

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR  
LA CEPA NATIVA SPG 321 DE *Mucor circinelloides* Y EVALUACIÓN DE  
SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**



**AURA PATRICIA CHAPARRO PEDRAZA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE POSTRADO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
GIBUJ  
BOGOTÁ D.C.  
2010**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR  
 LA CEPA NATIVA SPG 321 DE *Mucor circinelloides* Y EVALUACIÓN DE  
 SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**



**AURA PATRICIA CHAPARRO PEDRAZA**

**Trabajo de Grado**

**Presentado como requisito parcial para optar el título de  
MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA**

**Director**

**RUBEN DARIO TORRENEGRA G.**

**Químico**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE POSGRADO**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**GIBUJ**

**BOGOTÁ D.C.**

**2010**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR  
LA CEPA NATIVA SPG 321 DE *Mucor circinelloides* Y EVALUACIÓN DE  
SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

**AURA PATRICIA CHAPARRO PEDRAZA**

**APROBADO**

**Dr. MANUEL FRANCO  
Director de Posgrados  
Director de Posgrados**

**Dra. INGRID SCHULER  
Decana Académica  
Facultad de ciencias**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

Firma del Director de tesis

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

## DEDICATORIA

*A Humberto por su amorosa confianza, a Carito,  
Beto, Nata y a mi Madre por sus gestos de amor conmigo*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme disfrutar de este espacio en mi vida, por sus bendiciones en el día a día.

A mí amado Humberto, por su paciencia, su apoyo incondicional, la dedicación y sobre todo por su inmenso amor.

A lo máspreciado, mis tesoros, Carito, Beto y Nata, por ser el motor que mueve mi universo.

A mi mamita, por su entrega sin condición y sus inagotables actos de amor.

A Nidiecita, por su amistad y su apoyo incondicional.

A mi maestro el Dr. Rubén Torrenegra y las fantásticas personas que me han dado la posibilidad de conocer a todas ellas mil y mil gracias, siempre estarán en mi corazón.

A la Pontificia Universidad Javeriana por ser el medio para materializar este proyecto en mi vida.

A COLCIENCIAS por el apoyo al proyecto titulado “*Microflora de los Páramos de Guasca y Cruz verde, Metabolitos producidos por cepas nativas y su actividad biológica*”.

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones anotadas Son de responsabilidad del autor y no Comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”. (Artículo 9,18 del Reglamento de los trabajos de grado y de Investigación de 1989)

## ABREVIATURAS

Rf	Relación de frente
Pf	Punto de fusión
C.C.D	Cromatografía en capa delgada
C.C	Cromatografía en columna
RP 18	Cromatografía en fase reversa
CG	Cromatografía de gases
L/L	Fraccionamiento líquido – líquido
S/L	Fraccionamiento sólido- líquido
I.R	Infrarrojo
KBr:	Bromuro de potasio
E.M	Espectrometría de masas
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear del protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear del carbono 13
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a
m / z	relación masa – carga
ppm	partes por millón
µm	micrómetros
µl	microlitos
mL	mililitros
UV	Ultravioleta
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
PETROL	Éter de petróleo
AcOEt	Acetato de etilo

Me <sub>2</sub> CO	Acetona
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
PETROL	Eter de petróleo
C	Caldo
B	Biomasa
S	Singlete
d	Doblete
t	Triplete
q	Cuarteto
m	Multiplete
M.c B1	Mezcla fracción CHCl <sub>3</sub> Biomasa
M.c B1A-1C	Compuestos
M.c B2	Mezcla fracción PETROL Biomasa
M.c B2A-2E	Compuestos
M.c C1	Mezcla fracción PETROL Caldo
M.c C1A-1B	Compuestos
M.c C2	Mezcla fracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
M.c C2A-2C	Compuestos
M.c B3	Compuesto biomasa

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	3
1. OBJETIVOS	4
2. MARCO REFERENCIA	5
2.1 El potencial de la biodiversidad	5
2.2 Generalidades de los hongos	6
2.3 Clasificación taxonómica	6
2.3.1 Filum Zygomycota	7
2.3.2 Orden <i>Mucorales</i>	8
2.3.3 Familia <i>Mucoraceae</i>	9
2.3.4 Género <i>Mucor</i>	10
2.4 METABOLISMO EN HONGOSFILAMENTOSOS	12
2.4.1 Metabolismo primario	13
2.4.2 Metabolismo secundario	14
2.5 BIOPROCESOS	16
3 MATERIALES Y METODOS	19
3.1 Localización	19
3.2 Selección del microorganismo	19
3.3 Identificación de la cepa SPG 321	20
3.3.1 Cultivos Monospóricos	20
3.3.2 Clasificación taxonómica de la cepa SPG 321 de <i>Mucor</i>	20
3.3.3 Recuento de conidios	21
3.3.4 Banco de células de la cepa SPG 321	21

3.4	CINÉTICA DE CRECIMIENTO	22
3.5	CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y FERMENTACIÓN	24
3.5.1	Preinoculo	25
3.5.2	Proceso fermentativo	27
3.6	EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE METABOLITOS	27
3.6.1	Técnicas utilizadas para la elucidación	28
3.6.2	Purificación e identificación de sustancias	29
3.7	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	34
3.7.1	Actividad antibacteriana	34
3.7.2	Actividad antifúngica	37
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1	Reconstitución de la cepa SPG 321	38
4.2	Identificación de la cepa nativa de mucor SPG 321	38
4.3	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Mucor circinelloides</i> .	48
4.3.1	Determinación de parámetros cinéticos	52
4.4	EXTRACTOSDECALDO CEPA SPG321	55
4.4.1	Fracción PETROL compuesto M.c C1A	55
4.4.2	Fracción PETROL compuesto M.c C1B	57
4.4.3	Fracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Mezcla M.c C2. Compuesto M.c C2A	58
4.4.4	Fracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> compuesto M.c C2B	59
4.4.5	Fracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> compuesto M.c C2C	60
4.5	COMPUESTOS AISLADOS DEL EXTRACTODE BIOMASA	61
4.5.1	Fracción CHCl <sub>3</sub> compuestos M.c B1A-1B-1B	62
4.5.2	Fracción PETROL mezcla M.c B2	65
4.5.3	Fracción PETROL compuesto M.c B3	72
4.6	PRUEBAS ANTIMICROBIANAS	78

4.7 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.	84
5 CONCLUSIONES	85
6. RECOMENDACIONES	87
7. BIBLIOGRAFÍA	88
8. ANEXOS	96

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de Mucor	6
Tabla 2.	Familia <i>Mucoraceae</i>	10
Tabla 3.	Características microscópicas	39
Tabla 4.	Taxonomía de <i>Mucor circinelloides</i>	47
Tabla 5.	Parámetros cinéticos	53
Tabla 6.	Compuestos fracción CHCl <sub>3</sub> , M.cB1A-1B-1C.	62
Tabla 7.	Compuestos fracción PETROL M.c B2A-	65
Tabla 8.	Asignaciones de analogía del espectro de RMN <sup>1</sup> H compuesto M.c B3	74
Tabla 9.	Lectura extractos crudos biomasa y caldo	78
Tabla 10.	Evaluación de la actividad antibacteriana fracciones PETROLY CHCl <sub>3</sub> de biomasa	80
Tabla 11.	Evaluación de la actividad antibacteriana en fracciones CHCl <sub>3</sub> de biomasa 0.5μ/ 50μL	82

## LISTA DE FIGURA

Figura 1.	Estructura morfológica del orden Mucorales	8
Figura 2.	Apariencia Macroscópica de especies del género <i>Mucor</i>	11
Figura 3.	Esquema general del metabolismo fúngico	14
Figura 4.	Esquema general de un bioprocesos	16
Figura 5.	Esquema de efectores de un bioprocesos	17
Figura 6.	Cepas aisladas del Banco de cepas del GIBUJ	20
Figura 7.	Biomasa en papel de filtro a 60°C	19
Figura 8.	Estructura del anillo antes y después de ser sometido a un proceso de calentamiento	24
Figura 9.	Preinoculo de la cepa nativa SPG 321	25
Figura10.	Metodología empleada con la cepa <i>Mucor</i> SPG 321	26
Figura 11.	Separación caldo - biomasa.	29
Figura 12.	Procedimiento analítico en la obtención de compuestos en el caldo de cultivo.	31
Figura 13.	Procedimiento analítico en la obtención de compuestos en biomasa	33
Figura 14.	Bioautografía fracción CHCl <sub>3</sub> de biomasa	36
Figura 15.	Morfología microscópica y macroscópica de <b><i>Mucor</i></b>	38
Figura 16.	Características Microscópicas (100x) de <i>Mucor</i>	41
Figura 17.	Características Macroscópicas de la colonia en PDA	42
Figura18.	Características Macroscópicas de la colonia en MEA	43
Figura 19.	Características Macroscópicas de la colonia en Cz	44
Figura 20.	Características Macroscópicas de la colonia de SPG 321 en luz azul	45

Figura 21.	Características en Medio PDA A: 25°C y B: 37°C	46
Figura 22.	Características en Medio Cz a A: 25°C y B: 37°C	46
Figura 23.	Concentración de biomasa vs tiempo	48
Figura 24.	Consumo de sustrato	49
Figura 25.	Concentración celular	50
Figura 26.	Tropofase de la cepa SPG 321 de <b><i>Mucor circinelloides</i></b>	51
Figura 27.	Comparación de biomasa y glucosa vs tiempo	52
Figura 28.	Velocidad de crecimiento de <b><i>Mucor circinelloides</i></b>	53
Figura 29.	Espectro de masas M.c C1A a 17.544 minutos, comparado con la base de datos Nist-05.	56
Figura 30.	Espectro de masas M.c C1B a 16.978 minutos comparado con la base de datos Nist-05	57
Figura 31.	Comparación entre espectro de masas compuesto McC2A a 17594 minutos y base de datos Nist-05	58
Figura 32.	Espectro de masas: compuesto McC2B 17.599 minutos y Comparado con base de datos Nist-05	59
Figura 34.	Espectro de masas: compuesto McB1A 16.552 minutos y base de datos Nist-05	63
Figura 35.	Comparación entre espectro de masas compuesto McB1B 17.709 minutos y base de datos Nist-05	64
Figura 36.	Comparación entre espectro de masas compuesto McB2A 17.709 minutos y base de datos Nist-05.	66
Figura 37.	Comparación entre espectro de masas compuesto McB2B 17.638 minutos y base de datos Nist-05	67

Figura 38.	Comparación entre espectro de masas compuesto McB2C 17.638 y base de datos Nist-05.	68
Figura 39.	Comparación entre espectro de masas compuesto McB2D 21.373 y base de datos Nist-05	69
Figura 40.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H Tomado en un equipo Bruker 300 MHz en (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO del compuesto M.c B3	73
Figura 41.	Espectro RMN <sup>1</sup> H simulado de Ergosterol y fórmula química	75
Figura 42.	Espectro de masas compuesto McB3 21.422 minutos y base de datos Nist-05.	76
Figura 43.	Estructura química de Ergosterol.	77
Figura 44.	Pruebas antibacterianas a. <i>S. aureus</i> b. <b><i>B. subtilis</i></b> y c. <b><i>E.coli</i></b>	79
Figura 45.	Pruebas antibacterianas a. <b><i>S. aureus</i></b> b. <b><i>B. subtilis</i></b> c. <b><i>E. coli</i></b> fracción PETROL extracto de biomasa	80
Figura 46.	Pruebas antibacterianas a. <b><i>E.coli</i></b> b. <b><i>S. aureus</i></b> y c. <b><i>B. subtilis</i></b> fracción CHCl <sub>3</sub>	81
Figura 47.	Pruebas antibacterianas <b><i>S. aureus. B. subtilis E.coli</i></b> fracción CHCl <sub>3</sub> concentración de 0.5µl/ 50µL	83
Figura 48.	Bioautografía para <b><i>S. aureus</i></b>	84
Figura 49.	Actividad antifúngica	84

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. MEDIOS DE CULTIVO	96
Anexo B. MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5 DINITROSALICILICO	98
Anexo C. CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA	99
Anexo D DATOS CINÉTICOS CEPA SPG 321DE <i>Mucor circinelloides</i>	100

## RESUMEN

La cepa nativa de ***Mucor circinelloides*** SPG 321 obtenida del Páramo de Guasca (Cundinamarca), por Cabrera y Chitiva en el 2001 y suministrada por el GIBUJ, fue objeto de este estudio, a la cual se le realizó la confirmación taxonómica teniendo en cuenta aspectos macro y microscópicos de la colonia. Se utilizaron las claves taxonómicas de Gilman 1963, Barnett, Hunter 1988 y Samson 1981. Esta reclasificación se realizó con base a lo referenciado por los autores Weitzman *et al* 1995, Chandra y Woodgyer 2002, Silva y Martínez 2006. De tal forma que la cepa corresponde al género ***Mucor*** y a la especie ***circinelloides***. Se utilizó como método de preservación el secado de esporas en sustrato inerte (papel filtro) y glicerol así como un banco celular para evitar cambios fenotípicos que afectaran la producción de los metabolitos. Se realizó la cinética de crecimiento, observando el inicio de la tropofase a las 48 horas empezando la ideofase a la hora 168 tomando el día 11 como clave para la finalización de la fermentación aeróbica. Posterior a esto se realizó la fermentación aeróbica con medio PGS se incubó a temperatura ambiente en agitador rotatorio a 160 rpm; se separó el micelio por extracción en Soxhlet con AcOEt; se hizo una extracción líquido-líquido del caldo con AcOEt, los extractos totales se fraccionaron con diferentes solventes; se purificaron con cromatografías de capa fina y columna en sílica gel, eluidas con diferentes relaciones de solventes. A partir del caldo de fermentación, se obtuvieron los compuestos: M.c C A-B y M.c C 2A-C. Los resultados dados por la técnica de gases acoplado a masas CG-EM confirman la producción de ácidos grasos insaturados. A partir del micelio se obtuvo un esteroide, que corresponde a un ergosterol compuesto denominado M.cB3. Se presentaron ácidos grasos insaturados en dos mezclas Mc B1 y Mc B2. Se realizaron pruebas antimicrobianas a partir de los extractos totales de caldo y micelio como también del compuesto M.cB3 frente a bacterias Grampositivas ***S. aureus*** ATCC 25923, ***Bacillus subtilis*** (ATCC 25921) y Gramnegativas (***Escherichia coli*** ATCC 25922). La fracción CHCl<sub>3</sub> en biomasa mostró actividad inhibitoria para los microorganismos ***S. aureus*** y ***B. subtilis***, e indeterminado para ***E. coli***. Se realizó actividad antifúngica con ***Fusarium oxysporum***, y no se evidenció actividad alguna con los extractos y fracciones analizadas.

## ABSTRACT

The native strain of *Mucor circinelloides* SPG 351, obtained from the *Paramo Guasca* (Cundinamarca) by Cabrera and Chitiva in 2001 and provided by the GIBUJ, was the subject of this study which was performed to confirm taxonomic classification taking into account macro- and microscopic characteristics of the colony. The taxonomic keys of Gilman 1963, Barnett and Hunter 1988 and Samson 1981 were used. This reclassification was based on the reports of Weitzman, et al 1995, Chandra and Woodgyer 2002, Silva and Martinez 2006. The strain belongs to the genus and species *Mucor circinelloides*. As preservation method was used the drying of spores in inert substrate (filter paper) and glycerol as well as a cell bank to avoid phenotypic changes affecting the production of metabolites. The kinetics growth was made, observing the beginning of the trophase at hour 48 and starting the idiofase at hour 168, taking the day 11 as the key for the ending of the aerobic fermentation. Then, it was done the aerobic fermentation with PGS medium, which was incubated at room temperature on rotary shaker at 160 rpm. The mycelium was separated by extraction in Soxhlet with AcOEt; a liquid-liquid extraction for the broth was done with AcOE. Full extracts were fractioned with different solvents; they were purified with thin layer chromatography and silica gel column, eluted with different relations of solvents. Different compounds were obtained from fermentation broth: M.c C A-B and M.c C 2A-C. The results given by the technique of coupled gas with GC-MS mass confirm the production of unsaturated fatty acids; a sterol was obtained from the mycelium, which is a composite ergosterol called M.cB3. A presence of unsaturated fatty acids in two mixtures Mc B1 and Mc B2 was noted. Antimicrobial tests were done from total extracts of the broth and the mycelium as well as the M.cB3 compound with Gram positive bacteria (*S. aureus* ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 25921) and Gram negative (*Escherichia coli* ATCC 25922). The fraction CHCl<sub>3</sub> in biomass revealed inhibitory activity for the microorganisms *S. aureus* and *B. subtilis*, and indeterminate for *E. coli*. Antifungal activity was done with *Fusarium oxysporum* and it was not noted any activity with the extracts and fractions analyzed.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos liberan compuestos químicos que afectan de manera significativa a otros organismos y determinan la existencia de interacciones químicas, producto de las vías metabólicas secundarias, que se encuentran íntimamente relacionadas con las vías que dan origen a los metabolitos primarios; carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

El uso de tecnologías y la optimización de procesos han permitido que se llegue a la caracterización de metabolitos secundarios aun en pequeñas cantidades, lo que significa una fuente potencial de compuestos susceptibles de ser utilizados cualquier identificación de este tipo, por especies nativas, puede tener implicaciones teóricas y prácticas de gran relevancia para el avance industrial de nuestro país.

El conocimiento sobre metabolitos secundarios por especies nativas, es escaso en la actualidad, por eso el particular interés de entender este proceso fisiológico para la cepa nativa ***Mucor circinelloides*** SPG 321 (Cabrera y Chitita, 2001). Recolectada en el páramo de Guasca (Cundinamarca), organismo filamentoso que pertenece a la clase Zygomycetes, al cual se le caracterizó sus metabolitos secundarios mayoritarios y determino su actividad antimicrobiana y antifúngica.

Este trabajo hace parte del proyecto patrocinado por COLCIENCIAS titulado “*Microflora de los Páramos de Guasca y Cruz verde, Metabolitos producidos por cepas nativas y su actividad biológica*”. Cód: 1203-12-17845.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- ❖ Aislar los metabolitos de la cepa nativa de *Mucor circinelloides* SPG 321 y determinar su actividad antimicrobiana y antifúngica.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Reclasificar mediante claves taxonómicas la cepa nativa de *Mucor* SPG 321 recolectada en el páramo de Guasca (Cundinamarca).
- ❖ Determinar los parámetros cinéticos de la cepa ***Mucor circinelloides*** SPG 321 y su relación con la producción de metabolitos secundarios en la idiofase.
- ❖ Identificar por métodos espectroscópicos los compuestos aislados de la cepa nativa de ***Mucor circinelloides*** SPG 321
- ❖ Evaluar la actividad biológica de extractos crudos de biomasa, caldo de fermentación y fracciones, mediante pruebas antibacterianas y antifúngicas.

## **2. MARCO REFERENCIAL**

### **2.1 EL POTENCIAL DE LA BIODIVERSIDAD COLOMBIANA**

El conocimiento de la biodiversidad es un tema importante y complejo que abarca desde la variabilidad genética de especies, poblaciones, comunidades y ecosistemas, hasta el conocimiento de las relaciones que se establecen entre los seres humanos y la naturaleza. El desconocimiento taxonómico, es uno de los principales obstáculos para su conservación y utilización sostenible (Álvarez, *et al* 1997).

En Colombia se han hecho avances significativos en la construcción del inventario nacional de la biodiversidad. Como lo demuestra el estudio realizado por Yepes *et al.* 2005 quien a partir de una muestra de 4944 investigaciones en biodiversidad ,a firma que el 40% de las investigaciones nacionales centran su trabajo en las plantas como grupo taxonómico , 33% en los vertebrados, 21% en los invertebrados y solo el 14% en los microorganismos.

La Colección Micológica del Banco de Cepas del Grupo de Investigación de Biotransformación de la Universidad Javeriana GIBUJ se inició en el 2003 con el objetivo de recolectar, mantener y proveer cepas de hongos entomopatógenos, fitopatógenos y ambientales para su utilización en investigación.

Es así como la línea de trabajo del grupo GIBUJ, se orienta hacia la identificación de moléculas o principios activos, o materiales de interés producidos por el metabolismo de microorganismos nativos con el fin de orientar el potencial de la biodiversidad hacia actividades de bioprospección.

## 2.2. GENERALIDADES DE LOS HONGOS

Los hongos son organismos eucariotas, no fotosintéticos con estructuras hifales y esporas de diversos tipos. Los hongos forman un grupo coherente filogenéticamente. Se reconocen tres grandes grupos: *mohos* u *hongos filamentosos*, las *levaduras* y las *setas* (Carlile y Watkinson, 1996).

Los hábitats de los hongos son diversos. Algunos son acuáticos. Aunque la gran mayoría de ellos son de medios terrestres, crecen en suelos o sobre materia orgánica en descomposición y contribuyen a la mineralización del carbono orgánico, muchas especies pueden nitrificar y desnitrificar, oxidar azufre, hierro y manganeso (Wainwright, 1992).

