

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



OBTENCION DE CELULASAS Y PECTINASAS A PARTIR DE LOS HONGOS
Trichoderma sp Y *Aspergillus niger* **DESARROLLADOS EN DOS SUSTRATOS**
PECTINOCELULÓSICOS PARA EXTRAER EL COLORANTE NATURAL DE
LA SEMILLA DEL ACHIOTE (BIXA ORELLANA)

TESIS PRESENTADA POR LOS BACHILLERES:

Dongo Martínez, Doménica

Vizcarra Llerena, José Daniel

Para optar el grado de INGENIERO
BIOTECNÓLOGO

ASESOR: Blgo. Iván Paz Aliaga

AREQUIPA - PERU

2013

INDICE

INDICE	II
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XII
CAPÍTULO N° 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO N° 2.....	6
MARCO TEÓRICO	6
1.- LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SOLIDO (FES).....	6
1.1.- Ventajas y Desventajas de la FES.....	8
1.2.- Parámetros considerados en la FES	9
1.2.1.- Temperatura	9
1.2.2.- Tamaño de partícula	10
1.2.3. El pH.....	10
1.2.4.- El Sustrato	11
1.2.4.1.- Generalidades de los sustratos.	12
1.2.4.1.1.- Propiedades biológicas de los residuos sólidos orgánicos.	13

1.2.4.2.- Características del Sustrato	13
1.2.4.4.- Cascara de cebolla	15
1.2.5.- Microorganismos	15
1.2.5.1.- Aspergillus.....	19
1.2.5.1.1.- Aspergillus níger	20
1.2.5.1.2.- Usos Industriales del Aspergillus níger	20
1.2.5.2.- <i>Trichoderma sp.</i>	21
2.- ENZIMAS FÚNGICAS.....	23
2.1.- Las Celulasas	23
2.2.- Las Pectinasas	24
2.2.1. Origen y Clasificación.....	25
3.- LOS COLORANTES NATURALES (BIXINA A PARTIR DEL ACHIOTE).....	29
3.1. El Achiote.....	29
3.2.- Bixina y Norbixina.....	30
4.- EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DE LOS COLORANTES	31
CAPÍTULO N° 3.....	33
MATERIALES Y METODOS	33
FLUJO GRAMA DE ACTIVIDADES	35
Material Biológico	37
Material de Vidrio	37
Equipos:	37
Reactivos:	38
Otros:.....	38
1.- RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE SUELO AGRÍCOLA DE LA RIZÓSFERA DE ZAPALLO.....	39
1.1.- Ubicación.....	39
1.2.- Toma de muestras y selección de área	39
1.3 Determinación de pH del suelo.....	40

1.4.-Traslado y almacenaje de las muestras de suelo	41
1.5.- Estabilización de las muestras de suelo	41
2.- AISLAMIENTO DE LOS HONGOS DE INTERÉS.....	41
2.1.- Medios de cultivo	41
2.2.- Técnica de siembra por dilución seriada.	42
2.3.- Identificación y Purificación de los hongos	42
2.3.1.- Re siembra periódica en medios frescos.....	42
2.3.2.- Identificación macroscópica de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma sp.</i>	43
2.3.3.- Identificación Microscópica de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma sp.</i>	43
2.3.4.- Degradación de celulosa por prueba en tubo de ensayo	43
2.3.5.- Prueba para degradación de celulosa	44
2.4.-Inducción de los hongos <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma sp.</i>	44
2.5.- Obtención del inóculo.....	45
2.5.1.- Preparación y almacenamiento del inóculo.....	45
3.-EXTRACCION DE LAS ENZIMAS.....	46
3.1.- Recolección del sustrato	46
3.2.- Selección del tamiz adecuado para los hongos.....	46
3.3.- Determinación de los parámetros óptimos para la FES	47
3.4.- Desarrollo de la FES.....	47
3.5.- Extracción de celulasas y pectinasas	49
3.6.- Medición de la actividad enzimática.....	49
3.6.1.-Prueba de Benedict para celulasas y pectinasas	50
3.6.1.1.-. Procedimiento	51
3.6.2.- Determinación de la Actividad Pectinas	51
3.6.3.-. Determinación de Actividad Celulasa	52
3.6.3.1. Procedimiento.....	52
4.- OBTENCIÓN DEL COLORANTE	54
4.1.- Método Enzimático.....	54
4.2.- Método Alcalino (Químico)	55

4.3.- Rendimiento	55
CAPÍTULO N° 4.....	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
1.- Recolección de la muestra de suelo agrícola de la rizosfera de zapallo de	56
1.1.- Determinación de pH de la muestra de suelo agrícola.....	56
2.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS HONGOS	57
2.1.- <i>Aspergillus niger</i>	58
2.1.1.- Aislamiento del <i>Aspergillus niger</i>	58
2.1.2.- Identificación del <i>Aspergillus niger</i>	59
2.1.2.1.- Taxonomía del <i>Aspergillus niger</i>	59
2.1.2.2.- Identificación Macroscópica.....	59
2.1.2.3.- Identificación Microscópica del <i>Aspergillus sp.</i>	60
2.2.- <i>Trichoderma sp.</i>	61
2.2.1.- Aislamiento y Purificación	61
2.2.2.- Identificación del <i>Trichoderma sp.</i>	61
2.2.2.1.- Taxonomía del <i>Trichoderma sp.</i>	61
2.2.2.2 Estructura Macroscópica	61
2.2.2.3.- Identificación Microscópica del <i>Trichoderma sp.</i>	62
2.3.1.- Soluciones con Inductores.....	63
2.3.2.- Degradación de Celulosa por la prueba de papel filtro.....	66
2.3.3.- Prueba del tubo de ensayo.....	66
2.4.- Obtención del inculo	67
3.- EXTRACCIÓN DE ENZIMAS	67
3.1.- Selección del Tamiz adecuado para los hongos.....	67
3.2.- Determinación de Parámetros para la obtención de los extractos enzimáticos.....	71
3.3.- Extracción de Celulasas y Pectinasas	72
3.4.-Medición de la Actividad enzimática	73
3.4.1.- Análisis cualitativo	73
3.4.1.1.- Prueba con el reactivo de Benedict.....	73
3.5.- Evaluación de la actividad enzimática.....	75

3.5.1.- Evaluación de la actividad celulolítica	75
6.2.2.- Evaluación de la actividad pectinolítica.	88
4.- OBTENCIÓN DEL COLORANTE	104
4.1.- Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	107
CAPÍTULO N° 5.....	1088
CONCLUSIONES.....	1088
RECOMENDACIONES.....	11010
BIBLIOGRAFÍA.....	1111
ANEXOS.....	1177
ANEXO 1.-MEDIOS DE CULTIVO.....	1177
ANEXO 2_SOMOGYI NELSON	1222
Procedimiento:	1233
ANEXO 3.- KIT DE GLICEMIA.....	1244
ANEXO 4_TWEEN 80	1266
ANEXO 5_TABLA DE DATOS DE PH DE SUELO DE RIZÓSFERA DE ZAPALLO.....	1277
ANEXO 6.....	1288
Anexo 6.1.- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 1 a partir de 1g de muestra.....	1288
Anexo 6.2 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 2 a partir de 1g de muestra .-.....	1299
Anexo 6.3 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 3 a partir de 1g de muestra.-.....	13030
Anexo 6.4 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 4 a partir de 1g de muestra.-.....	1311
Anexo 6.5 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 5 a partir de 1g de muestra.-.....	1322
Anexo 6.6 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 6 a partir de 1g de muestra.-.....	1333
Anexo 6.7 . Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 7 a partir de 1g de muestra .-	1344
7.- COSTOS.....	1355

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: EJEMPLOS DE PRODUCTOS OBTENIDOS MEDIANTE LA FES	7
TABLA 2.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA FES FRENTE A OTROS PROCEDIMIENTOS DE FERMENTACIÓN	8
TABLA 3: GRUPOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS SUSTRATOS PARA LA FES.....	12
TABLA 4: CARACTERÍSTICAS DE LOS SUSTRATOS DE LA FES.....	14
TABLA 5.- MICROORGANISMOS GRAS.....	19
TABLA 6.- COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS PARA LA INDUCCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	44
TABLA 7.- SISTEMAS REALIZADOS.....	48
TABLA 8.- PROMEDIO DE LOS PH A 20CM DE PROFUNDIDAD.	56
TABLA 9.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ASPERGILLUS NÍGER.....	59
TABLA 10.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA PARA EL <i>TRICHODERMA SP.</i>	61
TABLA 11.- SELECCIÓN DE LOS TAMAÑOS DE PARTÍCULA DE LA CASCARA DE CEBOLLA Y EL ORUJO DE CEBADA A PARTIR DEL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS PARA UN SISTEMA FES AL SÉPTIMO DÍA.	69
TABLA 12.- RESULTADOS PARA PRUEBA DE BENEDICT.....	74
TABLA 13.- ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DE 1G DE LA MUESTRA DEL SISTEMA 1 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN HARINA DE MAÍZ (SUSTRATO).	76
TABLA 14.- ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA DEL SISTEMA 1 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN HARINA DE MAÍZ.	78
TABLA 15.- ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DE 1GR DE LA MUESTRA DEL SISTEMA 2 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN HARINA DE MAÍZ.	80
TABLA 16.- ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA DEL SISTEMA 2 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN HARINA DE MAÍZ.	82
TABLA 17.- ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DE 1GR DE LA MUESTRA DEL SISTEMA 3 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN HARINA DE MAÍZ.	84
TABLA 18.- ACTIVIDAD CELULOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA DEL SISTEMA 3 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN HARINA DE MAÍZ.	86
TABLA 19.- ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE 1 GR DE LA MUESTRA DEL SISTEMA 4 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PECTINA CÍTRICA.	88
TABLA 20.- ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA DEL SISTEMA 4 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PECTINA CÍTRICA.	90
TABLA 21.- ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE 1 GR DE LA MUESTRA DEL SISTEMA 5 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PECTINA CÍTRICA.	92

TABLA 22.- ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA DEL SISTEMA 5 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PECTINA CÍTRICA.	94
TABLA 23.- ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE 1 GR DE LA MUESTRA DEL SISTEMA 6 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PECTINA CÍTRICA.	96
TABLA 24.- ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA DEL SISTEMA 6 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PECTINA CÍTRICA.	98
TABLA 25.- ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE 1 GR DE LA MUESTRA DEL SISTEMA 7 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PECTINA CÍTRICA.	100
TABLA 26.- ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DEL EXTRACTO UTILIZANDO BUFFER ACETATO PH 4.8 Y TWEEN 80 AL 0.1% COMO SOLUCIONES DE EXTRACCIÓN A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA DEL SISTEMA 7 A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PECTINA CÍTRICA.	102
TABLA 27.- TRATAMIENTOS DADOS A LA SEMILLA DE ACHIOTE PARA OBTENER SU RENDIMIENTO	104
TABLA 28.- COMPARACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS ENTRE LOS MÉTODOS QUÍMICOS Y EL MÉTODO ENZIMÁTICO A PARTIR DE 10 GR DE MUESTRA DE SEMILLA DE ACHIOTE.	106



INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- ESTRUCTURA DE LOS HONGOS EN SU INTERACCIÓN CON EL SUSTRATO.	17
FIGURA 2.- RUTA METABÓLICA DE LA PECTINASA.	26
FIGURA 3.- FOTO DE UBICACIÓN DEL TERRENO DONDE SE OBTUVIERON LAS MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA A PARTIR DE LA RIZÓSFERA DE ZAPALLO	39
FIGURA 4.- ESQUEMA UTILIZADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA DE LA RIZÓSFERA DE ZAPALLO.....	40
FIGURA 5.-PREPARACIÓN DEL INOCULO DE ESPORAS A PARTIR DE UNA PLACA QUE CONTENGA ASPERGILLUS NÍGER Y OTRA QUE CONTENGA <i>TRICHODERMA SP.</i>	46
FIGURA 6.- ESQUEMA DEL DESARROLLO DE LAS FERMENTACIONES EN PLACAS PETRI EN LOS 2 SUSTRATOS UTILIZADOS.	48
FIGURA 7.- REACCIÓN CON EL REACTIVO DE BENEDICT.	50
FIGURA 8 IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA DEL ASPERGILLUS NÍGER	60
FIGURA 9.- OBSERVACIÓN AL MICROSCÓPIO DEL ASPERGILLUS NÍGER:	60
FIGURA 10.- IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA DEL HONGO <i>TRICHODERMA SP.</i> EN MEDIO PDA.....	62
FIGURA 11.- OBSERVACIÓN AL MICROSCÓPICA DEL <i>TRICHODERMA SP.</i>	63
FIGURA 12.- <i>ASPERGILLUS NIGER</i> EN MEDIO DE PECTINA.....	64
FIGURA 13.- <i>TRICHODERMA SP</i> EN MEDIO DE PECTINA:	65
FIGURA 14.-RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL TUBO DE ENSAYO.	66
FIGURA 15.- CRECIMIENTO DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> Y <i>TRICHODERMA SP</i> EN SUSTRATO DE ORUJO DE CEBADA.....	71
FIGURA 16.- COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL <i>ASPERGILLUS NIGER</i> .I.....	72
FIGURA 17.- RESULTADOS DE LA PRUEBA CUALITATIVA DE BENEDICT	75
FIGURA 18.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 1 A PARTIR DE 1GR DE MUESTRA.....	77
FIGURA 19.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 1 A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA.....	79
FIGURA 20.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 2 A PARTIR DEL LAVADO DE 1GR DE MUESTRA	81
FIGURA 21.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 2	83
FIGURA 22.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 3	85
FIGURA 23.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 3	87
FIGURA 24.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RELATIVA DEL SISTEMA 4.....	89
FIGURA 25.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 4	91
FIGURA 26.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 5	93
FIGURA 27.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 5	95
FIGURA 28.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 6	97
FIGURA 29.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 6	99
FIGURA 30 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 7 A PARTIR DEL LAVADO DE 1GR DE MUESTRA.	101
FIGURA 31.- MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SISTEMA 7 A PARTIR DEL LAVADO DE TODA LA PLACA.	103
FIGURA 32.- FOTO DE FOTO DE LA CORRIDA CROMATOGRAFICA EN CAPA DELGADA PARA LOS COLORANTES DEL ACHIOTE.....	107

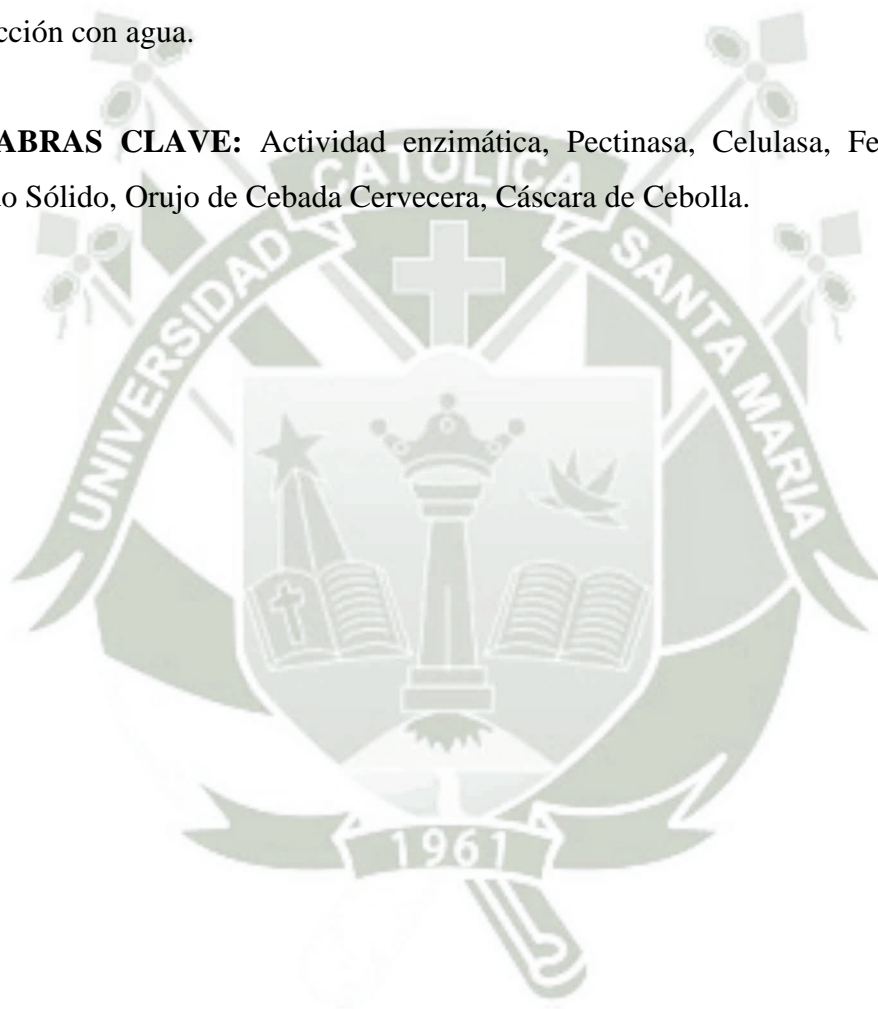


RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron pectinasas y celulasas fúngicas que degradan la pared celular de la semilla del achiote para la extracción del colorante bixina como un método alternativo a la utilización de métodos químicos, los cuales tienen un alto impacto medioambiental, empleando como medios de cultivo al orujo de cebada y la cáscara de cebolla para los hongos *Trichoderma sp.* y *Aspergillus niger*, que son las cepas que producirán las celulasas y pectinasas. Esto permite reducir costos y obtener un colorante de mejor calidad de forma natural. Para efecto del presente estudio, se aislaron y purificaron cepas de los hongos *Trichoderma sp.* y *Aspergillus niger* a partir de muestras de tierra agrícola a diferentes profundidades, con un pH promedio de 6.2; luego, las cepas se indujeron para que produzcan celulasas y pectinasas en medios selectivos, usando como fuentes de carbono CMC (Carboxi-metilCelulosa) al 0.5% y Pectina Cítrica al 0.75%. Para lograr un crecimiento uniforme y una producción enzimática óptima se realizaron pruebas a diferentes tamaños de tamices de los sustratos pectinocelulolíticos, de los cuales se vio que el tamiz de 1.6mm fue con el que se obtuvo mejores resultados. Para la obtención de las enzimas se realizó la fermentación en estado sólido (FES) donde se utilizaron como fermentadores placas Petri, determinándose que

la cantidad de esporas del inóculo fue de 4.5×10^7 esporas/ml de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.*, a 37°C , con agitación constante de 60 RPM y un tiempo de fermentación de 7 días, también se realizó la evaluación de las actividades enzimáticas celulolíticas y pectinolíticas, encontrándose valores de 4.16 mg de glucosa/ml del extracto celulolítico y un valor de 67.53 mg de azúcar reductor/ml de extracto pectinolítico; con estas enzimas se extrajo el colorante, con el que se obtuvo un rendimiento del 26% del colorante en comparación del 13% del rendimiento frente a una extracción con agua.

PALABRAS CLAVE: Actividad enzimática, Pectinasa, Celulasa, Fermentación en Estado Sólido, Orujo de Cebada Cervecera, Cáscara de Cebolla.



ABSTRACT

In the present work, fungal pectinases and cellulases were isolated for degrading the cell wall of Achiote seed for the extraction of the aqueous dye bixin, avoiding the use of chemical methods that have a high environmental impact, using as culture, the barley residue and the peel onions. These reduce costs and gain a greater dye with a higher quality. For this purposes, we isolated and purified strains of the fungus *Trichoderma sp.* and *Aspergillus niger* from agricultural soil samples at different depths, with an average pH of 6.2, then the strains were induced to produce cellulases and pectinases on selective media using 0.5% of CMC (Carboximetilcelulose) as carbon sources and 0.75% of Citrus Pectin. To achieve uniform growth and optimum enzyme production different sizes of sieves were tested, the best result was obtained at the sieve 1.6 mm, and have better results. For obtaining enzymes, solid state fermentation (SSF) was made, Petri dishes were used as fermenters, it was determined that the amount of spores of the inocule was 4.5×10^7 spores / ml of *Aspergillus niger* and *Trichoderma sp.* at 37°C , with constant stirring at 60 RPM and a fermentation time of 7 days. Cellulolytic and pectinolytic enzyme activities was measured, finding values 4.16 mg glucose / ml of extract cellulolytic and a value of 67.53 mg reducing sugar / ml of extract pectinolytic was obtained, with these enzymes the dye was extracted and a yield of 26 % dye was obtained compared with a 13% of performance against water extraction.

KEYWORDS : Enzyme activity, pectinase, cellulase, Solid State Fermentation, marc Malting Barley, onion peel.

CAPÍTULO N° 1

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la sociedad demanda cada vez más el desarrollo de procesos para la obtención de productos de utilidad, de bajo costo y que no contaminen el Medio Ambiente; por tal motivo, se están realizando numerosos trabajos dirigidos a la producción de distintos compuestos químicos y/o específicos, mediante la bioconversión de excedentes y residuos agroindustriales; este es el caso de la tecnología enzimática a donde, alrededor de un 65% de las enzimas que se producen actualmente, están relacionadas con el sector industrial debido a su alta eficiencia y bajo costo de obtención.

En el presente trabajo se pretende profundizar en el desarrollo de enzimas para aprovechar el principal subproducto de la industria cervecera (orujo de cebada), así como también la cáscara de cebolla utilizando la tecnología FES en la obtención de

enzimas celulolíticas y pectinolíticas, para su uso en la producción de colorantes a partir de la semilla del achiote (*Bixa orellana*).

La cáscara de cebolla y el orujo de cebada contienen restos de celulosa y pectina; estos, al no ser debidamente utilizados, constituyen una fuente de contaminación. Así mismo los químicos que se utilizan en la obtención de colorantes naturales, muchas veces resultan ser nocivos y contribuyen a la contaminación ambiental.

Una de las grandes aplicaciones de la tecnología enzimática está en la obtención de colorantes naturales, donde se puede incrementar el rendimiento en la producción de estos utilizando enzimas a partir de microorganismos de fácil cultivo, y con esto abaratar los costos de producción. Adicionalmente, las enzimas obtenidas por la FES, muestra la ventaja de que son excretadas al medio por el microorganismo (de preferencia GRAS) lo que facilita su extracción.

Trabajos anteriores realizados en torno al tema de obtención de colorantes utilizando enzimas, presentaron rendimientos altos (25% de colorante por cada 100gr. de semilla) (Bravo Venegas, 2010). El presente trabajo de tesis se centra en determinar las mejores condiciones de obtener enzimas celulasas y pectinasas para la extracción de un colorante de mayor rendimiento.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que mediante la FES, los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* utilizando los sustratos de orujo de cebada y cáscara de cebolla, se obtienen pectinasas y celulasas por inducción. Las Celulasas y Pectinasas en mucho de los casos son empleadas para facilitar la filtración de los zumos, siendo las pectinasas las que juegan el papel más relevante en el proceso; otros de los usos que se les da es en la industria textil, de detergentes, en la producción de biogás, etc.

La extracción del colorante natural bixina por medio de un método biotecnológico enzimático con actividad celulasa y pectinasa, donde la celulasa corta los enlaces β -1,4 y las pectinasas cortan los enlaces α -1,4 de la pared celular de la semilla del achiote, lo que libera el colorante con mayor concentración y pureza, el cual podría usarse en diferentes industrias.

Es importante señalar que el uso de estas enzimas pueden ser tomadas como una forma alternativa en la extracción de colorantes , ya que actualmente estos se extraen con solventes químicos, nosotros proponemos una extracción acuosa utilizando enzimas; La economía de los procesos biotecnológicos dependen en gran medida de la disponibilidad y del valor monetario del sustrato utilizado, de tal manera que la correcta selección del medio de cultivo, tiene un fuerte impacto en el éxito del proceso (Negrin *et al.*, 2007). Por tal razón, la búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición, que puedan ser utilizados como sustratos fermentables (fuentes de carbono o nitrógeno) en la preparación de medios de uso microbiológico, constituyen uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual (Coello *et al.*, 2003).

OBJETIVO

Objetivo General

Obtener celulasas y pectinasas a partir de los hongos *Trichoderma sp.* y *Aspergillus niger* desarrollados en dos sustratos pectinocelulósicos para extraer el colorante natural de la semilla del Achiote (*Bixa orellana*)

Objetivos Específicos

1. Evaluar la presencia de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* en la rizosfera de cultivo de zapallo.
2. Determinar el tiempo de crecimiento óptimo del *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* en dos sustratos pectinocelulósicos.
3. Evaluar el tamaño de partícula óptimo de los dos sustratos pectinocelulósicos para el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.*
4. Evaluar la extracción de las pectinasas y celulasas de los sustratos y microorganismos utilizados.
5. Comparar el rendimiento del colorante natural de la semilla de achiote obtenido por un método enzimático, versus extracción acuosa y extracción química (Alcalina).



HIPÓTESIS

Las pectinasas y celulasas obtenidas en el laboratorio a partir del *Trichoderma sp.* y *Aspergillus niger* en medios de orujo de cebada cervecera y cáscara de cebolla permitirán un mejor rendimiento en la extracción del colorante natural bixina a partir de la semilla del achiote (*Bixa orellana*) en comparación a su extracción química.

CAPÍTULO N° 2

MARCO TEÓRICO

1.- La Fermentación en Estado Sólido (FES)

Si bien la *Fermentación en estado sólido (FES)* ha sido practicada por muchos años en la preparación de alimentos tradicionales, su aplicación a nuevos productos con la nueva estructura de la biotecnología moderna es relativamente restringida (Mitchell, Krieger, & Berovic, 2006). Esta fue considerada para la producción de enzimas en los años 1900 y para la producción de penicilina en el año de 1940, pero el interés en esta tecnología se fue perdiendo gracias a los avances de la fermentación de los sustratos sumergidos.

La FES consiste en la formación de producto y crecimiento microbiano en partículas sólidas en la ausencia (o cerca de ausencia) de agua; sin embargo, el sustrato contiene suficiente humedad para permitir que el microorganismo genere crecimiento y produzca diferentes metabolitos (Mussatto, 2012). En este sistema, el agua está presente en el sustrato, cuya capacidad de retención de líquido varía según el tipo de material. (Graminha E, 2007).

Hesseltine en 1972 empleó el término de la FES a todas las fermentaciones donde el sustrato no es líquido. Luego Raimbault en 1980 propuso que la FES son las fermentaciones en las cuales el sustrato no está ni disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua. No obstante Moo-Young y colaboradores, propusieron en 1983 que la FES son los procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre.

Algunos ejemplos de productos tradicionalmente obtenidos mediante FES son descritos en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de productos obtenidos mediante la FES

El “koji” japonés	Que utiliza arroz al vapor como sustrato sólido y <i>Aspergillus oryzae</i> como inóculo.
El “tempeh” de Indonesia	Que se obtiene por fermentación de la soja mediante el hongo <i>Rhizopus oryzae</i> .
El “queso Roquefort”	Obtenido por fermentación de queso fresco con <i>Penicillium roquefortii</i>

Productos obtenidos utilizando la tecnología de la Fermentación en Sustrato Sólido (FES), haciendo uso de residuos orgánicos y microorganismos para su producción.

La definición más general y reciente de la FES fue formulada por Viniegra-González y col. en 1997, quienes la describen como *un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos con capacidad para absorber y contener agua, ya sea con o sin nutrientes solubles*. Por tal motivo, se trata de un proceso donde el sólido presenta una baja actividad del agua, que influye en aspectos fisiológicos de los microorganismos como son el tipo de crecimiento, la esporulación y la germinación de esporas, además de la producción de metabolitos y enzimas como también la actividad de las mismas.

La FES es una técnica que está principalmente enfocada a la producción de alimentos, enzimas hidrolíticas, ácidos orgánicos, giberelinas, sabores y biopesticidas, generalmente, para la obtención de estos productos se utilizan como sustratos sólidos,

residuos agroindustriales, lo que resulta de gran interés ya que, por un lado, se obtienen productos de interés industrial y, por otro, se resuelven problemas de deposición de residuos sólidos. De esta forma, sustratos de bajo costo como son los residuos de fruta y verdura, cortezas de árboles, cáscara de frutos secos, salvado de trigo, cáscara de café, bagazo de caña de azúcar, etc. pueden ser utilizados para la producción de etanol, enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios biológicamente activos, entre otros.

1.1.- Ventajas y Desventajas de la FES

A continuación como se puede ver en la tabla 2 describiremos, una serie de ventajas y desventajas de carácter general a cerca de la FES frente a otros procedimientos de fermentación.

Tabla 2.- Ventajas y desventajas de la FES frente a otros procedimientos de fermentación

Ventajas	Desventajas
Los rendimientos son similares o mayores que aquellos que se obtienen de cultivos sumergidos.	La determinación de Biomasa es más difícil.
Las condiciones ambientales son similares a aquellas del habitat natural de los hongos, lo cual constituye al grupo de los microorganismos usados en el FES.	Solamente los microorganismos capaces de crecer a niveles bajos de humedad son los que se pueden utilizar.
Los niveles más altos de aireación, especialmente en los procesos adecuados que exigen un metabolismo oxidativo intensivo.	La naturaleza sólida del sustrato provoca problemas en el seguimiento de los parámetros del proceso (pH, contenido de humedad, el oxígeno y la concentración de biomasa).
La inoculación con esporas (en los procesos que implican los hongos) facilita su dispersión uniforme a través del medio.	La agitación puede ser muy difícil. Por esta razón se prefieren condiciones estáticas.
Reactores de diseño sencillo, con pocos requisitos espaciales, se pueden utilizar debido a la naturaleza concentrada de los sustratos.	La falta de Información sobre los diseños y operación de los reactores a gran escala.
Bajos requerimientos energéticos (en algunos casos tratamiento en autoclave de vapor o tratamiento, mecánico, no son necesarios).	Posibilidad de contaminación por hongos indeseables.

1.2.- Parámetros considerados en la FES

El estudio de parámetros como la temperatura, la humedad, tipo de sustrato, el tamaño de partícula, etc., es fundamental para el éxito de la FES debido a que de ellos va a depender tanto el crecimiento del microorganismo como la formación del producto final (Díaz Sanchez, 2009). Por este motivo, a continuación se va a describir la influencia que cada uno de ellos tiene en el proceso.

