecanismo hidrolítico similar al reportado en serin proteasas, con la formación de un estado de transición tetrahedral, la estabilización de un anillo oxoanión en el residuo carbonilo del sustrato y la participación de una molécula de agua para finalizar la reacción. Este

proceso se puede resumir en dos etapas, la acilación y posterior desacilación de la enzima.

Primera Etapa: (Acilación) La catálisis comienza con un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del éster, por parte de la OH-Ser, residuo activado por la influencia de la Histidina catalítica. En el segundo paso, se forma el intermediario tetrahedral y se estabiliza del anillo oxoanión con residuos de aminoácidos cercanos al sitio activo. La necesidad de estabilizar el anillo imidazol, rompe el intermediario tetrahedral.

La primer etapa termina con la liberación del alcohol como producto y con la serina del sitio activo acilada.

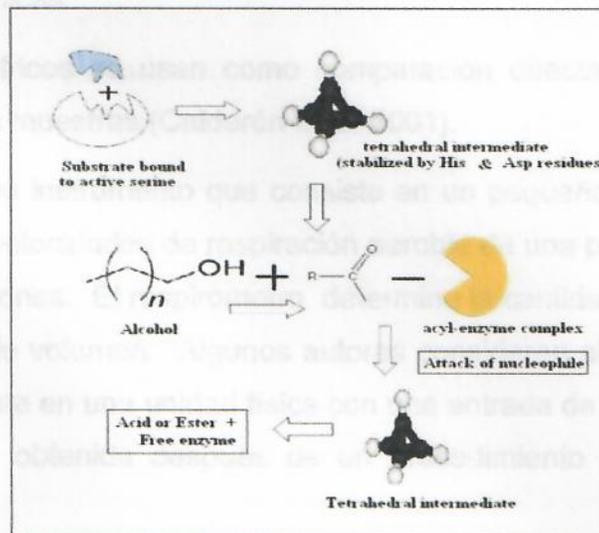


Fig.5. Mecanismo de acción de catálisis de las enzimas esterasas (Sayali *et al.* 2013).

Segunda etapa: (Desacilación) El segundo paso de la hidrólisis, incluye la desacilación de la enzima y la liberación del ácido carboxílico como producto final. La segunda etapa comienza con un nuevo ataque nucleofílico hacia el carbono carbonilo por una molécula de agua, asistida de nuevo por la Histidina catalítica.

Lo siguiente es la formación de nuevo del intermediario tetrahedral y la estabilización del anillo oxoanión por aminoácidos cercanos al sitio activo. La necesidad de estabilizar al anillo imidazólico de la Histidina permite el siguiente paso de la reacción. La hidrólisis es finalizada con la liberación del ácido carboxílico como producto final y la enzima libre. Como consecuencia se obtiene la hidrólisis del éster.

1.8 Respirometría como método de estimación del crecimiento microbiano

La respirometría es una técnica basada en la medición del consumo de O_2 y/o la producción de CO_2 por microorganismos que consumen un sustrato orgánico, el cual es degradado y oxidado a CO_2 , es útil para:

- Evaluar biodegradación de sustancias químicas específicas.
- Tratabilidad de residuos orgánicos industriales.
- Evaluar el efecto de cantidades conocidas de compuestos tóxicos en la reacción de consumo de oxígeno en una muestra de agua residual o de sustancias químicas orgánicas.

Los datos respirométricos se usan como comparación directa entre el consumo de oxígeno de diferentes muestras (Calderón *et al.* 2001).

Un respirómetro es un instrumento que consiste en un pequeño conjunto de sensores que ayudan a medir velocidades de respiración aerobia de una población microbiana en determinadas condiciones. El respirómetro determina la cantidad de O_2 consumida por unidad de tiempo y de volumen. Algunos autores consideran al respirómetro como un sensor, ya que consiste en una unidad física con una entrada de muestra externa y una salida de resultados obtenida después de un procedimiento interno (Guisola *et al.* 2004).

1.9 Fermentación líquida

La fermentación líquida es un proceso en el que los microorganismos son inoculados en una solución acuosa de nutrientes produciendo biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas, en ausencia o presencia de oxígeno (Fazenda *et al.* 2008). En este sistema los microorganismos se desarrollan flotando en un volumen del medio de cultivo. En el caso de los hongos, éstos pueden formar pequeñas esferas de micelio (pellets) cuando hay agitación (Córdoba *et al.* 2014), tal es el caso de algunos hongos de pudrición blanca que crecen en fermentación líquida. A medida que los microorganismos descomponen los nutrientes, secretan enzimas al medio acuoso (Grimm *et al.* 2005).

2. ANTECEDENTES

A continuación se describen algunos trabajos que han evaluado el efecto de diferentes ftalatos (DBF, DEHF, DEF) en el crecimiento de diferentes hongos ascomicetos y basidiomicetos.

Tanaka *et al.* (2000) observaron la degradación de DBF por la enzima lipasa de *Candida cylindracea* en un pH de 7. El producto de degradación, benzil ftalato (BF), fue detectado por cromatografía líquida (HPLC) después de 24 horas de incubación. La concentración de éste disminuyó en tres días y se degradó en ácido ftálico.

En un estudio realizado por Kim *et al.* (2003) evaluaron la degradación de DEHF (500 mg/L) empleando una cutinasa pura obtenida del hongo *F. oxysporum*, y se comparó con una esterasa de *C. cylindracea* en fermentación líquida, evaluando además la toxicidad de los productos de degradación de cada enzima. Se obtuvieron niveles superiores de actividad hidrolítica y de degradación para la cutinasa fúngica, con respecto a la esterasa, encontrando una tasa de descomposición del 90% de DEHF en las primeras 12 h de fermentación utilizando una concentración de 10 mg/L de la enzima. También se encontró que el producto de degradación obtenido de la cutinasa de *F. oxysporum*, 1,3 -isobenzofuranoide (IBF), no resultó tóxico para el organismo utilizado en el bioensayo (bacteria bio-luminiscente recombinante de *Escherichia coli*). En comparación, la esterasa, además de IBF, produjo un compuesto desconocido; ambos compuestos resultaron tóxicos para *E. coli*. En otro estudio de degradación enzimática en el que se utilizó una cutinasa comercial (enzima lipolítica que degrada a la cutina), se evaluó la degradación de DEHF encontrando que casi el 70% de la concentración inicial de este compuesto se degradó en 4.5 h (Kim *et al.* 2007).

Lee *et al.* (2007) utilizaron el hongo de pudrición blanca *Polyporus brumalis* para degradar 3 diferentes concentraciones (250, 750 y 1250 μ M) de DBF. El DBF fue casi eliminado del medio de cultivo durante los primeros 12 días de incubación, encontrando que el 50% del DBF fue adsorbido por el micelio del hongo. Se detectaron al DEF y al monobutil ftalato (MBF) como productos intermedarios de la degradación; de acuerdo con sus resultados, la degradación de DBF por este hongo puede ser completada a

través de 2 rutas, la trans-esterificación y la desesterificación, las cuales sucesivamente se combinan en una vía de degradación intracelular.

Por otra parte, Hwang *et al.* (2008) investigaron la biodegradación de los ftalatos DEF, DMF y DBF en un medio de cultivo líquido YMG (Extracto de levadura, extracto de malta y Glucosa) por 10 hongos de pudrición blanca (*Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus*, *P. brumalis*, *Schizophyllum commune*, *Fomitella fraxinea*, *Merulius tremellosus*, *Trametes versicolor* y *T. versicolor* MrP1, *T. versicolor* MrP13 y *T. versicolor* MnP2-6) aislados en Korea. Encontraron que a una concentración de 100 mg/L de cada ftalato, la degradación ocurre dentro de los primeros 12 días de incubación y que el sobrenadante del cultivo de *P. ostreatus* cuando el hongo creció en medio de extracto de levadura y glucosa (YMG) durante 4 días (30°C) degradó el 14.9% de DBF. Cuando los ftalatos se agregaron después de 5 días de incubación, la mayoría de los hongos, excepto *I. lacteus* mostraron un incremento en la remoción. *P. ostreatus* mostró la mayor degradación para los 3 ftalatos, lo que se atribuyó a las enzimas que se encuentran asociadas al micelio y no a las enzimas extracelulares.

Chai *et al.* (2008) evaluaron la degradación de DEHF (40 ppm) por 14 cepas de hongos, encontrando que 9 de éstas degradaron más del 50% del compuesto, también observaron que *F. oxysporum* fue el hongo con mayor efectividad en degradar más del 98% del ftalato.

Sánchez *et al.* (2009) aislaron e identificaron cepas de hongos del suelo de los suburbios de Manchester, Inglaterra, identificadas como *F. oxysporum* y *F. culmorum*. Las cepas se crecieron sobre DEHF (concentración) como única fuente de carbono y energía, mostrando producción de biomasa después de 20 días de fermentación en caja.

Recientemente, Ahuactzin *et al.* (2014) evaluaron el crecimiento de tres cepas de hongos, *N. sitophyla*, *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus niger*, desarrolladas en medios con DBP con el objeto de determinar si estas cepas utilizaban este compuesto como fuente de carbono y energía, para esto se utilizó un medio de cultivo con tres concentraciones diferentes: 500 mg/L, 1000 mg/L de DBF y medio sin adición de ftalato, encontraron que las tres cepas mostraron mayor diámetro y grosor de la pared celular

de la hifa de la zona joven y zona madura de las colonias a mayor concentración de DBF, además observaron que los perfiles de pH disminuyeron conforme avanzaban los días de fermentación a un pH ácido, posiblemente por la generación de algunos compuestos ácidos durante su crecimiento. En general los tres hongos fueron capaces de crecer en presencia de DBF.

Zhu-Hua *et al.* (2012) encontraron que cepas de *Fusarium* sp. DMT-5-3 y *Trichosporon* sp. DMI-5-1 no mineralizaron completamente los ésteres de ftalato (EFs) pero sí los transformaron en sus intermediarios, monometil ftalato ó ácido ftálico por hidrólisis gradual de dos enlaces éster. Estos resultados sugirieron que las esterasas fúngicas son las responsables de la hidrólisis de los enlaces éster, y en los ésteres de ftalato son altamente específicas para su sustrato.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen muy pocos estudios sobre la degradación de ftalatos empleando hongos ascomicetos, por lo que en este trabajo se estudiará el crecimiento de *N. sitophila*, *F. oxysporum* y *F. culmorum* en un medio con diferentes concentraciones de DBF. Se evaluó el efecto de este compuesto en el crecimiento de los hongos y en la actividad enzimática de esterasas (enzimas responsables de la degradación de los ftalatos). Los resultados obtenidos de esta investigación aportarán información para futuros trabajos relacionados con la degradación de este tipo de compuestos.

4. HIPÓTESIS

Los hongos *F. oxysporum*, *N. sitophila* y *F. culmorum* desarrollados en presencia de dibutil ftalato producirán enzimas esterasas crecidos en una fermentación líquida.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del dibutil ftalato sobre la actividad enzimática de esterasas producidas en fermentación líquida por los hongos *F. oxysporum*, *N. sitophila* y *F. culmorum*.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la tasa específica de crecimiento, la biomasa y los cambios en el pH de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* crecidos en medios conteniendo 1500 mg y 2000 mg de DBF/L en fermentación líquida.
- Determinar la actividad enzimática de esterasas de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* crecidos en medios conteniendo 1500 mg y 2000 mg de DBF/L en fermentación líquida.
- Determinar el consumo de glucosa de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* crecidos en medios conteniendo 1500 mg y 2000 mg de DBF/L en fermentación líquida.
- Evaluar la producción de CO₂ y el consumo de O₂ de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *N. sitophila* crecidos en medios conteniendo 1500 mg y 2000 mg de DBF/L en fermentación líquida.

7. METODOLOGÍA

7.1 Organismos de estudio

Los organismos que se emplearon son: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Neurospora sitophila*, hongos filamentosos pertenecientes al cepario del laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

7.2 Preparación de inóculo y condiciones de cultivo

Se propagaron las 3 cepas, a partir de discos de micelio (10 mm) en agar extracto de malta. Los tiempos de desarrollo de las cepas fueron: 5 días para *N. sitophila*, 7 días para *F. culmorum* y *F. oxysporum*. El inóculo se tomó de la periferia de estas colonias (3 fragmentos de 10 mm de diámetro). Los ensayos en presencia o no de DBF, se llevaron a cabo en el medio de cultivo con la siguiente composición (g/L): Se preparó un medio con tres diferentes concentraciones KH₂PO₄, 0.6; ZnSO₄•7H₂O, 0.001; K₂HPO₄, 0.4; FeSO₄•7H₂O, 0.05; MnSO₄•H₂O, 0.05; MgSO₄•7H₂O, 0.5; CuSO₄ 0.25, extracto de levadura, 5 y glucosa, 10 (Córdoba *et al.* 2014). Como medio control (SAF) se usó el

medio antes descrito sin adición de DBF; el mismo medio fue adicionado con 1500 (medio 2), y 2000 mg DBF/L (medio 3). El pH se ajustó a 6.5 usando NaOH 0.1M.