## 2.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Mucor*.

El género *Mucor* comprende diferentes especies que hacen parte de los hongos filamentosos encontrados en la tierra, plantas, frutas y verduras en descomposición. De las especies más comunes del género se encuentran: *Mucor amphibiorum*, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Mucor indicus*, *Mucor racemosus*, y *Mucor ramosissimus* (González; et al, 200

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Mucor*

Reino	<i>Hongos</i>
Phylum	<i>Zygomycota</i>
Clase	<i>Zygomycetes</i>
Subclase	<i>Incertae Sedis</i>
Orden	<i>Mucorales</i>
Familia	<i>Mucoraceae</i>
Género	<i>Mucor</i>

Tomado de Weitzman; et al, 1995

### 2.3.1. Filum Zygomycota

El filum Zygomycota está formado por organismos terrestres, algunos son parásitos de plantas, hongos y animales. Todos los zigomicetos se reproducen sexualmente mediante esporas diploides de paredes gruesas llamadas cigoesporas, que se dispersan en el aire y germinan en unas estructuras negras llamadas esporangios (Schübler *et al*, 2001). Los hongos pertenecientes a esta división constan de 10 órdenes, 32 familias, 124 géneros, 83 sinónimos y 870 especies (Toro; *et al*, 1993).

Los hongos de la **clase Zygomycetes**, son comunes y se encuentran como saprófitos de material orgánico, formando una especie de moho. Algunos son parásitos débiles de hortalizas o semillas. Su importancia como patógenos se restringe casi exclusivamente a productos almacenados. Algunas especies son utilizadas por el hombre en la industria licorera y la producción de ciertos ácidos orgánicos (Garcés, 2003). Sus características más importantes son:

- Poseen micelio bien desarrollado y cenocítico, con o sin rizoide. Pared celular de quitina y quitosano.
- La reproducción asexual es realizada mediante la producción de numerosas esporas sin flagelo (aplanosporas) dentro de esporangios libres.
- Para llevar a cabo la reproducción sexual producen estructuras morfológicamente similares (isometangios) donde no se diferencian los sexos.
- Como resultado de la fusión de los isometangios se forma la Zigóspora, provista de gruesas paredes.

### 2.3.2 Orden Mucorales

Los representantes de este orden son a menudo llamados mohos negros, cuando llegan a la vejez desarrollan un pigmento moreno. En muchos casos algunas de las hifas se introducen al sustrato para fijar las sustancias nutritivas (Toro; *et al*, 1993).

Las especies de estos géneros desarrollan estolones, rizoides (*Rhizopus*, *Absidia* y *Rhizomucor*) y el esporangio contiene en su extremo esporangiosporas entre 3-6 mm de diámetro cada una, que sirven como forma de diseminación.

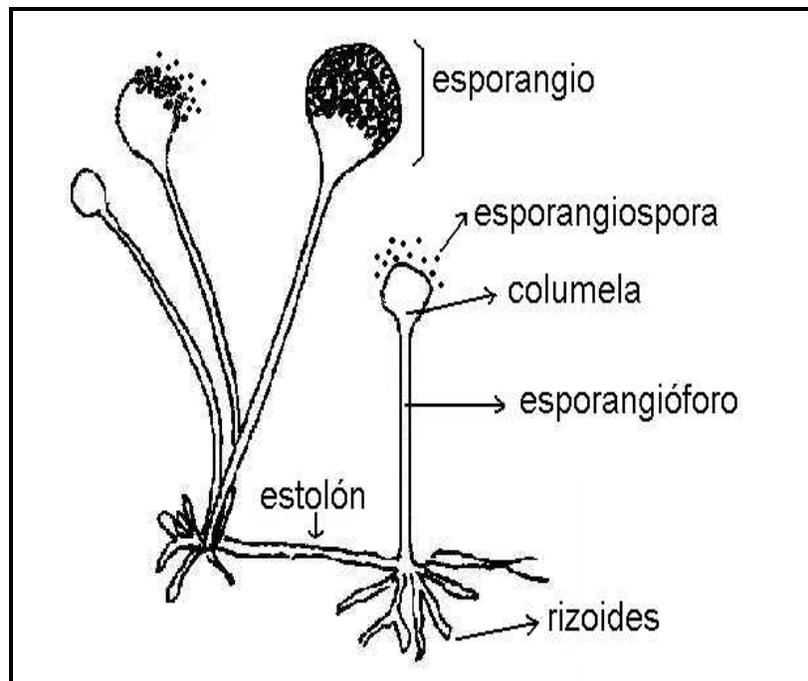


Figura 1. Estructura morfológica del orden Mucorales.

Fuente Wainwright 1992.

Presenta formas irregulares, hifas características largas y con ancho de 10 a 30  $\mu\text{m}$ , no septadas, que adoptan a menudo formas curvas o de cintas ramificadas en ángulo recto disposición que permite el libre flujo de núcleos y organelos citoplasmáticos; por esta razón se desarrollan rápidamente en los medios de cultivo habituales (Patrick; *et al*, 2006), como se muestra en la figura 1.

### **2.3.3 Familia *Mucoraceae***

Hongos con esporangios provistos de columela, formada por la pared transversal que separa el esporangióforo del esporangio hacia el interior, a fin de constituir una estructura vesicular o con forma de cúpula, zigósporas desnudas o ligeramente cubiertas por apéndices, caracterizados por tener el talo no segmentado o ramificado. Los géneros incluyen a:

- *Absidia*
- *Apophysomyces*
- *Mortierella*
- *Mucor*
- *Rhizopus*
- *Rhizomucor*

En la tabla 2 se resumen los rasgos que ayudan en la diferenciación de estos generos.

**Tabla 2. Familia *Mucoraceae***

Genero	Crecimiento óptimo	Esporangióforo	Columella	Esporangio	Rhizoid	Stylo-spore
<i>Absidia</i>	45°C	Ramificadas, hialino-	En forma de cúpula	En forma de pera	indistinto	-
<i>Apophysomyces</i>	≥42°C	Normalmente no ramificado de color marrón-grisáceo	Por lo general en forma de cúpula, rara vez alargada	En forma de pera	+	-
<i>Mortierella</i>	40°C	Ramificado, hialina	-	Esférica	+	+/-
<i>Mucor</i>	<37°C	Ramificados o no, hialina	+, En diferentes formas	Esférica	-	-
<i>Rhizomucor</i>	54°C	Ramificado, de color marrón	Formas esféricas	Esférica	+	-
<i>Rhizopus</i>	45°C	La mayoría marrón no ramificado	Formas esféricas y elongadas	Esférica	+	-

Tomado de Weitzman, *et al* 1995

### 2.3.4 Género *Mucor*

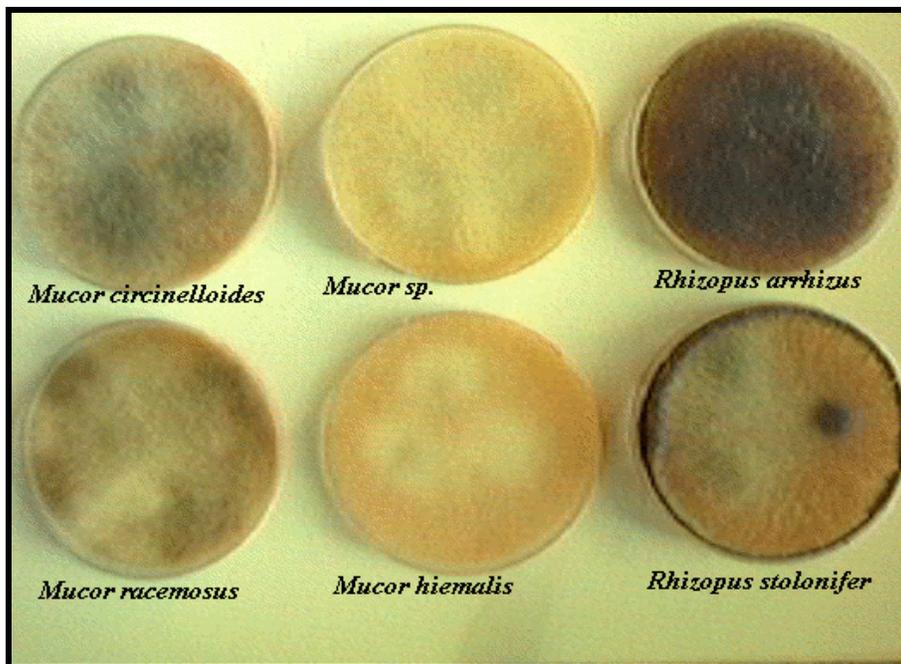
La especie más conocida y ampliamente distribuida es *Mucor mucedo*, se puede obtener con facilidad a partir de estiércol de caballo, donde abundan las esporas; tiene enzimas proteolíticas que desintegran las grasas, lo que ocasiona descomposición de alimentos.

*M. rouxii* es dimórfico: presenta estadios micelial y levaduriforme, el oxígeno favorece el desarrollo micelial, en tanto que la anaerobiosis y el dióxido de carbono promueven la formación de levaduras gemantes. Productor de amilasa, por lo que se usa industrialmente en la elaboración de alcohol; en oriente se utiliza en la preparación de bebidas alcohólicas, se obtiene a partir de arroz; es vendido como “levadura china”. Se caracteriza por sus esporangióforos ramificados y por producir clamisoporas negras en el micelio aéreo (Wiedermann, 1998).

Las especies de este género, pueden ser heterotálicas como *M. genevensis* y homotálicas como *M. miehei*; otras son excepcionalmente partenogénicas, cada gametangio se desarrolla sin previa fecundación dando origen a una

zigóspora, caso típico para *M. azygospora* y *M. bainieri*, la primera con esporangióforos sencillos y la segunda con esporangióforos ramificados.

▪ **Rasgos macroscópicos del género:** Las colonias crecen rápidamente a 25-30°C y rápidamente cubren la superficie del agar. Su apariencia algodonosa presenta una altura de varios centímetros; el color es inicialmente blanco y se vuelve castaño grisáceo con el tiempo (Figura 2).



**Figura 2. Apariencia Macroscópica de especies del género Mucor**

Tomado de Kendrick B. The Fifth Kingdom. 2008, on-line, [http:// www.mycology.com](http://www.mycology.com).

Los hongos filamentosos de este género, pueden ser mantenidos en medios relativamente pobres, estos no son exigentes, un medio que induce una buena esporulación es ideal. A continuación se hace referencia a algunas condiciones que favorecen el crecimiento (Deacon, 1993):

**1. Humedad:** La mayoría crecen a partir de 0.7-0.8. El límite máximo de la  $a_w$  es de 0.999 (Alexopoulos; *et al*, 1996).

**2. Temperatura:** La mayoría son mesofílicos, crecen entre 10-35°C. Su temperatura óptima esta entre 15-30°C. Pueden crecer y esporular a temperaturas de 45°C y superiores, pero su crecimiento decrece en temperaturas por debajo de 20°C (Wainwright, 1992).

**3. Oxígeno:** Los organismos obtienen su energía por metabolismo oxidativo (respiratorio) o por fermentación. En bajas concentraciones de oxígeno, pueden utilizar nitrato como oxidante. Pueden crecer en condiciones estáticas o de agitación. El aporte de  $O_2$ , en general, aumenta el crecimiento (Carlile y Watkinson, 1996).

**4. Luz:** En muchos estudios se reporta que la iluminación puede incrementar o reducir la tasa en que se propaga el hongo, este factor puede interferir en el metabolismo, los cuales pueden inducir la biosíntesis de carotenoides. Es el caso de *Mucor circinelloides*. Es en las longitudes de onda del azul sugieren que el fotorreceptor es una flavina (Silva y Martínez, 2006).

## **2.4. METABOLISMO DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS**

Los hongos son generalmente quimioheterótrofos, pero muchas especies filamentosas pueden oxidar fuentes reducidas de nitrógeno (nitrificación), oxidar azufre, hierro y manganeso, y pueden participar en los procesos de desnitrificación. Los hongos participan en estas transformaciones a velocidades más lentas que las bacterias. Se observa, que mientras la mayor parte de los hongos crecen en condiciones aeróbicas, muchos hongos filamentosos pueden crecer en condiciones microaerofílicas, pocos, como los miembros del rumen pueden crecer en condiciones anaeróbicas (Wainwright, 1992).

### **2.4.1 Metabolismo primario.**

El mecanismo por el cual el microorganismo realiza reacciones metabólicas necesarias para que pueda crecer y mantenerse vivo, reacciones anabólicas y catabólicas necesarias para el mantenimiento y crecimiento de la célula es conocido como metabolismo primario (Owen, 1989).

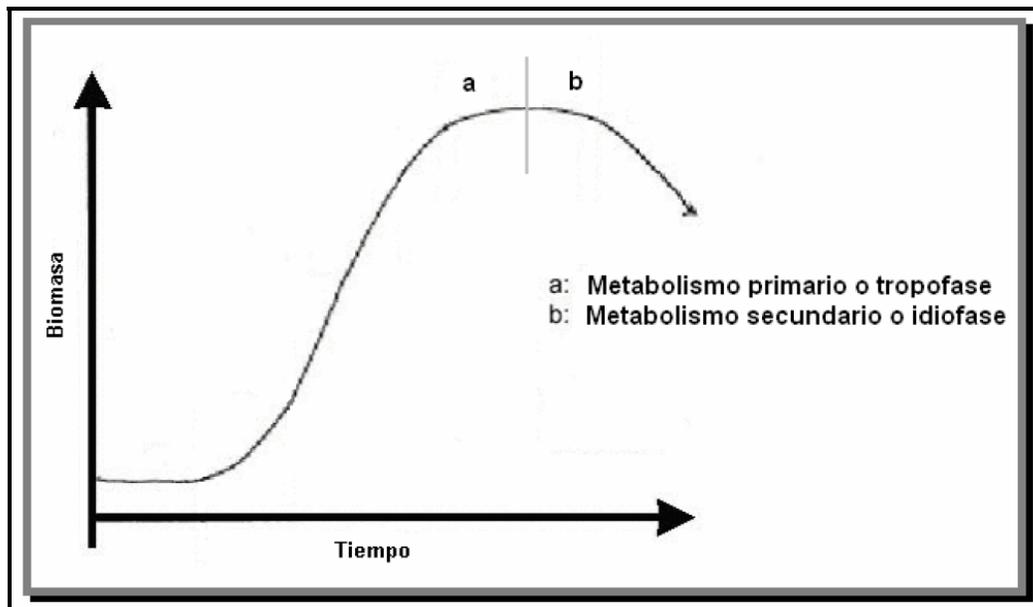
Industrialmente los metabolitos primarios son de interés para la elaboración de aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, solventes y ácidos orgánicos. La mayoría de estos metabolitos son elaborados por fermentación microbiana en lugar de síntesis química, debido a que las fermentaciones son procesos económicamente más competitivos y biológicamente útiles (De Baets; *et al*, 2000).

Las células vivientes derivan la energía a través del metabolismo empleado en las reacciones de oxido-reducción (redox). La oxidación de fuentes de carbono, como por ejemplo la glucosa, y el traslado de electrones involucra dos caminos: la biosíntesis y el metabolismo de energía. Sólo una pequeña parte de los electrones se usan en el suministro del nuevo material celular (biosíntesis). La gran mayoría se pasa a los aceptadores terminales de electrones o directamente a las reacciones del redox. (Demain, 1996).

## 2.4.2 Metabolismo secundario

El metabolismo secundario incluye aquellos procesos metabólicos que tienen lugar después de terminado el crecimiento, a través de vías biosintéticas específicas que no tienen función estructural ni de reserva (De Baets *et al.*, 2000).

Los metabolitos secundarios no son necesarios para la biosíntesis celular, no tienen por tanto un papel directo en el metabolismo energético en consecuencia, no se conoce con claridad la razón de su existencia. (Estrohl, 1997). Algunos de estos compuestos principalmente los antibióticos, son útiles para el organismo puesto que pueden inhibir a otros organismos de su entorno. Además tienden a ser sintetizados como familias de compuestos relacionados (Demain. 1996).



**Figura 3. Esquema general del metabolismo fúngico.**

Fuente Nickin 2000

Otro indicio de esta relación radica en que algunos metabolitos secundarios se producen por ramificaciones de vías biosintéticas primarias, que se inician al no sintetizarse más el metabolito primario. Así mismo, la presencia de algunos metales como manganeso, hierro y zinc inducen la producción de metabolitos secundarios en bacterias y hongos (Bentley, 1997).

Los metabolitos secundarios son productos de bacterias, hongos y plantas. Estos tienden a ser biosintetizados después de que la tasa de crecimiento durante. Aunque se desconoce en la mayoría de los casos, la función del metabolito secundario, la bioactividad de estos compuestos ha sido explotada como medicamentos, venenos, agentes saborizantes en alimentos, fitohormonas y otros de aplicación industrial (Bentley. 1997)

Según Demian 1996 y Madigan *et al.*, 1998, los metabolitos secundarios poseen las siguientes características:

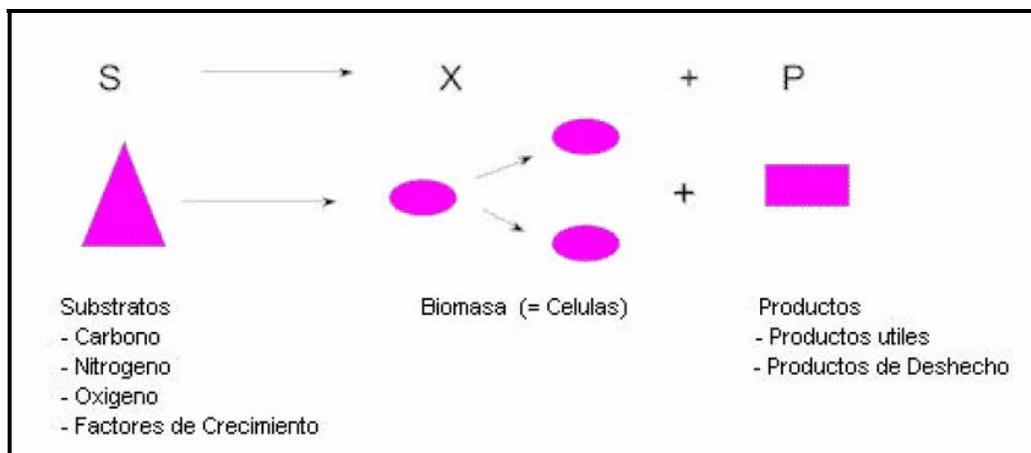
- Son productos naturales elaborados por grupos microbianos pertenecientes a ciertas especies.
- Generalmente sintetizados como compuestos químicos con diversidad estructural por ejemplo: Alcaloides, flavonoides, Benzoquinonas, glucósidos, tetraciclinas, cumarinas, aminoazúcares, macrólidos, salicilatos, e.t.c.
- Parece que no se encuentran relacionados con los procesos de las vías biosintéticas de macromoléculas como proteínas ácidos nucleicos y polímeros.
- En su mayoría son excretados al exterior, lo que puede estar relacionado con la eliminación de material tóxico.
- Producción de componentes estructurales de cubiertas fúngicas.
- Captación de minerales indispensables para otros microorganismos, lo que los hace competitivos.

-

- La formación de señales de diferenciación (esporulación y acumulación de productos de reserva).
- La producción de elementos que contribuyan a la colonización de espacio y nutrientes (antibióticos y toxinas).

## 2.5 BIOPROCESOS

Un bioproceso se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o biorreactor, en el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando con formación de productos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente. (Baughman Y Liu, 1995) como se ilustra en la figura 3.



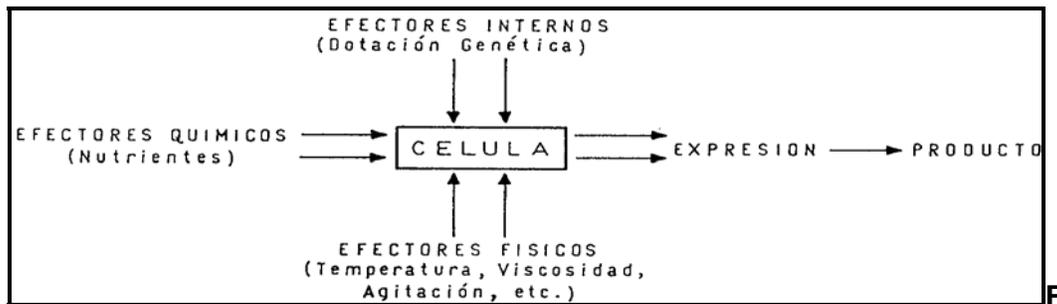
**Figura 4. Esquema general de un bioproceso**

Tomado de Baughman, 1995.

- **Efectores internos y externos**

El comportamiento del microorganismo en el reactor, es el resultado de los llamados efectores intra y extra celulares. Los efectores internos están representados por la dotación genética del organismo y por sus mecanismos de regulación metabólica. Los últimos pueden ser modificados por alteraciones del medio o más precisamente por los efectores externos mientras que la existencia de un gen depende de la especie del microorganismo (McNeil y Harvey, 1990).

Un gen está o no está, sólo su expresión puede modificarse. Las cepas empleadas pueden someterse a tratamiento físico o químico de mutación que al alterar algún sector del genoma logran aumentar la producción de un metabolito aunque también pueden disminuirla o incluso suprimirlo. También se efectúa la inserción de sectores del genoma de una especie en un microorganismo, haciéndose capaz de producir metabolitos que desde el punto de vista genético de su especie no podría hacerlo. Es decir que los efectores internos pueden modificarse para lograr la optimización de un proceso fermentativo (Doran, 1998). Se puede representar esquemáticamente como se muestra en la figura 5



**figura 5. Esquema general de efectores en un bioproceso**

Tomado de Baughman y Liu, 1995

- **Reactores:** Los reactores están vinculados al manejo o manipulación de los efectores externos, pues además de la regulación de las variables físicas. Son los reactores quienes determinan el tipo de fermentación. Para tal efecto cuando se operan los reactores en "batch" o en forma discontinua (todos los componentes son colocados desde un comienzo en el medio de producción) o cuando se opera el reactor en "batch alimentado" donde los componentes se alimentan en forma controlada durante el proceso. Finalmente cuando se opera el reactor en continuo, se alimenta medio a una determinada velocidad al mismo tiempo que se deja salir con la misma velocidad medio fermentado, lo que permite tratar la velocidad de crecimiento específico (Doran, 1998).