1.2.1.- Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más influyentes en la velocidad de crecimiento de los microorganismos. De esta forma, existe una temperatura óptima en la que dicha velocidad es máxima y por encima de la cual la velocidad de crecimiento decae bruscamente produciéndose la muerte celular.

Según el rango de temperaturas al que pueden crecer los microorganismos se pueden establecer fundamentalmente tres grupos: psicrófilos o criófilos (temperatura mínima de crecimiento comprendida entre -5 y 5°C), mesófilos (temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 40°C y máxima entre 35 y 47°C) y termófilos (temperatura óptima entre 50 y 75°C y máxima comprendida entre 80 y 113°C). Por tanto, se debe tener en cuenta este rango óptimo; Los hongos *Aspergillus* y *Trichoderma* se desarrollan a una temperatura de 25°C siendo clasificados como hongos mesófilos.

Durante la fermentación en estado sólido se genera, además, una gran cantidad de calor que es directamente proporcional a la actividad metabólica de los microorganismos. (Pandey A., 2003)

1.2.2.- Tamaño de partícula

El tamaño de partícula también es un factor importante a tener en cuenta. Sustratos de partículas pequeñas proporcionan una gran área específica, lo que afecta de manera positiva al desarrollo del microorganismo. (Pandey, Soccol, & Mitchell, 2000). Sin embargo, un tamaño de partícula demasiado pequeño, genera a su vez un espacio interpartícula reducido por lo que, disminuye la eficiencia de la respiración/aireación dificultando el crecimiento microbiano. Debido a esto es necesario alcanzar un tamaño óptimo de partícula, según el proceso del que se trate.

Kumar y col. estudiaron la influencia del tamaño de partícula del sustrato en la producción de ácido cítrico a partir de bagazo de caña de azúcar utilizando el hongo *Aspergillus Níger*. Los tamaños de partículas evaluados se encontraban en un rango comprendido entre 0,64 y 2 mm.

1.2.3. El pH

El rango de pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos se encuentra próximo a la neutralidad, (generalmente entre 5 y 8), aunque la mayor parte de los hongos están adaptados a un rango más amplio de pH. Sin embargo, para la mayoría de ellos, alteraciones bruscas del pH del medio podrían tener efectos adversos sobre el microorganismo, afectando a la membrana y al transporte de solutos, inhibiendo la actividad de las enzimas, etc. Por este motivo, es muy importante controlar este parámetro durante la fermentación.

La cinética de variación del pH está muy relacionada con el microorganismo utilizado. De esta manera se ha observado cómo, para la especie de *Aspergillus*, el pH suele caer rápidamente hasta un valor de 3. Sin embargo, para otros tipos de hongos como las especies de *Trichoderma*, el pH se estabiliza entre 4 y 5. La naturaleza del sustrato también tiene gran influencia en la cinética del pH, aunque los materiales

lignocelulósicos, que son los que normalmente se utilizan en la FES, presentan efectos tampón antes por su compleja composición. (Viesturs U, 1991).

La medida y el control del pH durante todo el proceso de fermentación se hacen necesarios para evitar alcanzar valores donde puede llegar a producirse la muerte del microorganismo. Además, el control del pH permite reducir o eliminar los riesgos de contaminación bacteriana en fermentaciones en estado sólido de hongos y levaduras.

Los principales componentes de la fermentación en estado sólido es el microorganismo, ser vivo que lleva a cabo el proceso, y el sustrato, medio sobre el cual se va a desarrollar el proceso fermentativo.

1.2.4.- El Sustrato

Un sustrato es todo material sólido distinto del suelo, puede ser natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico.

La selección del soporte adecuado para el cultivo en estado sólido es esencial ya que de ello depende el éxito del proceso (Díaz Sanchez, 2009). Los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de seleccionar un soporte son el tamaño de partícula, la porosidad y la composición química. Además, también es de gran importancia su disponibilidad y su precio.

La gran variedad de materiales sólidos utilizados en la FES pueden clasificarse en dos grandes grupos que serán descritos en la Tabla 3 :

Tabla 3: Grupos de clasificación de los sustratos para la FES

Grupos	Características
Materiales Inertes	Aquellos que únicamente actúan como soporte físico para el anclaje de los microorganismos.
Materiales no Inertes	Aquellos que no sólo actúan como soporte, sino que además proporcionan algunos nutrientes a los microorganismos. Estos sustratos son generalmente compost y productos heterogéneos de agricultura o subproductos de la industria agrícola.

Esta tabla nos muestra la clasificación de los sustratos utilizados en la FES.

1.2.4.1.- Generalidades de los sustratos.

Los residuos orgánicos Son aquellos residuos que provienen de restos de productos de origen orgánico, la mayoría de ellos son biodegradables (se descomponen naturalmente). Se pueden desintegrar o degradar rápidamente, transformándose, porque a pesar de tener su origen en un compuesto orgánico, poseen una estructura molecular más complicada.

Los residuos sólidos orgánicos según su naturaleza y/o característica se clasifican en:

- **Residuos de alimentos:** son restos de alimentos que provienen de diversas fuentes, entre ellas: restaurantes, comedores, hogares y otros establecimientos de expendio de alimentos.
- **Estiércol:** son residuos fecales de animales (ganado) que se aprovechan para su transformación en bio-abono o para la generación de biogás.
- **Restos vegetales:** son residuos provenientes de podas o deshierbe de jardines, parques u otras áreas verdes; también se consideran algunos residuos de cocina

que no han sido sometidos a procesos de cocción como legumbres, cáscara de frutas, etc.

1.2.4.1.1.- Propiedades biológicas de los residuos sólidos orgánicos.

Excluyendo el plástico, la goma y el cuero, la fracción orgánica de la mayoría de los residuos se puede clasificar de la forma siguiente:

- Constituyentes solubles en agua, tales como azúcares, féculas, aminoácidos y diversos ácidos orgánicos.
- Hemicelulosa, un producto de condensación de azúcares con cinco y seis carbonos.
- Celulosa, un producto de condensación de glucosa de azúcar con seis carbonos.
- Grasas, aceites y ceras, que son ésteres de alcoholes y ácidos grasos de cadena larga.
- Lignina, un material polímero presente en algunos productos de papel como periódicos.
- Lignocelulosa, una combinación de lignina y celulosa.
- Proteínas, que están formadas por cadenas de aminoácidos.

1.2.4.2.- Características del Sustrato

En la mayor parte de la FES el soporte y el sustrato coinciden (Pastrana, 1996). Por ello es frecuente que la formulación de los medios de cultivo se base en materiales tales como granos de cereales, semillas oleaginosas y residuos agrícolas y/o forestales.

Con todo, y dependiendo del producto de fermentación que se desee obtener, los sustratos deben poseer preferentemente las características descritas en la Tabla 4:

Tabla 4: Características de los sustratos de la FES

	Debe de ser insoluble en agua o en la solución de humectación, con el fin de garantizar durante la incubación las condiciones de la FES.
	Debe tener elevado contenido en carbohidratos y/o proteínas.
Características de los sustratos de la FES	Debe tener estructura granular que posibilite la adhesión y penetración del microorganismo, o en caso contrario, facilidad de ruptura para conseguir granulometrías adecuadas.
	Que sean fermentables por un solo hongo.
	Que posean baja tendencia a la aglomeración con el micelio y a la formación de masas compactas durante la incubación, a fin de evitar restricciones difusionales de los gases.

Características que deben de tener los sustratos que son utilizados en procesos FES.

1.2.4.3.- Orujo de cebada

El cultivo de la cebada de seis carreras o cebada cervecera se destina a la elaboración de cerveza, obteniéndose distintos residuos en las fases sucesivas de su procesamiento. Al término de la primera fase, en que la cebada ha brotado, se procede a secarla y extraer el germen o brote, que da lugar al brote de malta. A continuación, en una segunda fase, el almidón se transforma en maltosa y glucosa por acción de las enzimas diastasas y maltasa. Al separar la parte líquida se obtiene la malta y la parte sólida generada como residuo se denomina orujo de cebada.

El orujo de cebada o bagazo presenta un buen valor nutritivo, siendo su principal limitante el elevado contenido de humedad, lo cual la hace muy susceptible a fermentaciones y pudriciones.

La materia seca del orujo de cebada puede variar entre un 23 y 26 %, en función del proceso de prensado y del tiempo de almacenamiento. Esta cantidad de agua limita su transporte y favorece la proliferación de pudriciones y fermentaciones por lo que su ensilado es la opción más adecuada para evitar estos limitantes en su uso.

Otro uso que se le puede dar es como soporte para el crecimiento de microorganismos, dándole un pre tratamiento al orujo y produzca otros productos como pueden ser las enzimas.

1.2.4.4.- Cascara de cebolla

Según un estudio, la piel marrón de la cebolla se podría emplear como un ingrediente funcional rico en fibra alimentaria (principalmente del tipo insoluble) y en compuestos fenólicos, como la quercetina y otros flavonoides (metabolitos de las plantas con propiedades medicinales).

Las dos capas carnosas externas de la cebolla también contienen fibra y flavonoides.

Por su parte, los compuestos fenólicos ayudan a prevenir la enfermedad coronaria y presentan actividades anticancerígenas. Los altos contenidos de estos compuestos en la piel seca y las capas de fuera de los bulbos les confieren, además, una elevada capacidad antioxidante. También puede ser usado como soporte de microorganismos en la FES.

1.2.5.- Microorganismos

No todos los microorganismos se encuentran capacitados para desarrollarse sobre un sustrato sólido. Las principales limitaciones son consecuencia de los requerimientos de actividad de agua de los diversos tipos de microorganismos y de su capacidad de anclaje y/o la penetración en matrices más o menos porosas.

Los hongos comprenden un grupo muy amplio de protistas superiores, incluidas por los botánicos entre las *Talofitas*¹ (vegetales, sin clorofila). Son todos heterótrofos y

¹ Libro Procesos Microbianos - Capitulo N° 4 (Los protistas superiores).

representan la última etapa en la escala de evolución de los protistas; su hábitat más frecuente es el suelo (Frioni, 1999). Son extraordinariamente adaptables a diversos ambientes, tienen como función principal “Reciclar” los desechos orgánicos, es decir utilizarlos como fuente de alimentación de los microorganismos para su crecimiento y desarrollo.

Los microorganismos tienen muchas aplicaciones a nivel industrial como por ejemplo, en la potenciación del aroma de los mismos, en la producción de compuestos obtenidos de su metabolismo como el ácido cítrico y de antibióticos como la penicilina, también producen una gran cantidad de enzimas, principalmente oxidasas e hidrolasas y pueden utilizar la mayor parte de los sustratos orgánicos que existen en la naturaleza, incluyendo la celulosa, la quitina, el almidón, azúcares, hemicelulosas y lignina.

Normalmente los carbohidratos son las principales fuentes de carbono accesibles a los hongos; son metabolizados para proporcionar energía y actúan como precursores para la síntesis de material celular. Utilizan nitrógeno fundamentalmente en forma de amonio, aunque casi todos pueden usar nitrato.

Los hongos se encuentran en forma abundante en la tierra, se nutren por absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas (heterótrofos), crecen entre 0 y 55 °C (Deacon, 1988).

Los hongos filamentosos, se caracterizan por su crecimiento mediante hifas, son los microorganismos más eficientes y competitivos en sustratos sólidos por su gran potencial de excreción de enzimas hidrolíticas, su gran tolerancia a baja actividad del agua y su resistencia a condiciones de alta presión osmótica. (Bonifaz, 1990) La gran ventaja del crecimiento mediante hifas es que resulta más fácil la colonización de los sustratos sólidos y la utilización de los nutrientes disponibles.

El crecimiento mediante hifas da a los hongos filamentosos el poder de penetrar en el sustrato sólido. La estructura de la pared celular conectada con las terminaciones y las ramas del micelio asegura una firme y sólida estructura.

Las hifas del hongo forman una red porosa tridimensional que se conoce como micelio. El hongo se dispone en diferentes capas sobre el sustrato sólido: micelio aéreo (capa 1), micelio húmedo (capa 2) y micelio penetrante (capa 3), como se puede apreciar en la figura 1.

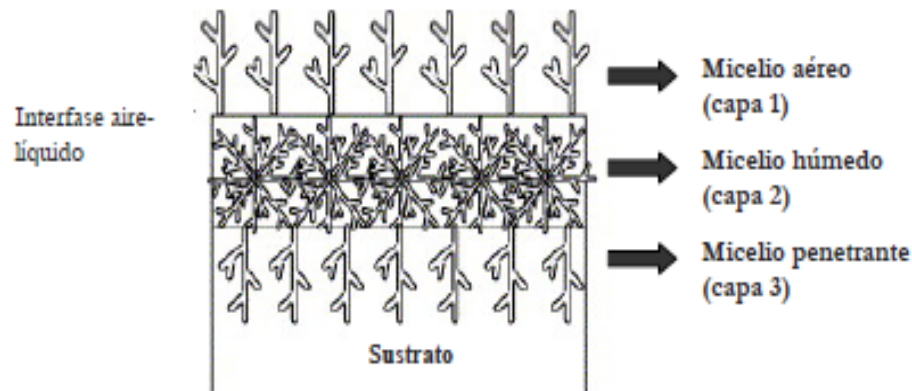


Figura 1.- Estructura de los hongos en su interacción con el sustrato.

La velocidad de penetración de las hifas en el sustrato depende de si hay oxígeno disponible en el medio. Así, a medida que se produce el crecimiento del hongo, la capa 1 se hace tan densa que empieza a transformarse en la capa 2, que se caracteriza por tener sus poros llenos de agua. Posteriormente, debido a que el hongo sigue creciendo, se produce el aumento de la densidad de la capa 2 y su ensanchamiento, tanto que su parte inferior se vuelve anaerobia. Esto hace que el oxígeno no pueda acceder a la matriz sólida del sustrato. Bajo condiciones anaerobias, el micelio en las capas 2 y 3 detiene su crecimiento y comienza a fermentar.

Pese a que en el mundo occidental los grupos de microorganismos utilizados tradicionalmente en la industria alimentaria son las bacterias y las levaduras, desde el punto de vista de la FES son sin duda los hongos, los microorganismos de elección, y ello, al margen de que, de forma natural crecen sobre materiales sólidos, por dos motivos principales. El primero es que el microorganismo debe tener la facultad de mezclar

varios polisacáridos. De modo general los hongos poseen sistemas enzimáticos completos que les permiten utilizar indistintamente varias fuentes de carbono y el segundo motivo es que el microorganismo debe tener capacidad de adherencia y penetración en las partículas del sustrato. Es claro que la estructura micelial de los hongos filamentosos les confiere en este sentido ventaja frente a otros microorganismos.

Adicionalmente, el microorganismo debe ser capaz de crecer en presencia de elevadas concentraciones de nutriente, al tiempo que posea una baja tendencia a la esporulación y alta hacia el crecimiento vegetativo rápido.

También los microorganismos seleccionados no deben ser patógenos ni producir toxinas. La reglamentación de la FDA (Food and Drug Administration), considera como GRAS a los microorganismos que pueden producir enzimas y otros productos de utilidad industrial. Por esta razón un gran número de enzimas comerciales son producidas por microorganismos GRAS, (ver Tabla 5).

La selección del microorganismo puede hacerse igualmente en términos de las características deseadas para la enzima; como por ejemplo tenemos la selección de organismos termófilos para obtener enzimas termoestables o bien la selección de una fuente de nitrógeno proteica que obligue a la inducción de ciertas proteasas (queratinasa).

Para encontrar el tiempo de máxima producción de las enzimas de interés se buscaron sustratos que puedan actuar como soporte para los microorganismos *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.*, los cuales con un mismo sustrato y diferentes soluciones de inducción produzcan la misma cantidad de enzima.

Tabla 5.- Microorganismos GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro por la FDA) y enzimas producidas (Adaptado del libro Biotecnología Alimentaria de García Garibay, M. y col. 1999)

Microorganismos	Producto
<i>Aspergillus Níger</i>	α -amilasa, celulasa, glucoamilasa, lactasa, pectinasa, catalasa, glucosa oxidasa, proteasas, lipasas, entre otras.
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -amilasa, glucoamilasa, lactasa, lipasa
<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilasa, proteasa
<i>Rhizopus oryzae</i>	α -amilasa, glucoamilasa, lactasa, lipasa
<i>Mortierella vinaceae</i>	α -galactosidasa
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Invertasa
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactasa
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Glucosa isomerasa
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Catalasa
<i>Trichoderma viride</i>	Celulasas, celobiasa
<i>Mucor mihei</i>	Renina, lipasa-esterasa

Enzimas producidas por microorganismos GRAS utilizando metodologías de fermentación en estado sólido (FES).

1.2.5.1.- *Aspergillus*

Aspergillus es un microorganismo ampliamente utilizado en la producción de una gran variedad de enzimas con un espectro tal que puede lograrse la completa degradación de la celulosa. Los *Aspergillus* presentan una serie de ventajas para la producción a gran escala, por ejemplo *Aspergillus* tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo, lo que posibilita la producción a gran escala, sus productos son generalmente considerados como GRAS (Generally Regarded

As Safe), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales (K. Villena, 2003).

1.2.5.1.1.- Aspergillus niger

El hongo *Aspergillus niger* ha sido objeto de investigación y de uso industrial por muchas décadas. Esta especie fúngica empezó a adquirir importancia industrial en 1919, donde se vio que tenía la habilidad de producir ácido cítrico (Schuster, 2002). Sin embargo desde 1960 *Aspergillus niger* se ha convertido en una fuente de producción de una gran variedad de enzimas que están establecidas como mejoras biotecnológicas en el procesamiento de frutas, bicarbonato, y en las industrias de almidón y alimentos, entre otras.

El *Aspergillus niger* pertenece a la clase de los *Eurotiomycetes*, son una clase de hongos omnipresentes capaces de vivir en hábitats muy variados. Los representantes más conocidos son los mohos como el género *Penicillium* o *Aspergillus*, que crecen sobre frutas pasadas y otros alimentos comportándose como saprófitos (se alimentan de materia orgánica muerta) (Watanabe, 2002). También pertenecen al orden de los *Eurotiales*, familia de los *Trichocomaceae*, género *Aspergillus* y Especie de los *Aspergillus Níger*.

1.2.5.1.2.- Usos Industriales del Aspergillus niger

Aspergillus niger se convirtió en un organismo utilizado industrialmente cuando se produjo ácido cítrico por primera vez en 1919 por fermentación. El ácido cítrico se utiliza ampliamente en varias industrias y, por volumen de ventas, es muy superior a otros metabolitos como ácido glucónico (Roukas 2000). En la industria farmacéutica, el citrato de hierro se utiliza como una fuente de hierro y ácido cítrico, ha sido como un conservante para la sangre almacenada; en las industrias de los cosméticos y artículos de tocador se le utiliza como un amortiguador, para ajustar el pH y como un antioxidante.

Además de ácido cítrico, *Aspergillus niger* es una rica fuente de enzimas como las Pectinasa, proteasas y amiloglucosidasas, las cuales fueron las primeras en ser explotadas, y fueron originalmente producidas en Superficie de cultivo (Frost y Moss 1987). A pesar de que tenía demostrado por el grupo de Kluver en Delft desde 1932 que era posible cultivar un hongo filamentoso como *Aspergillus niger* en cultivo sumergido (Kluver y Perquin 1932). Varias enzimas adicionales como celulasa y hemicelulasa fueron fabricados utilizando cepas de *Aspergillus niger* en los procesos de tanque agitado.

La Pectina, es un heteropolisacárido, componente principal en frutas y verduras comercialmente importantes. Varias enzimas, incluyendo pectin esterases, endo-y exopolysaccharidases y pectin lyases, son producidas a partir de *Aspergillus niger* que degrada la pectina (Grassin y Faugenbergue 1999).

Hasta la fecha, muchos productos enzimáticos están disponibles en el mercado de las cepas recombinantes de *Aspergillus niger*. En una reciente lista preparada por la Asociación Técnica de Enzimas, las enzimas α -amilasa, arabinofuranosidasa, catalasa, quimosina, glucoamilasa, glucosa oxidasa, pectin esterasa, fosfolipasa A2, fitasa, xilanasas, son mencionados por ser producida por las cepas recombinantes de *Aspergillus niger* (Pariza y Johnson 2001).

1.2.5.2.- *Trichoderma sp.*

Trichoderma (*Hypocrea*, Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) es un hongo saprofito que ha sido aislado comúnmente del suelo en diferentes países del mundo, también se ha encontrado sobre la superficie de la raíces de las plantas, sobre cortezas en descomposición, en el interior de troncos, y sobre otros hongos. Algunas especies de *Trichoderma* son ampliamente utilizadas como agentes de control biológico (por ejemplo *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. asperellum*, *T. koningii*) en la agricultura, contra varios hongos fitopatógenos y nematodos, otras para la producción de enzimas

(celulasas, glucanasas, pectinasas, quitinasas, proteasas) y antibióticos (peptaiboles, gliotoxina, 6-pentil- α -pirona, atroviridinas) activos contra hongos, bacterias y células cancerígenas humanas, en la biorremediación de ambientes contaminados, y como fuente de genes para la obtención de plantas transgénicas.

Los requerimientos nutricionales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, su humedad y temperatura óptimas de crecimiento se encuentran en un rango de 25 a 30 °C (Papavizas 1985). Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad.

De manera particular, los hongos del género *Trichoderma* se pueden encontrar en la rizosfera, donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos (Argumedo - Delira & Alarcón, 2009).

Los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridas, celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se han aprovechado en procesos industriales (Kubicek y Harman 1998, Verma *et al.* 2007). La explotación comercial de estas enzimas es diversa, ya que se emplean para producir detergente de ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles (Reese y Mandels 1989, Galante *et al.* 1993, Walsh *et al.* 1993, Verma *et al.* 2007). Por ejemplo, las celulasas de *T. reesei* se utilizan en el blanqueo de pulpa de papel, y son una alternativa amigable al convencional blanqueo con cloro, evitando el problema ambiental del cloro generado por dicho proceso (Buchert *et al.* 1994).

Las especies del género *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina (Brian 1944, Di Pietro *et al.* 1993) y hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Kleifeld y Chet 1992).

2.- Enzimas Fúngicas

Las enzimas fúngicas utilizadas en este estudio son las celulasas y pectinasas, enzimas extracelulares aisladas de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* Estas enzimas permiten la realización de un proceso más sencillo, la optimización del producto al generar, mayor calidad, mayor utilidad en su aplicación, mayor rentabilidad, y la obtención de un producto diferente o en mayor cantidad que sirva para compensar su reducida disponibilidad. El uso de enzimas microbianas proporciona grandes ventajas en actividades necesarias como en la biorremediación del agua, en la industria alimentaria y en la producción de antibióticos.

A continuación se describen a las celulasas y pectinasas.

2.1.- Las Celulasas

Los microorganismos encargados de la degradación de sustratos celulósicos producen múltiples enzimas que actúan en sinergia directamente sobre la celulosa (Murashima et al., 2003; Nidetzky et al., 1994). Las celulasas de muchas otras bacterias aeróbicas y las fúngicas, son solubles y actúan de forma independiente (Ng, 2004). Las celulasas son glicosil hidrolasas, y utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales.

Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión) (Withers, 2001).

Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuencia de aminoácidos. Este tipo de clasificación, por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre

ellas (Henrissat & Romeu, 1995). De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos.

- Endocelulasas: También denominadas endoglucanasas. Éstas son 1,4--D-glucan glucano-hidrolasas (EC 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 5,6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosil hidrolasas (Baldrian & Valaskova, 2008; Goedegebuur et al., 2002; Henrissat & Bairoch, 1993). Las endocelulasas actúan de forma azarosa sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferentes tamaños y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales.
- Exocelulasas. Son también conocidas como exoglucanasas, y actúan progresivamente en los extremos terminales del polímero liberando ya sea moléculas de glucosa, las glucohidrolasas (1,4-D-glucan glucohidrolasa, EC 3.2.1.74); o celobiosa, las celobiohidrolasas (1,4- -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91) (Baldrian & Valaskova, 2008).
- Glucosidasas: Son enzimas-D-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), pertenecientes a las familias 1 y 3 de las glicosil hidrolasas y se encargan de degradar la celobiosa a monómeros de glucosa (Baldrian & Valaskova, 2008; Lynd et al., 2002; Schmid & Wandrey, 1987).

Para la efectiva digestión de la celulosa las enzimas fúngicas han evolucionado mecanismos sinérgicos que les permiten contender con su recalcitrancia (Henrissat et al., 1985). Este fenómeno se refiere a la observación de que la actividad máxima de degradación de la celulosa no se da por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas (Nidetzky et al., 1994)

2.2.- Las Pectinasas

Las Pectinasas o enzimas pectinolíticas se encuentran en plantas superiores y en microorganismos, pero no son sintetizadas por animales superiores.

La presencia y acción de las enzimas pectinolíticas es importante tanto en las plantas vivas como en productos comercialmente importantes derivados de ellas. Las enzimas pectinolíticas obtenidas de ciertos microorganismos tienen diversas aplicaciones industriales. A los sustratos de estas enzimas se les conoce como sustancias pécticas - grupo de complejos polisacáridos ácidos que se presentan naturalmente en los materiales de las plantas.

Técnicamente, los polisacáridos pécticos son importantes como agentes gelificantes en la industria alimentaria. El tamaño, la densidad de carga, la distribución, el grado de sustitución de los polisacáridos pécticos puede modificarse fácilmente con enzimas u otros reactivos. Alteraciones muy pequeñas en la constitución de la molécula de pectina pueden ocasionar un profundo efecto en sus propiedades físico-químicas, hecho que ha sido utilizado para plantear esquemas de purificación.

2.2.1. Origen y Clasificación.

La degradación enzimática de la pectina, es un fenómeno asociado con numerosos procesos biológicos. Se presenta durante el desarrollo normal de las plantas al elongarse los tejidos vegetales en el crecimiento, al escindir las hojas en los árboles caducifolios y en la maduración de los frutos (Alabi y col. 1977; Rambouts y Pilnik, 1980), por dar solo unos ejemplos. Se degrada la pectina, junto con otros componentes de la pared celular de los vegetales, al establecerse ciertas asociaciones simbióticas de éstos con algunos microorganismos, así como durante los procesos de infección e infestación por parásitos de las plantas (Mc Guire y col., 1991).

No es sorprendente, pues, que las enzimas encargadas de degradar la pectina, en conjunto denominadas comúnmente como pectinasas, se encuentren ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo sintetizadas por numerosos organismos: bacterias, protozoarios, levaduras, hongos filamentosos e insectos, además de los propios vegetales (Runlin y col., 1990).

Para su estudio, las pectinasas han sido divididas en diferentes tipos, clasificándolas de acuerdo al modo de ataque que cada una presenta hacia la molécula pectina (Ward, 1985) (Fig. 2)

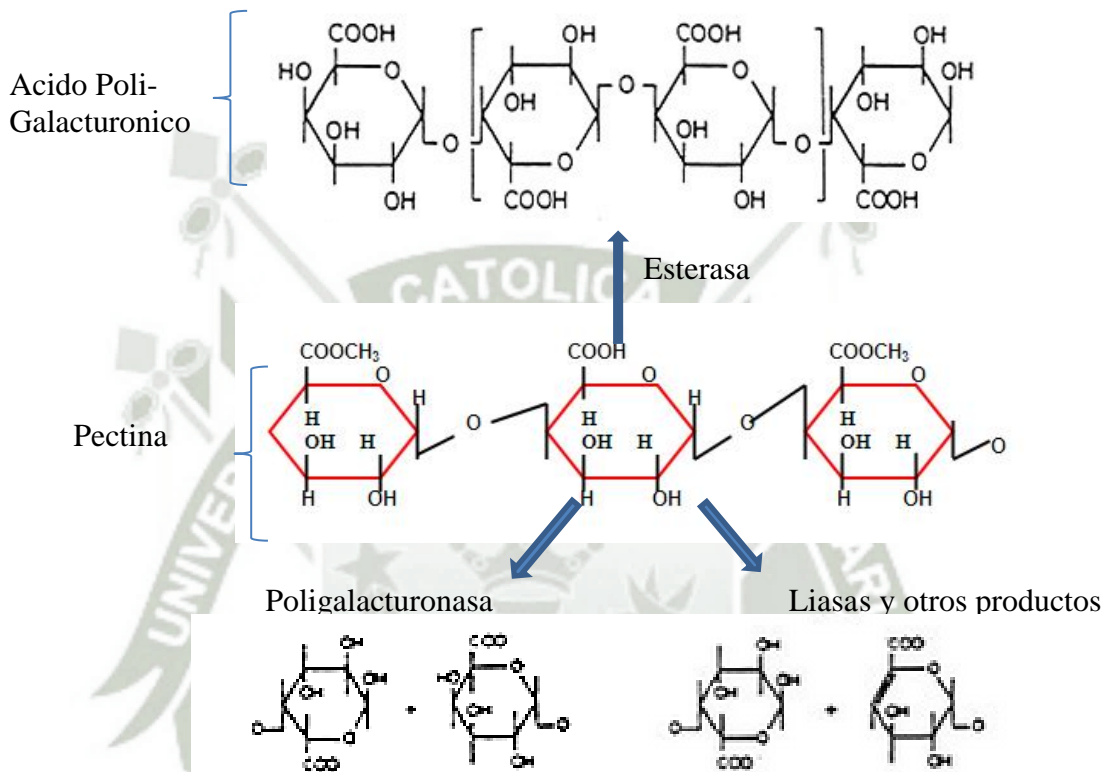


Figura 2.- Ruta Metabólica de la Pectinasa: Donde se aprecian los lugares de rompimiento de la pectina por acción de sus diferentes enzimas.

Tenemos, así, una primera clasificación en dos grandes grupos: las pectinesterasas, que son aquellas que atacan el enlace éster entre el metoxilo y el carbono 6 de cada Acido galacturónico de la cadena de la pectina, y las depolimerasas, que ocasionan la ruptura del enlace glicosídico α -1,4 entre dos residuos de ácido galacturónico adyacentes, ya sea por β -eliminación (liasas) o por hidrólisis (hidrolasas) (Rambouts y Pilnik, 1980).