7.3 Incubación del microorganismo en fermentación líquida

Como unidades experimentales, se emplearon matraces de 125 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo, se esterilizaron por 15 min a 120°C y se enfriaron. En todos los casos, el medio de cultivo sin adición de ftalatos (SAF) se utilizó como testigo (Sánchez *et al.* 2009). Los cultivos se incubaron a 25°C por 7 días para *F. culmorum* y *F. oxysporum* y 5 días para *N. sitophila* a 130 rpm.

7.4 Medición de pH

Los cambios del pH se midieron cada 12 h en el sobrenadante de los medios de cultivo filtrados, esto para las cepas de *F. oxysporum* y *F. culmorum*, para la cepa de *N. sitophila* se midió el pH cada 8 h, este proceso se llevó a cabo durante todo el tiempo que duro la fermentación de cada cepa empleando potenciometría (Ahuactzin *et al.* 2014).

7.5 Obtención del sobrenadante

El sobrenadante de la fermentación se obtuvo a las 12 h de cultivo, y posteriormente cada 12 h para *F. oxysporum* y *F. culmorum*, y cada 8 horas para *N. sitophila*, por filtrado y retención de la biomasa a través de papel de filtro Whatman No. 4, y se consideró como extracto crudo enzimático. La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó hasta peso constante para su cuantificación por diferencia en peso seco (Córdoba *et al.* 2014).

7.6 Cuantificación de la biomasa

La biomasa retenida sobre el papel Whatman que se cuantificó por diferencia de peso. Se utilizó para evaluar la tasa específica de crecimiento del microorganismo, la cual se evaluó mediante el progreso de la biomasa en función del tiempo $X = X(t)$ y se ajustó mediante la ecuación logística de Velhurst-Pearl (1):

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

La solución a la ecuación fue la siguiente (2):

$$X = X_{max} / (1 + Ce^{-\mu t}) \quad (2)$$

Donde:

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

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

t = Tiempo transcurrido en la fermentación (h)

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

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

$$C = (X_{max} - X_0) / X_0(3)$$

La estimación de los parámetros cinéticos con las ecuaciones mencionadas se realizaron usando la herramienta Solver de Microsoft Excel (Téllez-Téllez *et al.* 2008).

El rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato (glucosa) ($Y_{X/S}$) se estimó como la relación entre la X_{max} (g/L) y la glucosa consumida (g/L). El rendimiento teórico de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) se estima como la relación entre la E_{max} (U/L) y X_{max} (g/L). Se calcula la productividad en el pico máximo de actividad ($P_{RO} = E_{max}/$ tiempo de fermentación), además de la tasa específica de formación de la enzima ($qp = \mu Y_{E/X}$).

7.7. Actividad enzimática de esterases

La actividad de esterasa se determinó espectrofotométricamente siguiendo la hidrólisis de p -nitrofenil butirato (p NPB) durante un minuto frente a una solución blanco a 405 nm. La mezcla de reacción contenía 100 μ l de ECE y 900 μ l de reactivo preparado con los siguientes componentes: p NPB 1.76%, acetonitrilo 1.11%, Triton X-100 0.04% y agua destilada 11.11%, disuelto en buffer de fosfatos 0.01 M a un pH 7.5. Una unidad de actividad de esterasa fue definida como la cantidad de esterasa requerida para liberar un micromol de p -nitrofenol en un minuto bajo las condiciones de ensayo (25°C, pH 7.5).

7.8 Respirometría

Para estimar indirectamente los parámetros asociados al crecimiento, se cuantificaron las concentraciones volumétricas de O₂ y CO₂ en la corriente gaseosa a la entrada y salida de los matraces. Se utilizaron matraces de 125 ml con 50 ml del medio de cultivo, se sometieron a incubación a 130 rpm en una incubadora orbital, a 30 °C. A la salida de cada matraz, la corriente gaseosa húmeda se conectó a un sistema de deshidratación de aire. Los medidores de O₂ y CO₂ del sistema respirométrico están conectados a un Datalogger que transfiere los datos al programa LabView para su procesamiento y almacenamiento en el programa Excel (Torres, 2013).

7.9 Consumo de glucosa

Se cuantificó la cantidad azúcares reductores por medio del reactivo DNS (ácido 3,5 dinitro salicílico), a 100 µl de sobrenadante y 900 µl de agua destilada se le agregaron 2 ml del reactivo DNS. Se calentó a temperatura de ebullición por 5 min, se paró la reacción en baño en hielo, después de enfriarse se leyó la absorbancia a 575 nm.

7.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis se llevó a cabo aplicando un Análisis de varianza unifactorial (ANOVA) utilizando el programa Graph pad y las diferencias significativas entre medias se establecieron con una prueba de Tukey.

8. RESULTADOS

8.1 *Fusarium culmorum*

En el presente capítulo se muestran los resultados de la cepa de *Fusarium culmorum* en un medio con diferentes concentraciones de DBF.

8.1.1. Crecimiento

En la Fig.6 se muestra el crecimiento de la cepa *F. culmorum* crecida en medios de cultivo sin adición de DBF (SAF), y adicionado con 1500 y 2000 mg de DBF/L. En el medio SAF, *F. culmorum* presentó tres fases típicas de crecimiento microbiano (fase de

adaptación, exponencial y estacionaria), alcanzando la fase estacionaria a las X h. Se observa que la máxima producción de biomasa se alcanzó a las 108 h, obteniendo una X_{max} de 5.56 g/L y una μ de 0.044 h⁻¹, tiempo en el cual comenzó la fase estacionaria.

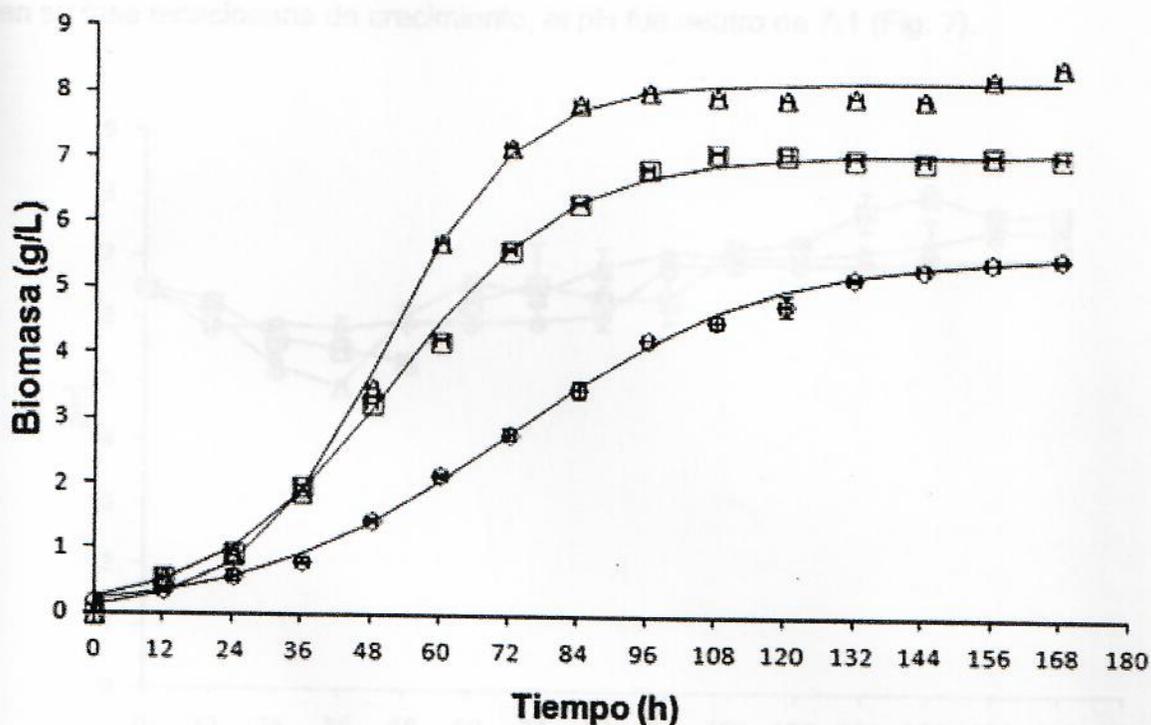


Fig. 6. Crecimiento de *F. culmorum* en medio sin adición de fitatos (SAF) (◇), 1500 (□) y 2000 (△) mg de DBF/L en fermentación líquida. Línea continua (—) corresponde a los datos ajustados usando la ecuación logística (ecuación 1) mostrando la desviación estándar.

Los valores de X_{max} , y μ en el medio SAF resultaron menores que los obtenidos para los medios que contenían 1500 mg y 2000 mg de DBF/L. Para el medio con 1500 mg DBF/L, se observó la máxima producción de biomasa a las 84 h, obteniendo una X_{max} de 7.08 g/L y una μ de 0.065 h⁻¹, también comenzó su fase estacionaria a las 84 h de fermentación. En el medio con 2000 mg DBF/L, alcanzó la máxima producción de biomasa y la fase estacionaria a las 84 h, obteniendo una X_{max} de 8.1 g/L y una μ de 0.085 h⁻¹. Comparando con el medio SAF y el medio que contenía 1500 mg de DBF/L, el medio que contenía 2000 mg de DBF/L presentó una mayor X_{max} .

8.1.2. pH

La cepa de *F. culmorum* se desarrolló en un medio con tres diferentes concentraciones a las cuales se les ajustó el pH a 6.5. En el medio SAF se observó un pH inicial de 5.8 hasta las 90 h de incubación, a las 100 h de incubación donde el hongo se encontraba en su fase estacionaria de crecimiento, el pH fue neutro de 7.1 (Fig. 7).

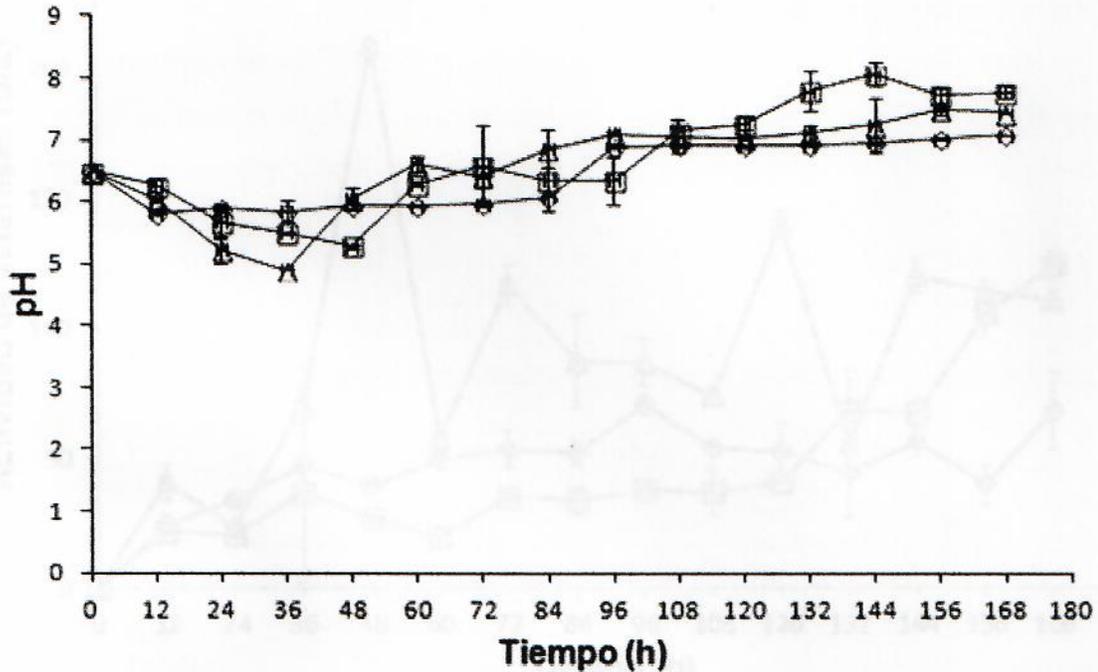


Fig. 7. pH de *F. culmorum* en medio sin adición de DBF (SAF) (\diamond), 1500 (\square) y 2000 (Δ) mg de DBF/L en fermentación líquida.

Para el medio que contenía 1500 mg DBF/L, se observó un pH inicial 6.3 hasta las 50 h de incubación que presentó un pH de 5.3. Conforme pasaron los días de fermentación el pH aumento y a las 90 h cuando el hongo se encontraba en la fase estacionaria de crecimiento el pH fue de 7.7. En el medio con 2000 mg DBF/L, se observó a las 40 h de incubación un pH ácido de 5.0, conforme pasaron los días de fermentación el pH se volvió básico y a las 100 h de incubación donde el hongo produjo su biomasa máxima e iniciaba su fase estacionaria, el pH fue neutro de 7.7.

8.1.3. Actividad enzimática de esterasas

En los medios que contenían 1500 y 2000 mg DBF/L se obtuvo una mayor actividad enzimática de esterasas (hasta X y Y, respectivamente) en relación con el medio control (SAF) donde se presentó una actividad enzimática de esterasas de 70.5 U/L (Fig. 8).