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 LOCALIZACIÓN

El desarrollo de la investigación fue realizado en la Universidad Javeriana, en los laboratorios de microbiología química y fitoquímica; tomando la cepa SPG 321 del banco de cepas del GIBUJ (Grupo de investigación de Biotransformación) cepa aislada del páramo de Guasca por Cabrera y Chitiva, 2001.

#### 3.2 SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO

La cepa utilizada en este estudio fue previamente aislada del páramo de Guasca por Cabrera y Chitiva, 2001, y pertenece al Banco de cepas del GIBUJ denominada como SPG321.



**Figura 6. Cepas aisladas del Banco de cepas del GIBUJ**

La cepa conservada en suelo, se activo esparciendo granos de suelo sobre cajas de petri en agar selectivo para hongos. En este caso se uso agar papa dextrosa (PDA), agar Czapeck (Cz), agar extracto de malta (MEA)(Anexo A) y se incubo a 25 °C por 6 días para su posterior estudio (Demain, 1986).

### **3.3 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE *Mucor circinelloides* SPG 321**

#### **3.3.1 Cultivos monospóricos.**

Para obtener cultivos axénicos a partir de un conidio o una célula hifal, se realizó en tubos con agar inclinado, se transfirió una pequeña porción de la colonia con una aguja micológica a un tubo con tween 80 al 0.5%, se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000), se mezcló y sembró por agotamiento en una caja petri con PDA. Se llevó a incubar a 25°C hasta que se observó la germinación de una espora, inmediatamente se transfirió asépticamente a un tubo inclinado con PDA, Agar extracto de malta y Agar Czapeck, se continuó hasta obtener el desarrollo total del hongo (Mayea, 1983).

Estos cultivos permitieron la obtención de conidias con un solo genotipo, para procedimientos posteriores; se comprobó la pureza de la cepa, mediante montaje en azul de lactofenol y verificando las estructuras propias del género **Mucor**, y descartando por coloración de gram contaminación bacteriana y /o de levaduras (Mayea, 1983).

#### **3.3.2 Clasificación taxonómica de *Mucor* SPG 321**

Se realizó la observación macroscópica durante la primera y la segunda semana de incubación en cuanto a forma, color superficial, textura, producción de pigmentos; paralelo a esto se realizó la identificación microscópica, utilizando azul de lactofenol, con los aumentos 10X, 40X, y 100X. Para esto se tuvo en cuenta forma, color, tamaño de las conidias, la disposición de las hifas, las características de estas en cuanto a: tabiques, ramas, diámetro, color y naturaleza de las paredes.

La cepa se sembró en medios de Agar extracto de malta 2% (MEA), extracto de levadura Czapek (Cz), Agar saboroud, inoculadas en tres puntos e incubadas a 5°C, 25°C y 37°C; para la identificación del género **Mucor** se empleo claves taxonómicas (Gilman, J, 1963, Samson, et al., 2000). Se inoculó en tres puntos para observar las variaciones morfológicas entre las colonias (Pitt, 1985).

- **Confirmación de la clasificación.** Frente a la dificultad para la identificación de las más de 50 especies válidas para el género **Mucor** como lo confirman y según metodología Weitzman *et al* 1995, se estudio el crecimiento de la cepa en luz azul y se realizó prueba de termoresistencia.

### **3.3.3 Recolección y preservación de conidios.**

Para fermentaciones posteriores la cepa de **Mucor SPG 321**. Se centrifugó, las esporas a 10.000 rpm durante una hora; el sobrenadante se descartó las esporas se recolectaron con pipeta pasteur estéril, en tubos eppendorf con glicerol y se almacena a -5°C; Como también se utilizó la preservación en suelo estéril colocando 1 ml de suspensión de conidios por 5 g de suelo (Demain, 1996).

### **3.3.4 Banco de células de la cepa SPG 321**

Con el fin de contar con una fuente pura y viable de la cepa nativa de **Mucor** SPG 321, se conservó la cepa en un banco celular a una concentración celular de  $10^7$  conidios/ml, para esto se utilizó glicerol como crioprotector en una relación 1:1, (Dupré & Espinoza, 2000), se guardó a una temperatura inferior a los -5°C. (Monroy y Meza, 2002).

### 3.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

A partir de la suspensión de conidios, se llevó a un volumen de 45 ml de caldo papa-glucosa-sulfato de amonio (PGS), compuesto por 40% de papa, glucosa 2% y sulfato de amonio 0.3% a pH  $7.0 \pm 0.2$  y 5 ml del inóculo utilizando 16 erlenmeyer de 250mL por un periodo de 384 horas, con relación 1/5 de aireación. Se determinó el crecimiento del microorganismo, realizando recuento de conidios en cámara de Newbauer para determinar la concentración de conidios. (Vélez *et al.*, 1997).

- **Determinación de parámetros cinéticos** Con los datos obtenidos de la curva de crecimiento en erlenmeyer y en fermentador de 5L, se determinaron parámetros cinéticos como rendimiento de biomasa a partir de sustrato  $Y_{x/s}(g/g)$ , velocidad específica de crecimiento  $\mu_x(h^{-1})$ , tiempo de duplicación  $t_d(h)$  y productividad (Doran, 1998). La curva de crecimiento se realizó por triplicado para obtener datos estadísticamente representativos.

- **Recuento de conidios.**

Se realizaron diluciones por duplicado  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  de la suspensión de esporas con tween 80 al 0.5% y se realizó el conteo en cámara de Newbauer, basándose en la siguiente formula (Bauer, 1986)

$$\frac{\text{Células contadas}}{\text{Área contada} \times \text{profundidad de la cámara} \times \text{dilución del recuento}}$$

0.1 mm: profundidad de la cámara.

área contada: # de cuadrantes contados / # de cuadrantes totales.

- **Determinación de peso seco**

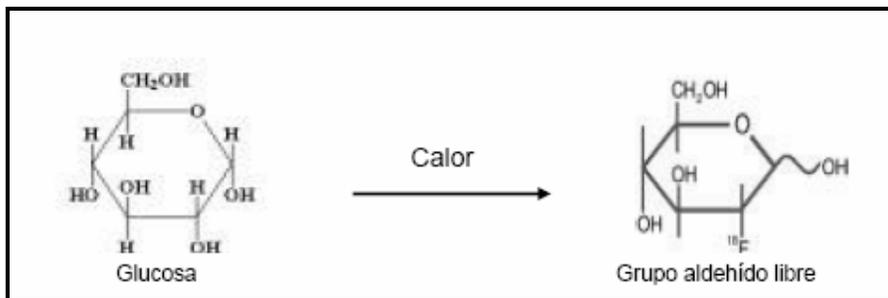
Se aplicó el método universal de determinación de peso seco, este método se considera el más exacto para medir crecimiento. Este se separo por filtración para secarla en horno a 60°C - 80°C hasta obtener un peso constante.



**Figura 7. Biomasa seca en papel de filtro a 60°C**

Paralelamente a la aparición de la biomasa, se aplicó un método indirecto en función del estudio de las variaciones de estos parámetros; que permite seguir la evolución de la biomasa, midiendo la dosificación de azúcar (sustrato) (Scriban Rene, 1985) para el cual se aplicó:

- **La Técnica del Ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS).** Esta es una técnica de oxido-reducción que se basa en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5 dinitrosalisílico en determinadas condiciones (anexo B), esta reducción produce una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores. Se evidencia por medio de la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a 540nm según la aplicación de la ley de Beer-Lambert (Miller, 1959), dando lugar a una reacción de oxidación como se observa en la figura 8.



**Figura 8. Estructura del anillo antes y después de ser sometido a un proceso de calentamiento**

<http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis>

### 3.5 CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y FERMENTACIÓN

Se realiza una fermentación discontinua o en batch en la cual, a tiempo cero, la solución esterilizada de nutrientes se inocula con el microorganismo de interés y se permite que se lleve acabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada (Owen, 1991).

### 3.5.1 Preinóculo

Se maneja un volumen efectivo de trabajo (VET) de 25 ml, preparados a partir de 24.5 mL de medio papa-dextrosa-sulfato de amonio (PGS) (Carranza, 2005), al que se le agregó 0,25mL de una suspensión de conidias a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/mL. Se incubó a 25°C y con agitación a 180 rpm; por 3 días conservando la proporción de 1/5 en erlenmeyer de 125 mL (Demain, 1996, Daza, 2001).



**Figura 9. Preinóculo de la cepa nativa de *Mucor circinelloide* SPG 321**

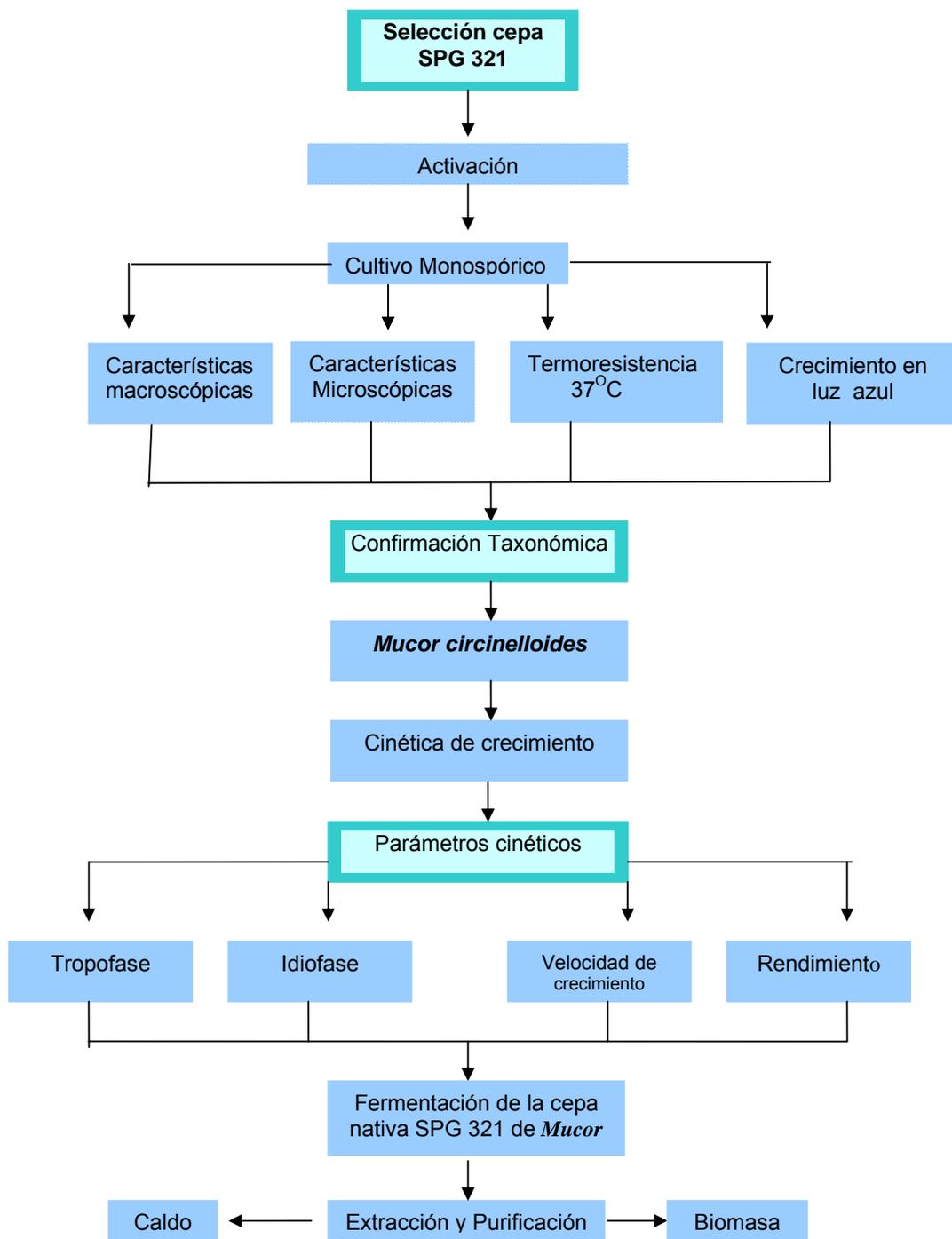


Figura 10. Diagrama metodología empleada. Cepa *Mucor* SPG 321

### **3.5.2 Proceso fermentativo**

La fermentación, se llevó a cabo en erlenmeyer de 5 litros, con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 1000 mL. Se inóculo 50 mL a erlenmeyer con 950 mL de medio papa -dextrosa-sulfato de amonio (PGS). Se completo 20 Litros de caldo de cultivo. (Demain, 1996; Daza, 2001). La fermentación se llevó a cabo a temperatura ambiente por 11 días (264 horas) con agitación de 120 rpm. (Figura 9) Para la aireación se uso un motor ELITE 799 con una salida de aire de 1000cc/min.

El proceso general se explica en la figura 10.

### **3.6 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE METABOLITOS**

Los cultivos de cada fermentación, se filtraron en un sistema al vacío, para obtener caldo y biomasa (figura 11), posteriormente la biomasa retenida por el sistema se llevó a un horno a 60°C por 24 h y se paso al desecador por 2 horas para absorber la humedad. Se cuantificó mediante la técnica de peso seco en balanza analítica. El peso de la biomasa es la diferencia del peso total menos el peso del papel. (Scragg, 1997).

La extracción de los metabolitos, se realizó tanto del caldo como del micelio. Los volúmenes de caldo obtenido se trataron en un sistema de extracción líquido-líquido, con acetato de etilo (AcOEt); para retirar el agua, se le adicionó sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ); la mezcla fue filtrada y concentrada en rotavapor BUCHI-RE111; obteniendo extracto total de biomasa y caldo. La biomasa seca se maceró y percoló con diferentes solventes en técnica soxhlet (Medina, 2001).



**Figura 11. Separación caldo - biomasa.**

### **3.6.1 Técnicas utilizadas para la elucidación estructural de los componentes.**

La identificación de los diferentes metabolitos se llevó a cabo por los siguientes métodos:

- Rf: se determinó en placas de sílica gel 60G (Kieselgel Merck 0,2-0,060mm), corridas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - MeOH (9:1)
- Punto de fusión: se realizó en un fusiómetro MEL-TEMP, laboratory. Devices. Mass 02139
- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Se realizó en un equipo de gases Agilent 6850N, acoplado a masas Agilent 5975 VL MSD con una columna HP-1 de 10m en un tiempo de corrida de 20 min con temperatura del inyector de 100° C, Temperatura inicial de columna 25° C con una rampa de 10° C / 2 min. hasta 285° C.
- Espectrometría de rayos infrarrojos en un equipo FTIR-8300 SHIMADZU.

- Resonancia magnética nuclear de RMN<sup>1</sup> H y de RMN equipo Bruker 300 MHz.

### **3.6.2 Purificación e identificación de sustancias.**

La purificación de las sustancias, se realizó por medio de técnicas cromatográficas (capa delgada y columna). Para las cromatografías de capa delgada se utilizó placas de sílica gel como fase estacionaria y éter de petróleo o acetato de etilo como fase móvil. Las placas se llevaron a una cámara saturada con el solvente seleccionado. Para ser visualizadas posteriormente con luz ultravioleta y reveladas con vainillina (Torrenegra, 2000).

En las cromatografías en columna, se preparó, la suspensión de la fase estacionaria con un solvente no polar como éter de petróleo. La muestra se aplicó por la parte superior, formando un disco de 5 mm aproximadamente y, se le agrega el solvente en porciones. Los componentes de la mezcla se eluyen por el solvente y se recolectan en recipientes separados, tomando porciones de distintos volúmenes dependiendo del tamaño de la columna y del número de componentes; cada fracción eluída de la columna, se examina para determinar su composición (Torrenegra, 2000).

#### **• COMPUESTOS QUIMICOS AISLADOS EN CALDO**

El extracto de AcOEt (4,89g), se percoló en dos fracciones CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y PETROL analizadas así:

**1. Fracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** (2,21g), está se corrió, en una cromatografía en columna empacada de (40 x 3 cm) con 100 g de sílica gel 60 (Kieselgel Merck 0,2-0,060 mm); la cual fue eluída con CHCl<sub>3</sub>, Me<sub>2</sub>CO (9:1); las fracciones se monitorearon en CCD reveladas bajo luz ultravioleta y luego con vainillina en

ácido sulfúrico. Se aisló una mezcla denominado **M.c C2**, solidó transparente que cristalizó en forma de láminas, con un peso de 96 mg.

**2. Fracción PETROL** a partir de 1,57 g de la fracción, se corrió una cromatografía en columna empacada de (40 x 3 cm) con 100 g de sílica gel 60 (Kieselgel Merck 0,2- 0,060 mm), eluída con  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (8:2); monitoreadas en CCD; reveladas bajo luz ultravioleta y luego con vainillina en ácido sulfúrico. Se aisló una mezcla denominada **M.c C1**, sustancia grasa amarilla con un peso de 85 mg. (Figura 12)

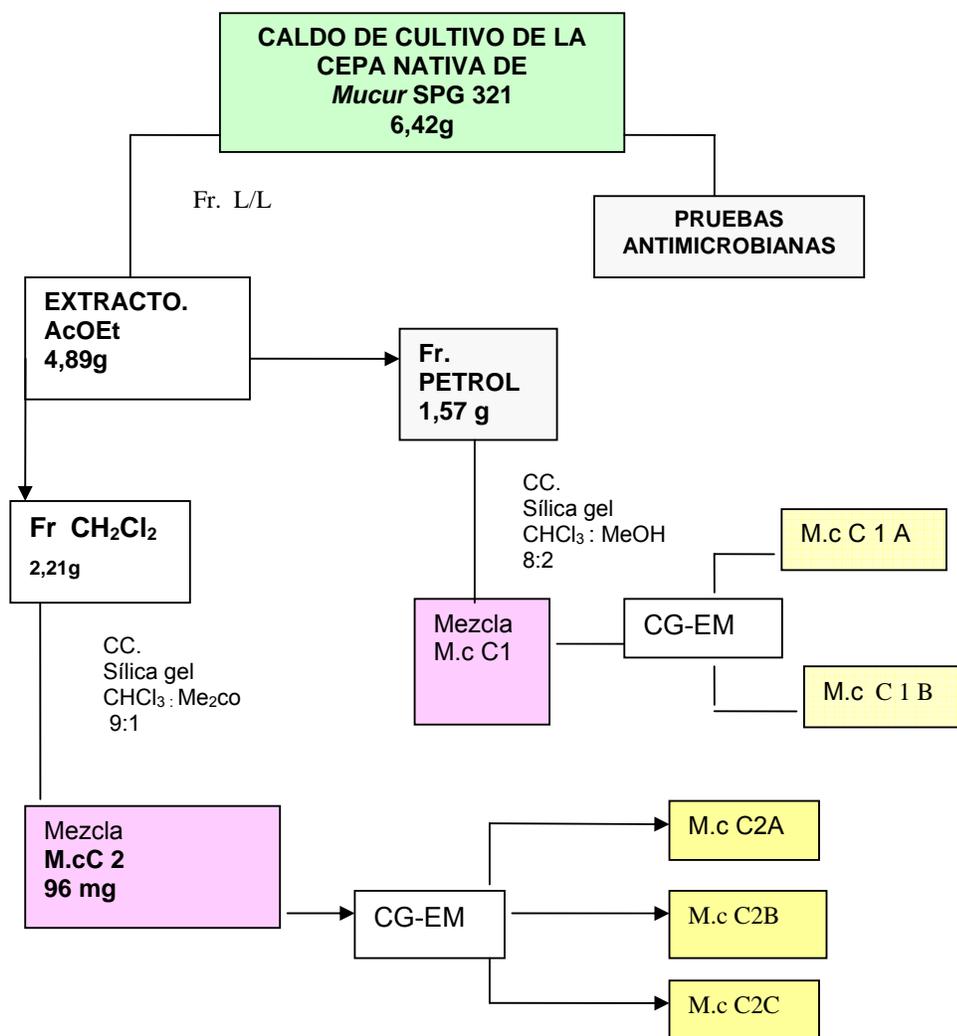


Figura 12. Procedimiento analítico en la obtención de compuestos en el caldo de cultivo.

▪ **COMPUESTOS QUÍMICOS AISLADOS DE BIOMASA**

De la biomasa se obtuvo 8,85g, se percolaron 5g del extracto de biomasa del cual se separó dos fracciones  $\text{CHCl}_3$  y PETROL analizadas de la siguiente forma:

**1. Fracción  $\text{CHCl}_3$  en biomasa,** Se percoló 1,50g del extracto diluido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a través de una cromatografía en columna de 40X 3 cm empacada con 80 g de sílica gel 60 (Kieselgel Merck 0,2- 0,060 mm). La elusión se realizó con  $\text{CHCl}_3$ : Petrol (8:2). Se aisló una mezcla denominada **M.c B1**, monitoreada mediante cromatografías de capa delgada CCD (Figura 13).

**2. Fracción PETROL en biomasa,** apartir de 3,41 g percolados en éter de petróleo, se corrió una cromatografía en columna de 40 X 3cm , empacada con 100 gramos de sílica gel 60 (Kieselgel Merck 0,2- 0,060 mm), eluida con  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (8:2) (Figura 13).