Dentro de las depolimerasas encontramos, a su vez, las exopectinasas y las endopectinasas, de acuerdo de si atacan a la pectina sólo a partir de los extremos, o bien, si la atacan en cualquier punto al azar, a lo largo de toda la cadena (Ward, 1985). En una clasificación más detallada se puede encontrar tipos más precisos de enzimas, capaces de degradar moléculas más específicas y liberar, diferentes productos:

- Las *pectinesterasas*, son formadas por las plantas superiores, hongos y levaduras, y algunas bacterias (Ward, 1985; Barnby y col, 1990). Estas enzimas presentan una alta especificidad hacia el enlace éster del ácido péctico, siendo más efectivas a grados de polimerización de 10 ó más (Rambout y Pilnik, 1980).
- Las liasas también llamadas transelimininasas, al atacar a sus sustratos por β -eliminación, producen un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del extremo reductor recién formado (Richardson y Hyslop, 1985). Esto permite el ensayo de sus actividades por medio del monitoreo del aumento de la absorbancia a 235 nm (tomando el coeficiente de extinción molar valores entre 460 y 550 cm³ /nmol) (Fogarty y Kelly, 1983).
- La exopectatoliasa (poli 1,4- α - D-galacturónido) exoliasa, (EC. 4.2.2.9) libera dímeros insaturados a partir del extremo reductor del pectato, que es el sustrato preferido sobre las pectinas para esta enzima (Richardson y Hyslop, 1985). Este tipo de enzimas pectinolíticas es sintetizado por varios géneros bacterianos y fúngicos (Ward, 1985), siendo en general no afectadas por los iones divalentes (Rambouts y Pilnik, 1980). Se han reportado valores de pH óptimos muy elevados para estas enzimas: entre 5 y 9.5; y existen, al parecer, algunos casos en que se encuentran fuertemente asociadas con pectinesterasas, conjugando sus acciones a modo de “línea de ensamble de la pectina” (Sicard. 1988).
- Los pectatos y las pectinas de bajo grado de metoxilación son los sustratos de mayor prioridad para la endopectatoliasas (poli 1,4- α -D-galacturónido) liasa, EC

4.2.2.2.) . Esta última enzima ataca al pectato en una forma aleatoria a lo largo de toda la molécula, produciendo una serie de oligogalacturonatos insaturados de distintos tamaños, a los que vuelve a atacar hasta producir una acumulación de dímeros o trímeros insaturados de galacturonato (Fogarty y Kelly, 1983; Richardson y Hyslop, 1985). Varios grupos de bacterias y de hongos patógenos para las plantas, producen endopectatoliasas, que presentan también valores óptimos de pH elevados y que tienen un requerimiento absoluto de iones Ca^{++} para funcionar adecuadamente (Durrands y Cooper, 1988).

- Un tercer tipo de liasas corresponde al de las endopectinliasas (poli(1,4-&D-galacturónido) glicano hidrolasa, EC. 3.2.1.15) atacan de modo preferencial al pectato, al cual hidrolizan aleatoriamente, provocando la acumulación de dímeros y trímeros de galacturonato; su actividad disminuye al aumentar el grado de esterificación del sustrato y/o al disminuir su grado de polimerización. Numerosos hongos fitopatógenos y saprofitos, levaduras y bacterias son capaces de sintetizar endopoligalacturonasas (Aguilar y Huitrón, 1987; Bailey y Pessa, 1990; Barnby y col, 1990).
- Por otro lado, la exo-poligalacturonasa (poli(1,4- α -D-galacturónido) galacturano hidrolasa. EC.3.2.1.67) ataca también preferencialmente a las cadenas de pectato, pero es también bastante activa degradando oligogalacturonatos e incluso digalacturonatos (Rambouts y Pilnik, 1980). Esta proteína libera monogalacturonatos a partir de un extremo de la cadena de ácido péctico; puede ser el extremo reductor ó el extremo no reductor, dependiendo del origen de la propia enzima (Ward, 1985).
- Las exopoligalacturonasas se pueden encontrar en las plantas superiores, en las bacterias, en hongos y en los tractos digestivos de algunos insectos herbívoros (Runlin y Col, 1990). El método más usual de ensayo de la actividad exopoligalacturónica es por medio de la medición de azúcares reductores

producidos por la liberación de monogalacturonatos en un cierto tiempo (Fogarty y Kelly, 1983).

- Un último tipo de enzimas pectinolíticas está constituido por las oligogalacturonasas. Estas son enzimas unidas a la superficie de las células de ciertos hongos y bacterias que degradan muy activamente oligogalacturonatos saturados o no, hasta reducirlos a unidades monoméricas. El ataque se realiza a partir de uno u otro extremo, reductor o no reductor (Rambouts y Pilnik, 1980; Ward, 1985). La principal diferencia entre estas exoenzimas y las exopectinasas descritas anteriormente es que las oligogalacturonasas atacan preferencialmente cadenas cortas de poligalacturonato, disminuyendo su tasa de actividad conforme la longitud del sustrato se incrementa. (Rambouts y Pilnik, 1980).

3.- Los colorantes Naturales (Bixina a partir del Achiote)

3.1. El Achiote

El achiote es el nombre común para la especie *Bixa Orellana* L. (Bixaceae) Pequeño arbusto indígena de la zona subtropical andina y de Latinoamérica; su fruto es una capsula, cuya semilla contiene un colorante color rojizo, en concentración de alrededor de 3% en semillas de mejor calidad.

El achiote ha sido utilizado desde tiempos antiguos por los nativos para pintarse el cuerpo de color rojo, como pintura de guerra, también se utilizó como colorante en la textilería y en la cerámica, y también como repelente de insectos.

El Perú es el primer productor y exportador mundial de achiote², representa un 35% de la producción mundial, el otro 65% proviene de Kenya, Brasil, e India. Los

² http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/ACHIOTE.HTM

principales países a quienes se les vende semillas de achiote son los Estados Unidos, Costa Rica, Puerto Rico, Venezuela, Canadá.

Los principales países a quienes se les vende el derivado de achiote Bixina / Norbixina son: Estados Unidos (quien está demandando este producto en diferentes concentraciones, siendo la más solicitada Bixina Cristal al 95%), Japón, Alemania, Holanda.

3.2.- Bixina y Norbixina

Las semillas del achiote proporcionan dos pigmentos, la bixina que es soluble en aceite y la norbixina que es soluble en agua. Ambos pigmentos son carotenoides y por tanto pueden verse adversamente afectados por la luz y el oxígeno. En casos extremos, es conveniente proteger los pigmentos utilizando ácido ascórbico (vitamina C). La norbixina es sensible al dióxido de azufre a niveles por encima de 100 ppm, mientras que el agua dura o condiciones de pH bajo pueden provocar la precipitación del pigmento a menos que se utilicen productos de colores naturales preparados con una fórmula especial.

La norbixina es estable al calor y proporciona un tono naranja. Se puede encontrar en el mercado frecuentemente como una mezcla con otros pigmentos, especialmente curcumina, para asegurar la obtención de tonos amarillo/naranja precisos. Tradicionalmente, el uso principal de la norbixina ha sido la coloración del queso, pero se utiliza en un número mucho mayor de aplicaciones que incluyen pan rallado, pastelería de harina, productos lácteos y helados.

El pigmento soluble en aceite, la bixina, se utiliza en rellenos de crema para bollos, margarina, productos para untar con bajo contenido de grasa y otros sistemas basados en grasa.

4.- Extracción Enzimática de los colorantes

Los colorantes se usan en la industria alimentaria para la coloración de mantequillas, margarinas, quesos, yogurts, aceites, néctares, productos de panadería y confitería (SGS, 1991).

El método más utilizado es el de extracción alcalina. Sin embargo, los principales mercados de exportación (Estados Unidos, Europa y Japón) desean que se eliminen los métodos de extracción que utilizan productos químicos (Liceras, 1988).

El uso de enzimas (pectinasas, celulasas, hemicelulasas) que degradan la pared celular, facilitaría la extracción acuosa del colorante (Godfrey, 1983). Estas enzimas que actúan sobre componentes insolubles tales como celulosa, hemicelulosa y pectina permitirían obtener un colorante de mayor pureza y calidad. Asimismo, permitiría dejar de lado las sustancias químicas utilizadas actualmente en los métodos de extracción industriales.

Una de las alternativas para aumentar la cantidad de producto a obtener en la extracción es la adición de enzimas, generalmente pectinolíticas a la biomasa macerada, para así mejorar el rendimiento del colorante³, al actuar destructivamente sobre componentes de la pared celular y permitir la liberación de los compuestos. Esta vía de mejoramiento del rendimiento parece tener ciertas ventajas:

- No es necesario un cambio completo del proceso de obtención tradicional, lo que implica una modificación menor y facilidad de instalación.
- La adición de pectinasas y otras enzimas aplicables no es una técnica nueva, ya que data de 1930, cuando Alemania y Estados Unidos las usaron en la clarificación de jugos de frutas.

³ Sacado de la fuente (García Garibay & Quintero Ramírez, 1999) capítulo 15 (colorantes naturales).

La adición de enzimas pectinolíticas o mezclas de estas con amilasas y otras enzimas, durante o después del macerado se ha ensayado a nivel piloto y parece tener amplias perspectivas. En particular, se ha propuesto su uso en la extracción de antocianinas en donde se han obtenido mejoras en el rendimiento del pigmento.

Un caso especial es el uso de lipasas usado para la extracción de carotenos a partir del paprika. La adición de las enzimas se efectúa antes de la extracción (2.5gr de lipasa/ 500 partes de paprika) bajo agitación por 8 horas, aumentando la eficiencia de la producción del pigmento carotenoide.



CAPÍTULO N° 3

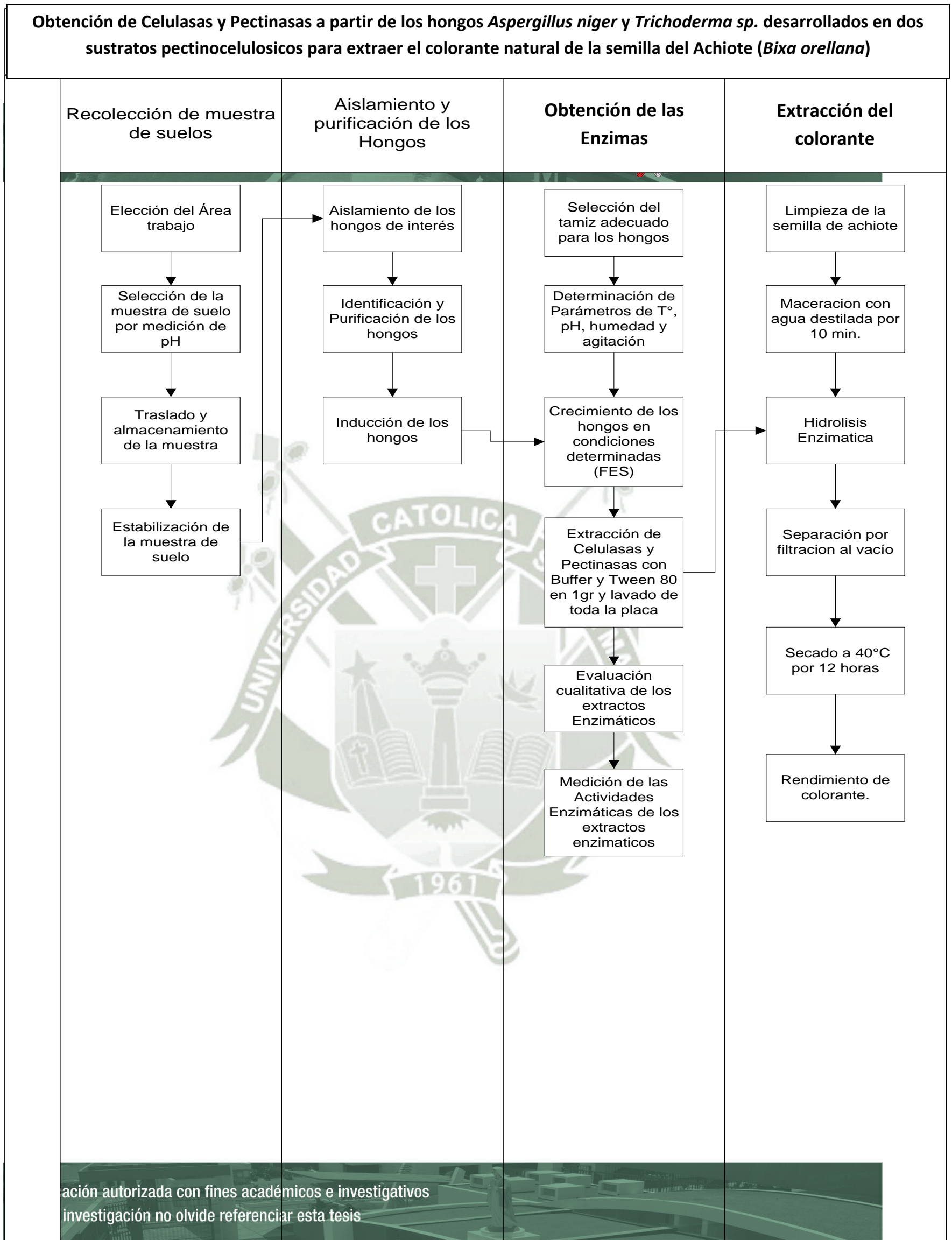
MATERIALES Y METODOS

El trabajo se ejecutó en 3 fases, la primera de ellas consistió en la recolección de la muestra y el aislamiento de los hongos *Trichoderma sp.* y *Aspergillus Níger*. La segunda fase, se seleccionó el tamiz adecuado del medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos fúngicos y la extracción de las enzimas; aquí, se trabajó con el orujo de la cebada cervecera y la cáscara de cebolla los cuales fueron usados como sustrato en las fermentaciones en estado sólido.

Finalmente, se midió la actividad de los dos extractos enzimáticos de interés, de ésta forma, se dio cumplimiento a la tercera fase de la investigación.

Adicionalmente los extractos enzimáticos de interés fueron probadas en la extracción del colorante natural bixina a partir de las semillas del achiote, comparando su eficiencia con diferentes métodos como se puede apreciar en el siguiente flujograma.

Flujo grama de Actividades



1.- Materiales

Material Biológico

- Orujo de Cebada Cervecera.
- Cáscara de Cebolla
- Tierra agrícola de la rizósfera de zapallo
- *Aspergillus Níger*.
- *Trichoderma sp.*

Material de Vidrio

- Placas Petri
- Baguetas
- Bureta de 100ml.
- Vaso precipitado
- Erlen Mayers de 50ml y de 250ml.
- Balones de 100ml
- Botellas de vidrio de 500ml

Equipos:

- Autoclave
- Microscopio
- Estufa
- Shaker
- Refrigeradora
- Hot plate

- Agitador magnético
- Mechero bunsen
- Balanza Analítica Labomed
- Baño Termostático Viking
- Espectrofotómetro Quimis
- Centrifuga Gemmy A-1215

Reactivos:

- Medio de cultivo Czapeck
- Medio de cultivo PDA.
- Medio de cultivo Sabouraud
- Reactivo de Benedict
- Kit de glicemia enzimática
- Reactivo de Somogy-Nelson
- Solución tamponada de almidón

Otros:

- Tamizadores (1mm, 1.2mm, 1.6mm, 1.8mm, 2mm)

1.- Recolección de la muestra de suelo agrícola de la rizósfera de zapallo

1.1.- Ubicación

El área seleccionada para recolectar la muestra de suelo de la cual se aislaron los hongos en estudio, se encuentra ubicada en la zona agrícola del distrito de Cayma, a una altura de 2394 m.s.n.m, a 5 minutos de la plaza de Cayma. (Ver figura 9).

- Latitud: $16^{\circ}20'56.04''$ s.
- Longitud: $71^{\circ}32'35.11''$ o

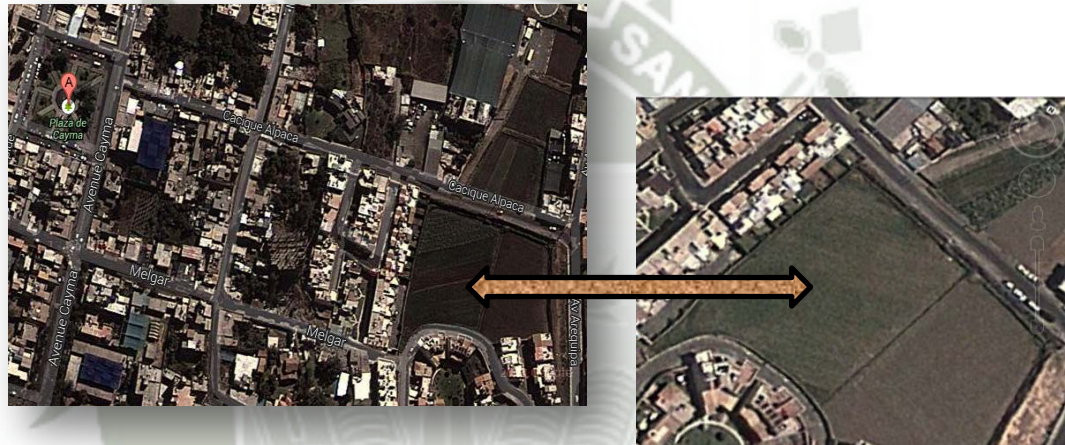


Figura 3.- Foto de Ubicación del terreno donde se obtuvieron las muestras de suelo agrícola a partir de la rizósfera de zapallo

1.2.- Toma de muestras y selección de área

La toma de muestras se realizó de forma aleatoria en una porción determinada de la parcela, específicamente en zonas cercanas a los bordes del terreno. Estas muestras se tomaron utilizando el sistema de recorrido en diagonal, de manera que se pudiera obtener una muestra representativa (Figura 4).

Se realizó una inspección del área del muestreo con el fin de determinar las zonas a muestrear, tomando puntos aleatorios en un esquema en donde se demarcaron 5 áreas de 25 m² equidistantes.

A partir de los 5 cuadrantes demarcados previamente, se tomaron muestras a 0, 10 y 20 cm de profundidad, (tres sub muestras con un peso de 50 g cada una aproximadamente), (Burlage et al., 1998). (Ver página 57 y 58)

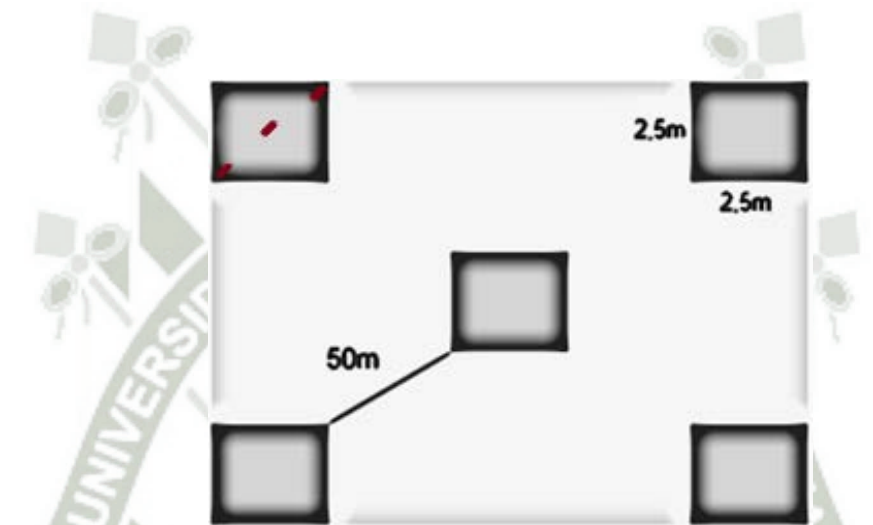


Figura 4.- Esquema utilizado para la Toma de Muestras de suelo agrícola de la rizósfera de zapallo.

1.3 Determinación de pH del suelo

Inicialmente se tomó el pH del agua des-ionizada, posteriormente se midió el pH del suelo mezclando 20 gr. de suelo en agua destilada en una proporción de 1:2,5. Luego se agitó la muestra y se registró el valor de pH. Se realizaron 3 repeticiones para cada uno de los cuadrantes.

1.4.-Traslado y almacenaje de las muestras de suelo

Para el transporte de muestras se utilizaron frascos estériles de cierre hermético. Estas fueron transportadas y procesadas el mismo día en el laboratorio, para lo cual, las muestras de suelo se tamizaron utilizando un tamiz de 2 mm. Este procedimiento se realizó en cámaras de cultivo para evitar contaminación cruzada.

1.5.- Estabilización de las muestras de suelo

Se realizó una pre incubación de las muestras de suelo durante 24 horas a 25°C en incubadora, este procedimiento fue realizado para evitar contaminaciones cruzadas con microorganismos del ambiente; Luego, se llevaron a cabo los procesos de aislamiento de los hongos.

2.- Aislamiento de los hongos de Interés

Estas pruebas se realizaron en cámara de cultivo para evitar contaminaciones.

2.1.- Medios de cultivo

Para la recuperación e identificación de hongos filamentosos se utilizaron medios de cultivo sólidos como el agar papa dextrosa (PDA), agar Czapeck, agar y el agar Sabouraud (Ver Anexo 1). El PDA se utilizó para llevar a cabo los procedimientos de aislamiento. Este medio, fue útil ya que proporcionó gran cantidad de nutrientes (fuente de nitrógeno y carbono), lo que permitió recuperar una amplia variedad de hongos filamentosos.

Para el aislamiento de los hongos filamentosos a los medios de cultivo se les adicionó Cloranfenicol (400ppm) 0,05mg/ml para evitar el crecimiento de otros microorganismos como bacterias y levaduras.

2.2.- Técnica de siembra por dilución seriada.

Este método se lleva a cabo diluyendo la muestra fresca en diferentes concentraciones de agua desionizada y sembrando las diferentes diluciones a las placas con medios de cultivo, para posteriormente observar el crecimiento micelial de los hongos presentes en las muestras.

Procedimiento:

Se tomaron 10gr.de suelo previamente incubado, a partir de este paso se tomaron diluciones seriadas 1/10, 1/100 y 1/1000, las muestras se colocaron sobre placas con agar PDA (Anexo 1) adicionandoles de Cloranfenicol (400ppm) 0,05mg/ml. por duplicado. Seguidamente las placas se llevaron a incubación por un periodo de 3 a 6 días a 25°C con el fin de observar crecimiento de colonias fúngicas.

2.3.- Identificación y Purificación de los hongos

2.3.1.- Re siembra periódica en medios frescos

Se realizaron sub cultivos a medios frescos con el objetivo de purificar el cultivo conservado. Para esto se utilizaron los siguientes medios: agar papa dextrosa (PDA), agar Czapeck (Cz), y agar Sabouraud.

Después de sembrados se llevaron a incubar a 25°C durante 7 días. Las placas Petri se almacenaron y se evaluó su pureza y viabilidad.

2.3.2.- Identificación macroscópica de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.*

Para la identificación del género y posible especie de los hongos aislados fue necesario la utilización de claves taxonómicas y manuales de identificación, para ello se tuvo en cuenta las características macroscópicas, es así como fue preciso examinar los aislamientos de cada una de las cepas utilizando diferentes medios de cultivo para la caracterización. La observación macroscópica se realizó teniendo en cuenta el aspecto, superficie y color de las colonias desarrolladas en medio PDA.

2.3.3.- Identificación Microscópica de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.*

Para la identificación microscópica se utilizó un asa de col para tomar una parte de la superficie de la colonia que luego se depositó sobre una gota de azul de lactofenol. Se extendió el preparado y se cubrió con una lámina cubreobjetos, para luego ser observada al microscopio con un aumento de 40X y 100X.

La observación microscópica de las estructuras de identificación se realizó a través de microscopio LEICA.

2.3.4.- Degradación de celulosa por prueba en tubo de ensayo

A 7 tubos de ensayo se agrega agar PDA y pedazos de papel filtro whatman N°1 intercalado hasta llegar a la parte superior del tubo. Los tubos con agar se solidificaron en baño con hielo para asegurar la distribución uniforme del agar y la del papel. Los hongos se inocularon en el agar en la superior de los tubos, se incubaron a temperatura ambiente. Se analizó después de 7 días.

2.3.5.- Prueba para degradación de celulosa

En cuatro placas Petri se colocaron retazos de papel filtro remojado con agua destilada, posteriormente en dos placas se inocularon los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* por separado. Luego se dejó incubar por 7 días a temperatura ambiente registrándose los resultados por crecimiento del microorganismo en el medio. Se realizó esta prueba para determinar si las cepas aisladas son degradadoras de celulosa. Esta prueba se realizó por triplicado. (Ver Figura 14)

2.4.-Inducción de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.*

Se realizó un estudio preliminar con idea de evaluar el crecimiento utilizando los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* Para ello, se empleó un medio típico para el crecimiento de hongos, que contenía como única fuente de carbono el CMC (Carboximetil Celulosa) y/o pectina, como inductores de Celulasas y Pectinasas, respectivamente.(Ver tabla 6)

Tabla 6.- Composición de los Medios para la inducción de los Microorganismos

Medio de Cultivo específico para Pectinasas	Medio de Cultivo específico para Celulasas
0.5gr. Peptona	0.5gr. Peptona
0.25gr. Extracto de Levadura	0.25gr. Extracto de Levadura
7.5 gr de Agar Agar	7.5 gr de Agar Agar
1.75 gr de Pectina	1.75 gr de CMC

Descripción de la composición de los de los medios de cultivo para la adaptación de los microorganismos para producir pectinasas y celulasas.

2.5.- Obtención del inóculo

La determinación de la concentración de esporas en el inóculo se llevó a cabo mediante un recuento estadístico en cámara Neubauer con ayuda de un microscopio óptico (LEICA, equipado con oculares de 10 aumentos y objetivos de 4, 10, 40 y 100). Para el desarrollo de las fermentaciones, cada placa petri se inoculó con $4,5 \cdot 10^7$ de esporas, añadiendo el volumen necesario de solución de esporas. Se utilizó esta concentración por encontrarse dentro del rango utilizado por la mayoría de los autores.

2.5.1.- Preparación y almacenamiento del inóculo

La preparación de la solución de esporas que se utilizó en cada uno de los experimentos, se dio a partir de dos placas Petri cultivadas respectivamente con ambos hongos. Este medio contenía CMC y Pectina como únicas fuentes de carbono para inducir la producción de Celulasas y Pectinasas (Diaz Sanchez, 2009).

Las esporas almacenadas en el medio sintético se re suspendieron con la adición de 2ml de una solución de NaCl (0,9%). A continuación, se añadieron 200 μ l de la suspensión a ocho placas petri, se incubaron a 20°C durante 5 días. Transcurrido este tiempo se recogieron las esporas adicionando a cada placa 1 ml de la solución de NaCl (0,9%)

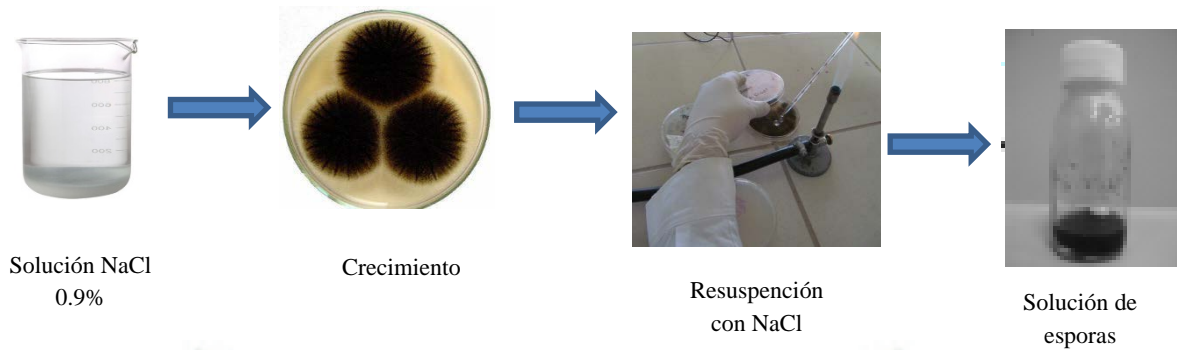


Figura 5.-Preparación del Inoculo de esporas a partir de una placa que contenga *Aspergillus niger* y otra que contenga *Trichoderma sp.*

3.-Extracción de las Enzimas

3.1.- Recolección del sustrato

El orujo de cebada recolectadas del Módulo de Cerveza de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa, y la Cascara de Cebolla recolectado del mercado mayorista “Mi Mercado”, fueron secadas en una estufa a 70°C y molidas hasta un tamaño de partícula no mayor a 2 mm en Mortero de porcelana.

3.2.- Selección del tamiz adecuado para los hongos

Se determinó el crecimiento del hongo en los diferentes tamices (1mm, 1,2mm, 1,6mm, 1,8mm y 2mm) identificando así cual es el mejor tamiz para el crecimiento y producción de los metabolitos secundarios a partir de los hongos.

3.3.- Determinación de los parámetros óptimos para la FES

Para el análisis de las mejores condiciones de crecimiento del hongo se evaluaron dos sustratos de fermentación distintos consistentes en el orujo de la cebada y las cáscaras de cebolla estériles, (antes de su uso, el sólido molido se sometió a un ciclo de esterilización de 20 min a 120 °C en el autoclave). Se utilizaron placas Petri de 20 ml. como fermentadores, cada una de ellas fue llenada con 5 gramos de sustrato previamente inoculadas con el hongo.

Se estudiaron bajo condiciones anaeróbicas diferentes parámetros experimentales relacionados con la producción de enzimas pépticas y celulíticas como son: tamaño de partícula, tipo de inóculo (esporas, micelio sin pre adaptar y micelio pre adaptado), la influencia de la adición de sales (KH_2PO_4 , urea y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), y soluciones de inducción de CMC a 0,5% y Pectina Cítrica al 0.75%, también se determinó el tiempo de crecimiento de los microorganismos en los diferentes sistemas.