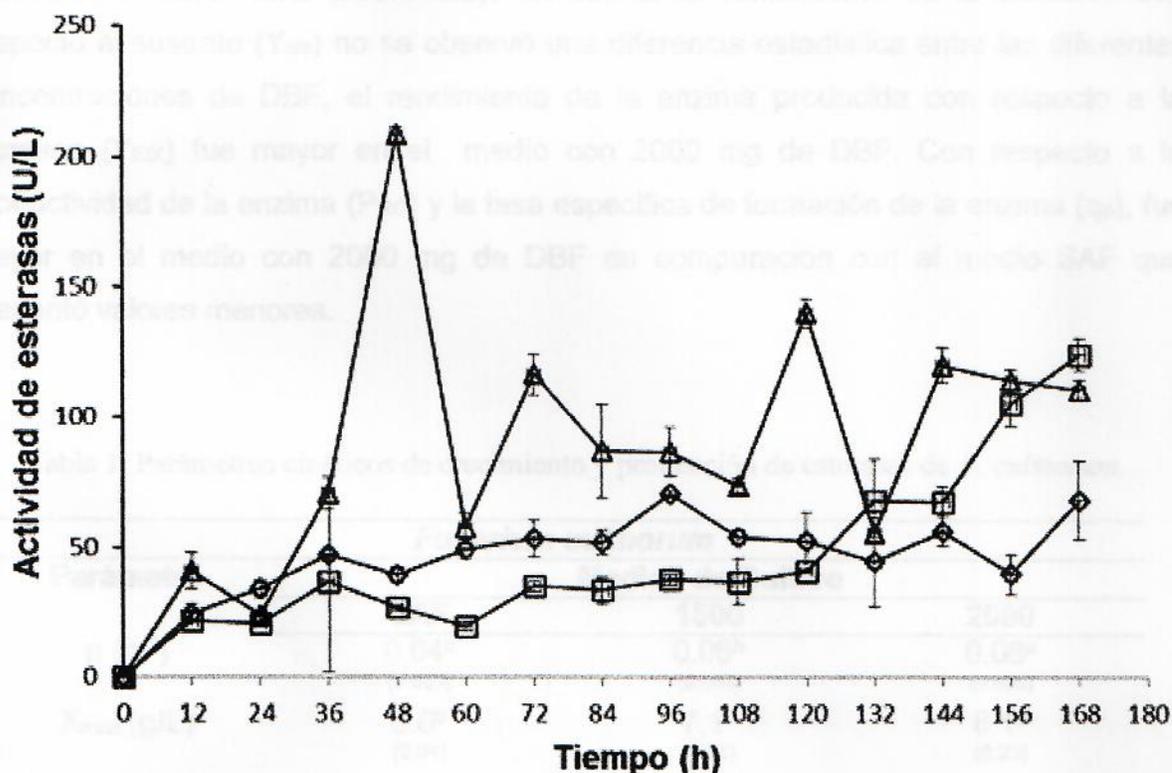


Fig. 8. Actividad enzimática de esterasas de *F. culmorum* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (◇), 1500 (□) y 2000 (△) mg de DBF/L en fermentación líquida.

Para el medio de 1500 mg de DBF/L se obtuvo una actividad de enzimas esterasas de 124.2 U/L, menor en comparación con el medio SAF. El medio de 2000 mg de DBF/L presentó una actividad enzimática de esterasas de 208.5 U/L, mayor que el medio que contenía 1500 mg de DBF/L. Estos resultados nos demuestran que no se inhibió la producción de enzimas esterasas en presencia de DBF en la cepa de *F. culmorum* aunque si disminuyó la cantidad.

8.1.4. Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de esterasas

En la Tabla 1, la μ fue mayor en el medio que contenía 2000 mg de DBF/L en comparación con los medios SAF y 1500 de DBF, los medios con 1500 y 2000 mg de DBF presentaron X_{max} con respecto al medio SAF, el medio con 2000 mg de DBF presentó la mayor E_{max} (208.5 U/L), en cuanto al rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) no se observó una diferencia estadística entre las diferentes concentraciones de DBF, el rendimiento de la enzima producida con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) fue mayor en el medio con 2000 mg de DBF. Con respecto a la productividad de la enzima (P_{RO}) y la tasa específica de formación de la enzima (q_p), fue mayor en el medio con 2000 mg de DBF en comparación con el medio SAF que presentó valores menores.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de esterasas de *F. culmorum*.

Parámetro	<i>Fusarium culmorum</i>		
	Medios de Cultivo		
	SAF	1500	2000
μ (h^{-1})	0.04 ^c (0.001)	0.06 ^b (0.004)	0.08 ^a (0.006)
X_{max} (g/L)	5.6 ^b (0.04)	7.1 ^a (0.03)	8.1 ^a (0.23)
E_{max} (U/L)	70.5 ^c (45)	124.2 ^b (24)	208.5 ^a (19)
$Y_{x/s}$ (gX gS ⁻¹)	0.6 ^a (0.001)	0.7 ^a (0.001)	0.8 ^a (0.001)
$Y_{E/X}$ (U gX ⁻¹)	12.6 ^b (0.5)	17.5 ^b (0.24)	25.7 ^a (0.8)
P_{RO} (UL ⁻¹ h ⁻¹)	0.7 ^b (0.003)	0.7 ^b (0.002)	4.3 ^a (0.001)
q_p (U h ⁻¹ gX ⁻¹)	0.5 ^b (0.001)	1.1 ^a (0.002)	2.1 ^a (0.001)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

8.1.5. Cuantificación de azúcares residuales

En la Figura 9 se observa que para el medio SAF la glucosa inicial se consumió casi completamente después de 36 h; este tiempo coincide con la fase exponencial de crecimiento del hongo. Para los medios que contenían 1500 y 2000 mg de DBF/L, se observó que aproximadamente a las 46 horas la concentración de glucosa disminuyó casi a cero y coincide con la fase exponencial de crecimiento del hongo.

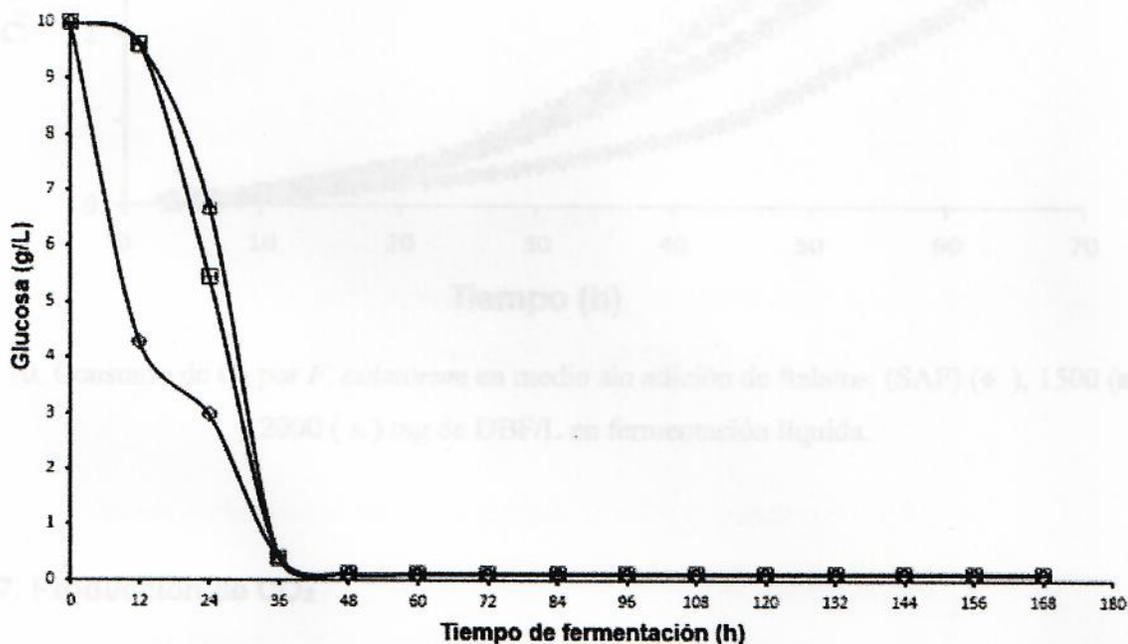


Fig. 9. Consumo de glucosa de *F. culmorum* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (◇), 1500 (□) y 2000 (Δ) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.1.6. Consumo de O₂

En la Figura 10 se muestran los resultados del consumo de O₂ de la cepa *F. culmorum* utilizando la técnica de respirometría en un medio sin adición de DBF, con 1500 y 2000 mg de DBF/L. El medio sin adición de DBF presentó la menor consumo de O₂ (2.6 mg/mL) en comparación con los medios que contenían DBF. Los medios que contenían 1500 y 2000 mg de DBF/L presentaron mayor consumo de O₂ (4.1 y 4.9 respectivamente).

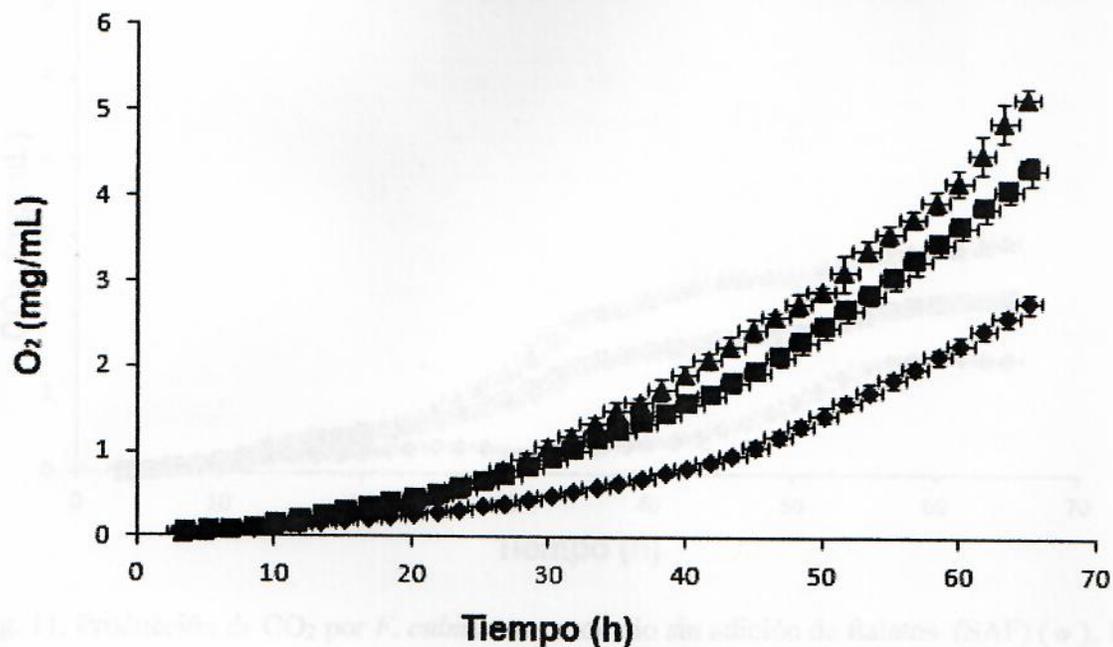


Fig. 10. Consumo de O₂ por *F. culmorum* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (◆), 1500 (■) y 2000 (▲) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.1.7. Producción de CO₂

Se utilizó la técnica de respirometría para evaluar el CO₂ producido durante el crecimiento de la cepa *F. culmorum* en un medio con diferentes concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg de DBF/L). En la figura 11 se observa que la cepa de *F. culmorum* presentó menor producción de CO₂ en el medio SAF (1.5 mg/mL) en comparación con los medios que contenían 1500 y 2000 mg de DBF. El medio que contenía la concentración de 2000 mg de DBF/L presentó mayor producción de CO₂ (2.9 mg/mL) en comparación con el medio con 1500 mg de DBF (2.2 mg/mL).