Las fracciones, se monitorearon mediante cromatografía de capa delgada CCD; permitiendo la unión de fracciones semejantes. Se aisló un cristal en forma de agujas que se denominó M.c B3; se le realizó análisis de RMN<sup>1</sup> H y CG-EM.

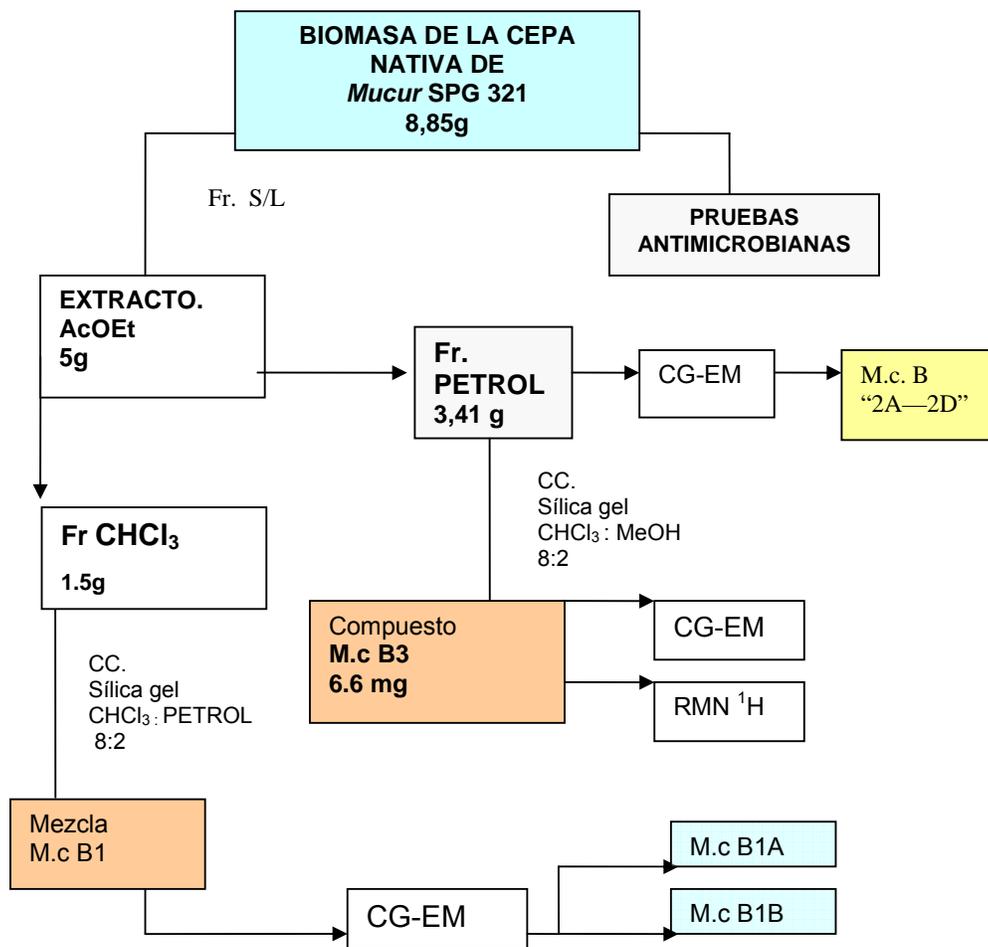


Figura 13. Procedimiento analítico en la obtención de compuestos en la biomasa.

### 3.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se utilizó el ensayo de difusión en gel, por su aplicabilidad en la determinación de patrones de susceptibilidad antimicrobiana, además es un método sensible y reproducible (Benveniste, 1973).

#### 3.7.1 Actividad antibacteriana

Se realizó, pruebas de sensibilidad; por difusión en agar, donde fueron evaluadas las siguientes bacterias:

- ***Bacillus subtilis***: Bacilo Grampositivo, formador de endosporas
- ***Escherichia coli***: Cocobacilo Gramnegativo.
- ***Staphylococcus aureus***: Coco Grampositivo.

Para el ensayo se usaron cultivos de 18-24 horas en caldo nutritivo (pH 6.5± 0.2 a 25°C) de ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923, ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Bacillus subtilis*** ATCC 6633. La concentración del caldo se determina por comparación de la turbidez del tubo con el estándar No 0.5 de Mcfarland, que equivale a una concentración de aproximadamente  $10^{8\text{UFC}}/\text{ml}$  (Koneman *et al.* 1999, NCCLS, 2003)

- **Medio de cultivo** .Se utilizó agar Mueller-Hinton, según metodología de Hewit y Vincent (1989) y los criterios de la NCCLS (2003). En éste medio, crecen bien, la mayor parte de las bacterias patógenas. Se adicionaron 20 mL por placa, se solidifico y realizaron cinco perforaciones por caja con ayuda de sacabocado.

- **Controles**. Como control positivo se utilizó cefalexina 15 µg/ 50 µL para ***Staphylococcus aureus*** ; norfloxacin 30 µg/ 50µL para ***Escherichia coli*** y para ***Bacillus subtilis*** penicilina 15µg / 50 µL. DMSO como control negativo.

- **Inoculación en cajas.** Los extractos de caldo y biomasa, se depositaron 2 horas antes, para que se difundieran en el medio; en las perforaciones hechas previamente con ayuda de un sacabocado de 0.5 cm de diámetro. Posteriormente se sello con 10 $\mu$ L de agar en el fondo. Se colocaron en cada pozo 50  $\mu$ L de cada uno; a una concentración de 2 mg/ $\mu$ L para los extractos y a 1mg/ $\mu$ L para las fracciones,

Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se realizó la lectura a las 6, 8 y 24 horas de incubación (Daza, 2001), (Ayala, 1999). Cada microorganismo se evaluó por triplicado, en agar *Mueller Hinton* y la actividad antimicrobiana se determinó por la presencia de halos de inhibición.

- **Pruebas antibacterianas.** Con el extracto de caldo y biomasa, Se determinó la actividad antibacterial a una concentración de 2mg/ $\mu$ L; las fracciones, a una concentración de 1mg/ $\mu$ L. Con las cepas de microorganismos Grampositivos ***Staphylococcus aureus***, y ***Bacillus subtilis***, Gram negativos ***Escherichia coli***, utilizando el método de difusión en agar.

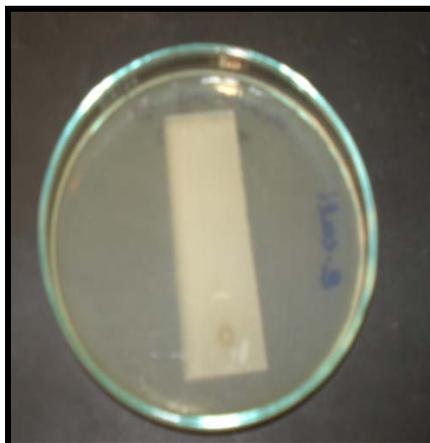
En este trabajo, se seleccionó el método de difusión, uno de los más usados en investigación y en literatura para la evaluación de sustancias puras. Tiene como ventaja el uso de una pequeña cantidad de muestra. Además, de su posibilidad de probar varios compuestos contra un mismo microorganismo (Ríos y Recio 1989).

Las condiciones óptimas fueron establecidas por Bauer *et al.* (1966), los cuales recomiendan utilizar el agar *Mueller Hinton* por su reproducibilidad, su baja concentración de inhibidores, el crecimiento satisfactorio de patógenos no fastidiosos y la gran experiencia en estudios de susceptibilidad.

- **Lectura:** Se realizaron, tres repeticiones por prueba, dos mediciones desde la línea que define el halo de inhibición de un lado al otro. El tamaño de la inhibición, se tomó, como el valor promedio de estas mediciones (NCCLS, 2003).

- **Bioautografía.** Los compuestos que dieron positivos por el método anterior, se le realizaron bioautografías por el método antisandwich, sembrando una placa cromatográficas de 7 cm de largo x 2.5 cm de ancho.

Se corrió la fracción  $\text{CHCl}_3$  de biomasa en la mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - MeOH (9:1). Luego, se colocó cada una de las placas en contacto con la caja que contenía 1 mL de la suspensión bacteriana, y 20 mL de agar Mueller Hinton previamente solidificado. Se incubó a 37 °C por 24, 48 y 72 horas. Se evaluó la presencia de halos de inhibición en la caja de cultivo (Figura 14).



**Figura 14. Bioautografía fracción  $\text{CHCl}_3$  de biomasa.**

### **3.7.2 Actividad antifúngica.**

Se utilizó el método de difusión en pozo, en esta técnica los componentes de un extracto o una sustancia pura, difunde a través de una placa de agar hacia la colonia fungosa en crecimiento. Si hay compuestos activos presentes, el crecimiento del hongo se disminuye o para, dando origen a la deformación de la colonia, esta técnica es cualitativa (Becerra y Segura 2003).

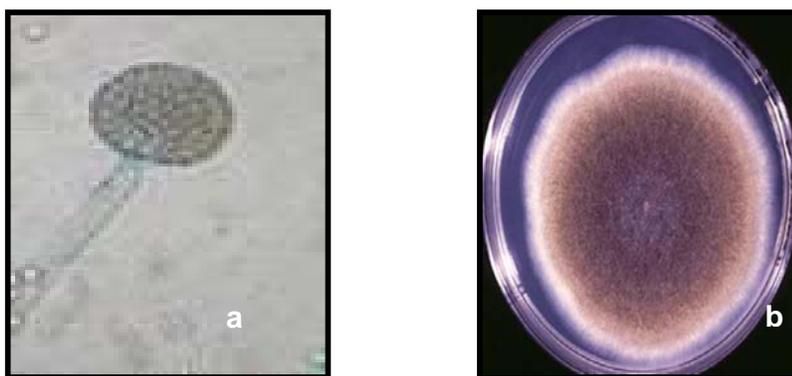
Se seleccionó *Fusarium oxysporum* como microorganismo indicador, por ser de crecimiento rápido y no poseer ciclo sexual definido (Koneman, 1999), la técnica empleada fue macrodilución.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Reconstitución de la cepa nativa *Mucor* SPG 321.

La cepa SPG 321 se reactivó en el medio PDA a 25 C, para la identificación y confirmación de la clasificación taxonómica de la cepa de *Mucor*.

### 4.2 Identificación de la cepa nativa *Mucor* SPG 321.



**Figura 15. Morfología macroscópica y 14b.microscópica de *Mucor***

Fuente: Autora

Posterior, a la reconstitución de la cepa y obtención de cultivo monospórico, se procedió a la confirmación de la clasificación. En donde las colonias de este genero, se describen con micelio aéreo compacto de color café intenso de 1 cm de altura entre 3 y 7 cm de diámetro; microscópicamente se presenta micelio hialino, esporangios globosos de 50-60  $\mu\text{m}$  café grisáceos; rectos o ligeramente encorvados. Columellas libres, semiesféricas, esféricas u ovales, incoloras, lisas; esporas globosas o elípticas de 3 $\mu\text{m}$  diámetro, lisas incoloras individualmente, pero de color gris pálido en masa. Semejante al genero *Mucor* y la especie *circinelloides* según las claves de Barnett and Hunter 1988. Gilman, 1963, Hogg, 2000. Samson *et al.*, 1981.

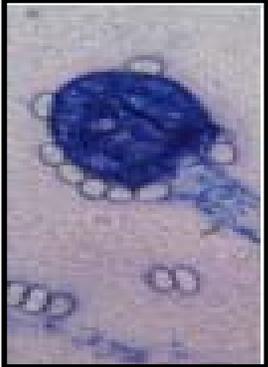
Esta reclasificación se realizó con base a lo referenciado por los autores Weitzman *et al.*, 1995, Chandra y Woodgyer 2002, Silva y Garre 2006 Martínez. & Valenzuela 2003.

(Figura 14 A)

- **Características microscópicas.** Se observó la presencia de columella elipsoidal y globosa en esporangios, de color café- grisáceo. Esporangios sin ramificar y tallos cortos ramificados de forma simpodial que en ocasiones se curvan hacia abajo; Las esporangiosporas de pared lisa, elipsoidales (Tabla 3).

**Tabla 3. Características microscópicas en cuanto a su morfología.**

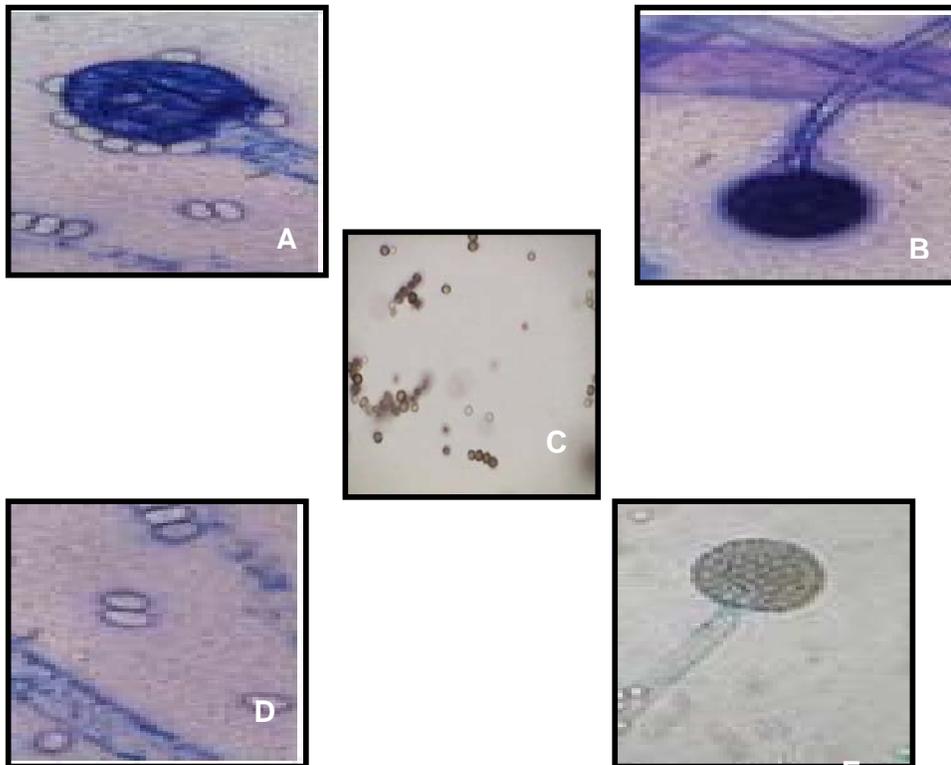
ESTRUCTURA	IMAGEN	DESCRIPCION
Esporangiosporas		De pared lisa, elipsoidales pueden llegar a medir hasta 5µm; de forma alargada; color café; superficie rugosa. (Gilman, 1963)

<p><b>Esporangio</b></p>		<p>Esporangios marrón pálido; se ven tallos curvados, sin ramificar y ramificados, de forma simpodial que en ocasiones se curvan hacia abajo; los esporangios miden entre 0-80 <math>\mu\text{m}</math>. Weitzman <i>et al.</i>, 1995</p>
<p><b>Esporangióforo</b></p>		<p>Las hifas terminan en un esporangióforo único. Se observa micelio de hifas muy gruesas y cenocíticas; con presencia de columella Weitzman <i>et al.</i>, 1995</p>
<p><b>Columella</b></p>		<p>La columella es obovoide casi elipsoidal y globosa en esporangios, hasta 50 <math>\mu\text{m}</math> de color café-grisáceo; hifas no septadas, con longitud entre 15-45 <math>\mu\text{m}</math>. Moore And Landecker (1996).</p>

Fuente: Autora

Se encontraron, las mismas estructuras microscópicas en los medios de cultivo empleados (PDA, MEA, Cz). Mostrando que a pesar de la variedad de componentes de cada medio, no se produjo cambios morfológicos durante su crecimiento y permitió la observación de columella, esporangios de color café-

grisáceo, hifas cortas ramificadas de forma simpodial y esporangiosporas de pared lisa, elipsoidales. Típicas del microorganismo. De manera simultánea se tuvo en cuenta las claves taxonómicas para su identificación, tales como color, forma y medidas de cada una de las estructuras (Figura 16).



**Figura 16. Características Microscópicas (100x) de Mucor en los medios A. PDA, B Cz. C.MEA, D. Cz. E.PDA**

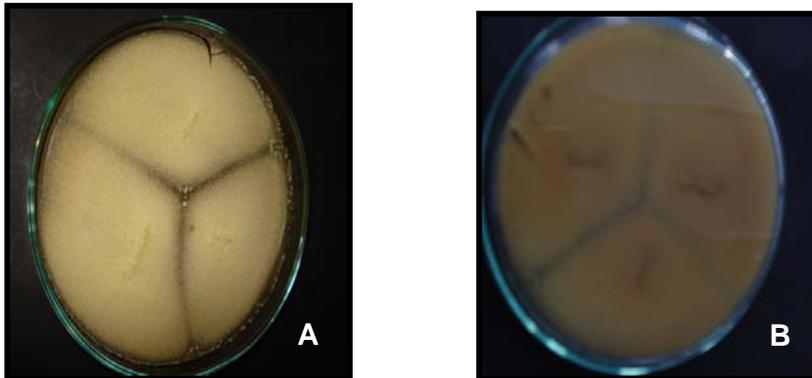
Fuente: Autor

- **Características macroscópicas.** Determinadas en tres medios de cultivo diferenciales PDA, MEA y Cz, inoculados en tres puntos.

- **Caracterización en medio PDA.**

**PDA 5 °C:** A los 7 días. No hay crecimiento.

**PDA 25°C:** En medio PDA, la cepa SPG 321; A los 7 días presentó un diámetro de 39 mm; colonia con bordes regulares; halos castaños al exterior y al interior halos de color amarillo ocre, de textura polvorosa; colonias de micelio aéreo abundante que al envejecer oscurecen. (Figura 17).



**Figura 17. Características Macroscópicas de la colonia de la cepa SPG 321 de Mucor PDA A: (1) a los 7 días de incubación a 25° C. B: Reverso**  
Fuente: Autor.

**PDA 37°C:** El diámetro de la colonia, después de 7 días de incubación fue de 4 cm; castaño-amarillento con micelio levantado de color marrón pálido, textura algodonosa y formación de exudados de color transparente a amarillo.

- **Caracterización en medio de extracto de malta (MEA).**

**MEA 5°C:** A los 7 días. No hay crecimiento.

**MEA 25°C:** A los 7 días la colonia, presentó un diámetro de 78 mm. Bordes irregulares amarillos, con halos blancos, textura algodonosa, con exudados de color transparente a amarillo. (Figura 18)



**Figura 18. Características Macroscópicas de la colonia SPG 321 anverso y reverso**

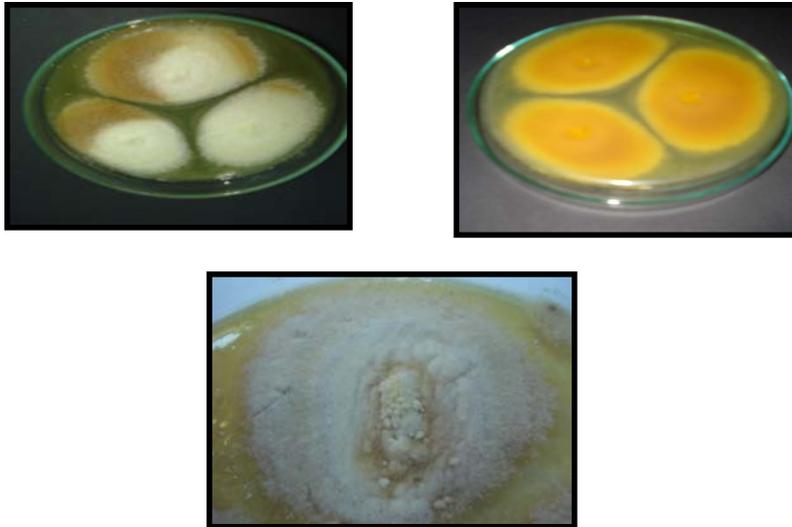
**MEA 37°C:** Crecimiento aéreo abundante que alcanza la tapa de la placa, color café a los 7 días de incubación a 25°C

- **Caracterización en medio CZAPECK.**

**Cz 5°C:** A los 7 días. No hay crecimiento.

**Cz 25°C:** Colonias de crecimiento rápido, de aspecto algodonoso de color amarillo marrón pálido; con 35 mm de diámetro, bordes irregulares blancos, halos en el centro color amarillo blancuzco, con canales radiales y exudados. Envés café (Figura 19)

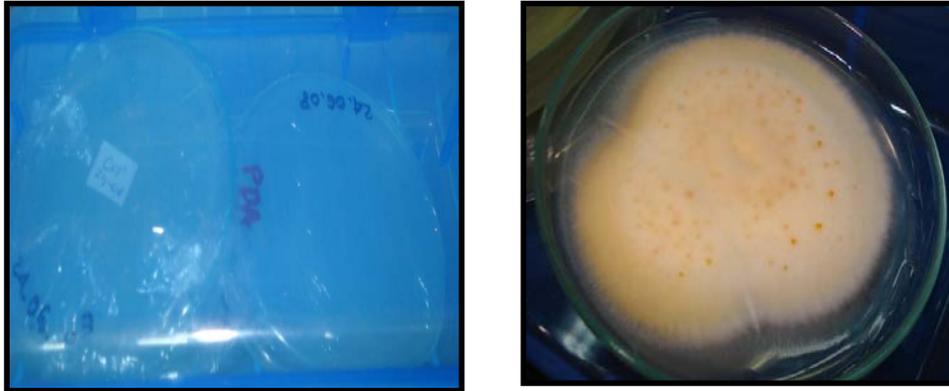
**Cz 37°C:** A los 7 días. Crecimiento moderado



**Figura 19. Características Macroscópicas de la colonia de SPG 321 en Cz a los 7 días de incubación a 25° C**

Fuente: Autor

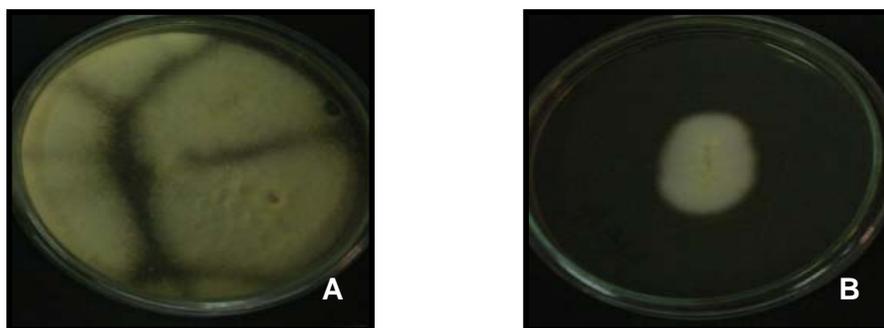
- **Crecimiento de cepa SPG 321 de *Mucor* en luz azul** Se evaluó, el crecimiento en luz azul de la cepa en agar PDA. Teniendo en cuenta metodología de Silva y Garre 2006. Como prueba confirmatoria para la especie ***circinelloides***. Como prueba confirmatoria para esta especie.