3.4.- Desarrollo de la FES

Las fermentaciones se llevaron a cabo en placas petri de 9 cm de diámetro, a las cuales se adicionó la cantidad de inductor, agua destilada y buffer para ajustar la humedad inicial del sólido al 70%,(según el experimento, (Diaz Sanchez, 2009)) Se colocó un volumen de inóculo tal que cada placa debió contener $4,5 \cdot 10^7$ células y 5 gramos de sustrato estéril. En todos los casos las placas se incubaron en un shaker SK-300 por 7 días. Cada experimento se realizó por triplicado.

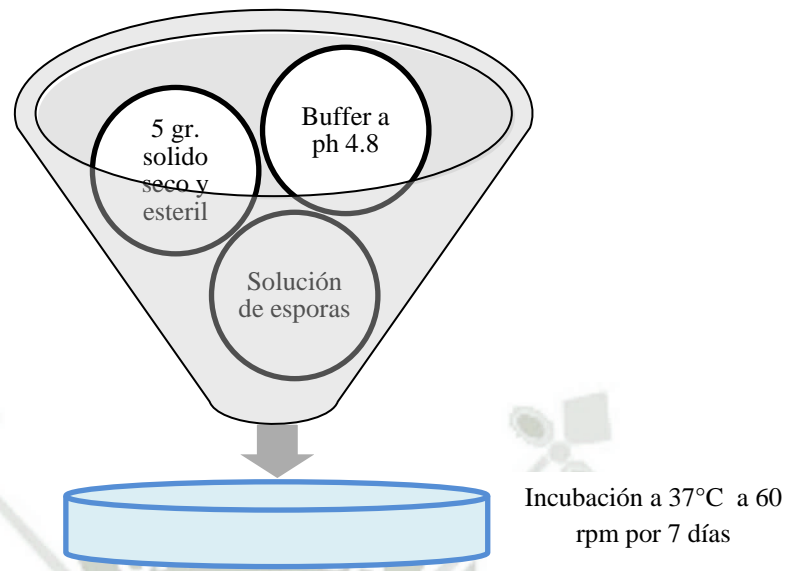


Figura 6.- Esquema del Desarrollo de las Fermentaciones en placas Petri en los 2 sustratos utilizados.

Se realizaron diversos experimentos con la idea de estudiar la producción de las enzimas en distintas condiciones. De este modo, se probaron distintas mezclas entre los hongos y los sustratos.

Con objeto de resumir los experimentos realizados y sus condiciones se adjunta la siguiente tabla.

Tabla 7.- Sistemas Realizados

	Hongo	Sustrato	Inductor
Sistema 1	Trichoderma	Orujo	Celulosa
Sistema 2	Trichoderma	Cebolla	Celulosa
Sistema 3	Niger	Orujo	Celulosa
Sistema 4	Trichoderma	Orujo	Pectina
Sistema 5	Trichoderma	Cebolla	Pectina
Sistema 6	Niger	Orujo	Pectina
Sistema 7	Niger	Cebolla	Pectina

Cada uno de estos experimentos, a excepción del correspondiente al medio sintético, se realizó por triplicado.

3.5.- Extracción de celulasas y pectinasas

Para la extracción de las enzimas se evaluó el efecto de distintas variables que influyen en la extracción a partir del orujo de cebada y la cascarilla de cebolla:

Tipo de Disolvente	•Se analizó el efecto de los disolventes, el tampon acetato pH 4,8 y el Tween 80 (0,1%) sobre la extracción de las enzimas en estudio.
Temperatura	•La temperatura de extraccion fue de 37°C (Temperatura Ambiente)
Tiempo de extracción	•El tiempo de extraccion fue de 30 min.
Velocidad de agitacion	•La velocidad fue de 1000 rpm por 6 min.
Volumen de disolvente	•Se tomó como volumen de extracción de las enzimas de interés 10 ml por cada gramo de sustrato sólido fermentado, como también para el lavado de toda la placa con los disolventes mencionados anteriormente

Se concluyó que las condiciones recomendadas para la extracción óptima de las enzimas en estudio a partir de orujo de la cerveza y de la cascara de la cebolla eran 10 ml de Tween 80 (0,1%), 37°C, 30 min y 60 rpm. Por este motivo, fueron las que se utilizaron para la extracción de los extractos enzimáticos de los sistemas utilizados.

3.6.- Medición de la actividad enzimática

Se evaluó la actividad de las celulasas, y pectinasas, para lo cual fue necesaria la preparación de las siguientes soluciones y reactivos que se explican a continuación.

3.6.1.-Prueba de Benedict para celulasas y pectinasas

Para determinar la presencia de los azúcares reductores producidos por los extractos enzimáticos de interés se utilizó el análisis cualitativo de Benedict.

Fundamento:

Esta prueba se basa en la capacidad del carbohidrato de reducir el Cu^{2+} en un medio alcalino a Cu^+ . Este Cu^+ se oxida y precipita en forma de Cu_2O , lo que proporciona la coloración con precipitado rojo ladrillo, la cual es positiva a la reacción.

La coloración producida va desde verde, amarillo, anaranjado o rojizo, dependiendo de la concentración de óxido de cobre y ésta a su vez de la cantidad de cobre reducido.

Esta reacción es específica para azúcares con grupo reductores libres ($\text{C}=\text{O}$). Todos los monosacáridos poseen un grupo reductor libre.



Figura 7.- Reacción con el Reactivo de Benedict (organica1.org/lab2/135.htm) Reacción química de Benedict donde un precipitado rojo ladrillo nos da una reacción positiva formando el Cu_2O ayudando así a identificar la presencia de azúcares reductores.

3.6.1.1.- Procedimiento

1. Colocar 5 ml de reactivo en un tubo de ensayo
2. Agregar 2ml de complejo sustrato enzima y mezclar bien.
3. Colocar el tubo en baño María hirviendo durante 5 minutos o calentar con llama hasta su ebullición durante 1-2 minutos.
4. Dejar que se enfríe lentamente

3.6.2.- Determinación de la Actividad Pectinas

La actividad total de las Pectinasas, debido a la acción de la poligalacturonasa, polimetilgalacturonasa y pectinliasa, se determinó midiendo el incremento de los azúcares reductores.

Se prepararon 20ml. de muestra (extracto enzimático + solución de pectina al 0.75%)

Se agregó 1ml de la solución enzimática en 2ml de Reactivo Somogyi-Nelson para enzimas lavadas con buffer acetato a ph 4.8 y tween 80 al 0.1%.

Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 37°C.

Se determinaron la presencia de azúcares reductores mediante Somogy Nelson modificado a 500nm.

Fundamento:

El reactivo de Somogy es una solución de Cu^{+2} , que en contacto con un agente reductor (azúcar) pasa a Cu^{+1} . El reactivo de Nelson es una solución de Mo^{+4} que en contacto con un agente reductor (Cu^{+1}) pasa a Mo^{+2} .

Entonces al poner la solución de Somogy, los reductores reducen el cobre, después ese cobre reducido es vuelto a oxidar por el manganeso que en estado de oxidación 2 forma un complejo de color azul. Luego por espectrometría para determinar la concentración del reductor. (Ver Anexo 2)

3.6.3.-. Determinación de Actividad Celulasa***Fundamento:***

Se utilizó el kit de glicemia enzimática para determinar la cantidad de glucosa producida por los extractos enzimáticos celulolítico provocándose una coloración rosada cuando reacciona la solución de trabajo con el extracto enzimático utilizando una temperatura de 37°C por diez minutos de incubación.

3.6.3.1. Procedimiento

El protocolo que se siguió fue el descrito por el kit de Glicemia enzimática marca Wiener Lab:

a) Reactivos Provistos

- Reactivo A: Solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en Buffer Tris 0,92 mol/l.
- Reactivo B: solución de fenol 55 mmol/l.

- Reactivo C: solución de glucosa oxidasa (1000 U/ml) y peroxidasa (120 U/ml).
- Standard: solución de glucosa 1 g/l.

b) Instrucciones Para Su Uso

- **Standard:** Listo para usar.
- **Reactivo A:** Listo para usar.
- **Reactivo B:** Listo para usar. Ver PRECAUCIONES. (Anexo 3)
- **Reactivo C:** Homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

Reactivo de Trabajo:

De acuerdo al volumen de trabajo, colocar en una probeta 500 partes de agua destilada, 50 partes de Reactivo A, 50 partes de Reactivo B y llevar a 1000 partes con agua destilada. Agregar 3 partes de Reactivo C previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar.

c) Procedimiento

En tres tubos marcados B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

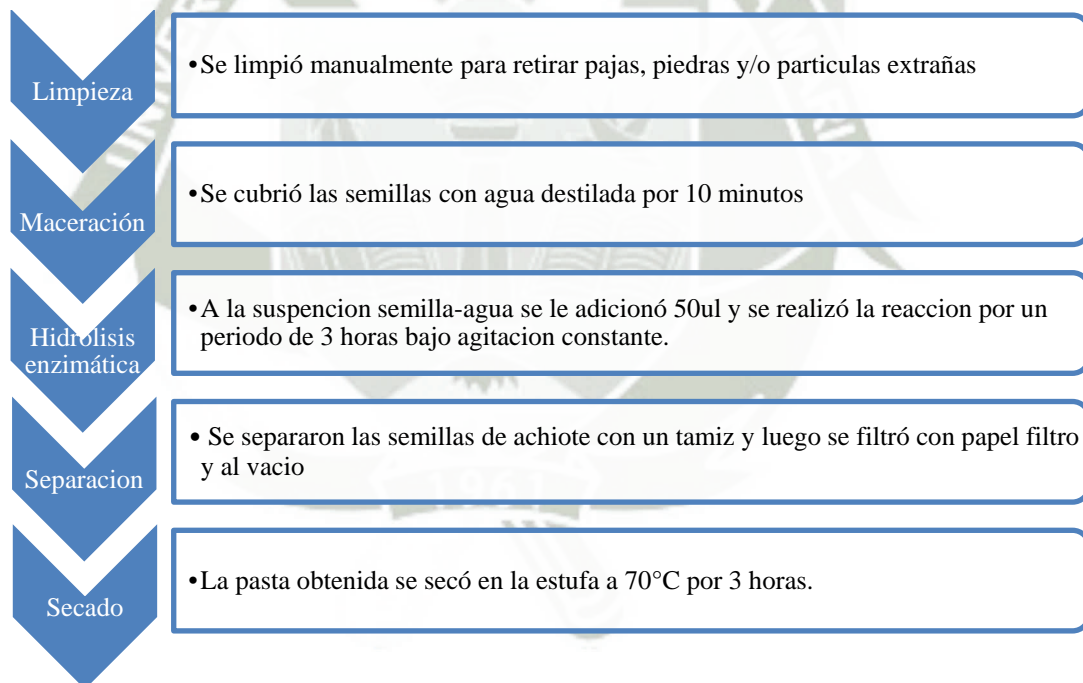
	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo de trabajo	de 2 ml	2 ml	2 ml

Incubar 10 minutos en baño de agua a 37°C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm. o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) llevando el aparato a cero con el blanco

4.- Obtención del colorante

4.1.- Método Enzimático

Para la extracción del extracto por métodos enzimáticos, se siguió el flujo de operaciones mostrado a continuación. Este flujo se adaptó del trabajo de Nieto (1992). Se utilizaron 5gr y 10gr de semillas de achiote y se realizaron tres repeticiones para cada ensayo. A continuación se describen las operaciones del proceso.



4.2.- Método Alcalino (Químico)

Se pesaron 10gr de semilla de Achiote y se siguió la metodología que se describe a continuación:

Limpieza	<ul style="list-style-type: none">• Se limpió manualmente para retirar pajas, piedras y/o partículas extrañas
1era extracción	<ul style="list-style-type: none">• Se le agrego 8 ml de agua destilada a la cual se le agrego 0.2ml. de NaOH al 1% se llevo a agitacion por 10 min.
2da extraccion	<ul style="list-style-type: none">• Se le agrego 6 ml de agua destilada a la cual se le agrego 4ml. de NaOH al 1% se llevo a agitacion por 10 min.
3era extraccion	<ul style="list-style-type: none">• Se le agrego 6 ml de agua destilada a la cual se le agrego 4ml. de NaOH al 1% se llevo a agitacion por 15 min
Filtración	<ul style="list-style-type: none">• A la filtracion se le agrego 1.75 de HCL al 1.5 N.
Centifugacion	<ul style="list-style-type: none">• A 4000 rpm por 15 min.
Secado	<ul style="list-style-type: none">• Se seco a 70 °C por 1 hora.

4.3.- Rendimiento

Para hallar el rendimiento se utilizó la siguiente formula

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Masa del Producto Final}}{\text{Masa inicial de semilla}} \times 100$$

CAPÍTULO N° 4

Resultados y Discusión

1.- Recolección de la muestra de suelo agrícola de la rizosfera de zapallo de

1.1.- Determinación de pH de la muestra de suelo agrícola

Primeramente se determinó el pH del agua des-ionizada el cual nos dio un valor de 6.0, con la que se disolvió la tierra; luego se determinó el pH del suelo agrícola dando un valor promedio de 6.2 (Ver tabla 8); esto se hizo mezclando 20g de muestra en agua des-ionizada (proporción 1:2.5).

Tabla 8.- Promedio de los pH a 20cm de profundidad.

Lugar	Promedio pH.
Cuadrante 1	6.0
Cuadrante 2	6.4
Cuadrante 3	6.3
Cuadrante 4	6.3
Cuadrante 5	5,9
Promedio final	6.2

El promedio de los pHs de las muestras de suelo agrícola del sector de Cayma en donde se tomaron como referencia 5 zonas de recolección de muestra. (Ver Anexo 5).

Para el análisis de pHs se seleccionó la muestra de 20 cm de profundidad, ya que en esta hubo mayor incidencia de hongos, tomando los cuadrantes 1(ver anexo 5), que bordean valores de pH entre 5.1 y 6.5, y el cuadrante 5 donde los pHs bordean valores entre 5.8 y 6.9.

Cochrane en 1963 dijo que a pHs altos se perjudica enormemente el desarrollo de los hongos por la solubilidad de los metales y a pHs bajos se afecta los sistemas enzimáticos, el ingreso de vitaminas esenciales, ácidos orgánicos y la toma de minerales. Kavanagh, 2005; Diemer, en 1996 el pH óptimo de suelos agrícolas está en 4 y 6.

El promedio de pHs obtenidos a partir de los 5 cuadrantes, nos dio, un valor de 6.2, esto nos da a entender que a estos pHs, se pueden encontrar los hongos de interés para nuestro trabajo.

Según Daniel Ibarra y col en el 2009 en su estudio sobre” La distribución espacial en terrenos agrícolas en Zapopan, México; presento un valor promedio de pH de 5.4, mientras que en nuestro estudio se obtuvo un valor promedio de 6.2 esto probablemente se da debido a una salinidad considerable en el suelo.

También en el 2008 Edna Arias y col. determinaron que suelos de 5.38 y 5.07 son óptimos para el aislamiento de microorganismos filamentosos estos resultados se dieron en los páramos de Guasca y Cruz Verde (Colombia)

2.- Aislamiento y purificación de los hongos

Se logró aislar 6 cepas fúngicas filamentosas a partir de las muestras tomadas a partir de los 5 cuadrantes demarcados, se tomaron 3 submuestras con un peso de 50gr de las muestras a tres profundidades diferentes, las cuales son en la parte superficial, a 10cm y a 20cm de profundidad.

Entre las cepas encontradas se pudieron observar hongos filamentosos como también bacterias y levaduras.

Entre los hongos filamentosos, en las muestras superficiales se pudieron observar hongos pertenecientes al género *Penicillium*, *Rhizopus*. A los 10cm de profundidad se pudieron observar hongos pertenecientes al género *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y a los 20cm de profundidad encontramos hongos pertenecientes al género *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Rhizopus*.

Las cepas fueron sembradas en medio genérico PDA por dilución seriada 1/10 y 1/100; de las muestras de suelo, las placas fueron llevadas a estufa por 5 días a 37°C, siendo la mejor la dilución 1/10 que fue la que mejor resultado nos dio en el aspecto de crecimiento de microorganismos.

Según Etna Arias y col. En el 2008 presentaron un trabajo sobre aislamiento e identificación de hongo filamentosos a partir de muestras de suelo en el cual encontraron hongos correspondientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium*, y *Trichoderma*, siendo los de mayor incidencia *Aspergillus*, y *Penicillium*, en nuestro caso hubo mayor incidencia de *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Trichoderma*.

2.1.- *Aspergillus niger*

2.1.1.- Aislamiento del *Aspergillus niger*

Para el aislamiento del *Aspergillus niger* se replicó la cepa unas 5 veces hasta obtener la cepa pura. También se usó el Agar Sabouraud pero no se llegó a separar a los 2 hongos ya que se produjo una contaminación cruzada y esto impidió una buena purificación en este medio.

2.1.2.- Identificación del *Aspergillus Níger*

2.1.2.1.- Taxonomía del *Aspergillus Níger*

La clasificación taxonómica del *Aspergillus Níger* es la siguiente: (Sistema de clasificación de Cronquist. 1981) como se puede apreciar en la tabla 8.

Tabla 9.- Clasificación Taxonómica del *Aspergillus Níger*

<i>Aspergillus niger</i>	
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Genero	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>Aspergillus Níger</i>

2.1.2.2.- Identificación Macroscópica

El color de las colonias al inicio va del color blanco al color amarillo, luego al llegar a la maduración es de color negro, más o menos al cuarto o quinto día de sembrado (Ver figura 10). La textura de las colonias es granular puesto que se produce la esporulación y el reverso de la colonia es incoloro o de color crema. El diámetro de las colonias es aproximadamente de 60 mm a más.



Figura 8 Identificación Macroscópica del *Aspergillus niger* mostrándose el tamaño de colonia, color de esporas y características de crecimiento en medio de cultivo PDA

2.1.2.3.- Identificación Microscópica del *Aspergillus* sp.

Se observó por microscopía óptica a diferentes objetivos (4X, 10X, 40X y 100X), la abundancia de hifas y conidios formando conidióforos y exceso de esporas (ver figura 10), en otras partes se vio la presencia abundante de esporas.

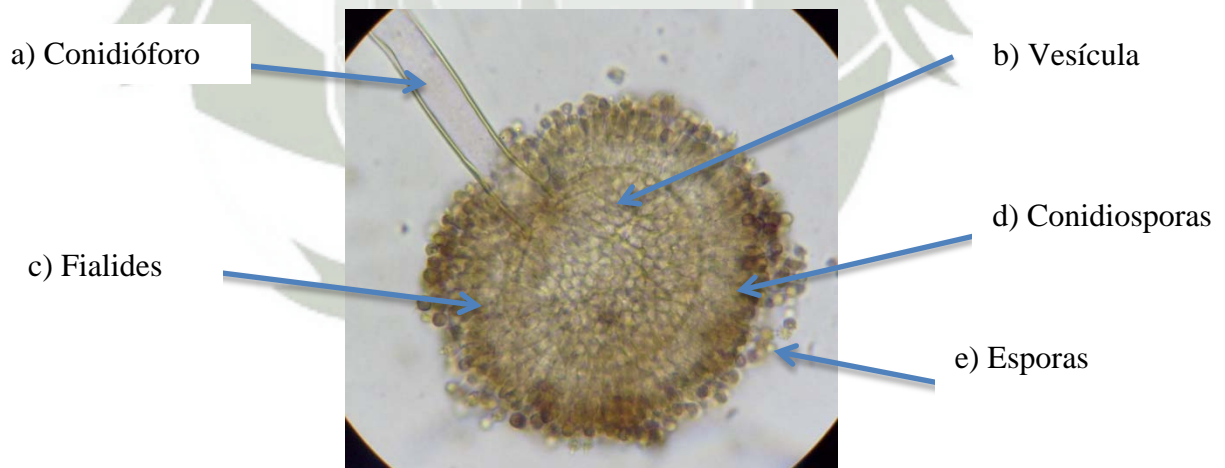


Figura 9.- Observación al Microscopio del *Aspergillus niger*: Se observan las características microscópicas del hongo *Aspergillus niger* en donde se puede ver: a) Conidioforo, b) Vesícula, c) Fiálides, d) Conidiosporas, e) Esporas, fijadas con KOH al 10%. Observado con el objetivo de 100X con aceite de inmersión

2.2.- *Trichoderma sp.*

2.2.1.- Aislamiento y Purificación

Para el Aislamiento del *Trichoderma sp* se replicó la cepa en un medio selectivo PDA y/o Agar Sabouraud modificado con cloranfenicol a partir de la placa madre, se replicó 5 veces hasta obtener la cepa pura.

2.2.2.- Identificación del *Trichoderma sp.*

2.2.2.1.- Taxonómica del *Trichoderma sp.*

La clasificación taxonómica del *Trichoderma* es la siguiente: (Sistema de clasificación de Cronquist. 1981) como se puede apreciar en la tabla 9.

Tabla 10.- Clasificación Taxonómica para el *Trichoderma sp.*

<i>Trichoderma sp.</i>	
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hipocreales
Familia	Hypocreaceae
Genero	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>Trichoderma sp</i>

2.2.2.2 Estructura Macroscópica

Las características evaluadas fueron el aspecto, bordes, color y velocidad de crecimiento de las colonias, siendo al inicio de color blanco creciendo en forma de copitos de algodón y mientras va madurando cambia de color a verde esmeralda

formando así esporas del mismo color, el tiempo de crecimiento aproximadamente es de 6 a 8 días, que es cuando alcanza su madurez, como se puede apreciar en la figura 11



Figura 10.- Identificación Macroscópica del hongo *Trichoderma sp.* en medio PDA

2.2.2.3.- Identificación Microscópica del *Trichoderma sp.*

Por medio de la microscopia óptica se logró observar las estructuras características que nos indicaban que la cepa observada se trataba del *Trichoderma*., donde se observó la forma y disposición de las fialosporas y fiálides como también la forma y la formación de las esporas, al igual que las hifas.



Figura 11.- Observación al Microscópica del *Trichoderma sp*, donde se observa la forma característica de a) Conidióforos, b) Fiálides, c) Conidios y d) esporas; Esta prueba fue realizada a 100X con KOH al 10%.2.3.- Inducción de los hongos

2.3.1.- Soluciones con Inductores

Para inducir a los hongos a que produzcan una mayor cantidad de enzimas celulolíticas y pectinolíticas, se utilizaron medios sintéticos y PDA modificado con pectina y con carboximetil-celulosa (CMC) como única fuente de carbono.

Cabe señalar que Díaz Sánchez en el 2009 publicó en su trabajo sobre el uso del orujo de uva para la producción de enzimas hidrolíticas, el uso de inductores en un medio de cultivo en donde la única fuente de carbono era la *Pectina* y el xilano usando un medio sintético compuesto por compuesto por 1 g/L de peptona, 0,5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de agar, 3,5 g/L de xilano y 3,5 g/L pectina.

Este medio fue usado para una cepa de *Aspergillus awamori*. La composición de nuestros medios de inducción es descrita en la tabla 6.

Como nos podemos dar cuenta la composición de nuestros medios de cultivo es similar a la del PDA, solamente que existe el cambio de la fuente carbonada puesto que se reemplaza el almidón de la papa por la pectina y/o la CMC.

En el trabajo de Domínguez, 1993 utilizaron agar-CMC para aislar microorganismos que degraden la celulosa y/o produzcan extractos enzimáticos celulolíticos; en donde ellos encontraron 6 cepas productoras de celulasas.

En nuestro caso agar CMC fue utilizado para adaptar a las cepas de *Trichiderma* sp. y *Aspergillus niger*, para producir extractos enzimáticos celulolíticos. El agar Pectina fue usado para adaptar a las cepas a producir extractos enzimáticos pectinolíticos.

Se obtuvo como resultado cepas adaptadas a los diferentes medios de cultivo, con lo cual las cepas inducidas pueden ayudarnos a producir los extractos enzimáticos de interés en los sustratos seleccionados. La morfología de las cepas cambia de acuerdo al tipo de medio al cual son sometidos.

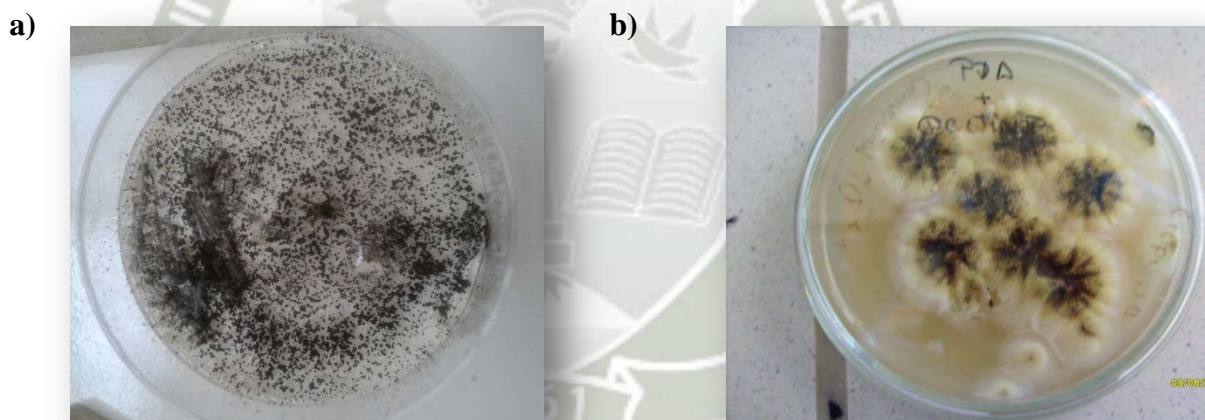


Figura 12.- *Aspergillus niger* en medio de Pectina Donde en la figura (13a) observamos una cepa de *Aspergillus niger* en medio de cultivo PDA, mientras que en la figura (13b) se sembró la cepa del *Aspergillus niger* en Agar Pectina.

Como se puede ver en la Figura N°13 la morfología de la cepa de *Aspergillus niger* cambia drásticamente, puesto que en medio PDA la cepa crece uniforme en toda la placa; en cambio al replicar el hongo en mención en el Agar Pectina la cepa no crece uniforme, se vuelve rugosa, teniendo también una ligera coloración amarillenta alrededor de las esporas lo que nos indica que la cepa está empezando a adaptarse a las condiciones de estrés a las que está siendo sometida.

El crecimiento de la cepa no se uniforme en toda la placa sino que aparecen varias colonias de la cepa unas desarrollándose mejor que las otras.

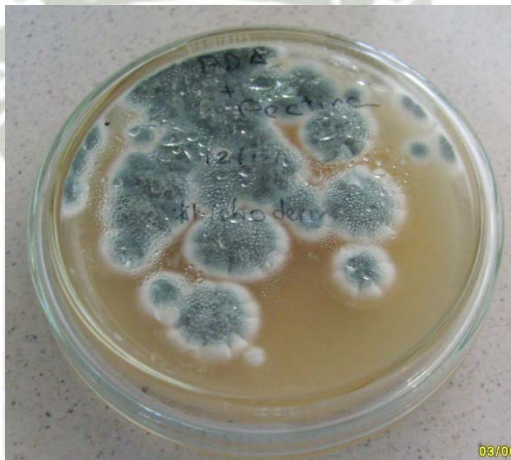


Figura 13.- Trichoderma sp en medio de Pectina:

El *Trichoderma sp.* se desarrolló en agar pectina presentando también rugosidades y formación de varias colonias lo que nos indica que también se adaptó al medio, manteniendo sus características de crecimiento así como también el color de las esporas.

En el caso del Agar CMC el *Aspergillus niger* tuvo problemas para adaptarse al medio puesto que no desarrollo colonias lo que se observó fueron colonias dispersas en todo el medio, mientras que el *Trichoderma sp.* la cepa se desarrolló más rápido y a los 7 días el hongo no perdió sus características macroscópicas.

2.3.2.- Degradación de Celulosa por la prueba de papel filtro.

Esta prueba se realizó para probar si el *Trichoderma sp.* y *Aspergillus niger*, presentan la capacidad para degradar celulosa por lo que al trabajar con papel remojado se vio que en el caso del *Aspergillus niger* al sexto día de incubado, creció y se desarrolló en el medio de papel remojado; mientras que en el caso del *Trichoderma sp.* se observó que su crecimiento y desarrollo se dio entre el octavo y noveno día. Ambas cepas dieron positiva a la prueba de degradación de celulosa.

2.3.3.- Prueba del tubo de ensayo

En esta prueba se vio la degradación de la celulosa de ambos hongos por medio de la producción de gas.

Se pudo observar que al séptimo día de tratamiento el *Aspergillus niger* produjo aproximadamente 1 cm de gas (entre el medio de cultivo y el papel remojado) en el tubo de ensayo. Mientras que *Trichoderma* se demoró 9 días pero produjo mayor cantidad de gas, aproximadamente 2 cm de separación frente al *Aspergillus niger*.

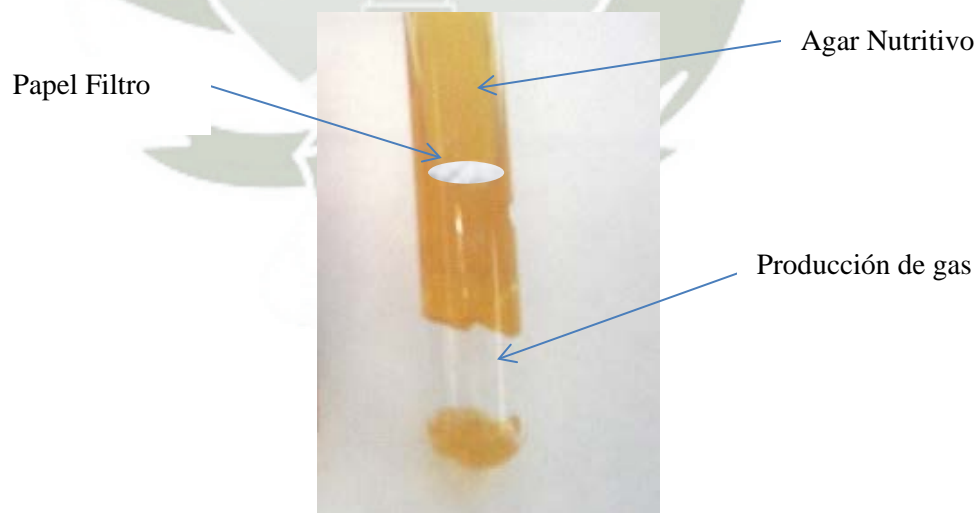


Figura 14.-Resultados de la prueba del tubo de ensayo.