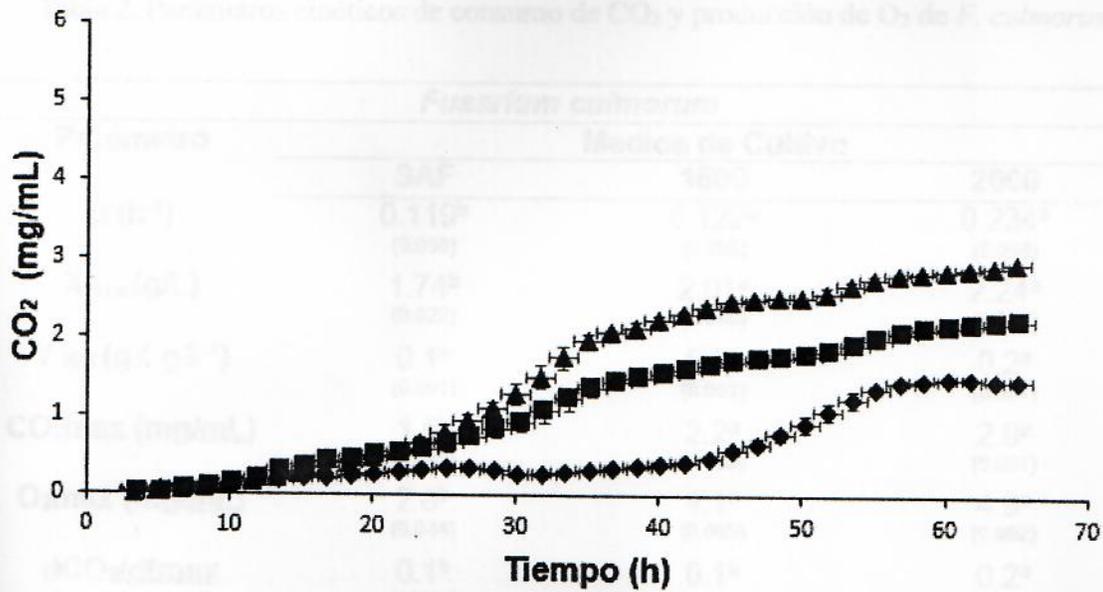


Fig. 11. Producción de CO₂ por *F. culmorum* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (◆), 1500 (■) y 2000 (▲) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.1.8 Parámetros cinéticos de producción de CO₂ y consumo de O₂

En la tabla 2 se presentan los parámetros cinéticos de producción de CO₂ y consumo de O₂ en un medio con diferentes concentraciones de DBF. El medio sin adición de DBF presentó una mayor μ en comparación con el medio SAF y 1500 mg de DBF. De acuerdo a la X_{max} , el medio con 2000 mg de DBF tuvo la mayor X_{max} en comparación con el medio SAF y 1500 mg de DBF. De acuerdo a los parámetros de producción de CO₂ y consumo de O₂ fueron mayores en los medios que contenían el DBF en comparación con el medio SAF que presentó valores menores. En los valores de producción de CO₂ y consumo de O₂ se observó que entre las concentraciones de 1500 y 2000 mg de DBF/L no existe una diferencia estadística, en comparación con el medio SAF que si presentó una diferencia estadística en comparación con el medio con concentraciones de DBF.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de consumo de CO₂ y producción de O₂ de *F. culmorum*.

Parámetro	<i>Fusarium culmorum</i>		
	Medios de Cultivo		
	SAF	1500	2000
μ (h ⁻¹)	0.119 ^b (0.050)	0.122 ^b (0.095)	0.234 ^a (0.094)
X _{max} (g/L)	1.74 ^b (0.022)	2.01 ^a (0.046)	2.24 ^a (0.044)
Y _{X/S} (gX gS ⁻¹)	0.1 ^b (0.001)	0.2 ^a (0.001)	0.2 ^a (0.001)
CO ₂ max (mg/mL)	1.5 ^b (0.023)	2.2 ^a (0.035)	2.9 ^a (0.081)
O ₂ max (mg/mL)	2.6 ^b (0.044)	4.1 ^a (0.069)	4.9 ^a (0.092)
dCO ₂ /dtmax (mg/mL .h)	0.1 ^b (0.001)	0.1 ^b (0.001)	0.2 ^a (0.001)
dO ₂ /dtmax (mg/mL .h)	0.1 ^b (0.001)	0.2 ^a (0.001)	0.2 ^a (0.001)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

8.2. *Neurospora sitophila*

En el presente capítulo se muestran los resultados de la cepa de *N. sitophila* en un medio con diferentes concentraciones de DBF.

8.2.1. Crecimiento

La cepa *N. sitophila* se creció en un medio de cultivo con tres concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg/L) en una fermentación líquida y se desarrolló durante 5 días de fermentación (120 h). *N. sitophila* presentó tres fases de crecimiento durante el tiempo de fermentación (fase de adaptación, exponencial y estacionaria) (Fig. 12). *N. sitophila* presentó su máxima producción de biomasa a las 88 h obteniendo una X_{max} de 4.85 g/l y una μ de 0.064 h⁻¹ en el medio SAF. El medio que contenía 1500 mg de DBF/L, alcanzó su máxima producción de biomasa a las 88 h, obteniendo una X_{max} de 5.84 g/l y una μ de 0.078 h⁻¹.

El medio con 2000 mg de DBF/L presentó una X_{max} de 6.00 g/l y una μ de 0.064 h⁻¹ a las 88 h de incubación.

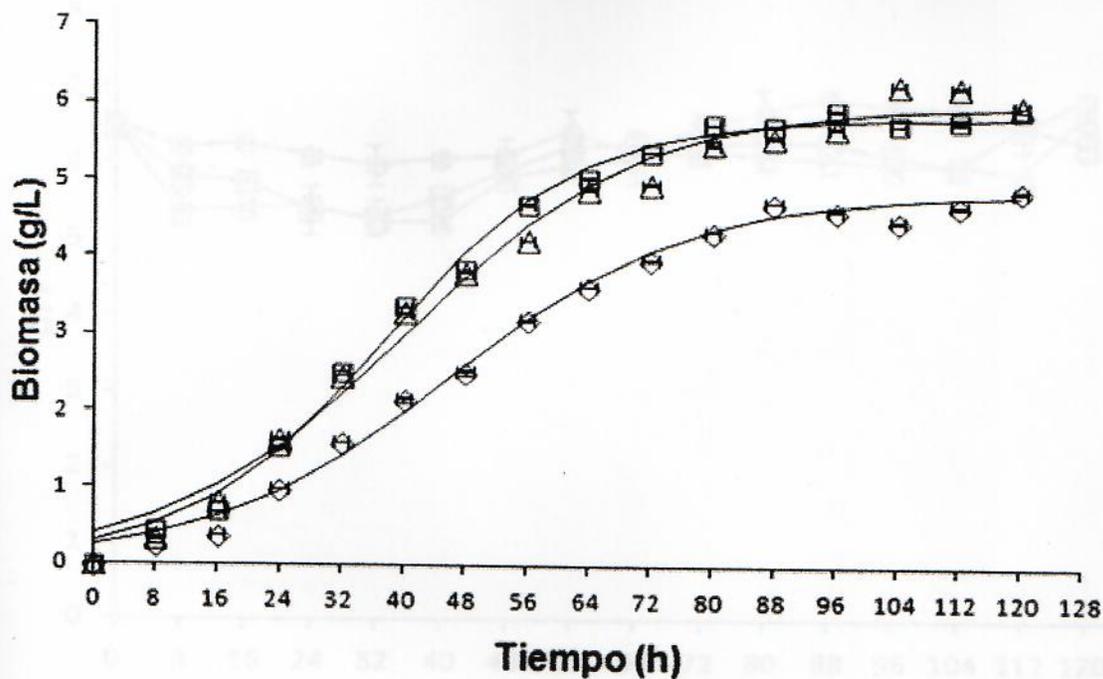


Fig. 12. Crecimiento de *N. sitophila* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (◇), 1500 (□) y 2000 (△) mg de DBF/L en fermentación líquida. Línea continua (—) corresponde a los datos ajustados usando la ecuación logística (ecuación 1) mostrando la desviación estándar.

8.2.2. pH

La cepa *N. sitophila* se desarrolló en un medio de cultivo con tres diferentes concentraciones de DBF y se les ajustó el pH a 6.5. En el medio SAF se observó un pH inicial de 6.1 a las 50 h de incubación, a las 120 h de incubación el pH del medio de cultivo fue de 6.8 como se muestra en la Fig.13.

El medio que contenía 1500 mg de DBF/L presentó un pH inicial de 5.3 a las 50 h de incubación, se observó que conforme pasaron los días de fermentación el pH del medio de cultivo fue de 7.01.

El medio que contenía 2000 mg de DBF/L presentó un pH de 5.4 a las 40 h de incubación, conforme pasaron los días de fermentación el pH del medio cambió y a las 120 h de incubación el pH fue de 7.1.

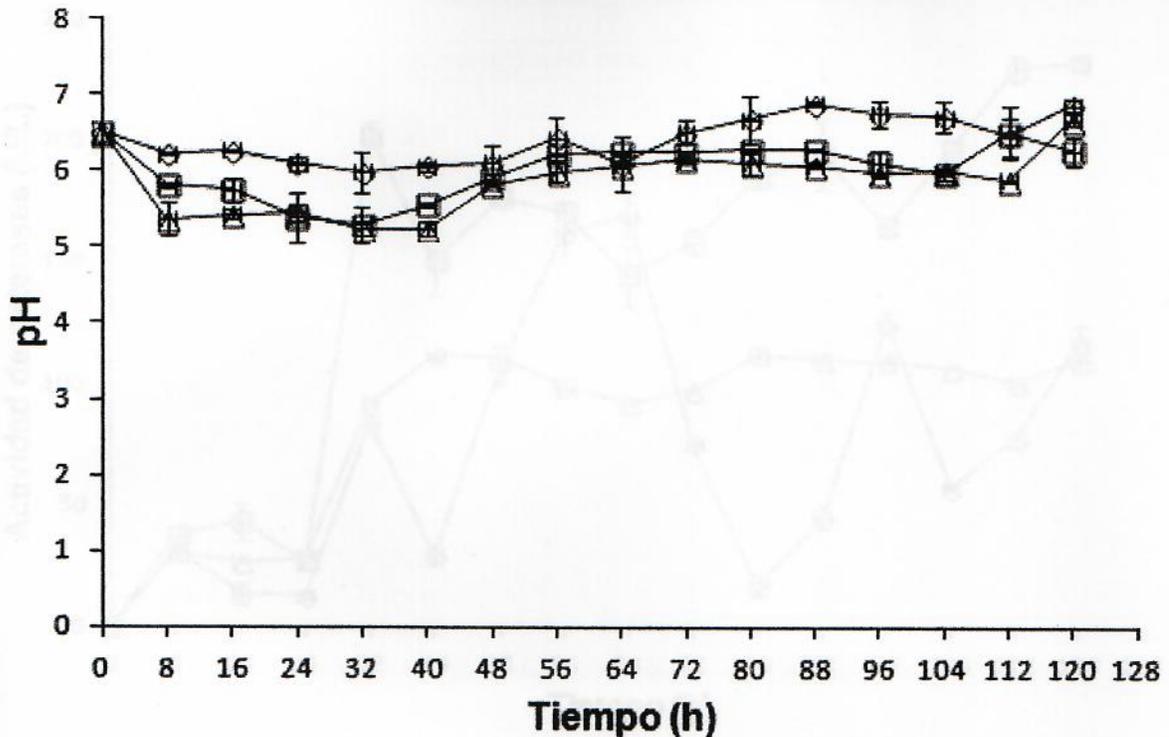


Fig. 13. pH de *N. sitophila* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (\diamond), 1500 (\square) y 2000 (Δ) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.2.3. Actividad enzimática de esterases

De acuerdo a la actividad enzimática de estererasas se observó que en los medios que contenían 1500 y 2000 mg de DBF/L se obtuvo una mayor actividad enzimática de estererasas (Fig. 14).

El medio con 2000 mg de DBF/L presentó una actividad enzimática de estererasas de 138.1 U/L. El medio SAF presentó una actividad enzimática de estererasas de 169.8 U/L. El medio de cultivo con 1500 mg de DBF/L obtuvo una actividad de enzimas estererasas (265.8 U/L), el medio con 1500 mg de DBF/L presentó la mayor actividad de estererasas en comparación con los medios de SAF y 2000 mg de DBF/L.

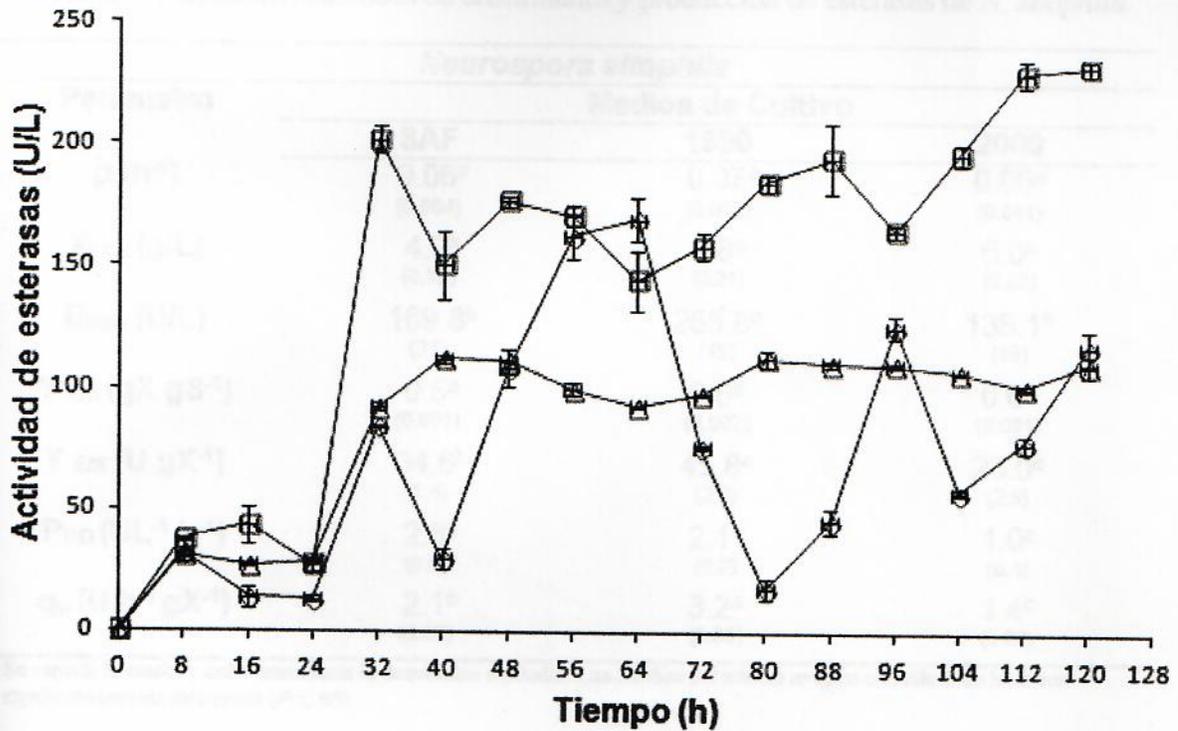


Fig. 14. Actividad enzimática de estererasas de *N. sitophila* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (\diamond), 1500 (\square) y 2000 (Δ) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.2.4. Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de estererasas

En la tabla 3 se observó que los valores de la μ fueron estadísticamente iguales para las tres concentraciones. La X_{max} fue mayor en los medios con 1500 y 2000 mg de DBF/L. De acuerdo al rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) fue estadísticamente igual para los tres medios de cultivo. La E_{max} y el $Y_{E/X}$ presentaron valores mayores en el medio con 1500 mg de DBF/L. La productividad de la enzima (P_{RO}) fue mayor en el medio SAF. En cuanto a la tasa específica de formación de la enzima (q_p) fue mayor en el medio con 1500 mg de DBF/L.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de esterases de *N. sitophila*.