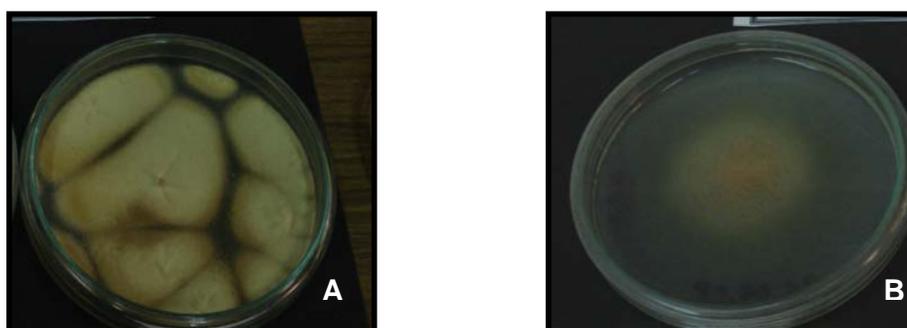
**Figura 20. Características Macroscópicas de la colonia de SPG 321 en PDA a los 7 días de incubación a 25° C, bajo luz azul.**

Fuente: Autor

Frente a la dificultad para la identificación de las más de 50 especies válidas para el género *Mucor* y listadas en el Índice de la website de Fungorum ([www.indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp)). Se tuvo en cuenta, crecimiento a 37°C estudios adelantados por Weitzman, *et al.*, 1995, Ribes, *et al.*, 2000., Iwen *et al.*, 2005. Afirman, que solo 5 especies causan enfermedad humana y sólo 3 especies de *Mucor* son reportadas como termotolerantes. Éstos incluyen las especies de *Mucor circinelloides*, *Mucor indicios*, *Mucor ramosissimus*. (Patrick *et al.*, 2006).



**Figura 21. Características en Medio PDA A: 25°C y B: 37°C**



**Figura 22. Características en Medio Cz a A: 25°C y B: 37°C**

Se evaluó, el crecimiento de **Mucor** en luz azul, observando la presencia de pigmentos naranjas en el micelio. Junto con las observaciones macroscópicas y microscópicas; las claves taxonómicas utilizadas (Barnett y Hunter 1975; los autores Weitzman *et al.*, 1995, Chandra y Woodgyer 2002, se confirma, que pertenece al género **Mucor**. La presencia de pigmentos naranjas bajo condiciones de luz azul, confirman la especie **circinelloides**, que muestra, síntesis de carotenos inducida por la luz azul (fotocarotenogénesis). Sus esporangioforos, presentan fototropismo positivo (figura 19). Ambas respuestas, dependen de la luz azul como se encontró en el estudio de Fátima Silva y Garre 2006. Datos que permiten realizar la clasificación de la cepa SPG 321 en la Tabla 4.

**Tabla 4. Taxonomía de *Mucor circinelloides***

Reino	Fungi
phylum	Zygomycota
Clase	Zygomycetes
Orden	Mucorales
Familia	Mucoraceae
Genero	<b><i>Mucor</i></b>
Especies	<b><i>circinelloides</i></b>

Fuente: Barnett y Hunter, 1988

- **Banco celular.** Después de confirmar la clasificación taxonómica; de la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y con el fin de contar con una fuente pura y viable para el estudio; teniendo en cuenta los problemas de viabilidad y de pureza en los cultivos, con microorganismos que son comunes y frecuentes, se implemento un banco de células, a una concentración de  $10^7$  (García, 2000).

Para el mes sexto, la concentración celular disminuyó. Al observar esta pérdida se examino el conteo de otra de las alícuotas, se encontró una concentración de  $10^5$ . Con esta pérdida y descenso en la concentración. Se procedió a la implementación del segundo banco de células de la cepa nativa de ***Mucor circinelloides*** SPG 321; para lo que se utilizó crioprotector (glicerol) en una relación 1:1 (Dupré & Espinoza. 2000). El cual protege del daño, que se pueda producir en las células microbianas, en el momento en el que el agua se congela formando cristales que afectan la pared celular y por ende la viabilidad de las células congeladas; adicional a esto por no disponer de agua en forma líquida no se presenta crecimiento.

#### 4.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Mucor circinelloides*.

Con el fin de determinar el comportamiento de la cepa nativa SPG 321 en relación con la cinética del microorganismo y su relación con la producción de metabolitos secundarios, se procede al análisis de parámetros que influyen en el diseño de los procesos de fermentación.

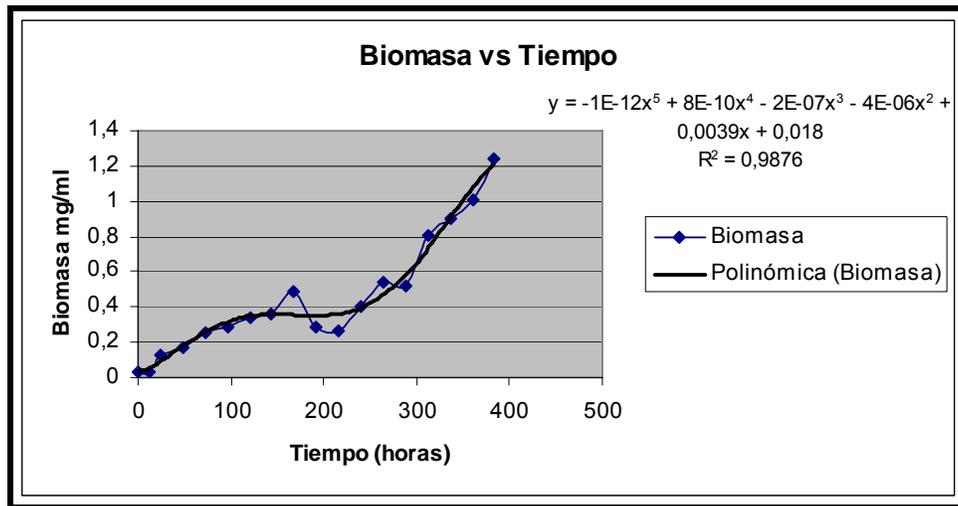


Figura 23. Concentración de biomasa vs tiempo.

La concentración de la biomasa, cambió progresivamente en el tiempo, aunque presentó una declinación en la hora 240. Debido a que los nutrientes de primera mano empiezan a agotarse (Litte y Gordon, 1967).

Como consecuencia de ello, la velocidad de crecimiento declina; sin embargo, la biomasa, alcanzó su máximo peso en la hora 384. Por la acumulación de productos de almacenamiento como lípidos y polisacáridos y la síntesis de metabolitos secundarios. Figura 23.

**Determinación de la curva patrón de Glucosa.** Para aplicar la técnica de DNS, se realizó la curva patrón, con la siguiente ecuación: (los datos obtenidos se encuentran en el anexo B).

Ecuación 1

$$Y = mx + b$$

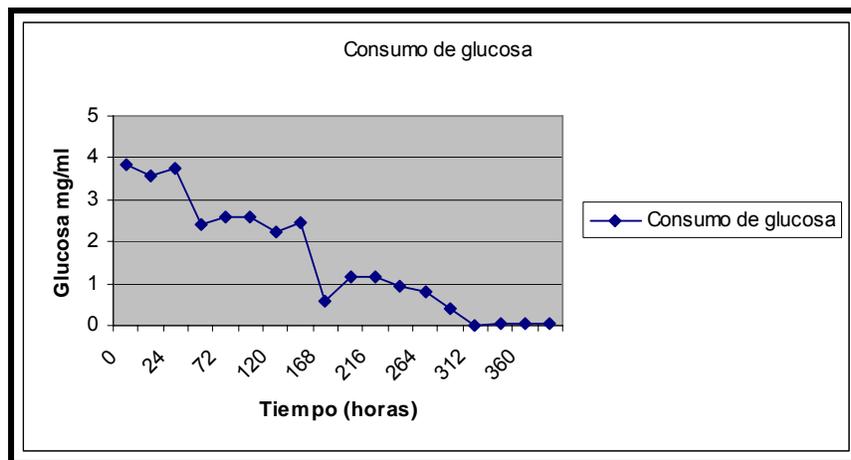
$$y = 0,2633x - 0,4867$$

$$R^2 = 0,9177$$

Curva patrón glucosa

Fuente: Autora

**Consumo de sustrato** Al analizar el consumo de sustrato para la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* se obtiene la gráfica 24

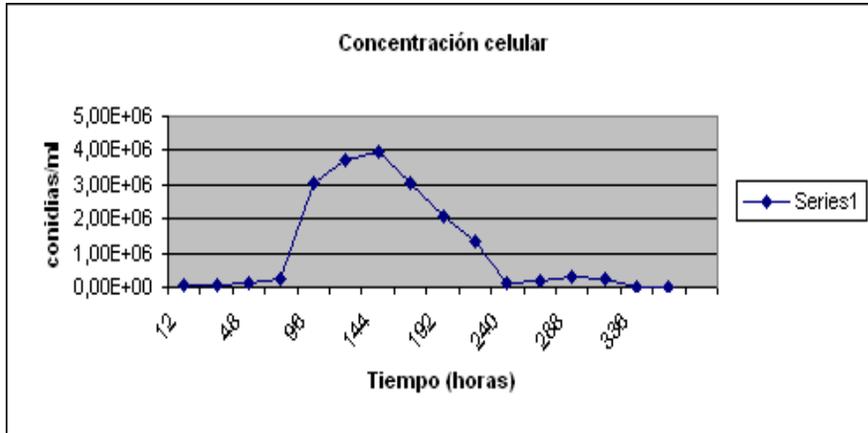


**Figura 24. Consumo de sustrato**

Se observa una disminución de glucosa en el tiempo. Usada como fuente de carbono. Disminuye al ser usado como sustrato, en la síntesis de nuevo material celular, entre las horas 144 y 192, se observa un descenso, con un aumento en la hora 216, lo que se asocia como una diauxia. Si se tiene en cuenta que el medio PGS, contiene dos fuentes de carbono diferentes dextrosa y almidón. *Mucor circinelloides*, utiliza aquella fuente que le proporciona

mayor rendimiento energético en este caso la glucosa, cuando ésta se acaba, hay un tiempo de adaptación al segundo sustrato que a continuación es consumido. El almidón. El rendimiento y velocidad de crecimiento es mayor para el primer sustrato que para el segundo (Miller, 1959).

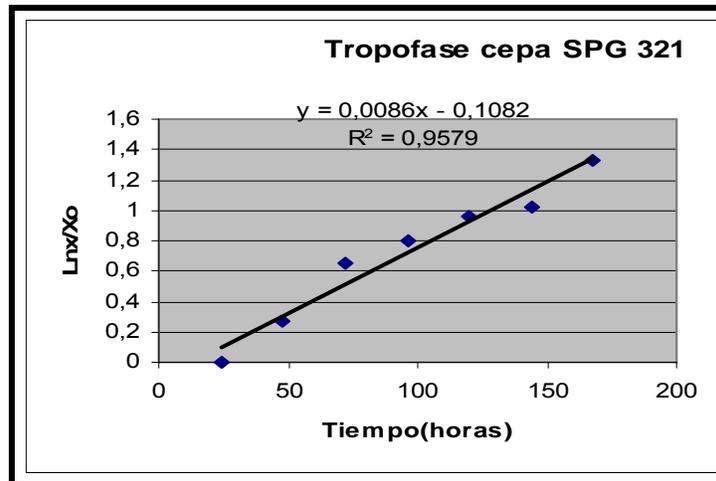
**Concentración celular** se realizó el recuento microscópico directo, figura 25.



**Figura 25. Concentración celular.**

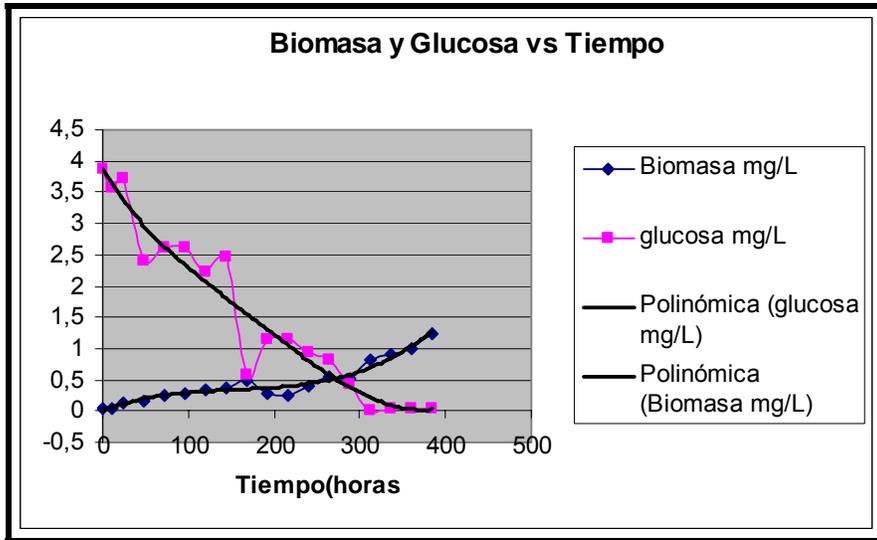
La cepa nativa, de *Mucor circinelloides* SPG 321, presenta una curva típica de desarrollo; al inocularse en el medio líquido PGS. La trofofase de acuerdo con la concentración celular se inició a las 72 horas, por división celular y formación de nuevo protoplasma a partir de los componentes del medio PGS. Se presentó la declinación a partir de la hora 168 debido a que los nutrientes sufren una pérdida en la concentración. La fase conocida como idiofase se presentó a partir de las 168 horas, para *Mucor circinelloides* SPG 321, culminando a las 264 horas día 11.

- **Identificación tropofase.** Para el resultado de la figura 26, semilogarítmica los datos se presentan en el anexo D.



**Figura 26.** Tropofase de la cepa SPG 321 de *Mucor circinelloides*

La fase de latencia, para la cepa nativa spg 321 de *Mucor circinelloides*. Termina a las 48 horas e inicia la tropofase, una vez se adapta a las condiciones de crecimiento, proporcionadas, por el medio PGS. El crecimiento de la biomasa, es descrito cuantitativamente por unidad de tiempo. En una gráfica semilogarítmica y culmina a las 168 horas.

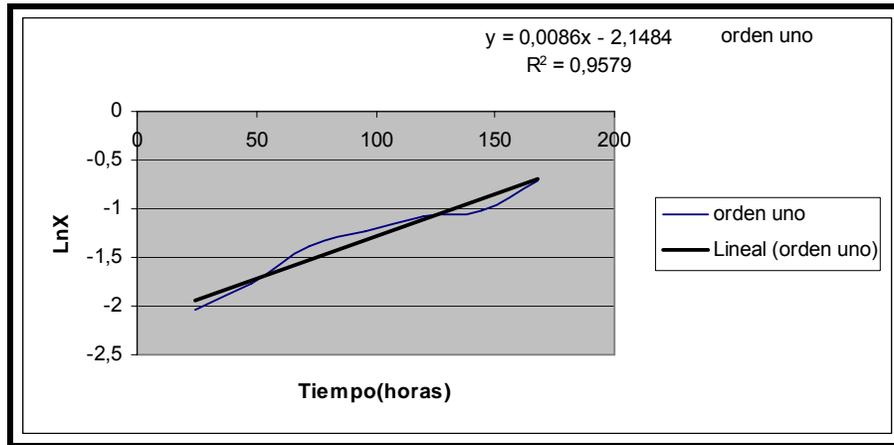


**Figura 27. Comparación de biomasa y glucosa vs tiempo.**

- **Idiofase:** En esta gráfica se observa que para la hora 264 culmina la idiofase; decae el consumo de glucosa. Lo que concuerda con el aumento de biomasa, razón por la cual se tomo el día 11(264 horas) última, hora de la idiofase, como día clave para la finalización de la fermentación.

#### 4.3.1. Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros, a determinar en este estudio fueron,  $\mu_x$  Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ),  $Y_{x/s}$  Rendimiento de biomasa a partir de sustrato ( $g/g$ ),  $t_d$  tiempo de duplicación ( $h$ ) y productividad ( $gL^{-1}/h$ ). Para determinar los parámetros cinéticos en la fermentación llevada a cabo en un biorreactor de 1,5L, se aplico la cinética de orden 1 con un  $R^2 = 0,9579$



**Figura 28. Velocidad específica de crecimiento de *Mucor circinelloides* en biorreactor**

En la tabla 8, se muestran los resultados de los parámetros cinéticos de *Mucor circinelloides*

**Tabla 5. Parámetros cinéticos**

$\mu_x$	0,0086	mg/h-1
Td orden uno	80,5985094	h
$\mu_{max}$	0,86550113	mg/h
Ks	19,5689804	h-1
Yx/s	0,18719512	mg/mg
Productividad	0,00255833	mg/Lh-1

Analizando, los datos obtenidos se concluye que la velocidad máxima de crecimiento es baja, esto dado, a las condiciones de fermentación. Puesto que la cepa de *Mucor circinelloides*, necesita energía adicional. Para degradar substratos de cadena larga, el almidón de papa, presente en el medio. Comparado con lo reportado por la literatura; para *Mucor hiemalis*, que tiene una  $\mu_{max}$  de 0,17 (Crueger, 1989). En comparación con 0,0086 mg/h-1. Este valor confirma que *Mucor*, estaba en condiciones de estrés. Teniendo en cuenta que en la tropofase, el interés es el aumento de biomasa. Cuando los microorganismos se cultivan en un medio rico, balanceado de nutrientes, éstos

no producen metabolitos secundarios o si lo hacen es a un nivel muy bajo (Vining y Taber 1979).

- **Rendimiento de biomasa** 0,187 mg/L, este valor confirma que el medio PGS, aporta sustratos complejos en los requerimientos nutricionales necesarios para la formación de biomasa. La glucosa, normalmente es una fuente de carbono excelente para el crecimiento; Pero a menudo interfiere con la formación de metabolitos secundarios. En cambio, polisacáridos como el almidón, oligosacáridos como, lactosa y aceites como el aceite de soja se usan para las fermentaciones debido a que presentan mejor, rendimiento de metabolitos secundarios (Demain, 1996).
- **Tiempo de duplicación.**  $80,59 \text{ h}^{-1}$ , se correlaciona con la productividad de biomasa, y un tiempo de producción prolongado. El control en la síntesis enzimática, generalmente se ejerce por el “pool” de nitrógeno intracelular. Muchas vías del metabolismo secundario, se ven afectadas al manipular las fuentes de nitrógeno por ejemplo, las sales de amonio bajan la asimilación de un aminoácido, es por esto que se usa a menudo para potenciar la producción de metabolitos secundarios. (Demain, 1986). Los niveles de oxígeno disuelto no afectan la fermentación. En este caso, se ha indicado niveles cercanos al 20% de saturación necesarios para el mantenimiento de las células de ***Mucor circinelloides***. Debido a, que éste, presenta un sistema dimórfico reversible, es decir, las células cambian a levaduras en un ambiente anaerobio (Archer, 2000).

#### **4.4 MEZCLAS AISLADAS DE LOS EXTRACTOS DE CALDO CEPA DE *Mucor circinelloides* SPG321**

De la cepa nativa de *Mucor circinelloides* SPG321, se identificó siguientes sustancias con el extracto de caldo.