2.4.- Obtención del inóculo

Se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer del *Aspergillus niger* donde se obtuvo una concentración de 2.3×10^8 esporas/ml. como se mencionó en la metodología se trabajó con una concentración de 4.5×10^7 esporas/ml. para esto se agregó 5.11 ml de NaCl al 0.9%, que se le agregó al mililitro de esporas obtenido anteriormente.

Para el caso del *Trichoderma sp.* se partió de 1ml que contenía 2.2×10^8 de esporas/ml, se aplicó una dilución de 4.68 ml para llegar a una concentración de 4.5×10^7 de esporas/ml.

3.- Extracción de Enzimas

3.1.- Selección del Tamiz adecuado para los hongos

Al evaluar el sustrato se tomaron en cuenta varias características para el desarrollo de los microorganismos en un sistema FES. Pastrana en 1996 publicó su trabajo de fundamentos de la FES y su aplicación a la industria alimentaria donde menciona que la porosidad es un factor importante de los sustratos para que puedan tener una buena adhesión con los microorganismos. Otros factores que se tomaron en cuenta con respecto al sustrato fueron el tamaño de tamiz y su especificidad con los microorganismos. Es por tal motivo que se tomó en cuenta la elección de los sustratos para el trabajo los cuales fueron el *orujo de la cebada cervecera* y la *cascara de cebolla*.

Se seleccionaron estos 2 sustratos porque ambos residuos contaminan el medio ambiente, cuando no se les utiliza adecuadamente, resaltando de que el orujo de la cebada cervecera tiene un uso conocido en la alimentación de ganado y la cascara de cebolla está siendo usada en la industria de los colorantes, pero en nuestra ciudad mayoritariamente estos dos residuos son eliminados y/o quemados.

Otros factores importantes en la FES a tomar en cuenta son la humedad de 60%, la cantidad de esporas donde se trabajó con 4.5×10^7 esporas/ml (Díaz Sánchez, 2009), esta cantidad fue utilizada porque se describe en varios trabajos (Díaz Sánchez, 2009).

El tamaño de partícula es uno de los factores importantes a tener en cuenta en la FES, ya que los sustratos de partículas pequeñas proporcionan una gran área específica, lo que afecta de manera positiva al desarrollo del microorganismo. Sin embargo, un tamaño de partícula demasiado pequeño, que genere a su vez un espacio inter-partícula reducido, disminuye la eficiencia de la respiración/aireación dificultando el crecimiento microbiano.

Kumar y col. estudiaron la influencia del tamaño de partícula del sustrato en la producción de ácido cítrico a partir de bagazo de caña de azúcar utilizando el hongo *Aspergillus niger*. Los tamaños de partículas evaluados se encontraban en un rango comprendido entre 0,64 y 2 mm.

Los resultados de nuestro estudio determinaron que la máxima producción se obtuvo cuando se utilizaban partículas de 1.6-1,8 mm, como se puede apreciar en la tabla 12, mientras que el crecimiento más bajo se dio en los medios con partículas de 1.0, 1.2 y 2.0 mm. Esto podría deberse a que las partículas de tamaño medio utilizadas presentaban mayor porosidad y se daba con mayor facilidad el crecimiento de los microorganismos.

Tabla 61.- Selección de los tamaños de partícula de la Cascara de Cebolla y el Orujo de cebada a partir del crecimiento de los microorganismos para un sistema FES al séptimo día.

a) Para Orujo de cebada

Tamaño de Partícula	<i>Trichoderma sp.</i>	Aspergillus Níger
1 mm	++	+
1,2 mm	+	++
1,6 mm	+++++	+++++
1.8 mm	++++	++++
2,0 mm	++	+

Se probaron varios tamices del orujo de cebada para determinar su mejor crecimiento el cual fue calificado por cruces donde: (+) significa crecimiento de los microorganismos es muy bajo, (++) significa crecimiento bajo, (+++) significa crecimiento regular de los microorganismos, (+++++) significa crecimiento bueno de los microorganismos y (+++++) significa que los microorganismos crecen adecuadamente en el tamiz adecuado.

Como podemos ver en la tabla 10a, los microorganismos *Aspergillus níger* y *Trichoderma sp.* sembrados en un sustrato de orujo de cebada, tienen mejor crecimiento en un tamaño de partícula de 1,6cm; es por tal motivo que se usó este tamiz en los experimentos posteriores en donde hablaremos de la extracción de las enzimas.

b) Para Cascarilla de Cebolla

Tamaño de Partícula	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Aspergillus Níger</i>
1 mm	+	+
1,2 mm	+	++
1,6 mm	+++++	+++++
1.8 mm	++++	+++
2,0 mm	++	+

Se probaron varios tamices del orujo de cebada para determinar su mejor crecimiento el cual fue calificado por cruces donde: (+) significa crecimiento de los microorganismos es muy bajo, (++) significa crecimiento bajo, (+++) significa crecimiento regular de los microorganismos, (+++++) significa crecimiento bueno de los microorganismos y (+++++) significa que los microorganismos crecen adecuadamente en el tamiz adecuado.

Para la cascara de cebolla roja el mejor tamiz de trabajo se encontró entre 1,6mm ya que según Yegres, en el 2001, el tamaño de partícula es muy importante para el crecimiento de los microorganismos, así como también para el desarrollo de la FES, es por tal motivo que ese tamaño de partícula se usó en el desarrollo de la FES y la posterior extracción de las enzimas.

Las muestras trabajadas se llevaron a agitación por 7 días 150 rpm. Se evaluó al séptimo día el crecimiento de las cepas, usando como fuentes de humedad buffer acetato a pH 4.8 y agua destilada en un inicio, más una dilución de esporas de cada hongo de 6ml (dilución 1:5)⁴.

Posteriormente se colocaron soluciones de CMC al 0.5% y pectina al 1.5% con las cuales finalmente se indujeron los hongos para producir extractos enzimáticos de interés.

⁴ Dilución 1 ml de solución de esporas + 5 ml de NaCl 0.9%.

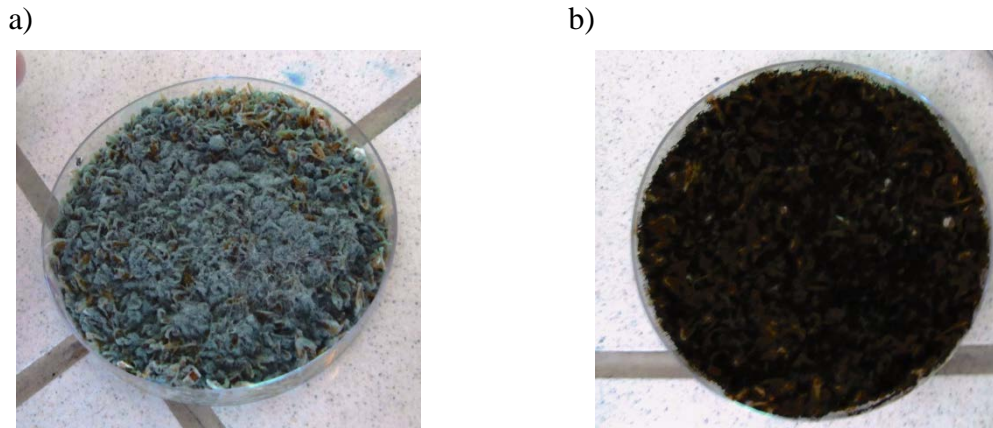


Figura 15.- Crecimiento de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp* en sustrato de orujo de cebada.

En la figura (15a) se puede apreciar el crecimiento del *Trichoderma sp.* en el sustrato de orujo de cebada cervecera en un tamiz de 1.6mm a los 7 días, y en la figura (15b) se aprecia al hongo *Aspergillus niger* en el orujo de cebada cervecera con tamaño de partícula de 1.6 mm a los 7 días

3.2.- Determinación de Parámetros para la obtención de los extractos enzimáticos

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en pruebas preliminares se utilizó el tamaño de partícula óptimo de 1,6 mm, una humedad aproximada de 65%, una cantidad de 4.5×10^7 esporas/ml, a 37°C , un pH de 4.8 y un sistema FES en Placas Petri (90 x 15mm); los microorganismos fueron sembrados en el tamiz seleccionado y evaluados durante 11 días.

Se determinó que el tiempo óptimo de cultivo de las enzimas celulolíticas fue entre el sexto y séptimo día en el caso del *Aspergillus niger*, y en el caso del *Trichoderma sp.* se cultivó en el séptimo día.

Según Díaz Sánchez en el 2009 recomienda que el momento óptimo para la extracción de las enzimas sea al séptimo día, ya que los dos microorganismos llegan a su etapa de madurez en este tiempo y empiezan a producir los extractos enzimáticos a las condiciones indicadas anteriormente.

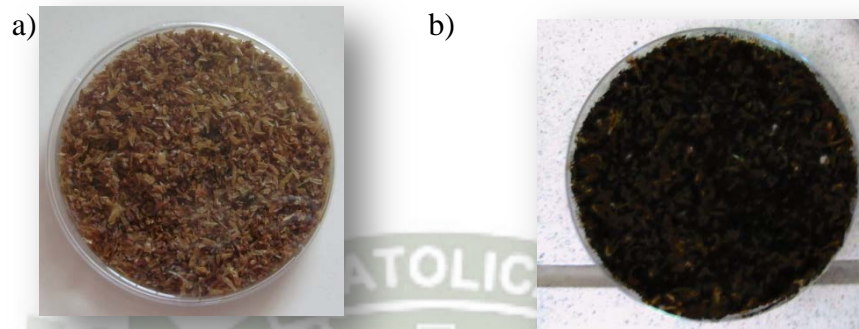


Figura 16.- Comparación del crecimiento del *Aspergillus niger* inoculado en el sustrato de orujo de cebada al primer y séptimo día.

En la figura (16a) se puede apreciar el sustrato de orujo de cebada al primer día de inoculación del *Aspergillus niger*; y en la figura (16b) apreciamos el sustrato con crecimiento de *Aspergillus niger* al séptimo día de inoculado.

3.3.- Extracción de Celulasas y Pectinasas

Para la obtención de los extractos enzimáticos se tomaron en cuenta los siguientes factores:

- La importancia del *solvente*, donde se analizó el efecto de los disolventes como el tampón acetato pH 4,8 y el Tween 80 al 0,1% (Ver Anexo 4) sobre la extracción de las enzimas en estudio. Se vio que las extracciones con Tween 80 fueron mejores.
- La temperatura de extracción analizada fue de 20°C, temperatura con la cual se trabajaron todos los experimentos.

- La velocidad de centrifugación fue 1000 rpm por 6 minutos con el fin de eliminar los residuos del sustrato y las esporas, entre otros interferentes.
- El volumen de disolvente utilizado fue de 10 ml por 1 gramo de muestra y de 50 ml cuando se lavó toda la placa con ambos disolventes ya mencionados anteriormente.

3.4.-Medicion de la Actividad enzimática

3.4.1.- Análisis cualitativo

3.4.1.1.- Prueba con el reactivo de Benedict

Se realizó este análisis cualitativo de medición de azúcares reductores para determinar el tiempo que nuestros extractos enzimáticos celulolíticos y pectinolíticos demoran en transformar los sustratos en sus productos finales; en el caso de los extractos celulolíticos el producto resultante es glucosa y en el caso de los extractos pectinolíticos el producto resultante debe de ser principalmente el ácido galacturónico.

Este estudio se realizó a diferentes tiempos de incubación (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 minutos).

Esta prueba se hizo a los siete sistemas con los que se trabajó determinándose así que en todos los sistemas a partir del minuto 10 ya se empezaron a activar las enzimas degradando los sustratos a sus productos determinándose por el precipitado rojo ladrillo.

En los dos primeros tubos (Blanco y Muestra a tiempo 0) en el blanco no se observó cambio de coloración, caso contrario si en la muestra de tiempo 0 en la cual se apreció un de cambio de color poco significativo determinándose presencia de trazas de color verde y un pequeño precipitado naranja.

Tabla 12.- Resultados para prueba de Benedict

PRUEBA DE BENEDICT			
Tubo	Contenido	Presencia de azúcar reductor	Ausencia de azúcar reductor
1	Blanco		-
2	Extracto enzimático al tiempo 0 + sustrato + reactivo		-
3	Extracto enzimático al tiempo 10 + sustrato + reactivo	+	
4	Extracto enzimático al tiempo 20 + sustrato + reactivo	+	
5	Extracto enzimático al tiempo 30 + sustrato + reactivo	++	
6	Extracto enzimático al tiempo 40 + sustrato + reactivo	+++	
7	Extracto enzimático al tiempo 50 + sustrato + reactivo	++++	
8	Extracto enzimático al tiempo 60 + sustrato + reactivo	+++++	
9	Extracto enzimático al tiempo 70 + sustrato + reactivo	+++++	

Análisis cualitativo mediante la prueba de azúcares reductores de Benedict, donde se ve que a partir del tubo 3 (Extracto enzimático a los diez minutos de iniciada la incubación usando como sustrato harina de maíz más el reactivo de Benedict) en la cual se vio la presencia de precipitado rojo naranja y por lo tanto presencia de azúcares reductores, este efecto se dio hasta el minuto 70 que es cuando se dio por terminado el estudio.

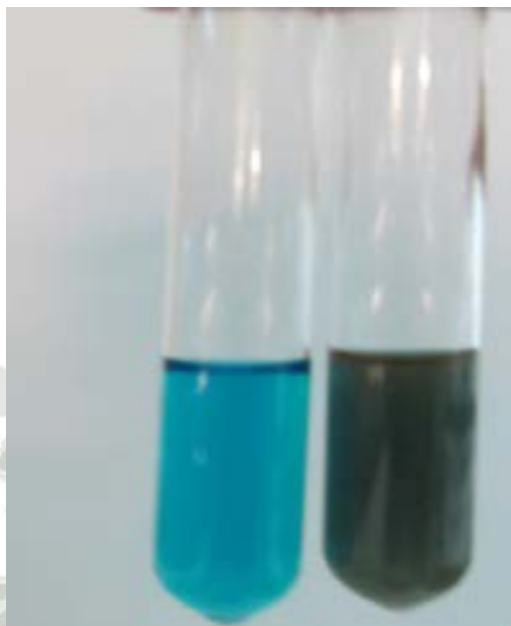


Figura 17.- Resultados de la prueba cu5litativa de Benedict

3.5.- Evaluación de la actividad enzimática

3.5.1.- Evaluación de la actividad celulolítica

Las evaluaciones se realizaron a partir del lavado con buffer acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% de 1gr de medio de cultivo de los sistemas (Ver tabla 7) y por el lavado completo de la placa; los resultados se ven en las tablas siguientes:

Tabla 13.- Actividad relativa Celulolítica del extracto enzimático utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir de 1g de la muestra del sistema 1 a distintos tiempos de incubación en harina de maíz (sustrato).

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml
0	0.221	0.367	0.205	0.172
10	0.204	0.160	0.216	0.299
20	0.219	0.343	0.237	0.554
30	0.253	0.750	0.265	0.893
40	0.257	0.794	0.289	1.176
50	0.287	1.152	0.328	1.639
60	0.330	1.675	0.359	2.018
70	0.263	0.869	0.308	1.400

Absorbancia neta de la muestra del sistema 1 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.190.

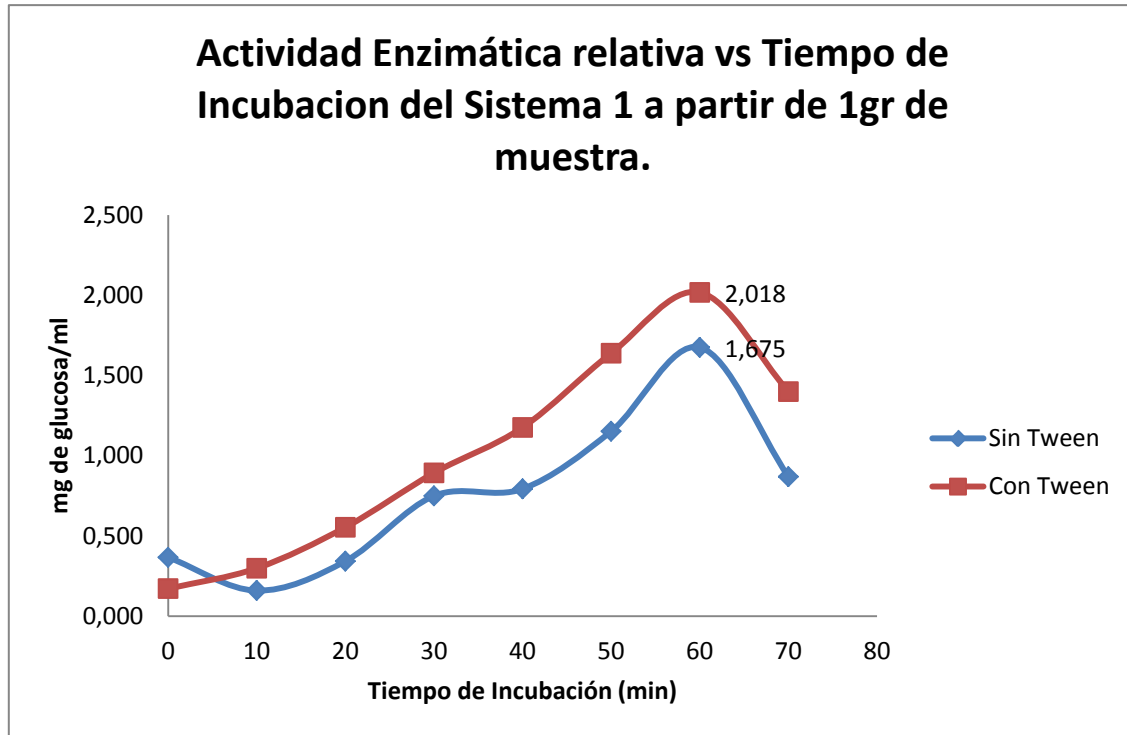


Figura 18.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 1 a partir de 1gr de muestra.

A partir de 1gr de muestra a diferentes tiempos, donde el Sistema 1 del pesado un gramo del medio de Orujo de cebada cervecera el que contiene al hongo *Trichoderma sp.*, usando como Inductor CMC. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

Como se observa en la figura 18, en la extracción de la enzima celulasa, los mejores resultados se obtuvieron con la muestra lavada con Tween 80 al 0.1% dándonos una máxima actividad de 2.02 mg. de glucosa/ml, en el minuto 60; mientras que la muestra lavada sin Tween 80, tiene una máxima actividad de 1.68 mg. de glucosa/ml.

También se puede ver que la actividad a partir del tiempo 0 tiene una tendencia de crecer hasta el minuto 60 que es cuando se llega a la máxima actividad; después se ve

que la enzima decrece, probablemente porque la enzima empieza a desnaturalizarse y decae en su actividad. Se realizó la prueba por triplicado (Ver Anexo 6.1)

Tabla 14.- Actividad relativa Celulolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir del lavado de toda la placa del sistema 1 a distintos tiempos de incubación en harina de maíz.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta de muestra de glucosa	mg de glucosa /ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml
0	0.265	0.680	0.233	0.307
10	0.326	1.420	0.273	0.790
20	0.266	0.692	0.273	0.792
30	0.296	1.057	0.328	1.445
40	0.308	1.198	0.349	1.695
50	0.312	1.246	0.327	1.441
60	0.297	1.065	0.280	0.877
70	0.300	1.105	0.342	1.621

Absorbancia neta de la muestra del sistema 1 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.191.

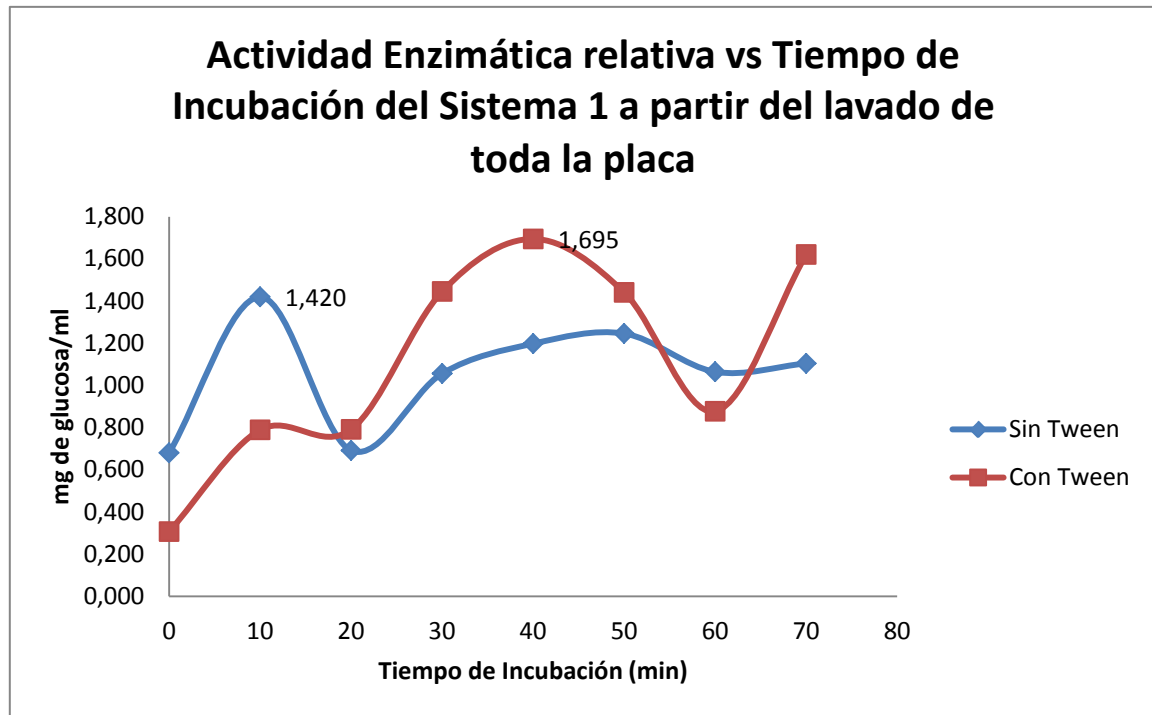


Figura 19.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 1 a partir del lavado de toda la placa

A partir del lavado de toda la placa a diferentes tiempos del Sistema 1; se realizó el lavado de toda la placa que contenía, medio de Orujo de cebada cervecera con el *Trichoderma sp.*, usando como Inductor CMC, usando como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 como se ve en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

Como se puede observar en la Figura 19, la mejor actividad enzimática se dio al lavar con Tween 80 al 0.1%, dándonos un valor de 1.70 mg de glucosa/ml valor obtenido en el minuto 40 de iniciada la reacción.

Caso contrario ocurre con el extracto obtenido por lavado con buffer Acetato, el cual nos da un valor de 1.42 mg de glucosa /ml esto en el minuto 10.

En el minuto 70 se observa una elevación de la actividad esto puede deberse a que la enzima está tomando otra ruta de metabólica o es otra enzima la que produce el subproducto.

Tabla 15.- Actividad relativa Celulolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir de 1gr de la muestra del sistema 2 a distintos tiempos de incubación en harina de maíz.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml
0	0.201	0.126	0.206	0.191
10	0.226	0.425	0.235	0.532
20	0.228	0.449	0.248	0.688
30	0.248	0.688	0.260	0.831
40	0.255	0.778	0.269	0.939
50	0.263	0.867	0.284	1.119
60	0.256	0.784	0.295	1.256
70	0.253	0.754	0.272	0.981

Absorbancia neta de la muestra del sistema 2 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.190.

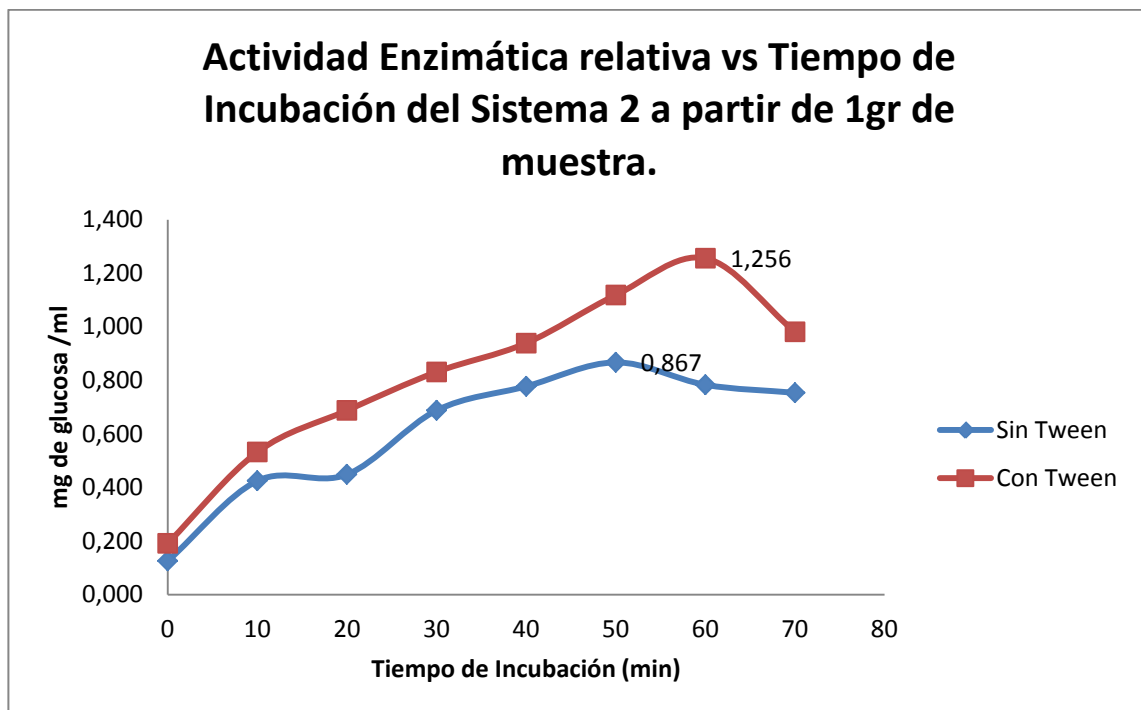


Figura 20.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 2 a partir del lavado de 1gr de muestra

A partir del lavado de 1gr de muestra con Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% a diferentes tiempos, del Sistema 2; se pesó un gramo del medio de Cascara de Cebolla, el que contiene al hongo *Trichoderma sp.*, usando como Inductor CMC. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 como se ve en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1.

Como podemos ver en la figura 20 la máxima actividad enzimática se dio a los 60 minutos de iniciada la reacción enzima sustrato lavándose con Tween 80 al 0.1% dándonos una actividad de 1.26 mg de glucosa/ml, lo cual indica que la estabilidad de la enzima de este sistema es buena ya que llega a una duración de 1 hora aproximadamente. A partir del minuto 70 la actividad enzimática decrece lo que nos da a entender que la enzima empieza a desnaturalizarse.

En el caso de la enzima lavado con Buffer el valor de actividad fue de 0.87 mg de glucosa/ml obtenido en el minuto 50. Se realizó la prueba por triplicado (Ver Anexo

6.2) Esto nos indica que el extracto enzimático lavado con tween es más estable y su actividad es mayor.

Tabla 16.- Actividad relativa Celulolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir del lavado de toda la placa del sistema 2 a distintos tiempos de incubación en harina de maíz.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml
0	0.276	1.053	0.376	2.207
10	0.210	0.269	0.215	0.287
20	0.220	0.389	0.230	0.467
30	0.252	0.772	0.251	0.712
40	0.279	1.089	0.292	1.208
50	0.343	1.854	0.333	1.693
60	0.385	2.357	0.539	4.163
70	0.280	1.101	0.322	1.561

Absorbancia neta de la muestra del sistema 2 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.190.

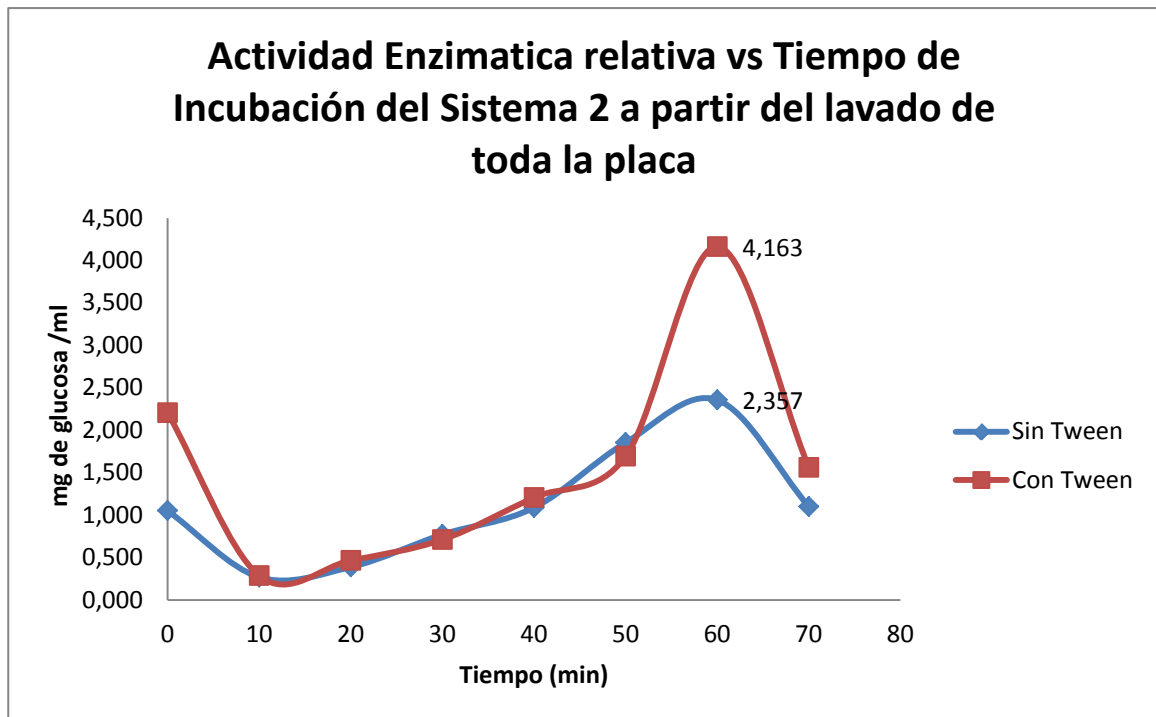


Figura 21.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 2 a partir del lavado de toda la placa.