Parámetro	<i>Neurospora sitophila</i>		
	Medios de Cultivo		
	SAF	1500	2000
μ (h ⁻¹)	0.06 ^a (0.004)	0.07 ^a (0.002)	0.06 ^a (0.001)
X _{max} (g/L)	4.9 ^b (0.12)	5.8 ^a (0.21)	6.0 ^a (0.22)
E _{max} (U/L)	169.8 ^b (21)	265.8 ^a (15)	138.1 ^b (19)
Y _{X/S} (gX gS ⁻¹)	0.5 ^a (0.001)	0.6 ^a (0.002)	0.6 ^a (0.001)
Y _{E/X} (U gX ⁻¹)	34.6 ^b (1.4)	45.8 ^a (2.2)	23.0 ^c (2.9)
P _{RO} (UL ⁻¹ h ⁻¹)	2.6 ^a (0.6)	2.1 ^b (0.2)	1.0 ^c (0.4)
q _p (U h ⁻¹ gX ⁻¹)	2.1 ^b (0.02)	3.2 ^a (0.03)	1.4 ^c (0.02)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

8.2.5. Cuantificación de azúcares residuales de *N. sitophila*.

En la Figura 15 se observa el consumo de la glucosa de *N. sitophila* crecida en un medio con diferentes concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg/L). El medio SAF consumió la glucosa a las 56 h cuando el hongo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento. Los medios con 1500 y 2000 mg de DBF/L consumieron la glucosa a las 24 horas de fermentación.

8.3.1. Crecimiento

La cepa *F. oxysporum* se desarrolló en un medio de cultivo con tres diferentes concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg/L) (Fig. 16). *F. oxysporum* se desarrolló normal 7 días de fermentación (168 h). *F. oxysporum* presentó tres fases de crecimiento (fase de adaptación, exponencial y estacionaria) en los tres concentraciones de DBF.

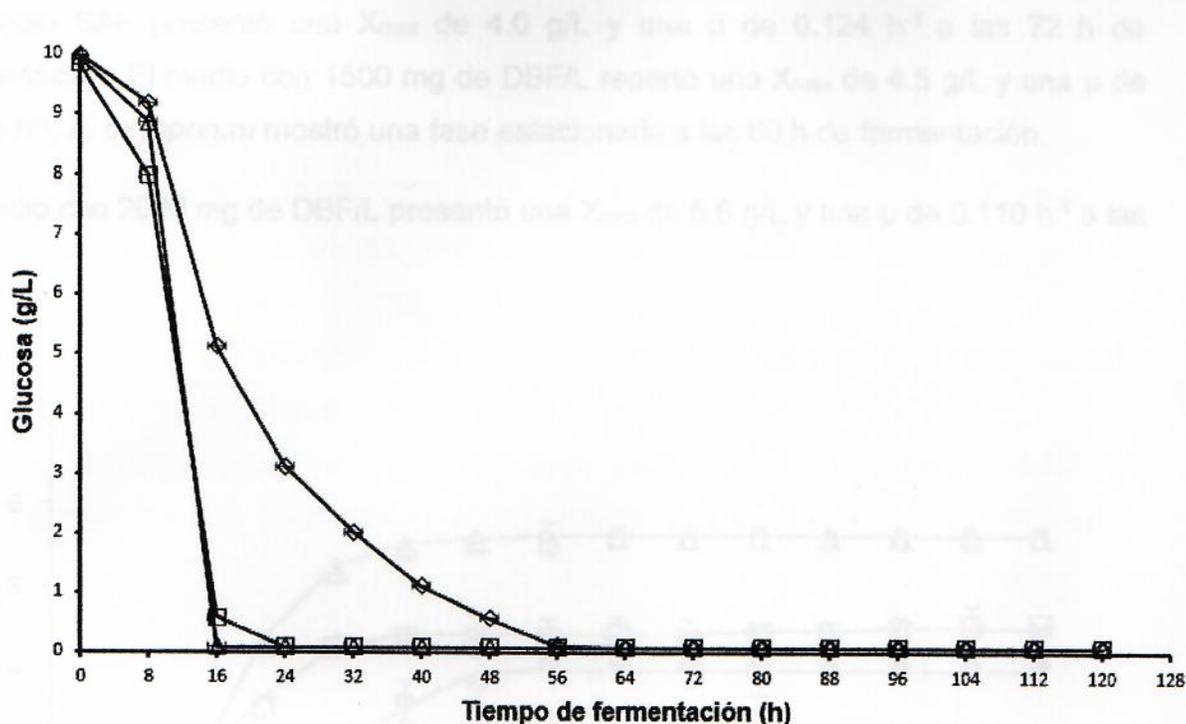


Fig. 15. Consumo de glucosa de *N. sitophila* en medio sin adición de fitatos (SAF) (◇), 1500 (□) y 2000 (△) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.3. *Fusarium oxysporum*

En el presente capítulo se muestran los resultados de la cepa de *F. oxysporum* en un medio con diferentes concentraciones de DBF.

8.3.1. Crecimiento

La cepa *F. oxysporum* se desarrolló en un medio de cultivo con tres diferentes concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg/L) (Fig. 16). *F. oxysporum* se desarrolló durante 7 días de fermentación (168 h). *F. oxysporum* presentó tres fases de crecimiento (fase de adaptación, exponencial y estacionaria) en las tres concentraciones de DBF.

El medio SAF presentó una X_{max} de 4.0 g/L y una μ de 0.124 h⁻¹ a las 72 h de fermentación. El medio con 1500 mg de DBF/L reportó una X_{max} de 4.5 g/L y una μ de 0.055 h⁻¹, *F. oxysporum* mostró una fase estacionaria a las 60 h de fermentación.

El medio con 2000 mg de DBF/L presentó una X_{max} de 5.6 g/L y una μ de 0.110 h⁻¹ a las 60 h.

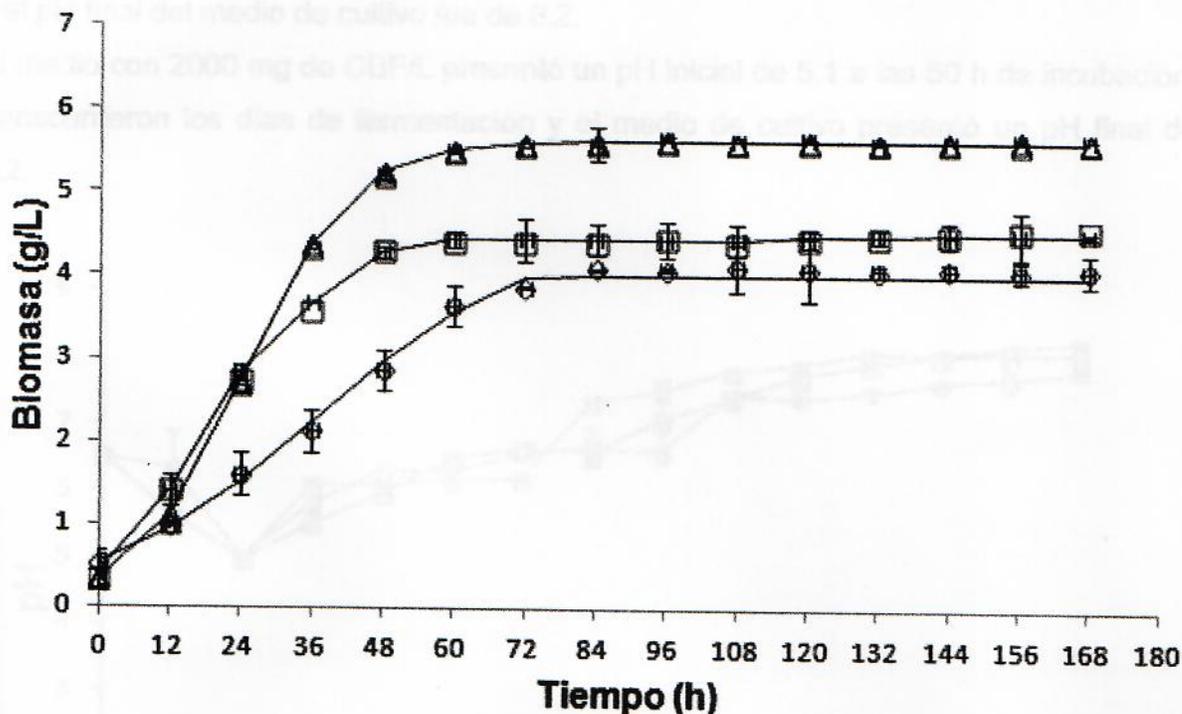


Fig. 16. Crecimiento de *F. oxysporum* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (◇), 1500 (□) y 2000 (△) mg de DBF/L en fermentación líquida. Línea continua (—) corresponde a los datos ajustados usando la ecuación logística (ecuación 1) mostrando la desviación estándar.

8.3.2 pH

La cepa *F. oxysporum* se desarrolló en un medio de cultivo con tres diferentes concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg/L), se les ajustó el pH a 6.5. Como se muestra en la Fig.17, el medio SAF reportó un pH inicial de 5.2 a las 30 h de incubación, y a las 110 h de incubación el pH fue de 7.4.

El medio con 1500 mg de DBF/L presentó un pH inicial de 5.1 a las 50 h de incubación y el pH final del medio de cultivo fue de 8.2.

El medio con 2000 mg de DBF/L presentó un pH inicial de 5.1 a las 50 h de incubación, transcurrieron los días de fermentación y el medio de cultivo presentó un pH final de 8.2.

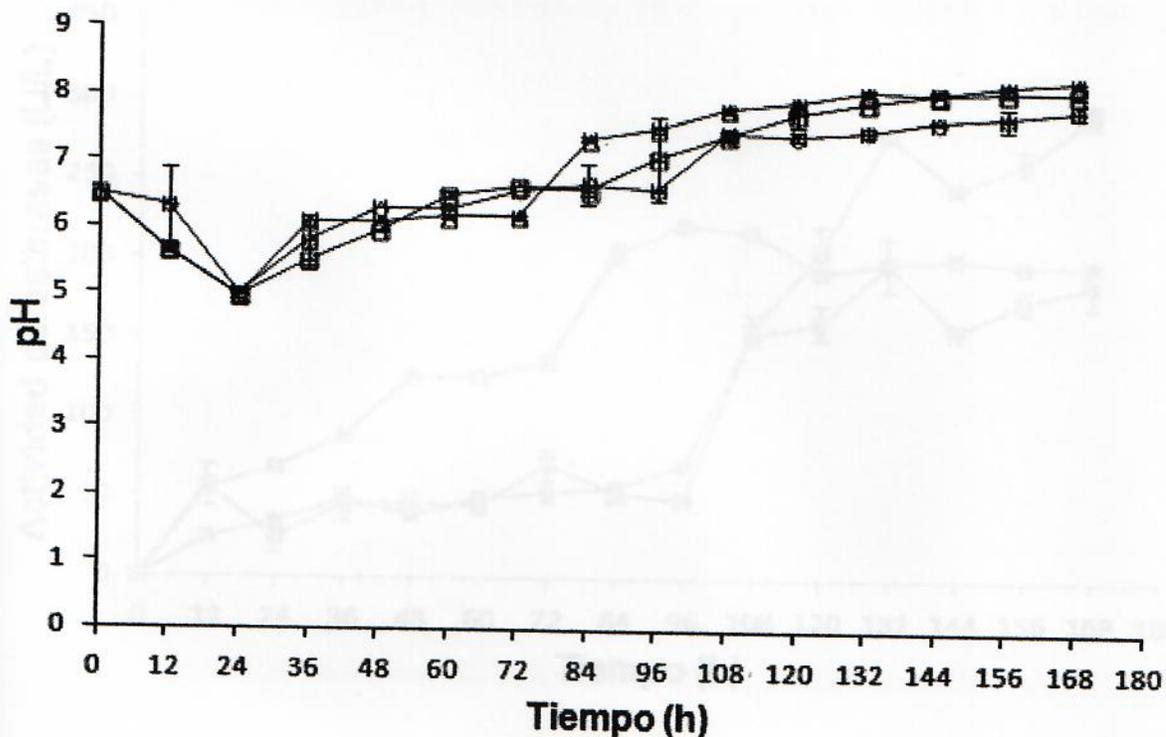


Fig. 17. pH de *F. oxysporum* en medio sin adición de italatos (SAF) (◇), 1500 (□) y 2000 (△) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.3.3. Actividad enzimática de esterases

En la Fig. 18, se observan las actividades enzimáticas del hongo *F. oxysporum* desarrollado en diferentes concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg/L). El medio SAF (201.17 U/L) reportó menor actividad enzimática de esterases en relación con el medio de cultivo con 1500 mg de DBF/L (309.17 U/L).