La mezcla **M.c C1 fracción PETROL**, se identificó por medio de la técnica de gases acoplado a masas CG-EM. Dos compuestos **M.c C1A y M.c C1B** con las siguientes propiedades físico-químicas: Un peso de 85 mg, con una apariencia grasa de color amarillo soluble en MeOH y CHCl<sub>3</sub>

De la fracción CHCl<sub>3</sub> se aisló la mezcla **M.c C2.**, por la técnica de gases acoplado a masas CG-EM. Se identificó los compuestos **M.c C2A, M.c C2B y M.c C2C**. Esta fracción presentó las siguientes propiedades físico-químicas: Un peso de 96 mg, con una apariencia sólida en forma de agujas con un punto de fusión 160 °C- 165 °C soluble en CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y Me<sub>2</sub>CO

##### **4.4.1 Fracción PETROL compuesto M.c C1A**

Según el espectro de masas el compuesto **M.c C1A** comparado con la base de datos Nist-05, se identificó como ácido oleico. Presentando un ion molecular de 282.3 m/z y un pico base de 55.1 m/z, con un porcentaje de coincidencia del 91%. Figura 29

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L  
Quality : 91  
ID : Oleic Acid

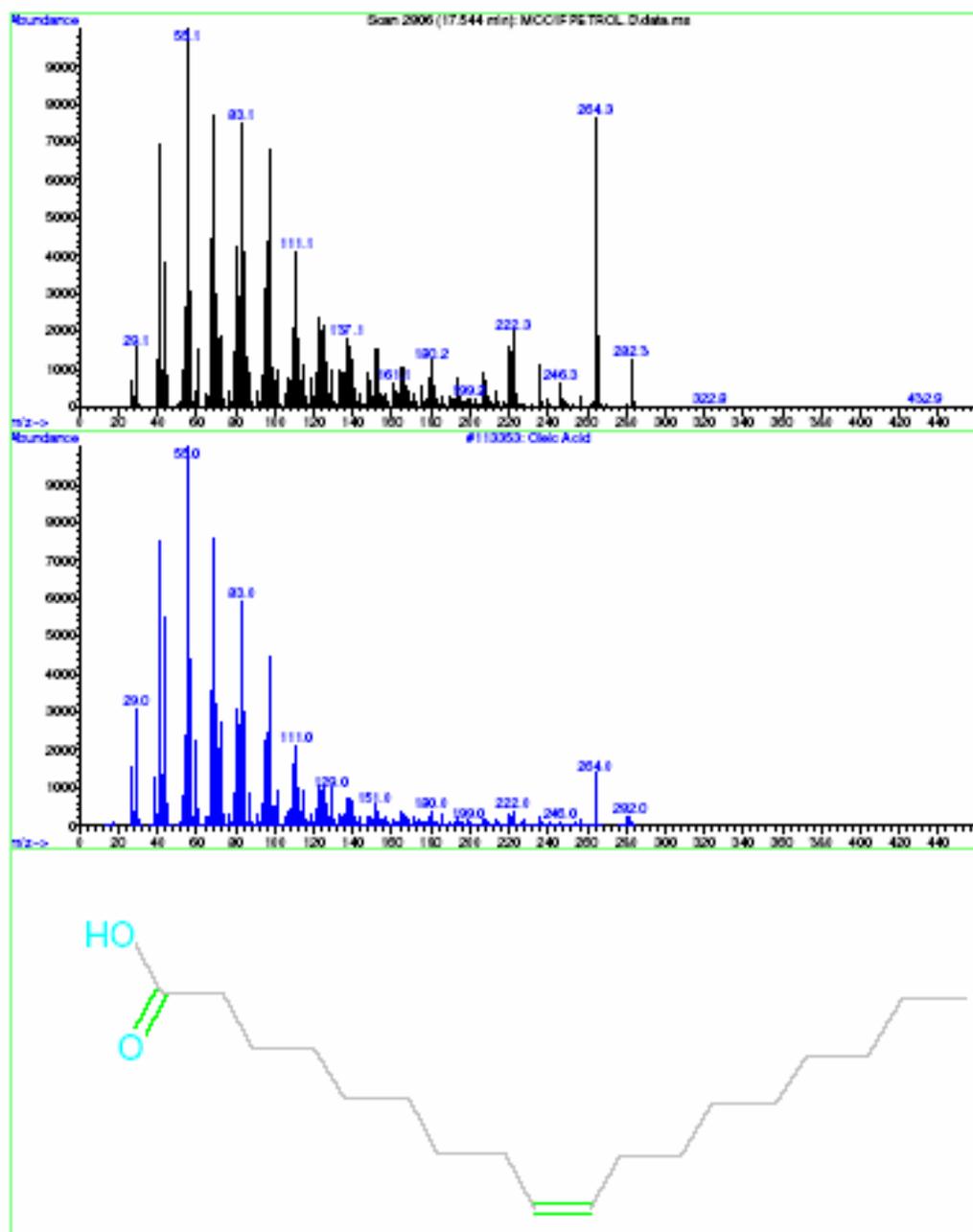


Figura 29. Espectro de masas M.c C1A a 17.544 minutos, comparado con la base de datos Nist-05.

#### 4.4.2 Fracción PETROL compuesto M.c C1B

Según el espectro de masas el compuesto **M.c C1B**, se comparó con la base de datos Nist-05 identificado como Acido hexadecanoico, conocido como acido palmitito. Este presenta un ion molecular de 258.3 m/z y un pico base de 258.3 m/z, con un porcentaje de coincidencia del 90%.

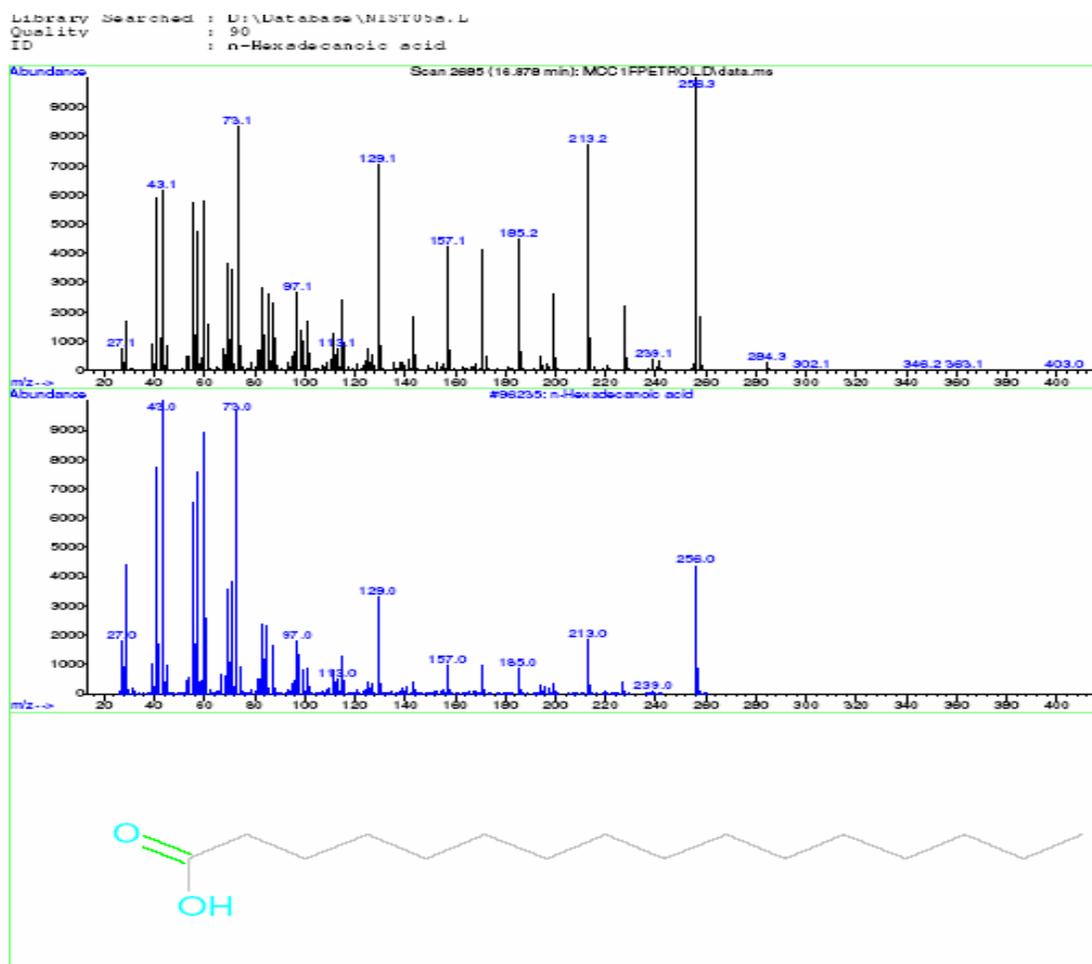


Figura 30. Espectro de masas M.c C1B a 16.978 minutos, comparado con la base de datos Nist-05.

#### 4.4.3 Fracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Mezcla M.c C2. Compuesto M.c C2A

Por la técnica de gases acoplado a masas CG-EM, en esta mezcla, se identificó el compuesto M.c C2A. Según el espectro de masas se identificó como Acido 9 hexadecanoico, conocido como ácido palmitoleico que presentó un lón molecular de 264 m/z , un pico base 55 m/z, un porcentaje de coincidencia del 97% en un tiempo de retención de 17,594 minutos.

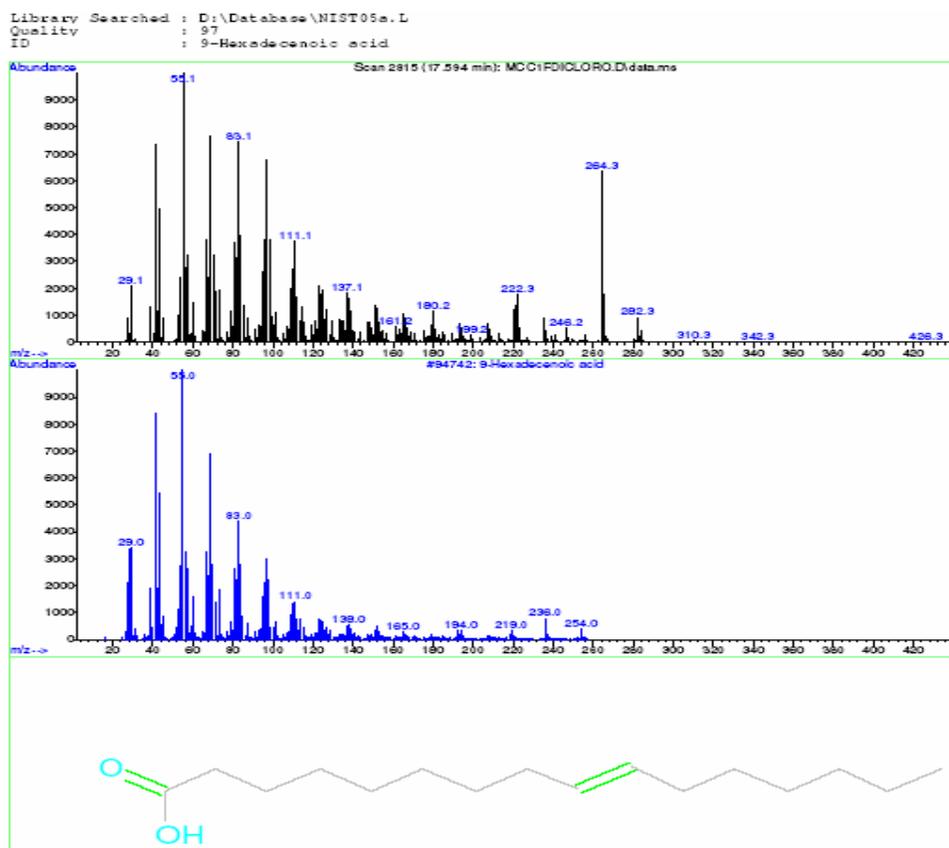


Figura 31. Comparación entre espectro de masas: compuesto McC2A a 17594 minutos y base de datos Nist-05

#### 4.4.4 Fracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> compuesto M.c C2B

Según el espectro de masas el compuesto M.c C2B, fue identificado, como octadec-9 acido enoico ó ácido trans-9-octadecenoico, conocido, como ácido elaídico. Presentó un lón molecular de 282 m/z; un pico base 55 m/z, un porcentaje de coincidencia del 98%, en un tiempo de retención de 17,599 minutos .

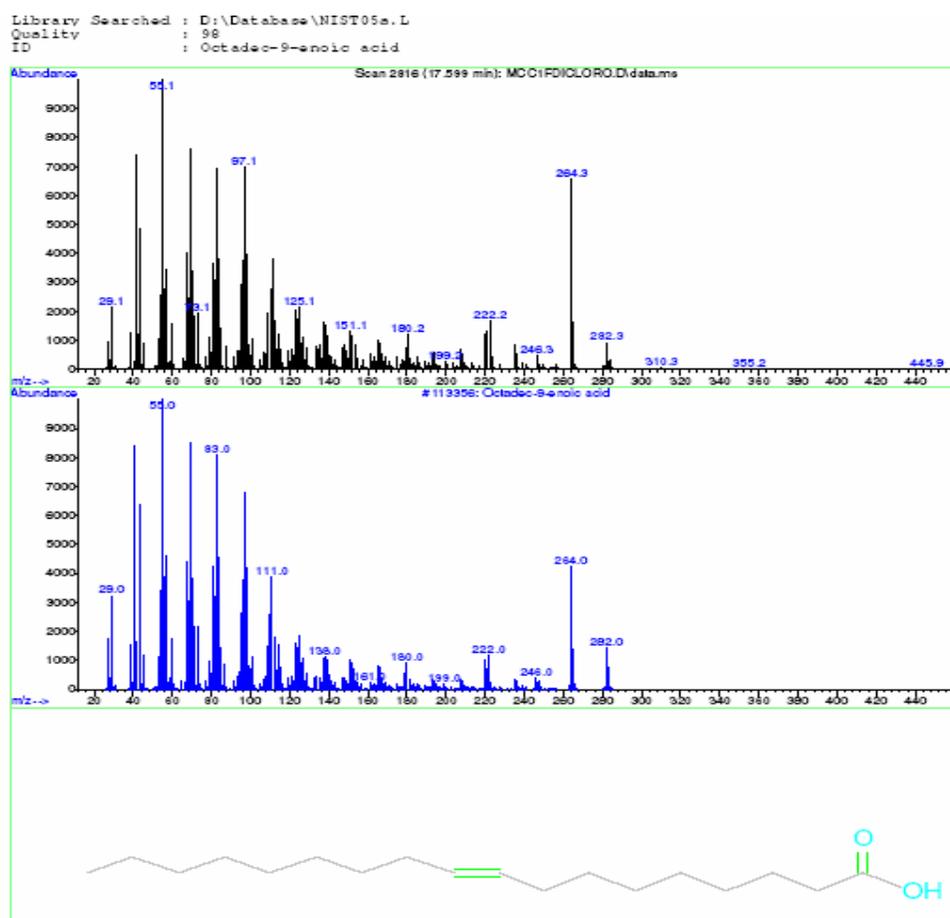


Figura 32. Espectro de masas: compuesto McC2B 17.599 minutos y Comparado con la base de datos Nist-05

#### 4.4.5 Fracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> compuesto M.c C2C

Según el espectro de masas el compuesto M.c C2C, fué identificado, como ácido oleico, con lón molecular de 282 m/z, un pico base 55 m/z, un porcentaje de coincidencia del 99%, en un tiempo de retención de 17,599 minutos .

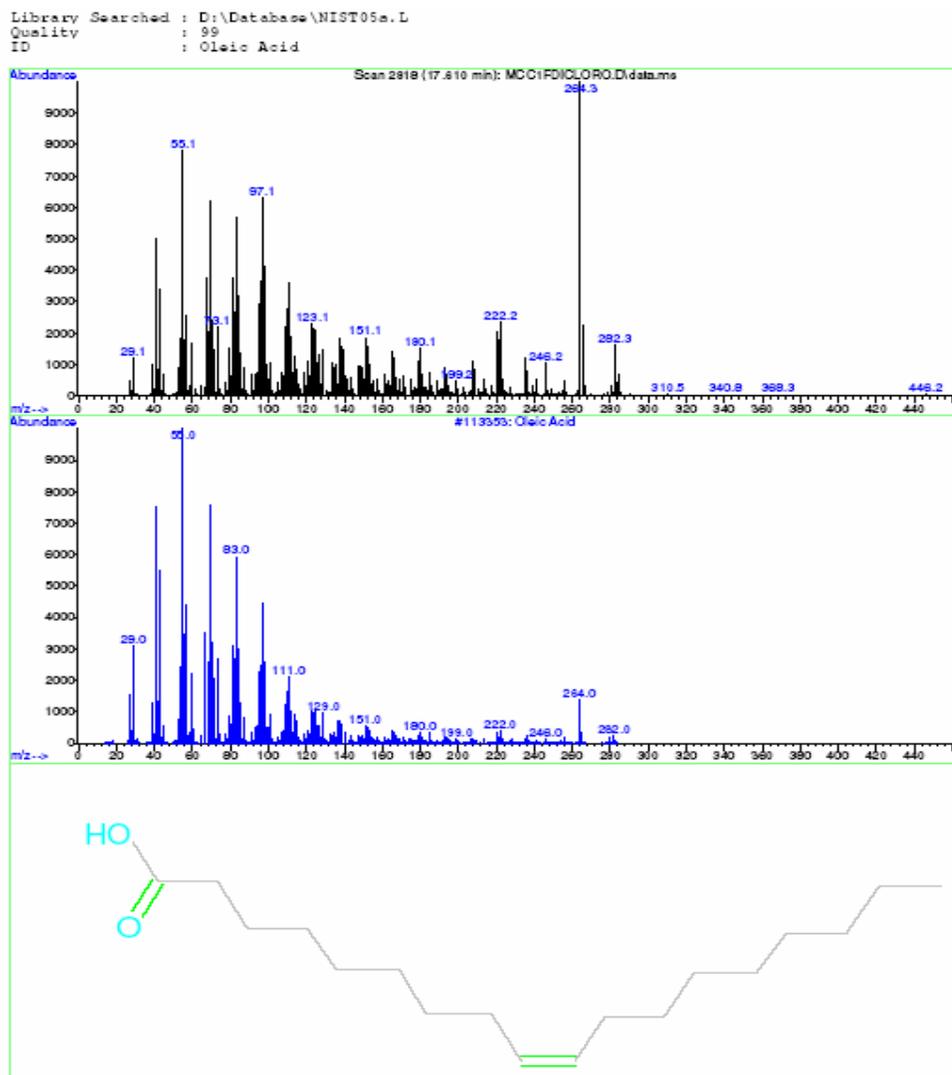


Figura 33. Espectro de masas comparado con la base de datos Nist-05 del compuesto McC2C a 17.610 minutos

#### 4.5 COMPUESTOS Y MEZCLAS AISLADOS DEL EXTRACTO DE BIOMASA DE LA CEPA DE *Mucor circinelloides* SPG321

A partir de la cepa nativa de *Mucor circinelloides* SPG321, se identificó, las siguientes sustancias en el extracto de biomasa.

De la fracción  $\text{CHCl}_3$  se aisló la mezcla **M.c B1.**, por la técnica de gases acoplado a masas CG-EM, se identificó los compuestos **M.c B1A** y **M.c B1B**, esta fracción presentó las siguientes propiedades físico-químicas: Un peso de 1.5 g, con una apariencia grasa de color amarillo soluble en  $\text{CHCl}_3$ .

En la fracción PETROL, se aisló la mezcla **M.c B2.**, se identificó por medio de la técnica de gases acoplado a masas CG-EM, los compuestos **M.c B2 A- 2D** con las siguientes propiedades físico-químicas: Un peso de 3.41 mg, con una apariencia sólida amorfa de color amarillo soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{Me}_2\text{CO}$ , punto de fusión  $160^\circ\text{C} - 165^\circ\text{C}$ .

De la fracción PETROL, se aisló el compuesto **M.c B3**, este se identificó por CG-EM, RMN<sup>1</sup>H. Con las siguientes propiedades físico-químicas: Un peso de 6,6 mg, apariencia sólida, en forma de cristales de color transparente; soluble en MeOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{Me}_2\text{CO}$  con un punto de fusión  $130^\circ\text{C}$  presentando un resultado positivo en la prueba de liebermann burchard.

#### 4.5.1 Fracción CHCl<sub>3</sub> Compuestos M.c B1A-1B-1B

En la tabla 9 se presentan los compuestos comparados con la base de datos Nist-05 para su identificación.