A partir del lavado de toda la placa a diferentes tiempos, del Sistema 2; se vio que contenía medio de Cascara de Cebolla con el *Trichoderma sp.*, usando como Inductor CMC usándose como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 como se ve en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

En la Figura 21 se puede observar que la máxima actividad enzimática celulolítica por lavado con Tween 80 es en el minuto 60 obteniéndose un valor de 4.16 mg de glucosa/ml, logrando un aumento desde el minuto 10 de iniciada la reacción hasta el minuto 60 que es cuando llega a su máxima actividad, su declive se inicia en el minuto 70 lo que nos da a entender que la enzima empieza a desnaturalizarse.

En el caso de la enzima lavada con Buffer acetato la máxima actividad se dio en el minuto 60 dando un valor de actividad de 2.36 mg de glucosa/ml donde también se puede apreciar que en el minuto 70 empieza su desnaturalización ya que su actividad cae.

Tabla 17.- Actividad relativa Celulolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir de 1gr de la muestra del sistema 3 a distintos tiempos de incubación en harina de maíz.

Tiempo (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	Concentración (mg/ml)	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml
0	0.215	0.383	0.238	0.670
10	0.225	0.503	0.248	0.790
20	0.239	0.670	0.263	0.969
30	0.250	0.796	0.275	1.113
40	0.248	0.778	0.287	1.262
50	0.269	1.023	0.295	1.358
60	0.262	0.939	0.293	1.334
70	0.243	0.718	0.273	1.089

Absorbancia neta de la muestra del sistema 3 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.190.

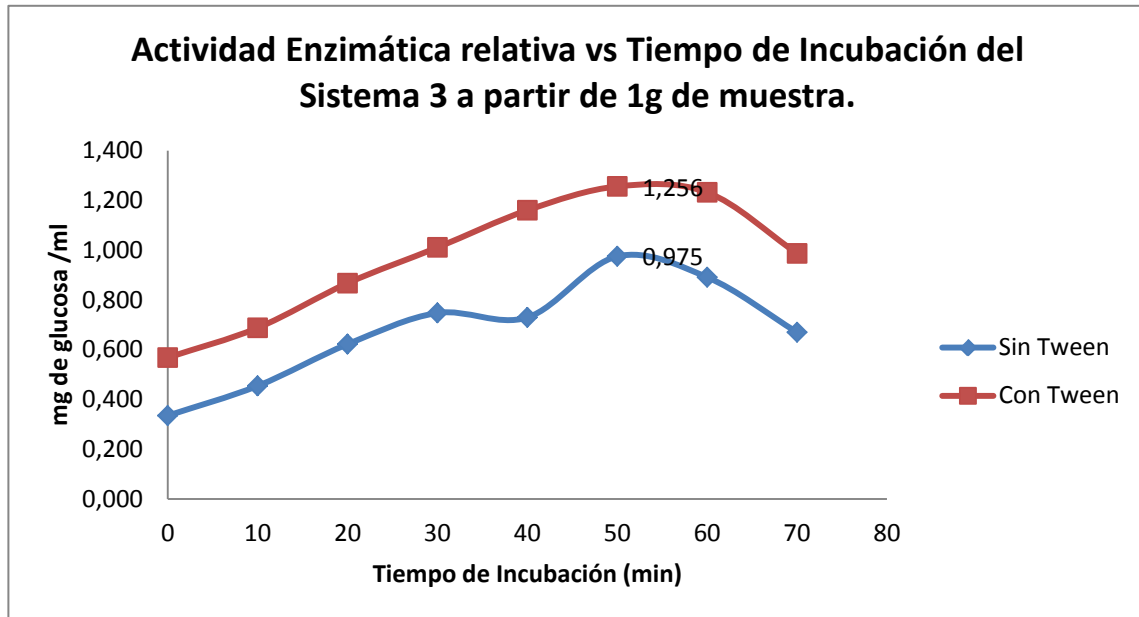


Figura 22.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 3 a partir del lavado de 1gr de muestra

A partir del lavado de 1gr de muestra con Buffer a diferentes tiempos, del Sistema 3; se pesó un gramo del medio de Orujo de Cebada Cervecera, con el *Aspergillus niger*, usando como Inductor CMC. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 como se ve en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

Observando la Figura 22, el mejor disolvente para extraer la enzima fue el Tween 80 al 0.1% donde su mayor actividad enzimática se dio en el minuto 50 de iniciada la reacción dando un valor de actividad de 1.36 mg de glucosa /ml. A partir del minuto 60 la enzima empieza a perder actividad y por consiguiente inicia su degradación.

En el caso de la enzima lavada con Buffer acetato se vio que su mejor actividad fue a los 50 minutos de iniciada la reacción obteniendo un valor de actividad de 1.02 mg de glucosa/ml, comparando ambos resultados se ve que el lavado con Tween 80 fue mucho mejor, dándonos una mejor actividad enzimática. Se realizó la prueba por triplicado (Ver Anexo 6.3)

Tabla 18.- Actividad relativa Celulolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir del lavado de toda la placa del sistema 3 a distintos tiempos de incubación en harina de maíz.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml	DO. neta del extracto enzimático	Concentración (mg/ml)
0	0.313	2.064	0.277	1.633
10	0.172	0.377	0.196	0.664
20	0.175	0.419	0.203	0.742
30	0.170	0.359	0.235	1.125
40	0.233	1.107	0.266	1.501
50	0.232	1.101	0.288	1.764
60	0.448	3.678	0.546	4.845
70	0.291	1.806	0.337	2.345

Absorbancia neta de la muestra del sistema 3 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.190.

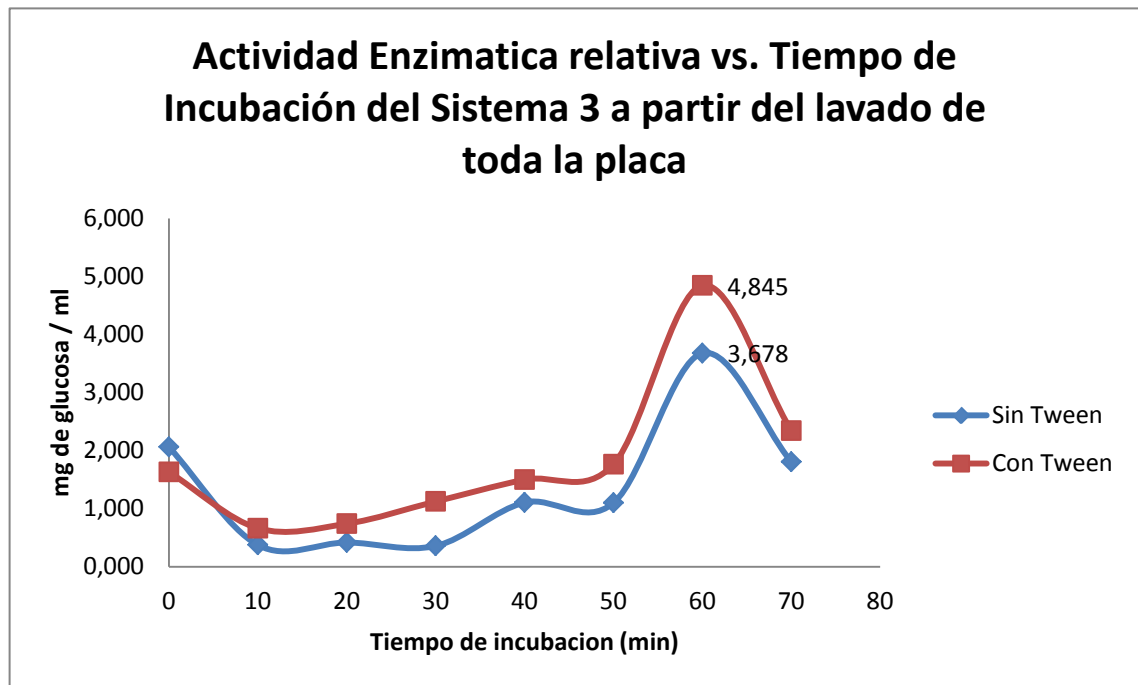


Figura 23.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 3 a partir del lavado de toda la placa

A partir del lavado de toda la placa a diferentes tiempos, Del Sistema 3, se vio que contenía, medio de Orujo de Cebada Cervecera, con el *Aspergillus niger*, usando como Inductor CMC. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 como se ve en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

La máxima actividad enzimática en este sistema fue de 4.845 mg de glucosa/ml aplicando un lavado con Tween 80, donde se vio que la estabilidad del sistema es buena a partir del minuto 10 hasta el minuto 60, a partir de este punto la enzima empieza a desnaturalizarse.

En el caso de la enzima lavada con buffer se vio que su mejor actividad se dio en el minuto 60 dándonos un valor de 3.678 mg de glucosa/ml, y en el minuto setenta cae su actividad; por tal motivo se vio que el lavado con Tween 80 fue el que mejores resultados dio en la experiencia.

6.2.2.- Evaluación de la actividad pectinolítica.

Tabla 19.- Actividad relativa Pectinolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir del lavado de 1 gr de la muestra del sistema 4 a distintos tiempos de incubación en Pectina Cítrica.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	Concentración (mg/ml)	DO. neta del extracto enzimático	Concentración (mg/ml)
0	0.240	3.142	0.411	19.274
10	0.539	31.349	0.579	35.170
20	0.399	18.142	0.460	23.896
30	0.433	21.396	0.706	47.151
40	0.410	19.226	0.631	40.028
50	0.300	8.849	0.443	22.292
60	0.329	11.585	0.437	21.726
70	0.262	5.217	0.322	10.925

Absorbancia neta de la muestra del sistema 4 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.314.

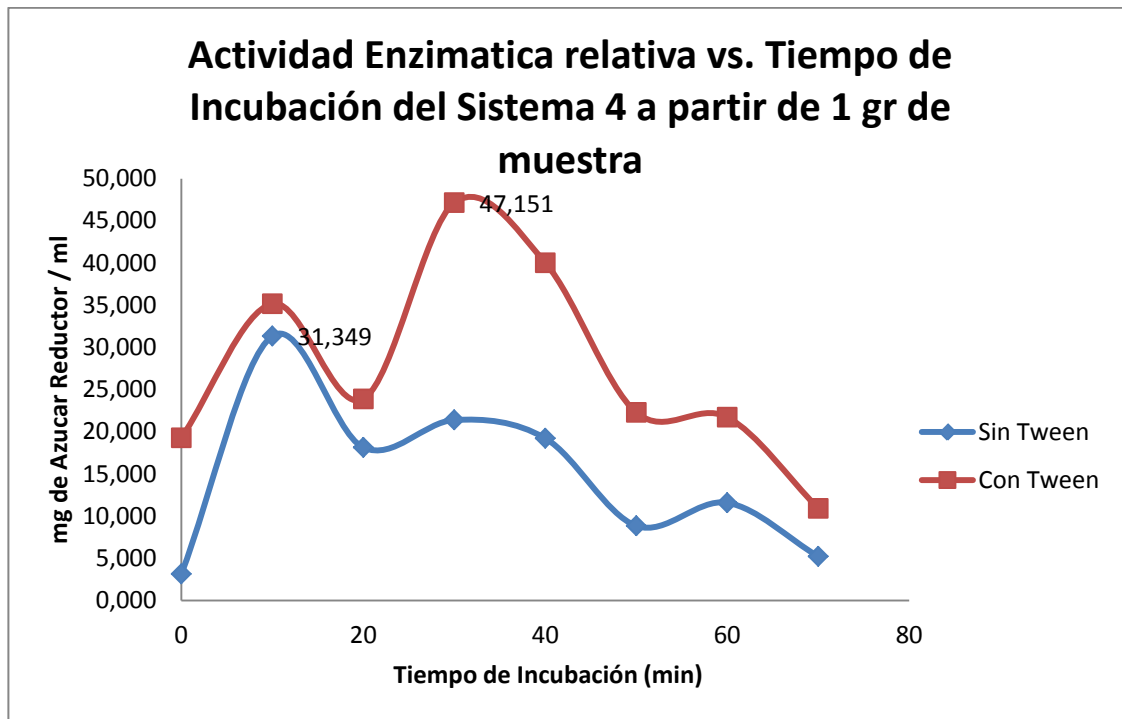


Figura 24.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 4 a partir del lavado de 1gr de muestra

A partir del lavado de 1gr de muestra con Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% a diferentes tiempos, del Sistema 4; se pesó un gramo del medio de Orujo de Cebada Cervecera, con el *Trichoderma sp.*, usando como Inductor Pectina. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

La máxima actividad conseguida en el sistema 4 fue de 47.15 mg de azúcar reductor/ml, lo que indica que el género *Trichoderma* en el minuto 30 lavándose la muestra con Tween 80 al 0.1% usando como sustrato el orujo de cebada da su máxima actividad enzimática pectinolítica en ese punto, mientras que la enzima lavada con buffer presenta una máxima actividad en el minuto 10 presentando un valor de actividad de 31.35 mg de azúcar reductor/ml y a partir del minuto 20 presenta un decrecimiento en su actividad. Se realizó la prueba por triplicado (Ver Anexo 6.4)

Se demuestra que el lavado con Tween nos da una mejor actividad que lavando con Buffer lo que indica que al aplicarle un tenso activo a la muestra probablemente libere mayor cantidad de producto en este caso, Enzima.

La enzima presenta desnaturalización desde el minuto 40 hasta el final de la reacción puesto que presenta un decrecimiento en su actividad.

Tabla 20.- Actividad relativa Pectinolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como solución de extracción a partir del lavado de toda la placa del sistema 4 a distintos tiempos de incubación en Pectina Cítrica.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	ABS neta de muestra de azúcar reductor	mg de azúcar reductor/ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de glucosa /ml
0	0.352	8.873	0.480	20.995
10	0.475	20.524	0.531	25.783
20	0.357	9.392	0.523	25.005
30	0.531	25.736	0.672	39.038
40	0.462	19.226	0.541	26.750
50	0.474	20.358	0.572	29.627
60	0.438	16.962	0.495	22.410
70	0.460	19.061	0.438	16.962

Absorbancia neta de la muestra del sistema 4 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.314.

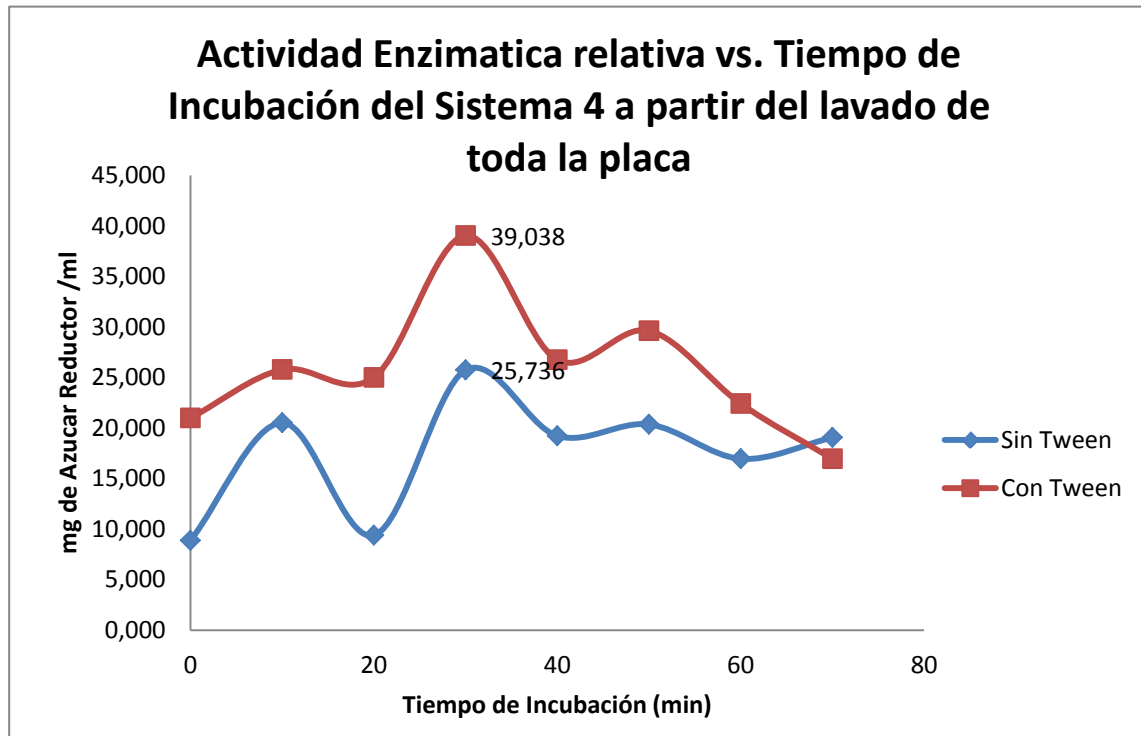


Figura 25.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 4 a partir del lavado de toda la placa.

A partir del lavado de toda la placa a diferentes tiempos, del Sistema 4; Se vio que contenía como medio de cultivo Orujo de Cebada Cervecera, con el *Trichoderma sp.*, usando como Inductor Pectina, usando como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

En la figura 25 se puede observar que al lavar toda la placa con Tween 80 al 0.1%, la actividad enzimática es mayor que cuando se lava con Buffer, dado que en este sistema se consiguió una actividad máxima de 39.04 mg de azúcar reductor/ml en el minuto 30 de iniciada la reacción enzima-sustrato, el decrecimiento de la actividad de la enzima inicia desde el minuto 40 lo que nos da a entender que empieza su desnaturalización y su estabilidad es baja frente a las otras enzimas, mientras que en el caso del Buffer su máxima actividad fue de 25.736 mg de azúcar reductor/ml conseguido en el minuto 30.

Tabla 21.- Actividad relativa Pectinolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como solución de extracción a partir del lavado de 1 gr de la muestra del sistema 5 a distintos tiempos de incubación en Pectina Cítrica.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	ABS neta de azúcar reductor	mg de azúcar reductor/ml	ABS neta de azúcar reductor	mg de azúcar reductor /ml
0	0.166	-0.349	0.339	12.198
10	0.354	10.830	0.244	3.283
20	0.421	17.151	0.488	26.255
30	0.457	20.500	0.609	37.670
40	0.282	3.991	0.571	34.132
50	0.373	12.623	0.280	6.632
60	0.392	14.368	0.621	38.849
70	0.461	20.925	0.443	22.057

Absorbancia neta de la muestra del sistema 5 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.314.

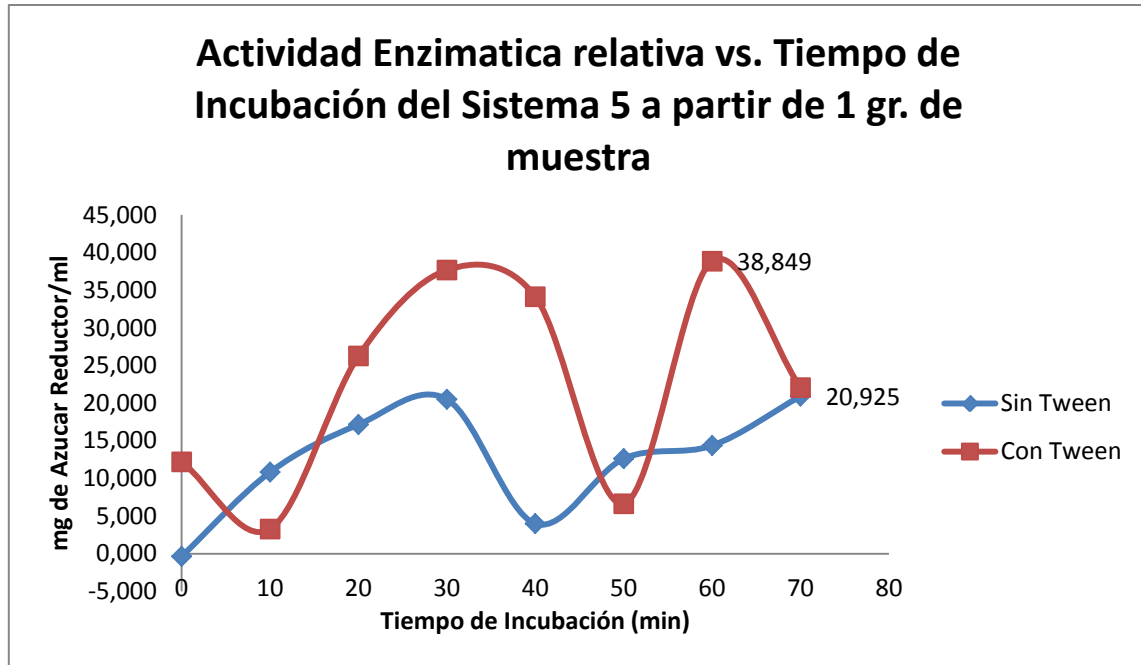


Figura 26.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 5 a partir del lavado de 1gr de muestra.

A partir del lavado de 1gr de muestra con Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% a diferentes tiempos, del Sistema 5; se pesó un gramo del medio de Cascara de Cebolla, con el *Trichoderma sp.*, usando como Inductor Pectina. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 como se ve en azul y en rojo con Tween 80 al 0.1%.

En la figura 26 se pueden observar que la máxima actividad enzimática se da en el minuto 60 obteniéndose un valor de 2.593 mg de azúcar reductor/ml, como se puede ver el sistema posee una gran estabilidad hasta el tiempo 40 en su lavado con Tween 80 al 0.1%, a partir del minuto 70 la enzima se desnaturaliza.

En el caso de la enzima lavada con buffer su máxima actividad es de 1.61 mg de azúcar reductor/ml por consiguiente la actividad es mejor con Tween que con buffer. Se realizó la prueba por triplicado (Ver Anexo 6.5)

Tabla 22.- Actividad relativa Pectinolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir del lavado de toda la placa del sistema 5 a distintos tiempos de incubación en Pectina Cítrica.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	ABS neta de azúcar reductor	mg de azúcar reductor/ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml
0	0.291	9.981	0.317	5.075
10	0.3675	17.198	0.344	7.575
20	0.347	15.264	0.415	14.321
30	0.426	22.717	0.476	20.028
40	0.364	16.868	0.460	18.566
50	0.424	22.528	0.362	9.274
60	0.464	26.302	0.496	21.915
70	0.459	25.830	0.428	15.500

Absorbancia neta de la muestra del sistema 1 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.314.

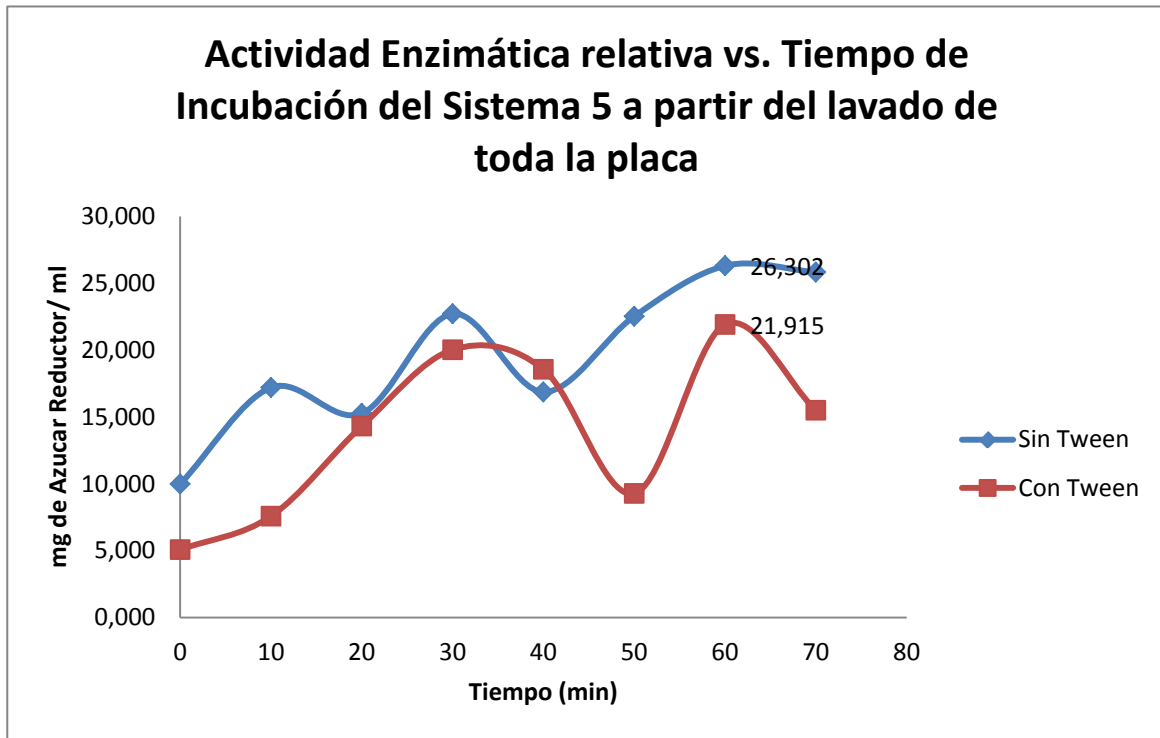


Figura 27.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 5 a partir del lavado de toda la placa.

A partir del lavado de toda la placa a diferentes tiempos, del Sistema 5, se realizó el lavado de toda la placa que contenía, medio de Cascara de Cebolla, con el *Trichoderma sp.*, usando como Inductor Pectina. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

La máxima actividad enzimática se dio en el minuto 60 por medio de un lavado con Buffer acetato pH 4.8 obteniéndose un valor de actividad de 26.30 g de azúcar reductor/ml.

La máxima actividad enzimática se dio en el minuto 60 por medio de un lavado con Buffer acetato pH 4.8 obteniéndose un valor de actividad de 26.30 g de azúcar reductor/ml.

La estabilidad de las enzima de este sistema como se puede ver es de baja estabilidad.

Tabla 23.- Actividad relativa Pectinolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como solución de extracción a partir del lavado de 1 gr de la muestra del sistema 6 a distintos tiempos de incubación en Pectina Cítrica.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml
0	0.489	22.858	0.322	16.618
10	0.680	40.877	0.579	40.904
20	0.600	33.377	0.396	23.659
30	0.878	59.604	0.511	34.532
40	0.702	43.000	0.599	42.865
50	0.582	31.679	0.427	26.604
60	0.787	50.972	0.602	43.086
70	0.435	17.811	0.375	21.682

Absorbancia neta de la muestra del sistema 6 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.314.

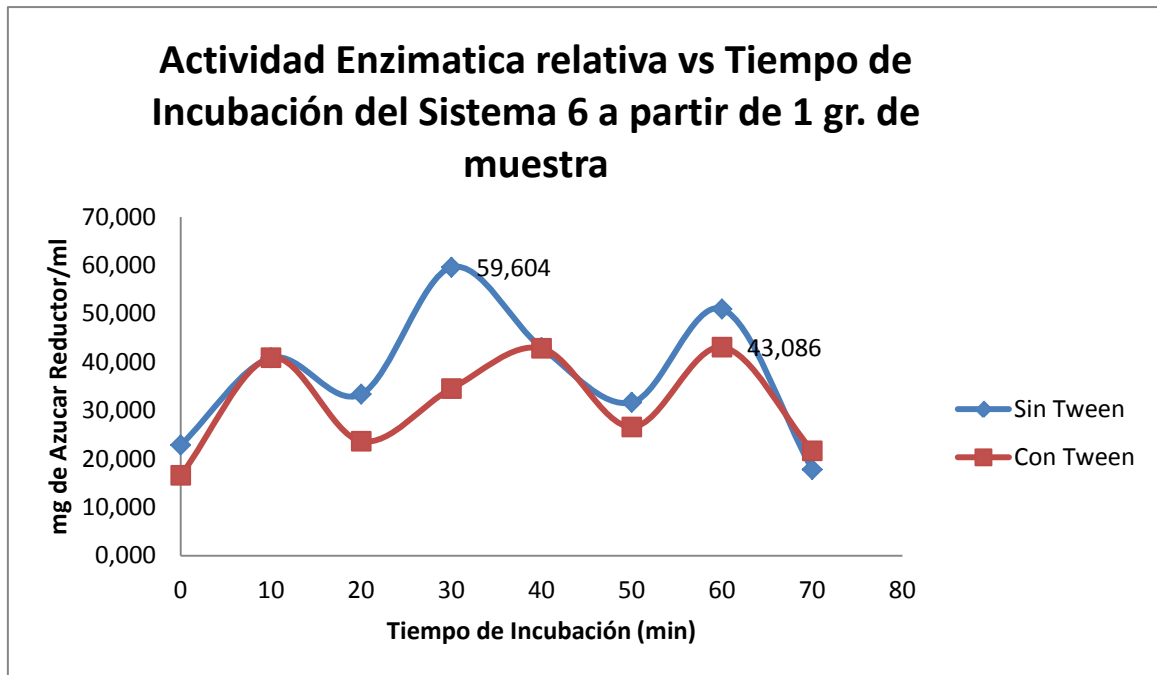


Figura 28.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 6 a partir del lavado de 1gr de muestra.

A partir del lavado de 1gr de muestra con Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% a diferentes tiempos, donde en el Sistema 6; Se pesó un gramo del medio de Orujo de Cebada Cervecera, el que contiene al hongo *Aspergillus niger*, usando como Inductor Pectina. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

En la figura 26 se puede ver que la mejor actividad se tuvo en el minuto 30 y lavada con Buffer dando un valor de actividad de 59.60 mg de azúcar reductor/ml, en cuanto a su estabilidad se vio que no es muy buena debido a que presenta varios picos, esto puede deberse a la presencia de otras enzimas.