El medio con 2000 mg de DBF/L presentó mayor actividad enzimática de esterases (222.7 U/L) en comparación con el medio SAF. Los medios con DBF presentaron la mayor producción de enzimas esterases a las 110 h de fermentación.

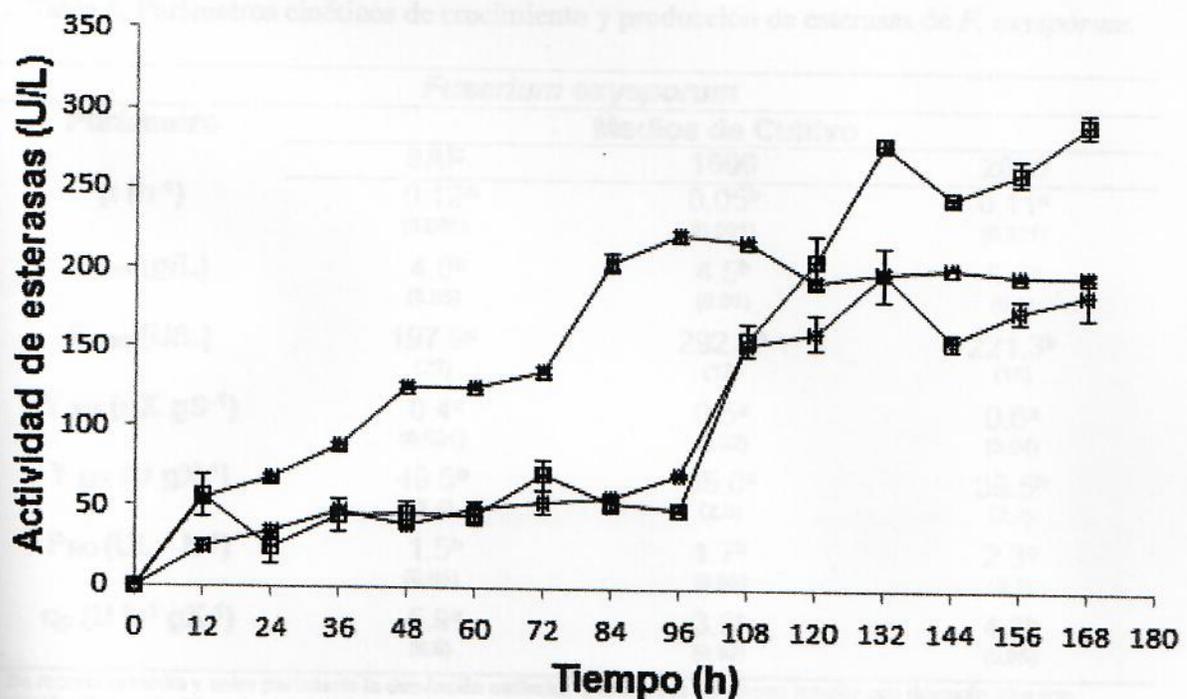


Fig. 18. Actividad enzimática de esterases de *F. oxysporum* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (\diamond), 1500 (\square) y 2000 (\triangle) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.3.4. Parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de esterases

En la Tabla 4, se observan los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de esterases para la cepa de *F. oxysporum* en diferentes concentraciones de DBF. El medio con 2000 mg de DBF/L presentó una μ y X_{max} mayor en comparación con los medios SAF y 1500 mg de DBF/L.

En cuanto al rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) no fue estadísticamente diferente en las tres concentraciones de DBF. De acuerdo al rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) y la productividad de la enzima (P_{RO}) fueron mayores en los medios con 1500 y 2000 mg de DBF/L.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de esterases de *F. oxysporum*.

Parámetro	<i>Fusarium oxysporum</i>		
	Medios de Cultivo		
	SAF	1500	2000
μ (h^{-1})	0.12 ^a (0.001)	0.05 ^b (0.001)	0.11 ^a (0.001)
X_{max} (g/L)	4.0 ^b (0.05)	4.5 ^b (0.01)	5.6 ^a (0.1)
E_{max} (U/L)	197.9 ^c (29)	292.5 ^a (12)	221.3 ^b (18)
$Y_{x/s}$ (gX gS ⁻¹)	0.4 ^a (0.001)	0.5 ^a (0.02)	0.6 ^a (0.04)
$Y_{E/X}$ (U gX ⁻¹)	49.5 ^b (1.4)	65.0 ^a (2.5)	39.5 ^b (2.2)
P_{RO} (UL ⁻¹ h ⁻¹)	1.5 ^b (0.05)	1.7 ^b (0.05)	2.3 ^a (0.1)
q_p (U h ⁻¹ gX ⁻¹)	5.9 ^a (0.6)	3.3 ^c (0.02)	4.3 ^b (0.05)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

8.3.5. Cuantificación de azúcares residuales

En la Figura 19 se observa el consumo de glucosa del hongo *F. oxysporum* en un medio con tres diferentes concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg/L). *F. oxysporum* consumió toda la glucosa a las 40 h de fermentación en los tres medios de cultivo (SAF, 1500 y 2000 mg de DBF/L), este tiempo coincide con el inicio de la fase exponencial de crecimiento del hongo.

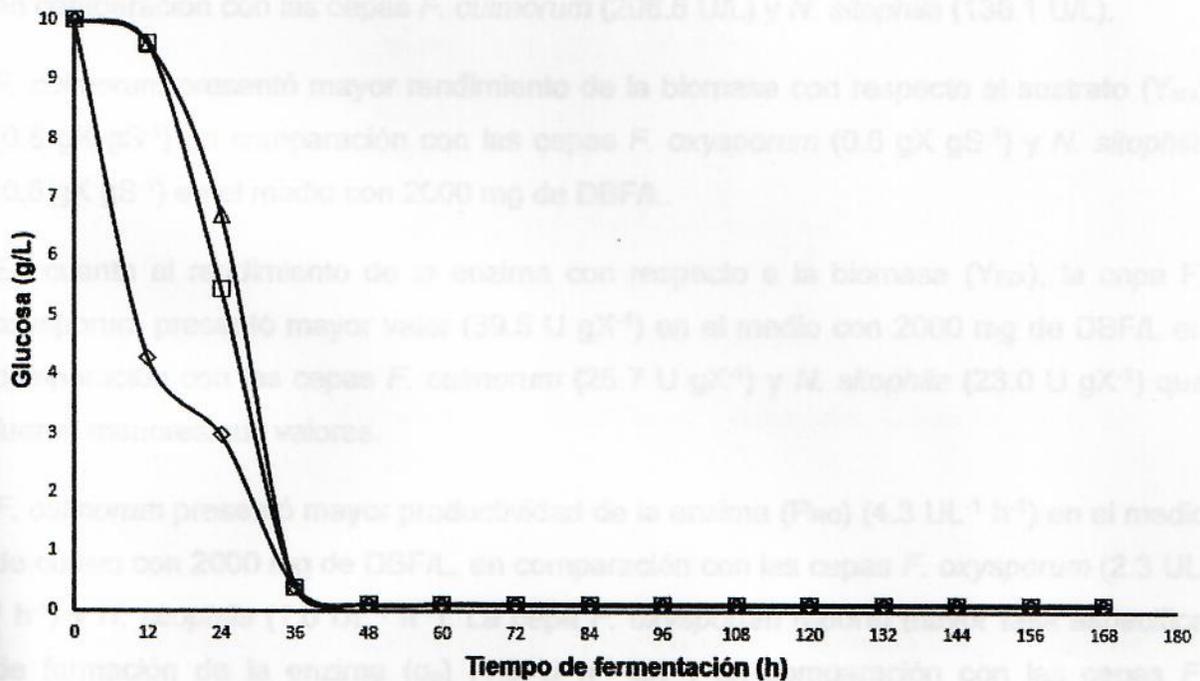


Fig. 19. Consumo de glucosa de *F. culmorum* en medio sin adición de ftalatos (SAF) (◇), 1500 (◻) y 2000 (△) mg de DBF/L en fermentación líquida.

8.4 Comparación entre cepas

En la Figura 20, se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de enzimas esterases de las tres cepas de *F. culmorum*, *N. sitophila* y *F. oxysporum*.

F. oxysporum presentó mayor μ (0.11 h^{-1}) en el medio con 2000 mg de DBF/L en comparación con las cepas *F. culmorum* (0.08 h^{-1}) y *N. sitophila* (0.06 h^{-1}) que fueron de menor valor.

La cepa *F. culmorum* presentó mayor X_{\max} (8.1 g/L) en el medio con 2000 mg de DBF/L en comparación con las cepas *F. oxysporum* (5.6 g/L) y *N. sitophila* (6.0 g/L). *F. oxysporum* reportó mayor E_{\max} (221.3 U/L) en la concentración de 2000 mg de DBF/L en comparación con las cepas *F. culmorum* (208.5 U/L) y *N. sitophila* (138.1 U/L).

F. culmorum presentó mayor rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) (0.8 gX gS^{-1}) en comparación con las cepas *F. oxysporum* (0.6 gX gS^{-1}) y *N. sitophila* (0.6 gX gS^{-1}) en el medio con 2000 mg de DBF/L.

En cuanto al rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$), la cepa *F. oxysporum* presentó mayor valor (39.5 U gX^{-1}) en el medio con 2000 mg de DBF/L en comparación con las cepas *F. culmorum* (25.7 U gX^{-1}) y *N. sitophila* (23.0 U gX^{-1}) que fueron menores sus valores.

F. culmorum presentó mayor productividad de la enzima (P_{RO}) ($4.3 \text{ UL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en el medio de cultivo con 2000 mg de DBF/L, en comparación con las cepas *F. oxysporum* ($2.3 \text{ UL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y *N. sitophila* ($1.0 \text{ UL}^{-1} \text{ h}^{-1}$). La cepa *F. oxysporum* reportó mayor tasa específica de formación de la enzima (q_p) ($4.3 \text{ U h}^{-1} \text{ gX}^{-1}$) en comparación con las cepas *F. culmorum* ($2.1 \text{ U h}^{-1} \text{ gX}^{-1}$) y *N. sitophila* ($1.4 \text{ U h}^{-1} \text{ gX}^{-1}$).

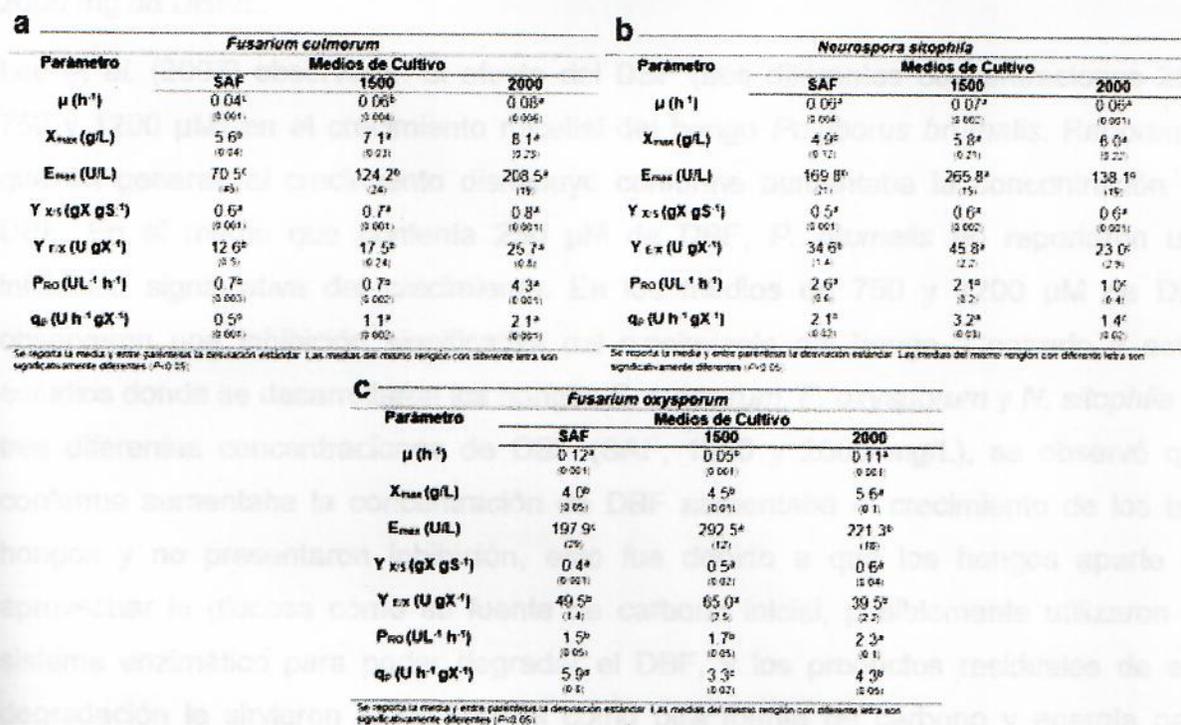


Fig. 20. Comparación de los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de enzimas esterases de *F. culmorum* (a), *N. sitophila* (b) y *F. oxysporum* (c) en medio sin adición de fitatos (SAF), 1500 y 2000 mg de DBF/L en fermentación líquida.