**Tabla 6. Compuestos de la fracción CHCl<sub>3</sub> M.c B1A-1B-1C.**

No de picos	Nombre del compuesto	Porcentaje de coincidencias	Ión molecular	Pico base
McB1A 16.552 minutos	Ácido hexadecanoico, metil ester	98 %	270 m/z,	74 m/z
Mcb1B 17.709 minutos	Acido octadecanoico etil ester	95%	312m/z,	88 m/z

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L  
Quality : 98  
D : Hexadecanoic acid, methyl ester

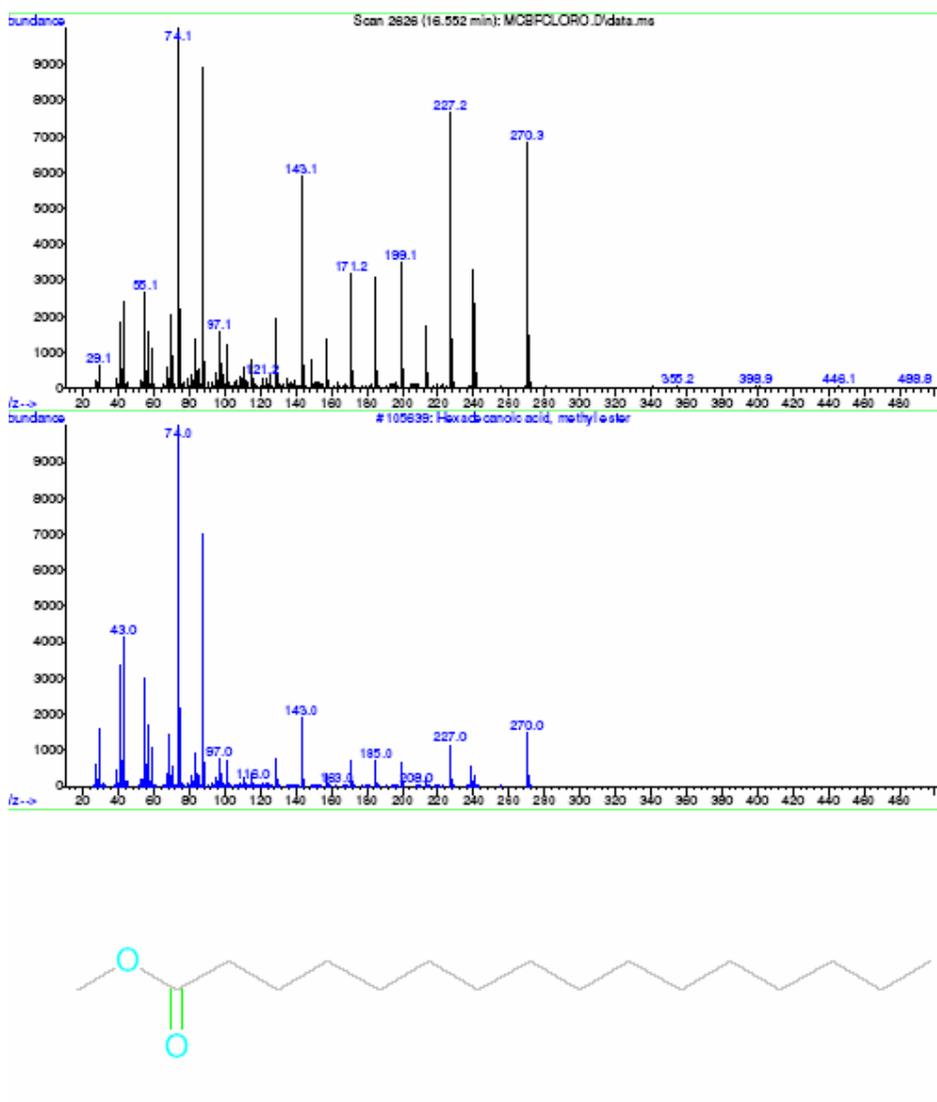
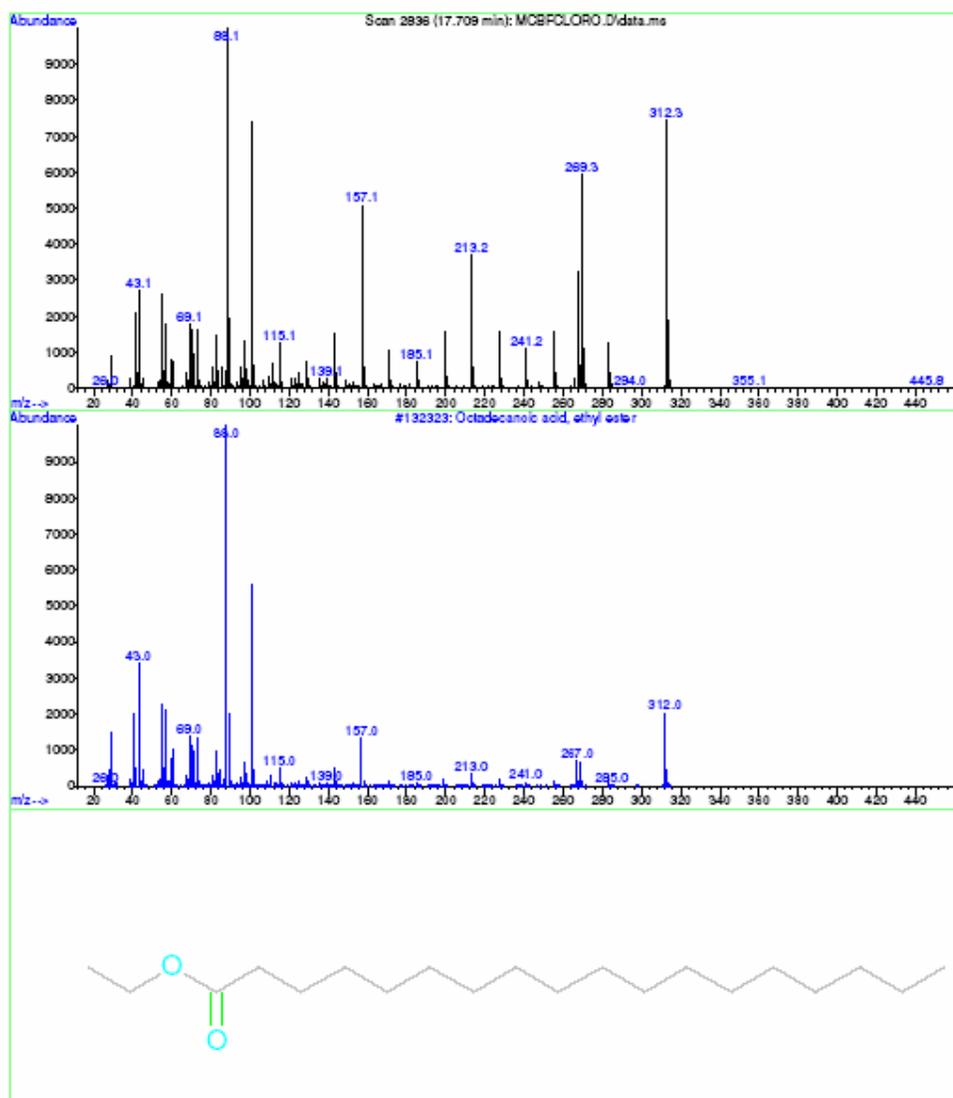


Figura 34. Comparación entre espectro de masas: compuesto McB1A 16.552 minutos y base de datos Nist-05.

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L  
Quality : 95  
ID : Octadecanoic acid, ethyl ester



**Figura 35.** Comparación entre espectro de masas: compuesto McB1B 17.709 minutos y base de datos Nist-05.

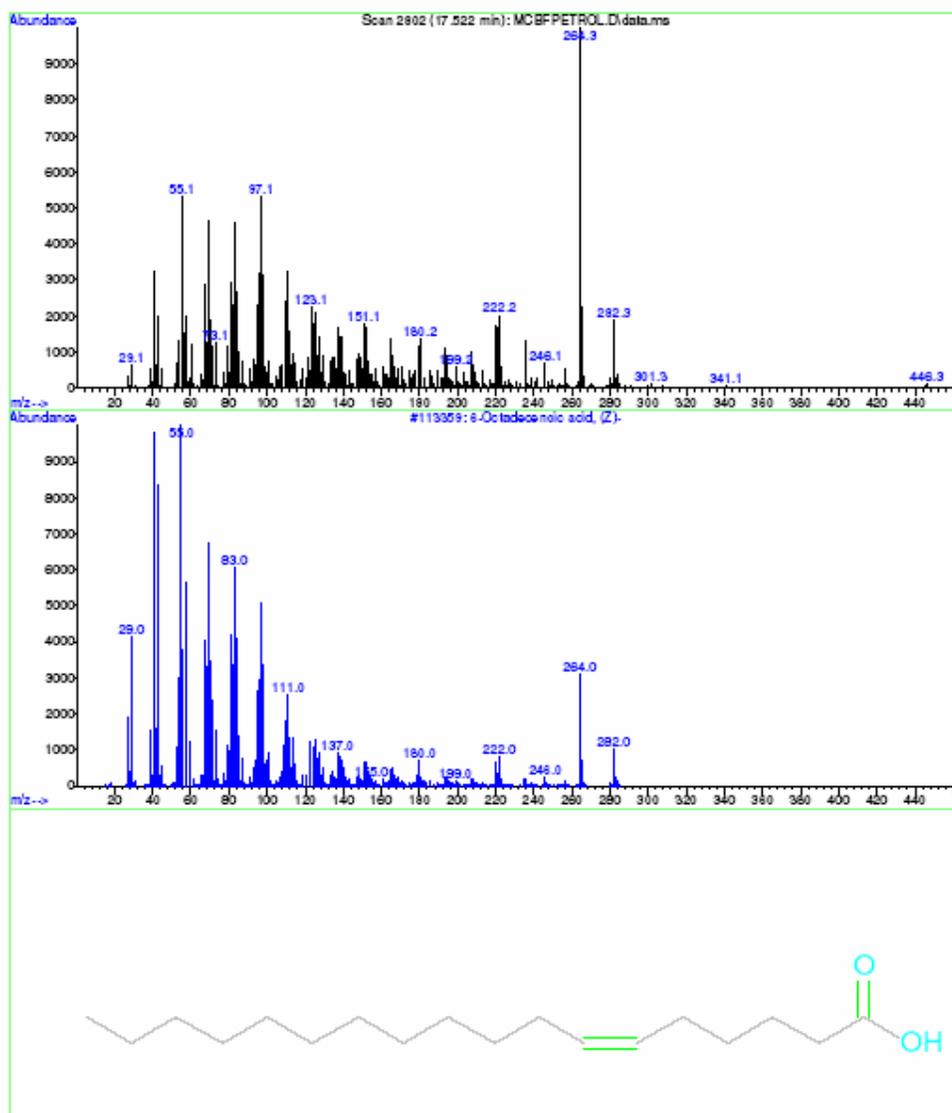
#### 4.5.4 Fracción PETROL mezcla M.c B2

En la tabla 7 se presentan los compuestos comparados con la base de datos Nist-05 para su identificación.

**Tabla 7. Compuestos de la fracción PETROL**

No de picos	Nombre del compuesto	Pico base	Ión molecular	Porcentaje de coincidencias
McB2A 17.522 minutos	Acido 6-Octadecenoico	55 m/z	282m/z,	94 %
McB2B 6.714 minutos	Acido Oleico	55 m/z	284 m/z,	96%
McB2C 17.533minutos	Acido octadecanoico	73 m/z	284m/z,	89%
McB2D	Neorgosterol	237m/z	396 m/z	94%

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L  
Quality : 94  
ID : 6-Octadecenoic acid, (Z)-



**Figura 36. Comparación entre espectro de masas: compuesto McB2A 17.522 minutos y base de datos Nist-05.**

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L  
Quality : 96  
ID : Oleic Acid

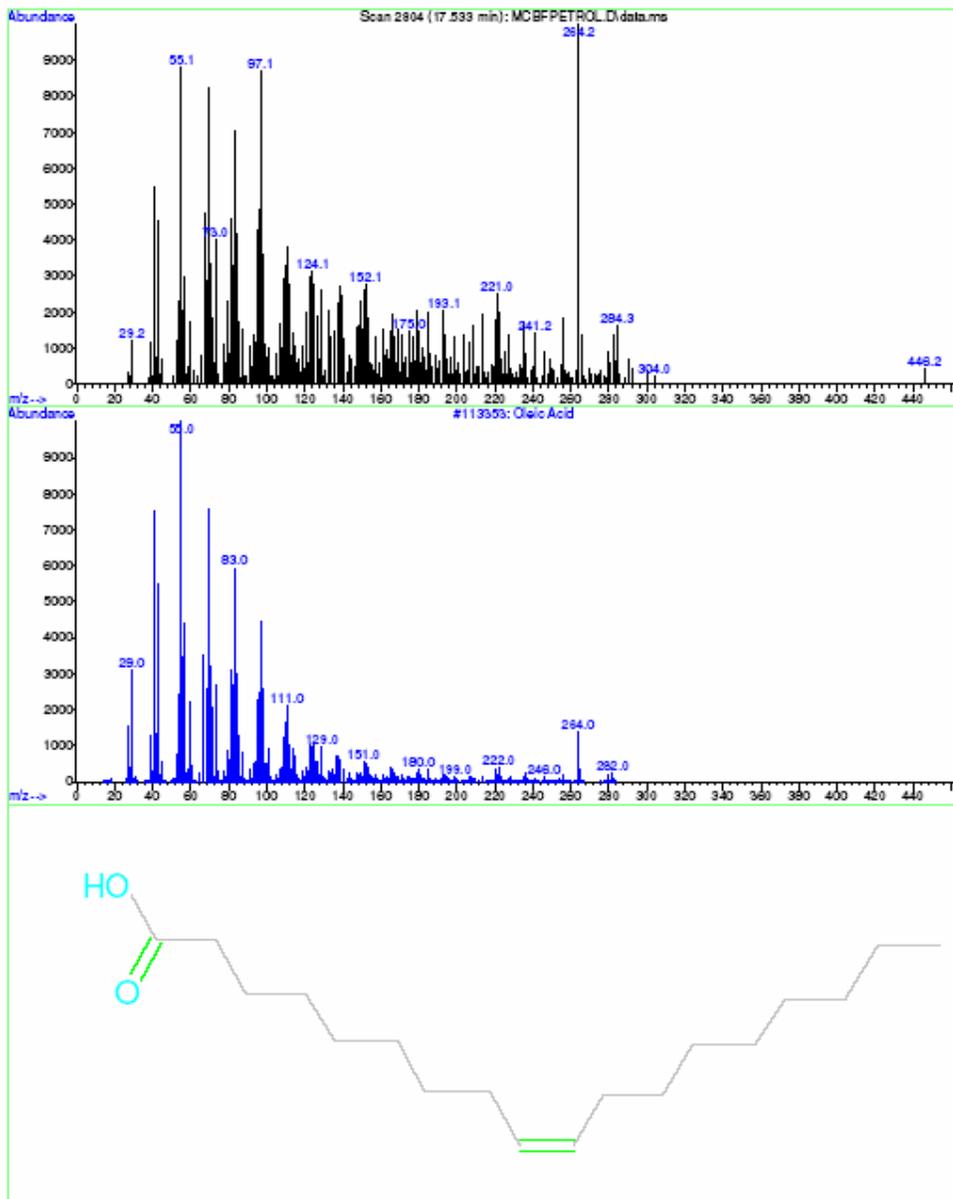


Figura 37. Comparación entre espectro de masas: compuesto McB2B  
17.533 minutos y base de datos Nist-05.

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L  
Quality : 89  
ID : Octadecanoic acid

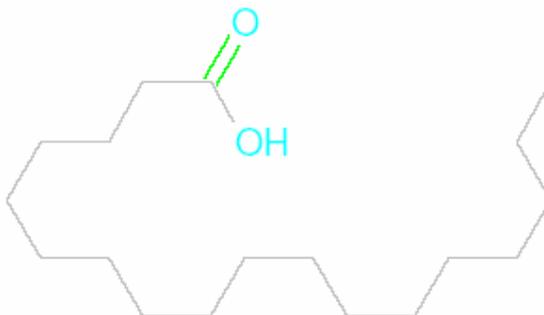
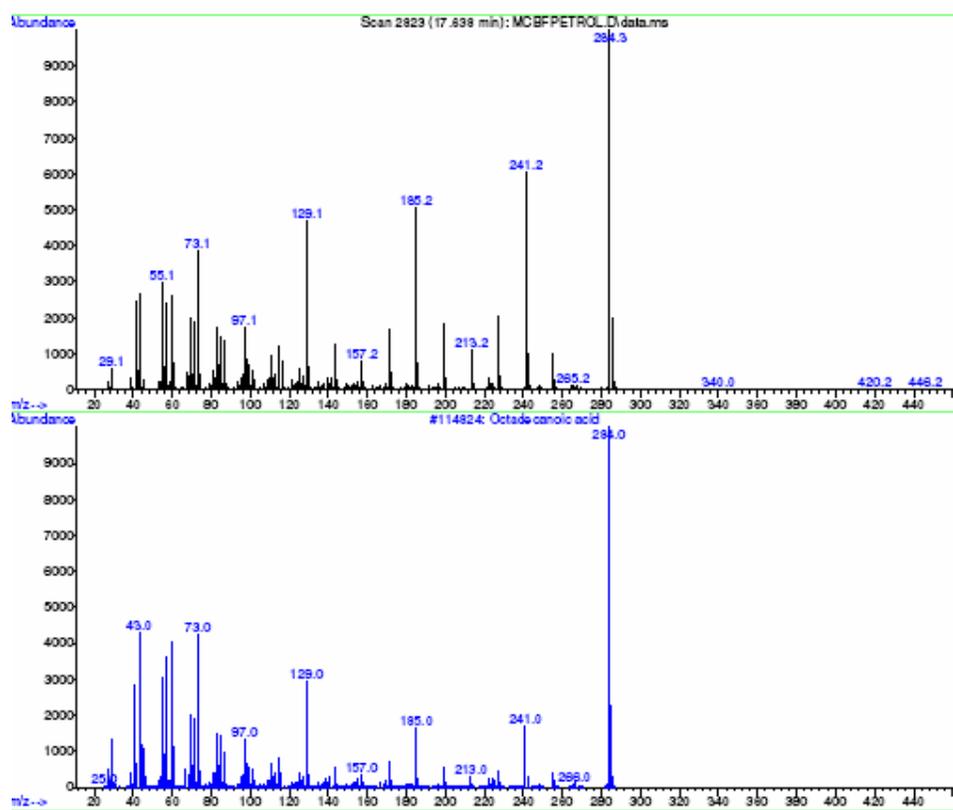
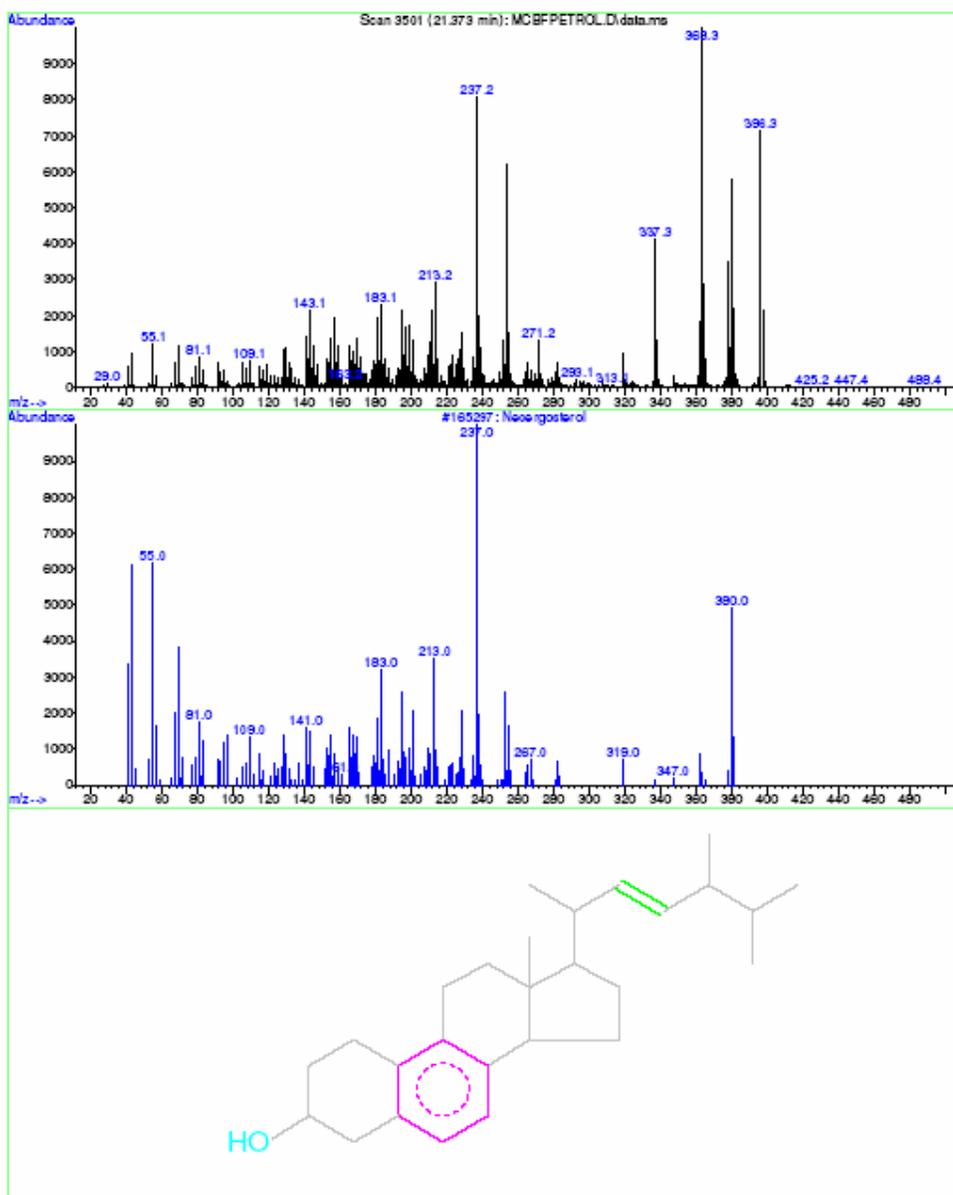


Figura 38. Comparación entre espectro de masas: compuesto McB2C 17.638 minutos y base de datos Nist-05.

Library Searched : D:\Database\NIST05a.L  
Quality : 94  
ID : Neoeurosterol



**Figura 39. Comparación entre espectro de masas: compuesto McB2D 21.373 minutos y base de datos Nist-05.**

Las tres familias o series de ácidos grasos insaturados, con importancia biológica se derivan del ácido oleico (AO), del ácido linoleico (AL) y del ácido linolénico (ALN); de los cuales la presencia de ácido oleico, coinciden según el análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM). En los compuestos y mezclas analizados en biomasa y extracto de caldo de la cepa nativa de ***Mucor circinelloides* SPG 321**.