En cuanto a la enzima extraída con Tween 80 se vio que su máxima actividad se dio en el minuto 60 y dio un valor de 43.09 mg de azúcar reductor/ml, también se vio que esta enzima presenta un carácter similar a la anterior, es probable que se presenten diferentes enzimas. Se realizó la prueba por triplicado (Ver Anexo 6.6)

Tabla 24.- Actividad relativa Pectinolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir del lavado de toda la placa del sistema 6 a distintos tiempos de incubación en Pectina Cítrica.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml
0	0.294	7.009	0.287	6.726
10	0.348	12.104	0.368	14.368
20	0.384	15.500	0.357	13.330
30	0.422	19.085	0.684	44.179
40	0.683	43.708	0.817	56.774
50	0.663	41.821	0.931	67.528
60	0.539	30.123	0.610	37.245
70	0.458	22.434	0.581	34.509

Absorbancia neta de la muestra del sistema 6 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.314.

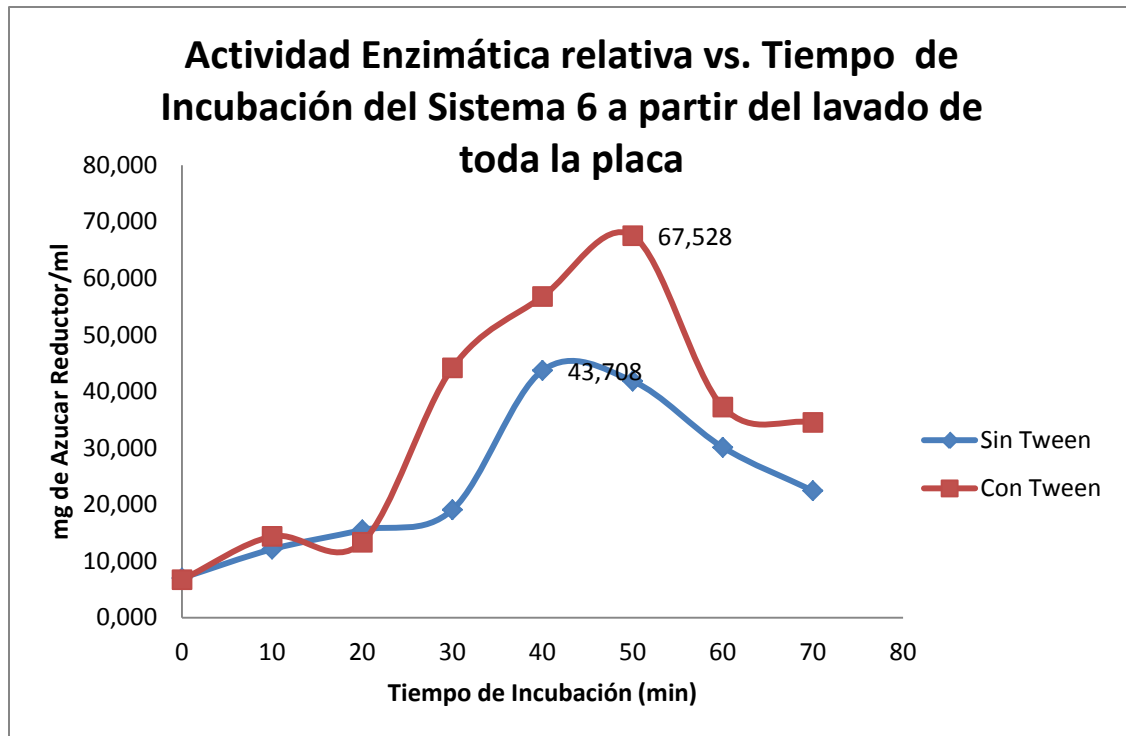


Figura 29.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 6 a partir del lavado de toda la placa.

A partir del lavado de toda la placa a diferentes tiempos, del Sistema 6; Se realizó el lavado de toda la placa que contenía, medio de Orujo de Cebada Cervecera, con el *Aspergillus niger*, usando como Inductor Pectina. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 en azul y en rojo con Tween 80 al 0.01%.

Como se puede apreciar la máxima actividad enzimática en este sistema se dio con un lavado con Tween 80 dando un valor de 67.53 mg de azúcar reductor/ml, esto se dio en el minuto 50, a partir del minuto 60 se inició el proceso de desnaturalización de la enzima.

En el caso de la enzima lavada con Buffer Acetato se vio que en el minuto 40 presentó su mejor actividad, dándonos un valor de actividad de 43.71 mg de azúcar reductor/ml, y a partir del minuto 50 se inicia su proceso de desnaturalización.

Tabla 25- Actividad relativa Pectinolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como solución de extracción a partir del lavado de 1 gr de la muestra del sistema 7 a distintos tiempos de incubación en Pectina Cítrica.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml
0	0.338	8.425	0.276	17.340
10	0.322	6.868	0.489	37.434
20	0.512	24.792	0.392	28.283
30	0.425	16.585	0.600	47.906
40	0.502	23.849	0.581	46.113
50	0.372	11.585	0.610	48.849
60	0.490	22.764	0.499	38.377
70	0.514	25.028	0.424	31.302

Absorbancia neta de la muestra del sistema 7 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.314.

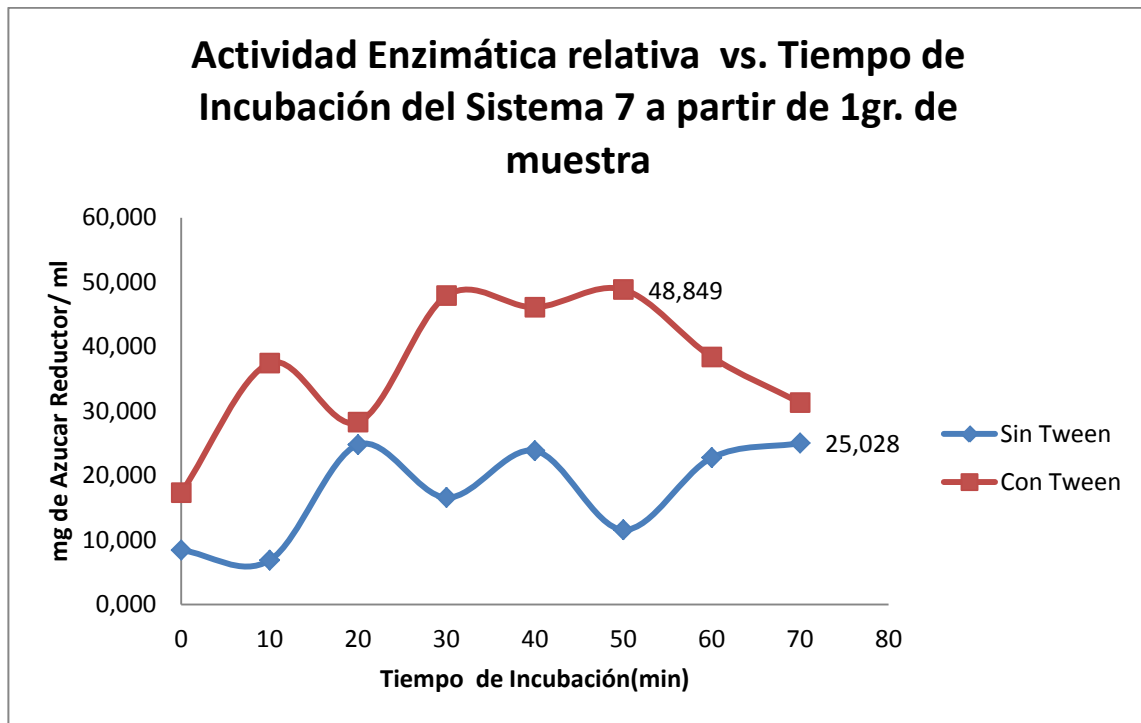


Figura 30 Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 7 a partir del lavado de 1gr de muestra.

A partir del lavado de 1gr de muestra con Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% a diferentes tiempos, del Sistema 7, se pesó un gramo del medio de Cascara de Cebolla, con el *Aspergillus niger*, usando como Inductor Pectina. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

En el Sistema 7 se puede apreciar que la mejor actividad se expresa con lavado con Tween en el minuto 50 de iniciada la incubación, dando un valor de 48.85 mg de azúcar reductor/ml. Mientras que con lavado con buffer la actividad más alta se dio en el minuto 70, obteniéndose un valor de 25.03 mg de azúcar reductor/ml.

Esto nos indica que el lavado con Tween nos da una mejor actividad enzimática. Se realizó la prueba por triplicado (Ver Anexo 6.7)

Tabla 26.- Actividad relativa Pectinolítica del extracto utilizando Buffer Acetato pH 4.8 y Tween 80 al 0.1% como soluciones de extracción a partir del lavado de toda la placa del sistema 7 a distintos tiempos de incubación en Pectina Cítrica.

Tiempo de Incubación (min)	Lavado con Buffer Acetato pH 4.8		Lavado con Tween 80 al 0.1%	
	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml	DO. neta del extracto enzimático	mg de azúcar reductor/ml
0	0.456	14.085	0.458	29.132
10	0.451	13.613	0.393	22.953
20	0.611	28.755	0.541	36.962
30	0.466	15.028	0.516	34.604
40	0.505	18.755	0.444	27.764
50	0.558	23.708	0.648	47.009
60	0.543	22.340	0.707	52.623
70	0.617	29.321	0.600	42.528

Absorbancia neta de la muestra del sistema 7 (ver tabla 7) utilizando un blanco de 0.314.

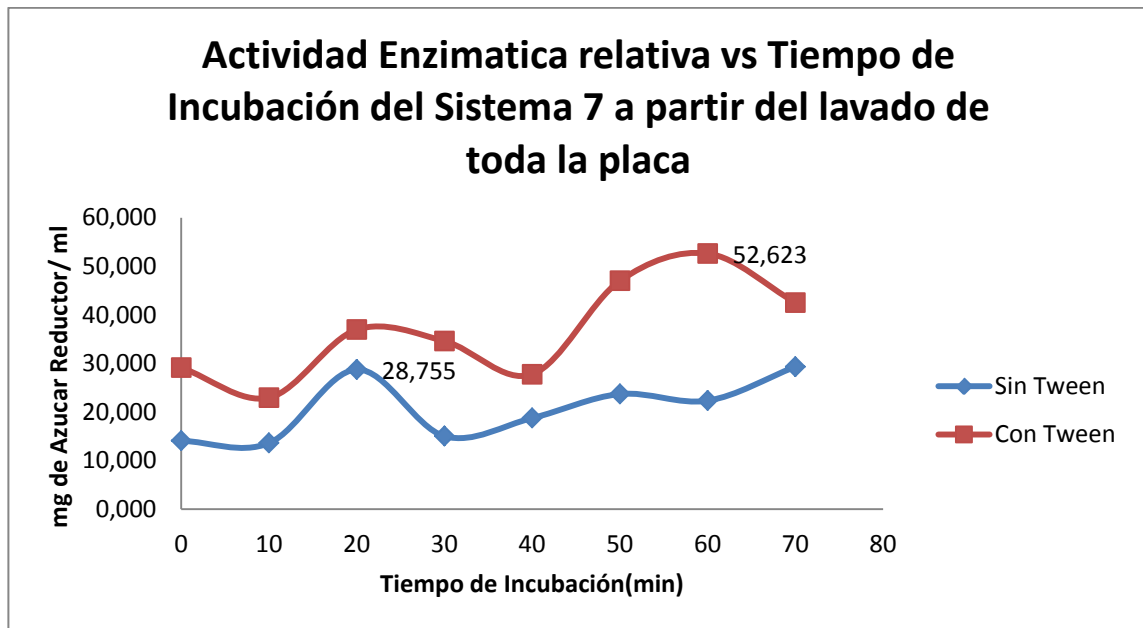


Figura 31.- Medición de la actividad enzimática relativa del sistema 7 a partir del lavado de toda la placa.

A partir del lavado de toda la placa a diferentes tiempos, del Sistema 7; Se realizó el lavado de toda la placa que contenía, medio de Cascara de Cebolla, con el *Aspergillus niger*, usando como Inductor Pectina. Se usó como soluciones de lavado Buffer Acetato pH 4.8, sin Tween 80 en azul y en rojo con Tween 80 al 0,1%.

La mejor actividad en este sistema se dio en el minuto 60 usando como solución de lavado Tween 80 al 0.1% dándonos un valor de actividad de 52.62 mg de azúcar reductor/ml.

En cuanto a su estabilidad se ve que la estabilidad no es buena puesto que hay varios picos, en el minuto 70 inicia la caída de su actividad.

En el caso de la enzima lavada con buffer su máxima actividad se da en el minuto 70 dando un valor de 39.32 mg de azúcar reductor/ml, en este caso la actividad es buena y no se ve inicios de desnaturalización de la enzima.

4.- Obtención del colorante

Para la obtención de colorante natural bixina a partir de la semilla del achiote se utilizó la hidrólisis enzimática como método de extracción obteniéndose 2.6 gr en peso seco de la bixina a partir de un peso inicial de 10gr de semilla contenidos en 30ml de agua destilada.

Se trabajó en las siguientes condiciones.

Tabla 27.- Tratamientos dados a la semilla de achiote para obtener su rendimiento

Muestra	Rendimiento
Achiote 5gr. + Agua	6%
Achiote 10gr. + Agua	12%
Achiote 5gr. + 25 μ l de mezcla enzimática	19%
Achiote 10 gr. + 25 μ l de mezcla enzimática	24%
Achiote 5 gr. + 50 μ l de mezcla enzimática	22%
Achiote 10 gr. + 50 μ l de mezcla enzimática	26%
Achiote 5 gr. + 100 μ l de mezcla enzimática	14%
Achiote 10 gr. + 100 μ l de mezcla enzimática	15%

La hidrólisis enzimática se dio utilizando 25 μ l de extracto celulolítico del sistema 2 y 25 μ l de extracto pectinolítico obtenido a partir del sistema 8, ambos extraídos con Tween 80.

El mejor sistema para la obtención del colorante fue pesando 10gr de muestra, la cual se lavó dos veces con una mezcla de 50 μ l de los extractos enzimáticos de interés, dando un rendimiento del 26% de bixina frente a un rendimiento del 12% obtenido con una extracción acuosa. De esta forma, queda demostrado que la hidrólisis enzimática nos ayuda a obtener una mayor cantidad de producto.

Salva y col en el 2000, en su investigación acerca de la extracción de colorante bixina por hidrólisis enzimática con enzimas comerciales obtuvieron resultados favorables, donde se incrementó el rendimiento del colorante bixina a un 24% con respecto a una extracción acuosa.

Domínguez et *al.*, (1995) también obtuvo resultados favorables con un tratamiento enzimático en la extracción de aceite de semillas oleaginosos (soya y girasol). Al respecto, se comprobó que mezclas enzimáticas de amilasas, glucanasas, pectinasas, celulasas, hemicelulasas y proteasas son efectivas para degradar las estructuras celulares de semillas oleaginosas.

De acuerdo a los experimentos realizados se pudo determinar que no es necesario utilizar grandes cantidades de extractos enzimáticos para un mayor rendimiento del producto; por lo tanto queda demostrado de que puede ser un método rentable puesto que se usan cantidades muy pequeñas de los extractos.

Para la extracción de colorantes, las mezclas enzimáticas son más efectivas, que cuando se usan celulasas o pectinasas solas.

Tabla 28.- Comparación de los rendimientos entre los métodos químicos y el método enzimático a partir de 10 gr de muestra de semilla de achiote.

Comparación de los rendimientos entre los métodos químicos y los métodos enzimáticos.

Método	Muestra	Rendimiento
Con agua	Achiote 10gr. + Agua	12%
Extracción enzimática	Achiote 10 gr. + 50µl de mezcla enzimática	26%
Método químico (alcalino)	Achiote 10 gr + NaOH 1%	17.6%

Como podemos ver en la tabla 28 se ve que el mejor rendimiento se obtuvo por el método enzimático, donde se obtuvo un rendimiento del 26% en comparación al método químico alcalino se obtuvo un rendimiento del 17.6%.

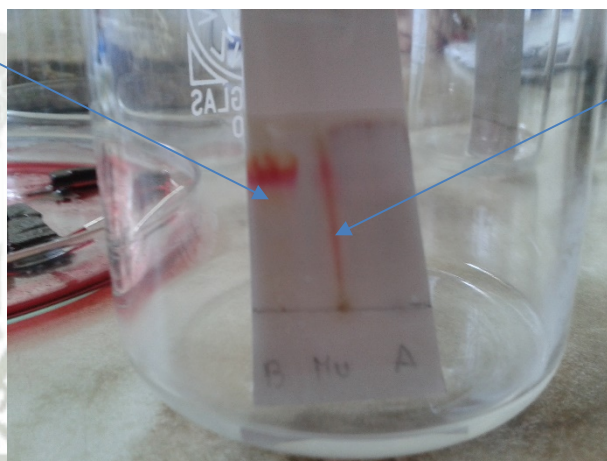
El método de lavado con agua no fue tan bueno puesto que se consiguió un rendimiento del 12%, todo esto a partir de 10 gr de muestra. Por tal motivo se puede decir que nuestro método enzimático fue el que tuvo un mayor rendimiento en cuanto a la extracción del colorante bixina, demostrándose así que el tratamiento enzimático nos otorga un mejor rendimiento frente a extracciones con métodos químicos.

También se realizó un análisis de costos aproximado del trabajo realizado en laboratorio el cual será explicado en el (anexo 6), donde se vio que 10 ml de enzima celulasa cuesta 21 soles y las pectinasas cuestan 21.2 soles. En el caso del colorante el precio es de 2.5 soles el gramo, en comparación a la bixina cristal al 95% de pureza que cuesta aproximadamente 258\$. el Kg y la bixina en polvo que cuesta 244\$. el Kg.

4.1.- Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Para la identificación de la bixina y norbixina se realizó una CCD donde separaron ambos pigmentos como se puede ver en la figura N° 32

Colorante bixina
método químico



Colorante norbixina
y bixina método
enzimático

Figura 32.- Foto de la Corrida cromatográfica en capa delgada para los colorantes del Achote.

CAPÍTULO N° 5

Conclusiones

1. Se evaluó que a una profundidad de 20 cm se encontraron las cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* aislados a partir de muestras de rizosfera de zapallo.
2. Se determinó que el crecimiento óptimo de las cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* en los dos sustratos pectinocelulósicos utilizados fue de 7 días a una temperatura de 37°C con agitación constante de 60 rpm.
3. De los cinco tamaños de partícula de sustratos (1, 1.2, 1.6, 1.8, 2mm) el que permitió el mejor desarrollo de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* fue el de 1.6 mm. para ambos sustratos.

4. Se determinó que el mejor sistema para las celulasas el número 2 una actividad enzimática relativa de 4.16 mg de glucosa/ml y para pectinasas fue el sistema 7 dándonos una actividad enzimática relativa de 52.62 mg de azúcar reductor/ml
5. Se extrajo enzimáticamente el colorante natural de la bixina a partir de la semilla del achiote usando un volumen de mezcla enzimática de 50ul. obteniéndose un rendimiento del 26% frente a 17% obtenido de la extracción química y el 12 % obtenido de la extracción acuosa.



Recomendaciones

1. Buscar otras fuentes de sustratos lignocelulósicos disponibles en el lugar para la extracción de enzimas fúngicas.
2. Evaluar el uso combinado del *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp.* en el mismo sustrato.
3. La utilización de otros microorganismos para la obtención de enzimas.
4. Estudio de otras aplicaciones para estos extractos enzimáticos en el campo agroindustrial e industrial.
5. La purificación de estos extractos enzimáticos.
6. Llevar a escala piloto e industrial este trabajo de investigación, tomando como referencia los parámetros mencionados, añadiéndole estudios de humedad, variaciones de temperatura y variaciones de pH
7. Usar otros tipos de molienda que remplacen a la molienda manual para la optimización del proceso

Bibliografía

1. Al - Taweil, H. I. (2009). OPTIMIZING OF *Trichoderma viride* CULTIVATION IN SUBMERGED STATE FERMENTATION. *American Journal of Applied Sciences* Vol. 6 N° 7, 1277 - 1281. Obtenido en: <http://thescipub.com/pdf/10.3844/ajassp.2009.1284.1288> [2009].
2. Argumedo - Delira, R., & Alarcón, A. y. (2009). EL GÉNERO FÚNGICO *Trichoderma* Y SU RELACION CON CONTAMINANTES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* N° 25 Vol 4, 257 - 269. Obtenido en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-49992009000400006&script=sci_arttext [Noviembre del 2009]
3. Arias, E. y Piñeiros, P. (2008) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS FILAMENTOSOS DE MUESTRAS DE SUELO DE LOS PARAMOS DE GUASCA Y CRUZ VERDE. *Bogota D.C. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Programa de Microbiología Industrial*. Obtenido en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf> [16-04-2008]
4. Bravo Venegas, J. K. (2010). AISLAMIENTO DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES A PARTIR DE LA OLEORRESINA DE PAPRIKA (*Capsicum annuum*), POR HIDROLISIS ENZIMÁTICA. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería - Programa Profesional de Ingeniería Química. Obtenido en : <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/1006> [2010]
5. Bustamante Munives, S., & Puccier Luna, M. y. (s.f.). OBTENCION ENZIMATICA DE COLORANTE NATURAL DE PAPRIKA (*Capsicum annuum*). obtenido en: <http://es.scribd.com/doc/75937890/Obtencion-Enzimatica-de-Colorante-a-Partir-de-Paprika> [17-11-2012]
6. Cañedo, V. y. (2004). MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP). Obtenido en: <http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf> [2004]
7. Chavez García, M. y. (2008). EFECTO DEL SUSTRATO Y LA EXPOSICION A LA LUZ EN LA PRODUCCION DE UNA CEPA DE *Trichoderma sp.* *Universitas Scientiarum* Vol. 13 N° 3, 245 - 251. Obtenida en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/1434/896> [07-03-2008]

8. Contreras Esquivel, J. C. (2003). PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE POLIGALACTURONASAS DE *Aspergillus kawachii*. La Plata - Argentina: Universidad Nacional de La Plata - Facultad de Ciencias Exactas. Obtenido en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2373/Documento_completo.pdf?sequence=1 [Mayo 2003]
9. Cruz C., N., & Castellanos S., D. y. (2009). DEGRADACION DE CELULOSA Y XILANO POR MICROORGANISMOS AISLADOS DE DOS TIPOS DE COMPOST DE RESIDUOS AGRICOLAS EN LA SABANA DE BOGOTA. *Revista colombiana de ciencias hortícolas - Vol. 3 - No.2*, 237 - 249. Obtenido en : <http://www.soccolhort.com/revista/pdf/magazin/vol3/vol.3.%20no.2/pathogen%20compost%20patogenos%20degradation%20cellulose.pdf> [2009]
10. Cuervo, L. y. (2009). LIGNOCELULOSA COMO FUENTE DE AZUCARES PARA LA PRODUCCION DE ETANOL. *Bio Tecnología Vol. 13 N° 3*, 11 - 25. Obtenido en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf [2009]
11. Dávila Zambrano, L. E. (1996). PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA ENZIMA PECTINASA PRODUCIDA POR *Aspergillus niger* POR MEDIO DE LA TECNICA DE FERMENTACION SOLIDA. Iztapalapa: Universidad Autonoma Metropolitana - Ingenieria Bioquimica Industrial. Obtenida en: <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=3660&docs=UAM3660.PDF> [24 de Mayo de 1996]
12. Diaz Sanchez, A. B. (2009). RECICLADO DEL ORUJO DE UVA COMO MEDIO SOLIDO DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE INTERES INDUSTRIAL. Cadiz: Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz - Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Obtenida en <http://es.scribd.com/doc/88496447/9788469333495> [Abril, 2009]
13. Diaz, D. D. (1991). PRODUCCION DE BIOMASA DE HONGOS CELULOLITICOS PARA LA DEGRADACION DE RESIDUOS CELULOLITICOS. Madrid: Universidad Complutence de Madrid. Obtenido en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/X/3/X3016201.pdf> [1991]
14. Dueñas Gomez, Y. M., & Narváez Cuenca, C. E. (2008). BUSQUEDA DE LAS MEJORES CONDICIONES PARA LA EXTRACCION Y MEDIDA DE ACTIVIDAD DE CELULASA Y XILANASA EXTRAIDAS DE LA CORTESA DE LA PITAYA AMARILLA (*Acanthocereus pitajaya*). *Acta biológica de*

- Colombia, VOL 13 - N° 1, 217 - 228. Obtenida en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-548X2008000100015&script=sci_arttext [Abril, 2008]
15. Eliecer Carrera, J. (2003). PRODUCCION Y APLICACION DE ENZIMAS INDUSTRIALES. *Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol. 1 N° 1*, 9 - 15. Obtenida en: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol1/Ar11.pdf> [Marzo 2003]
 16. Frioni, L. (1999). PROCESOS MICROBIANOS. Rio Cuarto: Editorial de la Fundacion Universidad Nacional de Rio Cuarto.
 17. Gacesa, P. y. (1990). TECNOLOGIA DE LAS ENZIMAS . Zaragoza: Editorial Acribia S.A.
 18. Garcia Garibay, M., & Quintero Ramírez, R. y.-M. (1999). BIOTECNOLOGIA ALIMENTARIA. Mexico: Editorial LIMUSA.
 19. García Torres, A. M. (2003). PRODUCCION DE ENZIMAS LIGNOLÍTCAS POR *Basidiomycetes* MEDIANTE LA TÉCNICA DE FERMENTACION EN SUSTRATO SÓLIDO. *Revista Colombiana de Biotecnología Vol. 5 N° 001*, 56 - 64. Obtenida en: <http://www.redalyc.org/pdf/776/77650107.pdf> [Julio, 2003]
 20. Godfrey, T. y. (1996). INDUSTRIAL ENZYMOLOGY *2nd Edition*. London: Macmillan Press LTD.
 21. Griffin, H. L. (1974). CELLULASE PRODUCTION BY *Trichoderma viride* ON FEEDLOT WASTE. *Microbiology Applied Vol. 27 N° 6*, 1061 - 1066. Obtenida en: <http://aem.asm.org/content/27/6/1061.full.pdf> [11 de Enero de 1974]
 22. Gutierrez Campos, S. R. (1996). UTILIZACION DE ENZIMAS EN LA EXTRACCION DE COLORANTE A PARTIR DE SEMILLAS DE ACHIOTE (*Bixa orellana L.*). *Anales Científicos UNALM*, 2 - 17. Obtenido en: http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/anales/pdf_anales/XXXI-97.pdf [1996]
 23. Ibarra, D. y col. DISTRIBUCION ESPACIAL DEL pH DE LOS SUELOS AGRICOLAS DE ZAPOPAN, JALISCO, MEXICO. *Revista Agricultura Técnica en México Vol 35 N° 3 paginas (367 -276)*: Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0568-25172009000300003&script=sci_arttext [Septiembre del 2009]

24. Jahangeer, S. y. (2005). SCREENING AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL CELLULASE ISOLATED FROM THE NATIVE ENVIRONMENTAL SOURCE. *Pak. J. Bot. Vol. 37 N° 3*, 739 - 748. Obtenido en: http://www.researchgate.net/publication/215589030_SCREENING_AND_CHARACTERIZATION_OF_FUNGAL_CELLULASES_ISOLATED_FROM_THE_NATIVE_ENVIRONMENTAL_SOURCE/file/81ddc10c5a0518c43a325c4b9549b0da.pdf [2005]
25. Jaramillo Henao, G. y. (2008). APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS SOLIDOS ORGÁNICOS EN COLOMBIA. Antioquía - Colombia: Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería - Especialización en Gestión Ambiental. Obtenido en <http://tesis.udea.edu.co/dspace/bitstream/10495/45/1/AprovechamientoRSOUenColombia.pdf> [2008]
26. K. Villena, G. y. (2003). BIOPELICULAS DE *Aspergillus niger* PARA LA PRODUCCION DE CELULASAS: ALGUNOS ASPECTOS ESTRUCTURALES Y FISIOLÓGICOS. *Rev. peru. biol. 10 (1) - Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM*, 78 - 87. Obtenido en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v10n1/v10n1a09.pdf> [2003]
27. Lenis, M. (2011). ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE OBTENCION DE UN ADITIVO ENZIMATICO MEDIANTE FERMENTACIONES MICROBIANAS SOLIDA Y SUMERGIDA DE AFRECHO DE TRIGO. Valencia: Ingeniería de Procesos - Área de Estudios de Postgrado de Universidad de Carabobo. Obtenido en: <http://riuc.bc.uc.edu.ve/bitstream/123456789/192/1/12575.pdf> [Enero del 2012]
28. Liu, J. y. (2007). CELLULASE PRODUCTION BY *Trichoderma koningii* AS3.4262 IN SOLID STATE FERMENTATION USING LIGNOCELLULOSIC WASTE FROM THE VINEGAR INDUSTRY. *Food Technol. Biotechnol. Vol. 45 N° 4*, 420 - 425. Obtenida en: <http://hrcak.srce.hr/file/37778> [Diciembre 2012]
29. Mitchell, D. A., Krieger, N., & Berovic, M. (2006). SOLID-STATE FERMENTATION BIOREACTORS FUNDAMENTALS OF DESIGN AND OPERATION. Berlin: Editorial SPRINGER.
30. Murray, R. K., Mayas, P. A., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. (2004). *HARPER - BIOQUIMICA ILUSTRADA*. México D.F.: Manual Moderno.
31. Mussatto, S. y. (2012). USE OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES IN SOLID-STATE FERMENTATION PROCESSES. In K. -Y. Show, *Industrial waste* (pp. 121 -

- 140). Rijeka - Croatia: In Tech. obtenido en: http://cdn.intechopen.com/pdfs/30860/InTech-Use_of_agro_industrial_wastes_in_solid_state_fermentation_processes.pdf [Septiembre 2012]
32. Navarro, P. y. (1995). RESIDUOS ORGANICOS Y AGRICULTURA. Alicante: Edición electrónica Espagrafic.
33. Obregón, W. D. (2008). HIDROLASAS DE LÁTEX DE ESPECIES DEL GÉNERO ARAUJA. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS. Barcelona: Universidad Nacional de la Plata - Facultad de Ciencias Exactas.
34. Ovando Chacón, S. L. (2005). PREPARATIVOS DE CELULASAS COMERCIALES Y APLICACIONES EN PROCESOS EXTRACTIVOS. *Universidad y Ciencia Vol. 21 N° 042*, 113 - 122.
35. Pastrana, L. (1996). FUNDAMENTOS DE LA FERMENTACION EN ESTADO Y APLICACION A LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *Ciencia y Tecnología Alimentaria Vol. 1 N° 003*, 4 - 12.
36. Poveda Parra, D. C. (2006). SELECCION DE EXTRACTOS FUNGICOS EXTRACELUARES (EFE) CON POTENCIAL PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum Mill.*). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana - Facultad de Ciencias - Carrera de Microbiología Industrial.
37. Priede, M. y Viesturs, U. 2005. EFFECT OF PULSING MIXING INTERRUPTIONS ON THE *Aspergillus niger* MORPHOLOGY AND CITRICACID PRODUCTION. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 19 (4) 359–366. Disponible en: http://www.fkit.hr/cabeq/pdf/19_4_2005/Cabeq%202005_4_6.pdf [2008, 14 de agosto]
38. Ravelo Ron, D. y. (2002). FERMENTACION DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR EN UN BIOREACTOR A ESCALA DE LABORATORIO. *Tecnología Química Vol. 22 N° 2*, 32 - 40.
39. Rios Alzate, L. R. (2002). INMOVILIZACION DE PECTINASAS Y/O CELULASAS Y DETERMINACION DE ALGUNOS DE SUS EFECTOS EN EL JUGO DE GUAYABA. Manizales: Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ingenieria y Arquitectura - Ingenieria Química.