9. DISCUSIÓN

La fermentación líquida incluye una gran variedad de procesos microbiológicos con agitación y sin agitación, donde la biomasa está rodeada completamente por el medio de cultivo líquido (Fazenda *et al.* 2008). Existen variantes de este tipo de fermentación, donde las condiciones iniciales de cultivo se modifican debido al crecimiento del microorganismo, afectando el contenido final de las fuentes de carbono y nitrógeno, el pH del medio de cultivo y la cantidad de biomasa presente, incluyendo los metabolitos producidos a través del tiempo (Fazenda *et al.* 2008). En esta investigación se estudió el crecimiento de los hongos fitopatógenos *F. culmorum*, *F. oxysporum* y *N. sitophila* en

tres medios de cultivo diferentes SAF, medio conteniendo 1500 y medio conteniendo 2000 mg de DBF/L.

Lee *et al.* (2007) observaron el efecto del DBF (tres diferentes concentraciones 250, 750 y 1200 μM) en el crecimiento micelial del hongo *Polyporus brumalis*. Reportaron que en general, el crecimiento disminuyó conforme aumentaba la concentración de DBF. En el medio que contenía 250 μM de DBF, *P. brumalis* no reportaron una inhibición significativa del crecimiento. En los medios de 750 y 1200 μM de DBF observaron una inhibición significativa del crecimiento del hongo. Contrario a estos estudios donde se desarrollaron los hongos *F. culmorum*, *F. oxysporum* y *N. sitophila* en tres diferentes concentraciones de DBF (SAF, 1500 y 2000 mg/L), se observó que conforme aumentaba la concentración de DBF aumentaba el crecimiento de los tres hongos y no presentaron inhibición, esto fue debido a que los hongos aparte de aprovechar la glucosa como su fuente de carbono inicial, posiblemente utilizaron su sistema enzimático para poder degradar el DBF, y los productos residuales de esa degradación le sirvieron a los hongos como otra fuente de carbono y energía para continuar creciendo y producir mayor biomasa.

En cuanto a los valores de pH de los medios de cultivo (SAF, 1500 y 2000 mg DBF/L), se observó que en los primeros días de fermentación disminuyó el pH debido a la liberación de compuestos ácidos en el medio de cultivo, producto del metabolismo de los hongos que consumieron y degradaron la glucosa, así como también posiblemente el DBF, y conforme transcurrió el tiempo de fermentación, el pH aumento a rangos de 7.1 a 7.4, esto, debido a la secreción de ciertas enzimas al medio de cultivo y como consecuencia lisaron algunas proteínas presentes, liberando algunos compuestos aminados que modificaron el pH del medio de cultivo a 7.5, de acuerdo a Yeo *et al.* 2007, el valor óptimo reportado para la producción de enzimas esterases en estos hongos es de 7.0 a 8.5. Ahuactzin *et al.* (2014) realizaron estudios de degradación de DBF empleando las cepas *Neurospora sitophila*, *Hypocrea lixxi* y *Aspergillus niger* en un medio con 1000 mg de DBF/L, evaluaron el pH del medio de cultivo y observaron que conforme avanzaban los días de fermentación el pH de los medios de cultivo disminuyó llegando a rangos de 4.6- 4.5, debido a la liberación de mayor número de compuestos ácidos, producto del consumo de la glucosa y la degradación del DBF.

Córdoba *et al.* (2014) evaluaron la actividad de enzimas esterasas del hongo *Pleurotus ostreatus* en diferentes concentraciones de DEHF (750, 1200 y 1500 mg/L), observaron que en el medio que contenía 1500 mg de DBF/L presentó la mayor actividad de enzimas esterasas (188 U/L) y fue durante la fase estacionaria de crecimiento, también, González- Márquez *et al.* 2015, evaluaron la actividad enzimática de esterasas del hongo *Lentinula edodes* desarrollado en un medio con tres concentraciones de DEHF (750, 1200 y 1500 mg/L), *L. edodes* presentó mayor actividad de enzimas esterasas en el medio con 1500 mg de DEHF/L. En esta investigación, se observó que los hongos *F. culmorum*, *F. oxysporum* y *N. sitophila* presentaron mayor actividad de enzimas esterasas en los medios que contenían 1500 y 2000 mg de DBF/L, *F. culmorum* y *F. oxysporum* presentaron hasta 204 U/L de esterasas, entonces el DBF no inhibió la producción de esterasas aun en presencia de mayores concentraciones del DBF, al contrario participó como inductor de estas enzimas, esto se le puede atribuir a que la célula fúngica reconoció que debe secretar mayor número de enzimas al medio debido a la presencia del DBF, las enzimas esterasas reconocieron los enlaces ester del DBF y lo hidrolizaron, por lo cual los productos residuales de la degradación pudieron ser asimilados por los hongos como una fuente de carbono y energía para continuar creciendo y producir más enzimas.

De acuerdo con los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento (μ , X_{max} ,) y de rendimiento y producción de esterasas (E_{max} , $Y_{x/s}$, $Y_{E/x}$, P_{RO} , q_p), se observó que las cepas de *F. culmorum* y *F. oxysporum* presentaron valores mayores en los medios que contenían 1500 y 2000 mg de DBF/L en comparación con la cepa *N. sitophila*, debido a que las cepas de *Fusarium* posiblemente presentan mejor maquinaria enzimática que la cepa de *N. sitophila*. Las cepas de *fusarium* secretan mayor número de enzimas esterasas debido a que actúan hidrolizando la cutina que se encuentra en la cutícula de las pared celular de las plantas, promoviendo la patogenicidad hacia la planta. El DBF estructuralmente está formado por un anillo aromático unido estéricamente a dos cadenas carboxiladas por lo cual, las enzimas esterasas pueden actuar hidrolizando el enlace ester del DBF e iniciar el proceso de degradación del compuesto, los residuos que se generen de dicha degradación podrían ser aprovechados por el hongo como una fuente de carbono y energía. Díaz *et al.* (2013) realizó estudios empleando la cepa

P. ostreatus, el hongo lo desarrolló en un medio con diferentes pH (3.5, 4.5, 6.5 y 8.5), también evaluó la producción de enzimas lacasas en los diferentes medios y determinó los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de enzimas lacasas. La cepa *P. ostreatus* presentó mayores valores de los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de enzimas lacasas a un pH de 8.5, comparando con nuestro trabajo, el pH es óptimo para la actividad enzimática de esterases.

De acuerdo al consumo de glucosa se observó que las tres cepas de hongos están aprovechando la glucosa como fuente de carbono inicial para poder crecer y producir biomasa, además que por otra parte estos hongos pudieran estar degradando el DBF a través de la secreción de enzimas esterases haciendo estos compuestos más asimilables para el hongo, incorporándolos también en sus procesos metabólicos para continuar creciendo. Un estudio realizado por Guillén-Navarro, 1998 evaluaron la producción de biomasa y el rendimiento de la biomasa con respecto del sustrato ($Y_{x/s}$) del hongo *P. ostreatus* desarrollado en diferentes concentraciones de glucosa (0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 20 g/L). *P. ostreatus* reportó menor biomasa y menor ($Y_{x/s}$) en comparación con las cepas *F. culmorum* y *F. oxysporum*.

En esta investigación se evaluó el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, los valores indican que el hongo *F. culmorum* llevó a cabo procesos metabólicos de degradación y asimilación de los sustratos disponibles en los medios de cultivo principalmente de la glucosa, la cual utilizó durante su fase exponencial de crecimiento para la producción de biomasa y para la secreción de enzimas que ayudaran a la degradación del DBF presente en el cultivo, los productos de esa degradación pudieron ser asimilables por el hongo y poder incorporarlos a su metabolismo y continuar creciendo y produciendo biomasa. En un estudio realizado por Vasquez- Vanegas, 2013 evaluaron el consumo de O_2 y producción de CO_2 de un hongo ascomiceto (*Aspergillus* sp.) en una fermentación líquida, la cepa de *Aspergillus* sp. reportó menor μ ($0.104^{h^{-1}}$) en comparación con las cepas *F. culmorum*, *F. oxysporum* y *N. sitophila*. Las cepas empleadas en nuestro trabajo posiblemente presentaran una mejor maquinaria enzimática que *Aspergillus* sp para la degradación de sustratos.

10. CONCLUSIONES

Las tres cepas de hongos fueron capaces de crecer y producir mayor biomasa en los medios adicionados con 1500 y 2000 mg de DBF/L empleando una fermentación líquida, el DBF no inhibió el crecimiento.

El pH de los medios de cultivo fue básico para las tres cepas de hongos al final de los días de fermentación y el pH que se reportó es el óptimo para el crecimiento de los tres hongos.

La actividad de esterasas de *F. culmorum*, *N. sitophila* y *F. oxysporum* incremento en los medios adicionados con DBF, la fermentación líquida permitió obtener una muestra de las enzimas secretadas al medio de cultivo.

Las cepas de *F. culmorum* y *F. oxysporum* secretaron mayor cantidad de enzimas esterasas en los medios que contenían 1500 y 2000 mg de DBF/L.

Las tres cepas de hongos consumieron la glucosa como fuente de carbono inicial durante su fase de crecimiento (fase exponencial).

F. culmorum presentó mayor producción de CO₂ y mayor consumo de O₂ en el medio que contenía 2000 mg de DBF/L durante su fase de crecimiento, esto debido a que estaba aprovechando la glucosa del medio de cultivo.

11. REFERENCIAS

- Ahuactzin-Pérez M, Torres-García JL, Rodríguez-Pastrana BR, Soriano-Santos J, Díaz-Godínez G, Sánchez C. (2014). Fungal biodegradation of dibutyl phthalate and toxicity of its breakdown products on the basis of fungal and bacterial growth. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 30:2811-9.
- Akar T y Divriklioglu M. (2010). Biosorption applications of modified fungal biomass for decolorization of Reactive Red 2 contaminated solutions: Batch and dynamic flow mode studies. *Bioresource Technology* 101(19):7271-7277.
- Aurela B, Kulmala H y Soderhjelm L. (1999). Phthalates in paper and board packaging and their migration into Tenax and sugar. *Food Additives Contaminants* 16:571-577.
- Badenes SM, Lemos F y Cabral JMS. (2010). Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. *Biotechnology Letters* 32: 399-403.
- Bosland PW. (1988). *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in plant pathology* 6: 281-289.
- Bove JL, Dalven P y Kukreja VP. (1978). Airborne di-butyl and di-(2-ethylhexyl)-phthalate at three New York City air sampling stations. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 5:189-194.
- Bustamante MP, Lizama SB y Olaíz FG. (2001). Ftalatos y efectos en la salud. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 17:205-215.
- Calderon F, Pavlova M. (2001). Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno DBO5. Método Respirométrico. Bogotá.
- Carvalho ML, Aires-Barros MR y Cabral JM. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnology and Bioengineering* 66:17-34.
- CERHR. (2006). NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, NTP-CERHR-DEHP-05. Available at <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/dehp/DEHP-Monograph>.

- Chai W, Suzuki M, Handa Y, Murakami M, Utsukihara T, Honma Y, Nakajima K, Saito M y Horiuchi CA. (2008). Biodegradation of Di-(2-ethylhexyl) phthalate by Fungi. *Report of National Food Research Institute* 72:83-87.
- Chaverri P y Samuels GJ. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:302-313.
- Conrad S, Sung G, Giráldez F, Townsend J, Miadlikowska J, Hofstetter V, Robbertse B, Matheny B, Kauff F, Wang Z, Gueidan C, Andrie R, Trippe K, Ciuffetti L, Wynns A, Fraker E, Hodkinson B, Bonito G, Groenewald J, Arzanlou M, Hoog S, Crous P, Hewitt D, Pfister D, Peterson K, Gryzenhout M, Wingfield M, Aptroot A, Suh S-O, Blackwell M, Hillis D, Griffith GW, Castlebury L, Rossman A, Lumbsch H., Ucking R, Boudel B, Rauhut A, Diederich P, Ertz D, Geiser D, Hosaka K, Inderbitzin P, Kohlmeyer J, Volkmann-kohlmeyer B, Mostert L, O'donnell K, Sipman H, Rogers J, Shoemaker R, Sugiyama J, Summerbell R, Untereiner W, Johnston P, Stenroos S, Zuccaro A, Dyer P, Crittenden P, Cole M, Hansen K, Trappe JM, Yahr R, Lutzon F y Spatafora JW. (2009). The Ascomycota Tree of life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Systematic Biology* 58(2):224-239.
- Córdoba-Sosa G, Torres JL, Ahuactzin-Pérez M, Díaz-Godínez G, Díaz R, Sánchez C. (2014). Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di (2-ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* 4:186-193.
- Díaz R, Tellez- Tellez, Sanchez C, Bibbins- Martínez MD, Díaz- Godínez G y Soriano- Santos J. (2013). Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 16: 262-270
- Europea de Sustancias Químicas (ECB). (2003). Summary risk assessment report (RAR 003) on dibutyl phthalate (DBP). *Green Facts*.
- Fazenda ML, Seviour R. (2008). Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances Applied Microbiology* 63:33-103.

- Furtmann K. (1994). Phthalates in surface water a method for routine trace level analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 348:291-296.
- Giam CS, Atlas E y Chang HS. (1980). Phthalate esters, PCB and DDT residues in the Gulf of Mexico atmosphere. *Atmospheric Environment* 14:65-69.
- González- Márquez A, Ahuactzin- Pérez M y Sánchez C. (2015). *Lentinula edodes* Grown on Di(2Ethylhexyl) phthalate containing media: mycelial growth and enzyme activities. *Bioresources* 10:7898-7906.
- Grimm L, Kelly S, Krull R, Hempel D. (2005). Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69:375-384.
- Guillén- Navarro GK, Márquez- Rocha FJ y Sánchez- Vázquez JE. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología* 15:302-306.
- Guisola A, Baeza JA, Carrera J y Lafuente FJ. (2004). Respirimetría con aireación continua. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Hashizume K, Nanya J, Toda C, Yasui T, Nagano H y Kojima N. (2002). Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalates by microbes isolated from river water. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25:209-214.
- Herrera T y Ulloa M. (1998). El reino de los hongos. En: *Micología básica y aplicada*. Editorial Fondo de Cultura Económica. México DF. P 552
- Huber W, Grasl-Kraupp B y Schulte-Hermann R. (1996). Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk. *Critical Reviews in Toxicology* 26:365-481.
- Hwang S, Soon-Seok K, Hyung T y Hong-Gyu S. (2008). Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *Journal Microbiology Biotechnology* 18(4):767-772.
- Hwang SS, Kim HY, Ja KO, Song HG. (2012). Changes in the activities of enzymes involved in the degradation of butylbenzyl phthalate by *Pleurotus ostreatus*. *Journal Microbiology Biotechnology* 22(2): 239-243.

- Ingraham J y Ingraham C. (1995). *Introducción a la Microbiología*. Editorial Reverte. Barcelona.
- Keml. (2000). Swedish Chemical Inspectorate. Information on substances. http://www.kemi.se/kemamne_eng/ftalater:eng.htm.
- Kendrick B. (1985). *The fifth kingdom. Mycology*. Waterloo, Ontario.
- Kim YH, Lee J y Moon SH. (2003). Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 75-80.
- Kim YH, Seo H, Min J, Kim Y, Ban Y, Han K, Park J, Bae K, Gu M y Lee J. (2006). Enhanced degradation and toxicity reduction of dehexyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. *pisi* cutinase. *Journal Applied Microbiology* 102:221-228.
- Kim YH, Seo HS, Min J, Kim YC, Ban YH, Han KY, Park KD, Bae MB y Lee J. (2007). Enhanced degradation and toxicity reduction of dihexyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi* cutinase. *Journal Applied Microbiology* 102: 221-228.
- Lee S, Lee J, Koo B, Kim M, Choi D y Choi I. (2007). Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus *Polyporus brumalis*. *Biotechnology Bioengineering* 97:1516-1522.
- Liang D, Zhang T, Herbert H y He J. (2008). Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology Biotechnology* 80:183-198.
- Madigan M, Martinko J y Parker M. (2005). *Brock. Biología de los microorganismos*. Editorial Pearson Educación. Madrid.
- Moreno SN, Ospina VXA. (2000). Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción deleando *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, DC.
- Nelson PE, Tammen R y Baker R. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In M. E. Mace, A. A: Bell and C. C. H. Beckman. (Eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press. New York. 51-80.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) In consultation with the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). 1992. *Enzyme Nomenclature*.

Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. Recuperado el 10 de junio, 2013, de <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

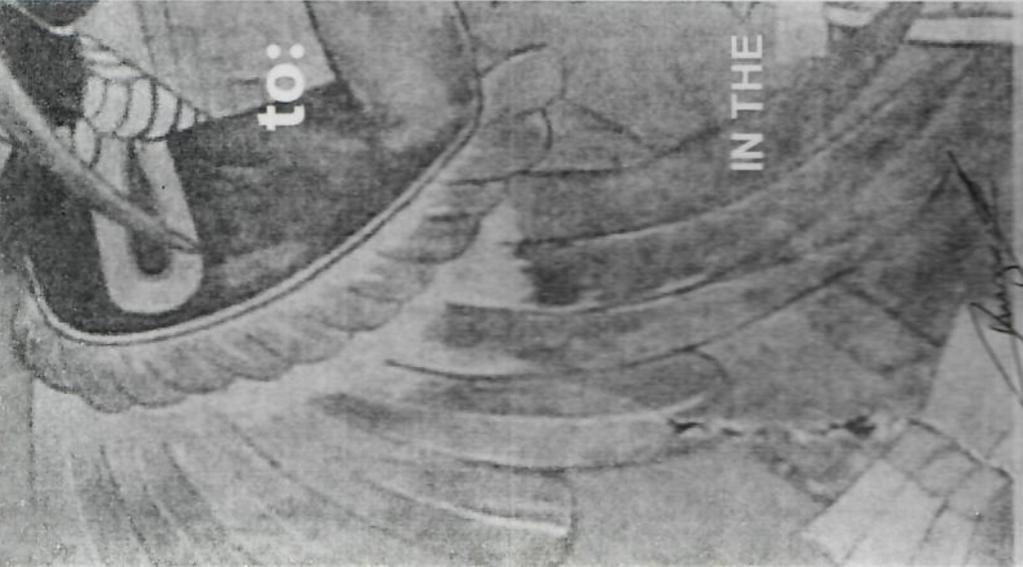
- Pandit A, Maheshwari R. (1996). Ciclo de vida de *Neurospora* en un campo de caña de azúcar. *Journal of Biosciences* 21: 57-79.
- Perwack J, Goyer M y Schimke G. (1981). An exposure and risk assessment for phthalate esters, di(2-ethylhexyl) phthalate, di-n-butyl phthalate, dimethyl phthalate, diethyl phthalate, di-n-octyl phthalate, butyl benzyl phthalate. EPA-440/4-81-020. NTIS No. PB85-211936. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC.
- Petersen JH y Breindahl T. (2000). Plasticizers in total diet samples, baby food, and infant formulae. *Food Additives Contaminants* 17:133-141.
- Pio TF y Macedo GA. (2009). Cutinases: properties and industrial applications. *Advances Applied Microbiology* 66:77-95.
- Sánchez C, Ryder RA, Vilki Z y Robson G. (2009). Enrichment and identification of di (2-ethylhexyl) phthalate-degrading fungi from soil. *Applied Microbiology Biotechnology*.
- Sayali K, Sadichha P y Surekha S. (2013). Microbial esterases: An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2:135-146.
- Schwarze F, Engels J y Mattheck. (2000). Fungal Strategies of Wood Decay in Tress. Springer Verlag, Berlín.
- Smith WG. (2002). *Fusarium culmorum*. *Revista Iberoamericana de Micología*. p. 31.
- Tanaka T, Yamada K, Tonosaki T, Konishi T, Goto H y Taniguchi M. (2000). Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen y phthalic ester. *Water Science Technology* 42:89-95.
- Téllez- Téllez M, Fernandez FJ, Montiel-González, Sánchez C, Díaz- Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus* in sumerged and solid- state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 00253-008-1628-6.

- Torres MT. 2013. Obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.
- Vásquez Venegas AM. 2013. Producción de xilanasas por *Aspergillus* sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Tesis para obtener el grado de maestra. Universidad Iberoamericana. México D.F.
- Wang Y y Gu J. (2006). Degradability of dimethyl terephthalate by *Variovorax paradoxus* T4 and *Sphingomonas yanoikuyae* D0S01 isolated from deep-ocean sediments. *Ecotoxicology* 6:549-557.
- Yeo S, Kim M, Choi H. (2007). Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Plebia tremellosa*. *FEMS Microbiology Letters* 278:72-77.
- Zheng Z, He PJ, Shao LM, Lee DJ (2007) Phthalic acid esters in dissolved fractions of landfill leachates. *Water Resources* 41:4696- 4702.
- Zhua-Hua L, ka-Lai P, Yi-Rui W, Ji-Dong G, Raymond K, Chow K, Vrijmoed LLP. (2012). Degradation of phthalates esters by *Fusarium* sp. DMT-5-3 and *Trichosporon* sp. DMI-5-1 isolated from mangrove sediments. *Biology of Marine Fungi. Progress in Molecular and Subcellular Biology* 299-328.



Instituto Politécnico Nacional

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala



AWARDS THIS

CERTIFICATE OF PRESENTATION

Angel González-Márquez, Rubén Díaz, Tania Volke-Sepúlveda and
Carmen Sánchez

for presenting the contribution entitled:

GROWTH OF FUSARIUM CULMORUM IN DIFFERENT CONCENTRATIONS
OF DIBUTYL PHTHALATE IN LIQUID FERMENTATION

1ST BIOTECHNOLOGY & 9^º ENCUENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN

Atlihuetzia Tlaxcala, México, October 13 to 16, 2014.

Dra. Myrna Solis Oba

Presidente del comité organizador

Dra. Norma Patricia Muñoz Sevilla

Secretaría de Investigación y Posgrado

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Director CIBA Tlaxcala



Sociedad Mexicana de Biotecnología
y Bioingeniería, A.C.
Delegación Yucatán



otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Por la presentación en cartel

**CRECIMIENTO DE FUSARIUM CULMORUM EN DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE DIBUTIL FTALATO EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA. Ángel González-Márquez*,**

Rubén Díaz-Godínez, Tania Volke-Sepúlveda, Carmen Sánchez.

**VII Congreso de Biotecnología
y Bioingeniería del Sureste**

llevado a cabo del 22 al 24 de Octubre en la Ciudad de
Mérida, Yucatán.

Dra. Elizabet Ortiz Vázquez
PRESIDENTA

Mérida, Yucatán, 24 de Octubre de 2014

Dr. Felipe Vázquez Flota
VICEPRESIDENTE

Encuentro Nacional sobre **Biotechnología** Universidad Autónoma de Tlaxcala

Otorga la presente
CONSTANCIA

A:

González-Márquez, A. Díaz-Godínez, R. Volke-Sepúlveda, T. Sánchez, C.

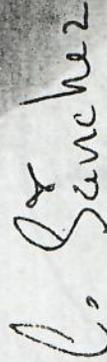
Por la presentación oral del trabajo:

CRECIMIENTO DE FUSARIUM CULMORUM CRECIDO EN DIBUTIL FTALATO EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA

en el "Primer Encuentro Nacional sobre Biotechnología en la UATx",
celebrado en la ciudad de Tlaxcala, México los días 7-10 de diciembre de 2014



Dr. Gerardo Díaz Godínez
Líder del Cuerpo Académico
de Biotechnología



Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández
Presidente del 1er Encuentro Nacional
sobre Biotechnología



Dr. Rubén Díaz Godínez
Jefe del Laboratorio de Biotechnología



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS



Otorgan la presente

Constancia

A González Márquez A., Volke Sepúlveda T., Díaz R. y Sánchez C.

Por su participación con el cartel **Crecimiento y actividad de esterasas de hongos filamentosos en presencia de dibutil ftalato en fermentación sumergida**

En la Cátedra Nacional de Biología CUMex "Juan Luis Cifuentes", llevada a cabo en la Universidad Autónoma de Tlaxcala del 2 al 5 de junio de 2015 en Tlaxcala, Tlax.

C.D José Luis Antón de la Concha

Coordinador de las Cátedras CUMex



Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. otorga la presente

Constancia

A: Angel González-Márquez, Roberto Cervantes- Badillo,
Binicio Ramirez- Mendoza, Ruben Díaz-Godínez, Tania Volke-
Sepúlveda, Carmen Sánchez

Por su participación con la Presentación en Cartel

"CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD DE ESTERASAS DE *Fusarium culmorum* Y *Neurospora sitophila* CRECIDOS EN DIBUTIL FTALATO EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA"

en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
realizado del 21 al 26 de Junio de 2015, en Guadalajara, Jalisco, México.

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Presidente de la SMBB

Dr. Carlos Regalado González
Presidente del Comité Organizador

Dr. José Adolfo Escalante Lozada
Presidente del Comité Científico