40. Rodríguez G., I. y. (2007). PRODUCCION DE COMPLEJOS ENZIMATICOS CELULOLITICOS MEDIANTE EL CULTIVO EN FASE SOLIDA DE *Trichoderma sp.* SOBRE LOS RACIMOS VACIOS DE PALMA DE ACEITE COMO SUSTRATO. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, ISSN 0121-4004 Volumen 14 número 2 - Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.*, 35 - 42.
41. Schuster, E. y. (2002). ON THE SAFETY OF *Aspergillus niger* - A REVIEW. *Appl Microbiol Biotechnol. Vol 59*, 426 - 435.
42. Sorana, Y. (2000). PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS A ESCALA PILOTO . *Saber Universidad de Oriente*, 54 - 56 .
43. Trejo Hernandez, M. R. (1991). PRODUCCION DE PECTINASAS DE *Aspergillus niger* POR FERMENTACION SOLIDA SOBRE SOPORTE. *Micología Neotrópica Aplicada 4*, 49 - 62.
44. Vilchez Paz, L. (2002). DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE EXOGLUCANASAS DE CEPAS FUNGICAS NATIVAS DE LAS PROVINCIAS DE HUAYLAS Y HUARAZ. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas - Departamento Académico de Microbiología y Prásitología.
45. Watanabe, T. (2002). PICTORIAL ATLAS OF SOIL AND SEED FUNGI - MORPHOLOGIES OF CULTURED FUNGI AND KEY TO SPECIES, *2nd edition*. Boca Ratón, London, New York, Washington D.C.: CRC Press.
46. Yegres, S. y. (2001). PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS - ENSAYOS PRELIMINARES. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela Vol. 13, N° 1*, 55 - 59.

Obtenido

en: http://ri.biblioteca.udo.edu.ve/bitstream/123456789/756/1/PRODUCCION_DE_ENZIMAS-13-1.pdf [octubre 2012].

ANEXOS

Anexo 1.-

1.- Medios de cultivo

1.1- Agar Dextrosa y Papa

Uso

El Agar Dextrosa y Papa es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos.

Explicación

El Agar Dextrosa y Papa puede ser suplementado con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano. Este medio es recomendado para realizar el recuento colonial. También puede ser utilizado para promover el crecimiento de hongos y levaduras de importancia clínica. La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos con algunos dermatofitos.

Algunos procedimientos señalan bajar el pH del medio a 3.5 +/- 0.1 con Acido tartárico al 10%, para inhibir el crecimiento bacteriano.

La infusión de papa promueve un crecimiento abundante de los hongos y levaduras y el agar es adicionado como agente solidificante.

Formula

Infusión de papa	200.00 gr
Dextrosa	20.0 gr.
Agar bacteriológico	15.0 gr.
pH 5.6 +/-	5.6 +/- 0.2

Método:

Suspender 39 gr. del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas estériles.

Procedimiento:

Consultar las referencias apropiadas sobre procedimientos y métodos estándar.



1.2.- Agar Czapek (Agar Czapek –DOX)

Uso

Medio para el cultivo de hongos saprofitos, bacterias de suelo y otros microorganismos a partir de diversos materiales.

Principio

En este medio la única fuente de carbono es la sacarosa y el nitrato aporta el nitrógeno. La APHA en su 15th Edición lo recomienda para el aislamiento de *Aspergillus* y *Penicillium*. De la flora bacteriana del suelo solo pueden desarrollar las bacterias no exigentes.

Sembrar la muestra de ensayo en la superficie del medio de cultivo. Incubar de 1 a 2 semanas a 25°C

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Agar	15.0	Sacarosa	30.0
Cloruro de Potasio	0.5	Sulfato ferroso	0.01
Fosfato dipotasico	1.0	Sulfato de magnesio	0.5
Nitrato de sodio	2.0	pH	7.3 +/- 0.2

PREPARACION

Rehidratar 49 gr del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri esteriles. Cuando se requiere el medio inclinado en tubo, distribuirlo antes de esterilizar. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C

1.3.- Agar Dextrosa Sabouraud

USO

El Agar Dextrosa Sabouraud es un medio utilizado para el cultivo de hongo y levaduras.

EXPLICACIÓN

El Agar de Dextrosa Sabouraud es una modificación a la fórmula original del Agar de Dextrosa desarrollado por Raymond Sabouraud. Este medio es utilizado para el cultivo de hongos patógenos, particularmente de aquellos asociados con infecciones de piel. La alta concentración de dextrosa y la estreptomina y penicilina, se obtiene un excelente medio para el aislamiento primario de dermatofitos. Este medio es también utilizado para la determinación microbiológica en cosméticos e para evaluar la presencia de hongos en alimentos. En este medio las peptonas proveen la fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos, la dextrosa actúa como fuente de energía y el agar es agregado como agente solidificante.

Formula

Dextrosa	40.0
Peptona de Caseina	5.0
Extracto de Carne	5.0
Agar Bacteriologico	15.0

Preparación

Método

Suspender 65g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Evitar el sobrecalentamiento.

Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45- 50°C y vaciar en placas de Petri estériles

Procedimiento:

- 1.- Sembrar las muestras tan pronto lleguen al laboratorio siguiendo las recomendaciones para su proceso y siembra
- 2.- Incubar las placas o tubos sembrados en una atmosfera húmeda a 25-30°C
- 3.- Examinar los cultivos semanalmente para reportar resultados de crecimiento. Los cultivos deberán dejarse en incubación hasta por 6 semanas antes de reportarse como negativos.



Anexo 2

Somogyi Nelson

Preparacion y reactivos

Reactivo Cuprico de Somogyi

- 4.0 g. De CuSO_4 ó 6.25 g. De $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre)
- 24 g. Na_2CO_3 (carbonato de calcio) Anhidro 16 g. De NaHCO_3 (bicarbonato de sodio)
- 12 g. De tartrato doble de sodio y de potasio.
- 18 g. De Na_2SO_4 (sulfato de sodio).

Disolver en un becquer de 1000 ml. Con 660 ml. De agua destilada, acrecentar los reactivos indicados en el orden indicado anteriormente. Transferir para un balon volumétrico de 1000 ml. Y completar a volumen con agua destilada, dejar de un día para otro al abrigo de la luz, guardar en frasco ámbar.

Reactivo Arsenomolibdico de Nelson (SN 2)

Sol. A : 50.0 g. de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (molibdato de amonio) ó 53.093 g de molibdato de amonio $4\text{H}_2\text{O}$ en 900 ml. De agua destilada.

Adicionar 42 ml. De H_2SO_4 concentrado.

Sol B 0.6 g de Na_2AsO_4 en 50 ml. De agua destilada ó 10.06 g de $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (arsénico disodico).

Mezclar A y B y mantener a 37 °C en baño maria ó estufa por 24 Horas.
Volumen final a 1000 ml.

Procedimiento:

- 1,0 ml. De solución problema más 2.0 ml. Del reactivo SIN.
 - 10 minutos en baño de agua en ebullición.
 - Enfriar en baño de hielo.
 - Adicionar dos ml. Del reactivo de SN2.
 - Esperar 5 minutos.
 - Completar a volumen para 25 ml. De agua destilada.
 - Leer absorbancia a 540 nm.
- a. Preparar la solución patrón de glucosa, Pesamos ó 0,04 g de glucosa anhidra. Luego agregamos agua destilada al vasito precipitado para disolver toda la glucosa que queda y se echa en una fiola de 100ml. Finalmente enrazamos hasta la línea y homogenizamos.
- b. Preparamos la muestra, pesamos 5.2505g de miel
- c. Enjuagamos con agua destilada y lo vaciamos a una fiola de 100ml. Completamos hasta la línea y homogenizamos. Tomamos 1 ml de la fiola de 100ml para una nueva fiola de 50 ml y enrasamos hasta llegar a la línea, homogenizo.

Anexo 3.- Kit de Glicemia



Glicemia

enzimática

Método enzimático para la determinación de glucosa en suero o plasma

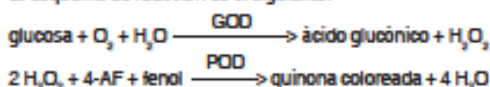
SIGNIFICACION CLINICA

La patología más común relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono es la diabetes mellitus. El diagnóstico precoz y el control de los pacientes diabéticos, tienen por objeto evitar la cetoacidosis y las complicaciones de los síntomas resultantes de la hiperglicemia, mediante el tratamiento adecuado.

Dado que existen múltiples factores causales de hiper o hipoglicemia, debe considerarse en cada caso la condición fisiológica y/o la patología presente en el paciente en cuestión.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema de reacción es el siguiente:



REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en Buffer Tris 0,82 mol/l.

B. Reactivo B: solución de fenol 55 mmol/l.

C. Reactivo C: solución de glucosa oxidasa (1000 U/ml) y peroxidasa (120 U/ml).

S. Standard: solución de glucosa 1 g/l.

Concentraciones finales

GOD	≥ 3000 U/l
POD	≥ 400 U/l
4-AF	1,25 mM
Fenol	2,75 mM
pH	7,4 ± 0,1

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: listo para usar.

Reactivo A: listo para usar.

Reactivo B: listo para usar. Ver PRECAUCIONES.

Reactivo C: homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

Reactivo de Trabajo: de acuerdo al volumen de trabajo, colocar en una probeta 500 partes de agua destilada, 50 partes de Reactivo A, 50 partes de Reactivo B y llevar a 1000 partes con agua destilada. Agregar 3 partes de Reactivo C previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar.

Pueden prepararse distintas cantidades respetando las pro-

porciones antedichas. Es importante además, respetar el orden de agregado de los reactivos y asegurar una perfecta homogeneización de los mismos, a fin de que el Reactivo B no deteriore el Reactivo de Trabajo.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

El Reactivo B (fenol) es tóxico e irritante. R36/38: irrita los ojos y la piel. R25: tóxico por ingestión. S24/25: evitese el contacto con los ojos y la piel. S37/38: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

Reactivo de Trabajo: en refrigerador (2-10°C) y en frasco color caramelo es estable un mes a partir de la fecha de su preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Durante el uso, el Reactivo de Trabajo puede desarrollar un ligero color rosado que no afecta su funcionamiento siempre que se procese un Blanco con cada lote de determinaciones y un Standard periódicamente. Desechar cuando las lecturas del Blanco sean superiores a 0,160 D.O. o las lecturas del Standard sean anormalmente bajas.

MUESTRA

Suero o plasma

a) **Recolección:** se debe obtener suero o plasma de la manera usual. Cuando no es posible extraer sangre venosa o en casos de extrema urgencia, la determinación se puede realizar en sangre capilar.

b) **Aditivos:** en caso de que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda el uso de Anticoagulante G de Wiener lab. para su obtención (el mismo contiene fluoruro como conservador).

c) **Sustancias interferentes conocidas:** los sueros o plasmas con hemólisis visible o intensa deben ser desproteinizados. No se observan interferencias por: bilirubina hasta 200 mg/l, ácido ascórbico hasta 75 mg/l, ácido úrico hasta 200 mg/l,

hemólisis ligera.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) **Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** los hematies y leucocitos son los responsables de la destrucción enzimática de la glucosa sanguínea, siendo máxima a 37°C, razón por la cual debe centrifugarse la sangre dentro de las dos horas posteriores a la extracción, hasta obtener un sobrenadante límpido y transferir a otro tubo para su conservación. En estas condiciones la glucosa es estable 4 horas a temperatura ambiente o 24 horas refrigerada (2-10°C). En caso de no poder procesarse la muestra de la forma antes indicada, deberá adicionarse un conservador en el momento de la extracción para inhibir la glucólisis.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Material volumétrico adecuado.
- Frasco de vidrio color caramelo.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
 - Temperatura de reacción: 37°C
 - Tiempo de reacción: 10 minutos
 - Volumen de muestra: 20 ul
 - Volumen de Reactivo de Trabajo: 2 ml
 - Volumen final de reacción: 2,02 ml
- Los volúmenes de Muestra y de Reactivo pueden variarse proporcionalmente (Ej.: 50 ul de Muestra + 5 ml de Reactivo de Trabajo).

PROCEDIMIENTO			
En tres tubos marcados B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:			
	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml
Incubar 10 minutos en baño de agua a 37°C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) llevando el aparato a cero con el blanco.			

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable 1 hora, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{glucosa g/l} = D \times f \quad \text{donde } f = \frac{1,00 \text{ g/l}}{S}$$

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (Standatrol S-E 2 niveles) con concentraciones conocidas de glicemia, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

Se analizaron con Glicemia enzimática, 120 muestras de individuos en ayunas, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 45 años, provenientes de la ciudad de Rosario (Argentina), sin síntomas de diabetes o cualquier otra enfermedad aparente. Se encontró que el 85% de los resultados cubrieron el siguiente rango:

Suero o plasma: 0,70 a 1,10 g/l

En la literatura (Tietz, N.W.) se menciona el siguiente rango de referencia:

Suero o plasma: 0,74 - 1,06 g/l

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia, teniendo en cuenta sexo, edad hábitos alimenticios y otros factores.

CONVERSION DE UNIDADES

$$\text{Glucosa (g/l)} = \text{Glucosa (mg/dl)} \times 0,01$$

$$\text{Glucosa (mg/dl)} \times 0,0555 = \text{Glucosa (mmol/l)}$$

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA. Los reductores disminuyen la respuesta de color, mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos. Dichos agentes son frecuentemente encontrados en el agua destilada empleada para preparar el Reactivo de Trabajo, por lo que se recomienda controlar la calidad de la misma. Los detergentes, metales pesados y cianuros son inhibidores enzimáticos.

PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** procesando replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvo lo siguiente:

Nivel	D.S.	C.V.
1,00 g/l	± 0,022 g/l	2,37 %
2,00 g/l	± 0,030 g/l	1,50 %

b) **Recuperación:** agregando cantidades conocidas de glucosa a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 99 y 101%.

c) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 4,5 g/l. Para valores superiores, diluir 1/2 la solución coloreada final con el Reactivo de Trabajo y repetir la lectura multiplicando el resultado final por dos.

d) **Exactitud:** empleando el método de la hexoquinasa como referencia, se observa que la correlación estadística entre ambos métodos es excelente (r= 0,99).

e) **Sensibilidad:** el mínimo límite de detección es 0,0054 g/l y la sensibilidad analítica es de 0,042 g/l.

PRESENTACION

- 1000 ml (Cód. 1400101)

BIBLIOGRAFIA

- Henry, R.J.; Cannon, D.C; Winkelman, J. - Clinical Chemistry,

Anexo 4

Tween 80

SINONIMOS:

Polisorbato 80 N.F., Monooleato de Sorbitán Polioxietilénico 80.

DESCRIPCION:

Líquido de color amarillo a ámbar. Tenso activo No- Iónico. HLB 15.0.

FUNCION:

El Tween 80 es un surfactante hidrofílico. Se utiliza para la emulsificación de aceite en agua (O/W), dispersión o solubilización de aceites, y para hacer lavables las pomadas anhidras. Con frecuencia se combina con surfactante SPAN 80 para promover la estabilidad de la emulsión.

SOLUBILIDAD:

Soluble en agua y etanol. Insoluble en Aceite Mineral y Propilenglicol.

Anexo 5

Tabla de Datos de pH de Suelo de rizósfera de zapallo.

	Zona de muestreo	pH
Cuadrante 1	- Zona 1	5.1
	Zona 2	6.2
	Zona 3	6.4
	Zona 4	5.8
	Centro	6.5
	Promedio	6.0
Cuadrante 2	- Zona 1	7.1
	Zona 2	6.8
	Zona 3	6.4
	Zona 4	6.3
	Centro	5.2
	Promedio	6.4
Cuadrante 3	- Zona 1	6.9
	Zona 2	6.7
	Zona 3	5.2
	Zona 4	7.1
	Centro	5.8
	Promedio	6.3
Cuadrante 4	- Zona 1	5.8
	Zona 2	7.2
	Zona 3	5.2
	Zona 4	6.6
	Centro	6.9
	Promedio	6.3
Cuadrante 5	- Zona 1	5.8
	Zona 2	6.2
	Zona 3	5.2
	Zona 4	5.6
	Centro	6.9
	Promedio	5.9

Anexo 6

Anexo 6.1.- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 1 a partir de 1g de muestra.

SIN TWEEN				CON TWEEN 80		
Repetición 1						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.190	0.244	0.646	0.191	0.224	0.395
10	0.190	0.205	0.180	0.191	0.240	0.586
20	0.190	0.223	0.395	0.191	0.246	0.658
30	0.190	0.253	0.754	0.191	0.264	0.873
40	0.190	0.253	0.754	0.191	0.309	1.412
50	0.190	0.257	0.802	0.191	0.333	1.699
60	0.190	0.305	1.376	0.191	0.352	1.926
70	0.190	0.289	1.184	0.191	0.329	1.651
Repetición 2						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.192	0.210	0.215	0.191	0.174	-0.203
10	0.192	0.213	0.251	0.191	0.180	-0.131
20	0.192	0.215	0.275	0.191	0.230	0.467
30	0.192	0.250	0.694	0.191	0.265	0.885
40	0.192	0.252	0.718	0.191	0.277	1.029
50	0.192	0.310	1.412	0.191	0.328	1.639
60	0.192	0.344	1.818	0.191	0.378	2.237
70	0.192	0.250	0.694	0.191	0.295	1.244
Repetición 3						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.189	0.209	0.239	0.190	0.217	0.323
10	0.189	0.193	0.048	0.190	0.227	0.443
20	0.189	0.219	0.359	0.190	0.235	0.538
30	0.189	0.256	0.802	0.190	0.267	0.921
40	0.189	0.265	0.909	0.190	0.281	1.089
50	0.189	0.293	1.244	0.190	0.322	1.579
60	0.189	0.342	1.830	0.190	0.348	1.890
70	0.189	0.250	0.730	0.190	0.299	1.304

Anexo 6.2 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 2 a partir de 1g de muestra .-

SIN TWEEN				CON TWEEN 80		
Repetición 1						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.189	0.208	0.227	0.19	0.213	0.275
10	0.189	0.216	0.323	0.19	0.221	0.371
20	0.189	0.218	0.347	0.19	0.237	0.562
30	0.189	0.228	0.467	0.19	0.243	0.634
40	0.189	0.240	0.610	0.19	0.256	0.790
50	0.189	0.254	0.778	0.19	0.278	1.053
60	0.189	0.238	0.586	0.19	0.275	1.017
70	0.189	0.237	0.574	0.19	0.250	0.718
Repetición 2						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.191	0.193	0.024	0.190	0.199	0.108
10	0.191	0.235	0.526	0.190	0.248	0.694
20	0.191	0.237	0.550	0.190	0.258	0.814
30	0.191	0.267	0.909	0.190	0.276	1.029
40	0.191	0.270	0.945	0.190	0.281	1.089
50	0.191	0.271	0.957	0.190	0.289	1.184
60	0.191	0.273	0.981	0.190	0.315	1.495
70	0.191	0.269	0.933	0.190	0.294	1.244
Repetición 3						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.190	0.201	0.132	0.192	0.206	0.168
10	0.190	0.226	0.431	0.192	0.235	0.514
20	0.190	0.228	0.455	0.192	0.248	0.670
30	0.190	0.248	0.694	0.192	0.260	0.814
40	0.190	0.244	0.646	0.192	0.269	0.921
50	0.190	0.249	0.706	0.192	0.284	1.101
60	0.190	0.253	0.754	0.192	0.295	1.232
70	0.190	0.219	0.347	0.192	0.272	0.957

Anexo 6.3 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 3 a partir de 1g de muestra.-

SIN TWEEN				CON TWEEN		
Repetición 1						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.184	0.230	0.550	0.190	0.271	0.969
10	0.184	0.235	0.610	0.190	0.276	1.029
20	0.184	0.253	0.825	0.190	0.280	1.077
30	0.184	0.262	0.933	0.190	0.299	1.304
40	0.184	0.250	0.790	0.190	0.315	1.495
50	0.184	0.277	1.113	0.190	0.324	1.603
60	0.184	0.266	0.981	0.190	0.311	1.447
70	0.184	0.263	0.945	0.190	0.304	1.364
Repetición 2						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.190	0.200	0.120	0.190	0.204	0.168
10	0.190	0.215	0.299	0.190	0.219	0.347
20	0.190	0.225	0.419	0.190	0.245	0.658
30	0.190	0.237	0.562	0.190	0.250	0.718
40	0.190	0.246	0.670	0.190	0.259	0.825
50	0.190	0.260	0.837	0.190	0.266	0.909
60	0.190	0.257	0.802	0.190	0.275	1.017
70	0.190	0.223	0.395	0.190	0.241	0.610
Repetición 3						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.190	0.215	0.299	0.191	0.238	0.562
10	0.190	0.225	0.419	0.191	0.248	0.682
20	0.190	0.239	0.586	0.191	0.263	0.861
30	0.190	0.250	0.718	0.191	0.275	1.005
40	0.190	0.248	0.694	0.191	0.287	1.148
50	0.190	0.269	0.945	0.191	0.295	1.244
60	0.190	0.262	0.861	0.191	0.293	1.220
70	0.190	0.243	0.634	0.191	0.273	0.981

Anexo 6.4 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 4 a partir de 1g de muestra.-

SIN TWEEN				CON TWEEN 80		
Repetición 1						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.314	0.340	3.47	0.314	0.528	21.21
10	0.314	0.630	30.83	0.314	0.936	59.70
20	0.314	0.387	7.91	0.314	0.546	22.91
30	0.314	0.531	21.49	0.314	0.718	39.13
40	0.314	0.496	18.19	0.314	0.766	43.66
50	0.314	0.414	10.45	0.314	0.656	33.28
60	0.314	0.518	20.26	0.314	0.734	40.64
70	0.314	0.407	9.79	0.314	0.451	13.94
Repetición 2						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.314	0.464	14.604	0.314	0.55	22.717
10	0.314	0.412	9.698	0.314	0.483	16.396
20	0.314	0.316	0.642	0.314	0.586	26.113
30	0.314	0.628	30.075	0.314	0.637	30.925
40	0.314	0.513	19.226	0.314	0.452	13.472
50	0.314	0.647	31.868	0.314	0.701	36.962
60	0.314	0.546	22.340	0.314	0.554	23.094
70	0.314	0.658	32.906	0.314	0.553	23.000
Repetición 3						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.314	0.240	-0.208	0.314	0.411	15.925
10	0.314	0.539	28.000	0.314	0.579	31.821
20	0.314	0.399	14.792	0.314	0.460	20.547
30	0.314	0.433	18.047	0.314	0.706	43.802
40	0.314	0.410	15.877	0.314	0.631	36.679
50	0.314	0.300	5.500	0.314	0.443	18.943
60	0.314	0.329	8.236	0.314	0.437	18.377
70	0.314	0.262	1.868	0.314	0.322	7.575

Anexo 6.5 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 5 a partir de 1g de muestra.-

SIN TWEEN				CON TWEEN 80		
Repetición 1						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.310	0.185	-5.113	0.312	0.475	22.2453
10	0.310	0.412	16.302	0.312	0.352	10.6415
20	0.310	0.542	28.566	0.312	0.518	26.3019
30	0.310	0.534	27.811	0.312	0.516	26.1132
40	0.310	0.306	6.302	0.312	0.630	36.8679
50	0.310	0.421	17.151	0.312	0.279	3.7547
60	0.310	0.447	19.604	0.312	0.830	55.7358
70	0.310	0.532	27.623	0.312	0.524	26.8679
Repetición 2						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.315	0.096	3.283	0.313	0.181	8.660
10	0.315	0.180	11.208	0.313	0.255	15.642
20	0.315	0.108	4.415	0.313	0.28	18.000
30	0.315	0.224	15.358	0.313	0.362	25.736
40	0.315	0.208	13.849	0.313	0.352	24.792
50	0.315	0.228	15.736	0.313	0.285	18.472
60	0.315	0.225	15.453	0.313	0.322	21.962
70	0.315	0.248	17.623	0.313	0.245	14.698
Repetición 3						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.312	0.486	16.679	0.314	0.453	13.566
10	0.312	0.555	23.189	0.314	0.432	11.585
20	0.312	0.586	26.113	0.314	0.550	22.717
30	0.312	0.628	30.075	0.314	0.589	26.396
40	0.312	0.520	19.887	0.314	0.568	24.415
50	0.312	0.620	29.321	0.314	0.438	12.151
60	0.312	0.703	37.151	0.314	0.669	33.943
70	0.312	0.670	34.038	0.314	0.610	28.377

Anexo 6.6 .- Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 6 a partir de 1g de muestra.-

SIN TWEEN				CON TWEEN 80		
Repetición 1						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.190	0.244	0.646	0.191	0.224	0.395
10	0.190	0.205	0.180	0.191	0.240	0.586
20	0.190	0.223	0.395	0.191	0.246	0.658
30	0.190	0.253	0.754	0.191	0.264	0.873
40	0.190	0.253	0.754	0.191	0.309	1.412
50	0.190	0.257	0.802	0.191	0.333	1.699
60	0.190	0.305	1.376	0.191	0.352	1.926
70	0.190	0.289	1.184	0.191	0.329	1.651
Repetición 2						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.192	0.210	0.215	0.191	0.174	-0.203
10	0.192	0.213	0.251	0.191	0.180	-0.131
20	0.192	0.215	0.275	0.191	0.230	0.467
30	0.192	0.250	0.694	0.191	0.265	0.885
40	0.192	0.252	0.718	0.191	0.277	1.029
50	0.192	0.310	1.412	0.191	0.328	1.639
60	0.192	0.344	1.818	0.191	0.378	2.237
70	0.192	0.250	0.694	0.191	0.295	1.244
Repetición 3						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	190	0.209	0.239	190	0.217	0.323
10	190	0.193	0.048	190	0.227	0.443
20	190	0.219	0.359	190	0.235	0.538
30	190	0.256	0.802	190	0.267	0.921
40	190	0.265	0.909	190	0.281	1.089
50	190	0.293	1.244	190	0.322	1.579
60	190	0.342	1.830	190	0.348	1.890
70	190	0.250	0.730	190	0.299	1.304

Anexo 6.7 . Datos obtenidos en las tres repeticiones del Sistema 7 a partir de 1g de muestra .-

SIN TWEEN				CON TWEEN 80		
Repetición 1						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.315	0.439	12.245	0.314	0.433	11.679
10	0.315	0.378	6.491	0.314	0.539	21.679
20	0.315	0.352	4.038	0.314	0.373	6.019
30	0.315	0.38	6.679	0.314	0.774	43.849
40	0.315	0.615	28.849	0.314	0.544	22.151
50	0.315	0.558	23.472	0.314	0.676	34.604
60	0.315	0.659	33.000	0.314	0.714	38.189
70	0.315	0.663	33.377	0.314	0.72	38.755
Repetición 2						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.314	0.489	22.858	0.312	0.322	16.618
10	0.314	0.680	40.877	0.312	0.579	40.904
20	0.314	0.600	33.377	0.312	0.396	23.659
30	0.314	0.878	59.604	0.312	0.511	34.532
40	0.314	0.702	43.000	0.312	0.599	42.865
50	0.314	0.582	31.679	0.312	0.427	26.604
60	0.314	0.787	50.972	0.312	0.602	43.086
70	0.314	0.435	17.811	0.312	0.375	21.682
Repetición 3						
Tiempo	Blanco	Muestra	Concentración	Blanco	Muestra	Concentración
0	0.314	0.485	16.585	0.315	0.576	25.170
10	0.314	0.530	20.830	0.315	0.415	9.981
20	0.314	0.691	36.019	0.315	0.670	34.038
30	0.314	0.439	12.245	0.315	0.580	25.547
40	0.314	0.569	24.509	0.315	0.400	8.566
50	0.314	0.640	31.208	0.315	0.710	37.811
60	0.314	0.616	28.943	0.315	0.648	31.962
70	0.314	0.767	43.189	0.315	0.694	36.302

7.- Costos

Para las enzimas			
Materiales	Cantidad	Um	Total S/.
buffer	10	ml	1.43
pectina	10	ml	0.1225
hongo + NaCl 0.9%	5	ml	0.09
otros			19.38
		Total	21.0225

Materiales	Cantidad	Um	Total S/.
buffer	10	ml	1.43
cmc	10	ml	0.26
hongo + NaCl 0.9%	5	ml	0.09
otros			19.38
		Total	21.16

Para el colorante

Para la obtención del Colorante			
Materiales	Cantidad	Um	Total S/.
Semilla de achiote	10	g	0.2
Agua destilada	50	g	0.05
Enzima Utilizada	0.05	g	1.05
otros			1.2
		Total	2.5