La identificación fue realizada sobre la base de los tiempos de retención y confirmada por comparación de los espectros de masas con los de la base de datos Nist-05, de gran utilidad para caracterizar de forma rápida y eficiente los compuestos orgánicos.

Los resultados dados por la técnica de gases acoplado a masas CG-EM, confirman la importancia de ***Mucor circinelloides*** y su potencial como hongo oleaginosos, (Mirosawa., *et al* 2002) reportado por su uso comercial en la producción de aceite rico en ácidos grasos insaturados (Wynn *et al.*, 1997), además de esto tiene la capacidad para acumular lípidos en torno al 25% de su peso seco (James *et al.*, 1999). (Kendrick, & Ratledge, 1992).

Muchos hongos, acumulan lípidos como material de almacenamiento. Cuando el crecimiento se ve limitado debido al agotamiento de nitrógeno, o de otro tipo de nutrientes, esta actividad se desarrolla en presencia de fuente de carbono (Ratledge, 1997). Esta capacidad llama la atención, es así como se ha realizado el análisis de una serie de enzimas implicadas en la bioquímica y la generación de NADPH para la síntesis de ácidos grasos (Evans & Ratledge, 1985).

El trabajo desarrollado por Wynn, Kendrick, A. & Ratledge, 1997 sobre la enzima málico en ***Mucor circinelloides***, implicada en la acumulación de lípidos en hongos filamentosos, confirman su papel en la prestación de NADPH para la biosíntesis y la desaturación de ácidos grasos, inhibidores de la enzima,

conducen a la disminución en la acumulación de lípidos. La enzima cataliza la reacción:

I-Malato - NADP+1piruvato- CO<sub>2</sub>- NADPH

Se han reportado propiedades de *M. circinelloides* en la síntesis de ésteres de ácidos grasos, glicerol y sacáridos Antczak, (1999). Así como el aislamiento de una lipasa intracelular de la biomasa, con actividad sobre la síntesis de ácido oleico y caprílico, demostrando su facilidad para la hidrólisis de grasas, y para llevar a cabo el proceso inverso, es decir, sintetizar enlaces éster. Además de catalizar reacciones de transesterificación e interesterificación. Debido a su estereoespecificidad el potencial biotecnológico de la lipasa es enorme y despierta un elevado interés en muchos sectores industriales. (Evans & Ratledge, 1985).

Los hongos filamentosos, *Mucor circinelloides* y *M. racemosus*. Tienen capacidad de formar numerosos cuerpos lipídicos en su biomasa, ricos en ácidos grasos insaturados con producción simultánea de lipasa intracelular mejorando el rendimiento del bioproceso (Antczak *et al.*, 2001), se reporta la presencia de los ácidos grasos: palmitico, palmitoleico, esteárico, oleico; los cuales coinciden con este estudio a excepción del ácido elaídico; lo cual puede ser específico para cada especie. Según Du Preez *et al.*, 1995 los resultados obtenidos sugieren que los hongos filamentosos tienen diferentes perfiles de ácidos grasos y que esta puede ser una técnica confiable para caracterizar especies y géneros. (Sthal Y Klug, 1996). Para ninguno de los espectros de masas se hizo patrón de fragmentación ya que la identificación se hizo por comparación con bases de datos.

El hongo *M.circinelloides* es una cepa lipofílica. Los ácidos grasos metabolizados a acetil-CoA por la vía de la  $\beta$ -oxidación. Las acetogeninas (policétidos) son productos cuyo único criterio de unificación es su biogénesis. El donante de unidades C<sub>2</sub> es malonilCoA (molécula elongadora) y el iniciador es la acetilCoA. El iniciador y el elongador, son convertidos por separado en los

respectivos tioésteres de proteínas transportadoras especiales (PT; SH) que contienen un grupo  $\beta$ -alanilaminoetanotiol como la coenzima A. Los dos tioésteres formados reaccionan entre sí, dando origen al acetoacetil-SPT con la liberación de una molécula de PT-SH y otra de CO<sub>2</sub>; reducciones posteriores transforman el acetacetil-SPT en butiril-SPT, recirculado hasta obtener cadenas C<sub>16</sub> o C<sub>18</sub>.

#### **4.5.5 Fracción PETROL compuesto M.c B3**

Presenta las siguientes propiedades físico-químicas. Peso de 6,6 mg, con una apariencia sólida en forma de agujas brillantes incoloras, soluble en MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> y Me<sub>2</sub>CO, con un punto de fusión 130°C y prueba positivo para Liebermann Burchard.

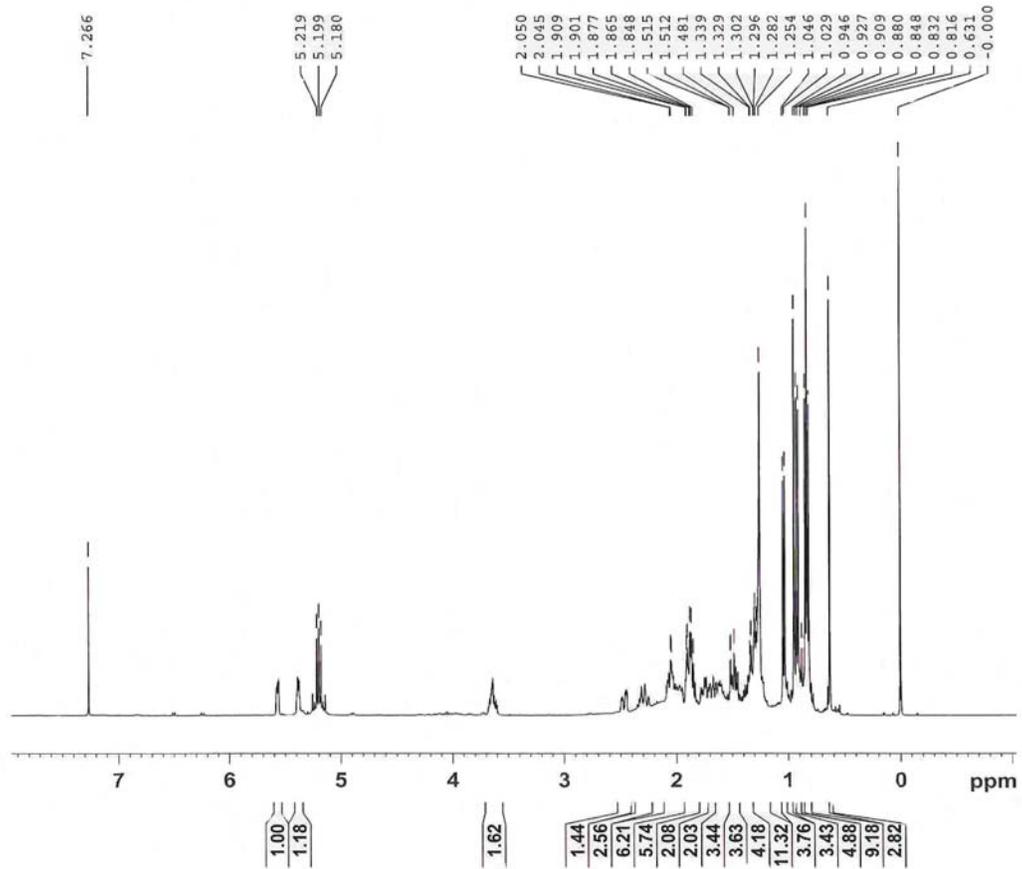


Figura 40. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  Tomado en un equipo Bruker 300 MHz en  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  del compuesto M.c B3

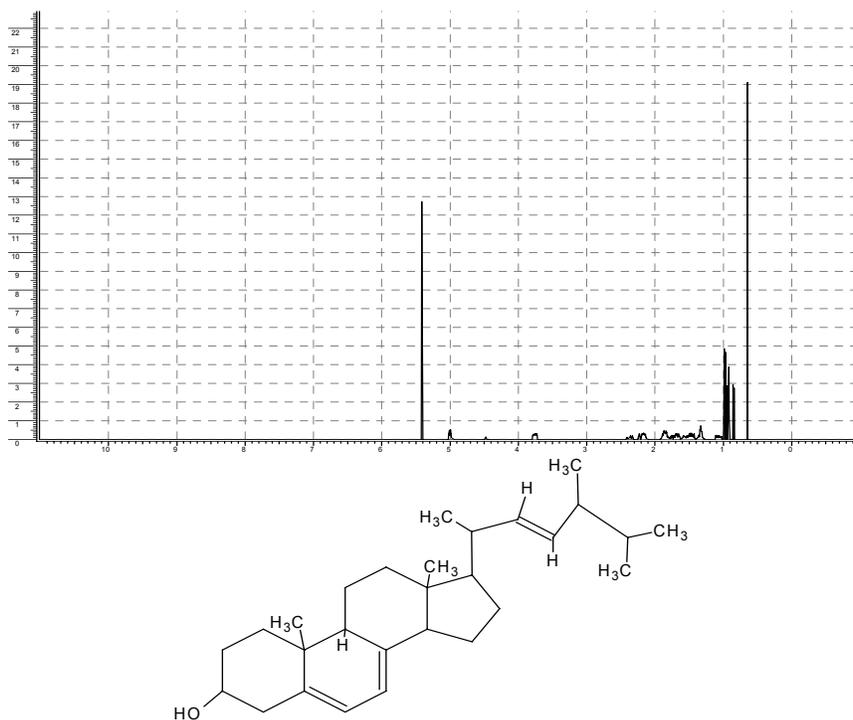
**Tabla 8. Asignaciones de analogía del espectro de RMN<sup>1</sup>H del Compuesto M.c B3**

RMN <sup>1</sup> H		
p.p.m	Multiplicidad	Integración
0.6	s	3
0.8	q	9
0.91	d	5
0.95	d	3
1.04	d	4
1.24	q	11
1.37	m	4
1.48	m	4
1.59	m	3
1.69	m	2
1.76	m	2
1.87	d	6
2.04	s	6
2.31	m	3
2.47	d	1
3.65	q	1
5.21	q	1
5.4	s	1
5.57	sex	1

**Espectrometría de resonancia magnética nuclear protónica** .El espectro de RMN<sup>1</sup>H en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (Fig. 42, Tabla 8), presenta señales (δ p.p.m) de multipletes a δ 0.62 que integra para 3H; a δ 0.83 que integra para 9H; δ 0.91 integra para 5H; δ 0.95 integra para 3H; δ 1.04 integra para 4H; δ 1.24 integra para 11H; δ 1.37 integra para 4H; δ 1.48 integra para 4H; δ 1,59 integra para 3H; δ1.69 integra para 2H; δ 1.76 integra para 2H; δ 1.87 integra para 6H; δ 2.04 integra para 6H; δ 2.31 integra para 3H y δ 2.47 integra para 1H. A campo bajo se encuentra un multiplete integrando para 1H a δ 3.6; a campo más bajo se encuentran tres multipletes que integra para 1H cada uno a δ 5.21, δ 5.4 y δ 5.57 p.p.m.

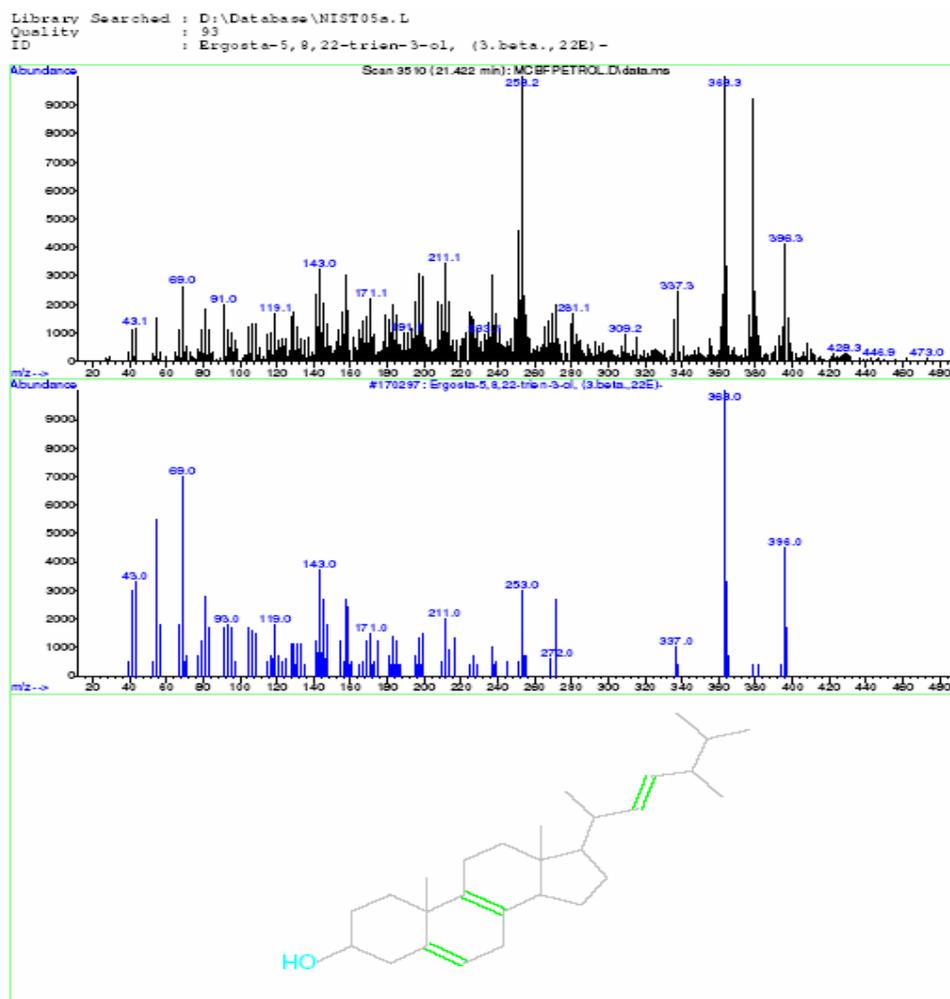
Por las características del espectro este compuesto se asemeja a un esteroil, los espectros de resonancia magnética nuclear protónica de los esteroides deben ser preferiblemente de alta resolución (220, 360 MHz, etc.), debido al número y clases de protones que contienen. En forma general se observa las señales de protones metílicos en la región de 0-1 ppm. El protón ligado al carbono 3 se observa alrededor de 360 MHz como un "quintete" cuando el

hidroxilo está en posición 3 $\alpha$ . como en este caso. En el caso de esteroides con enlaces dobles en C-5 y C-7 (esteroides con núcleo tipo ergosterol) los protones H-6 y H-7 se observan como multipletes en 5.4 ppm y 5.5 ppm. Concuerda en este caso, además en el espectro aparece la señal del grupo metilo del acetato alrededor de 1.8 ppm. La región de protones metílicos (0-1.2 ppm) es conocida para varios esteroides.



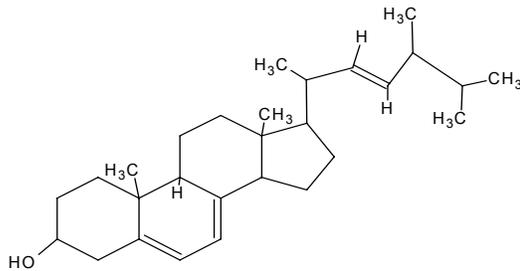
**Figura 41. Espectro de RMN $^1\text{H}$  simulado de Ergosterol y formula química.**

Teniendo en cuenta lo anterior, se comparó con espectros de RMN<sup>1</sup>H simulados de esteroides comunes en hongos como lo son ergosterol, zimosterol, acosterol y fecosterol, se encontró que el espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto es semejante al espectro de ergosterol que se encuentra principalmente en hongos y levaduras. Se confirmó con la base de datos Nist-05 del espectro de masas del compuesto McB3 figura 44



**Figura 42.** Comparación entre espectro de masas: compuesto McB3 21.422 minutos y base de datos Nist-05.

Se sabe que el ergosterol es un constituyente de las membranas del micelio, esporas y células vegetativas Samsong 1981 y ha sido reportado como metabolito secundario. Tiene una fórmula condensada  $C_{28}H_{44}O$ , estructura química parcial (figura 45.)



Ergosterol

**Figura 43. Estructura química de Ergosterol.**

Los hongos son conocidos como buena fuente de fitosteroles. Su interés nutricional se deriva de la capacidad de reducir la absorción de colesterol. El fitosterol que se presenta con mayor abundancia en hongos es el ergosterol; cuando éste se expone a la luz ultravioleta, debido a su fotólisis, se produce pre-vitamina D2, taquistero y lumisterol (Teichmann, A. 2007).

Biogénesis. Los esteroides se derivan biogénicamente de la AcetilCoA (Ruta del Acetato) vía mevalonato y escualeno. Los esteroides vegetales tienen como precursor inmediato al cicloartenol, mientras que los animales tienen al lanosterol. De forma análoga se originan los triterpenoides. En la biogénesis de los esteroides también están implicados procesos tales como hidrogenaciones y deshidrogenaciones, metilaciones (vía-Sadenosilmetionina), hidroxilaciones,

etc. Un hecho estructural notable es que la gran mayoría de esteroides naturales tienen sustituyentes alquílicos sobre los carbonos 4 y 24 fundamentalmente, y este hecho es justificado por la misma biogénesis. Los hongos son conocidos como buena fuente de fitosteroides. Su interés nutricional se deriva de la capacidad de reducir la absorción de colesterol. El fitosterol que se presenta con mayor abundancia en hongos es el ergosterol; cuando éste se expone a la luz ultravioleta, debido a su fotólisis, se produce pre-vitamina D<sub>2</sub>, taquisterol y lumisterol (Teichmann, A. 2007).

Para ninguno de los espectros de masas se hizo patrón de fragmentación ya que la identificación se hizo por comparación con bases de datos.

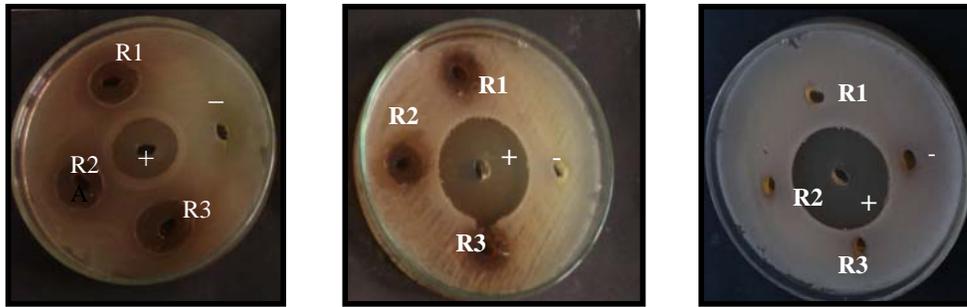
#### 4.6 PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

Para las pruebas antibacterianas se utilizaron los microorganismos: *E. coli* ATCC 25922 representante de bacterias gramnegativas, *S. aureus* ATCC 25923 y *B. subtilis* ATCC 6633 microorganismos grampositivo

(Fenical, 1993)

**Tabla 9. Lectura extractos crudos biomasa y caldo**

DIÁMETRO PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN EN mm (milímetros) A LAS 24 HORAS 2µ/L			
BACTERIA	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>
FRACCIONES			
Extracto Biomasa	15.6 mm	13.3 mm	-5.0 mm
Control positivo	28m.m	33mm	27mm
Extracto Caldo	-5mm	-5mm	< 5.0 mm
Control positivo	35mm	40mm	33mm

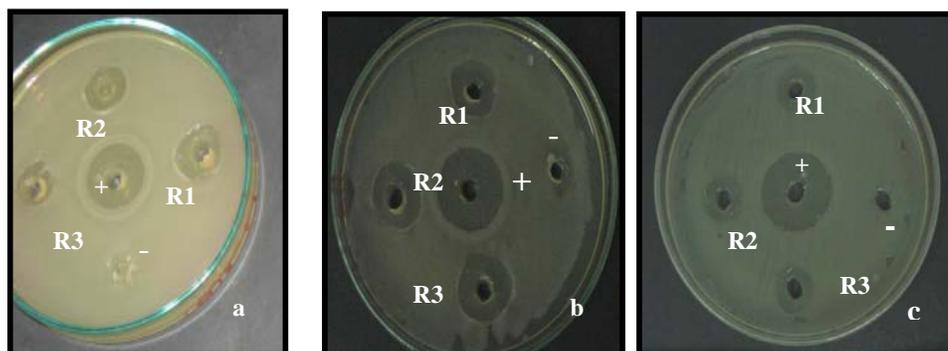


**Figura 44. Pruebas antibacterianas A. *S. aureus* B. *B. subtilis* y C. *E.coli***

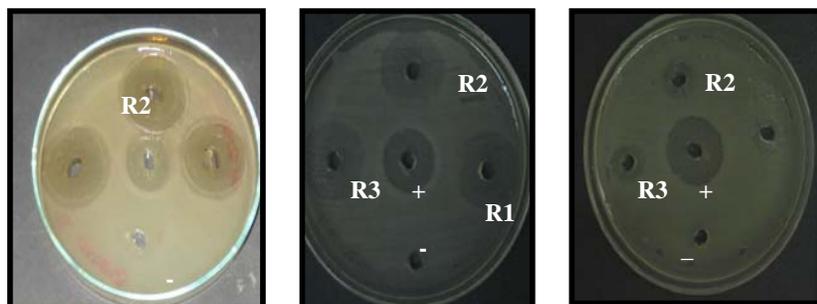
Los resultados, muestran que solo el extracto crudo de Biomasa obtenido de la cepa nativa de *Mucor* SPG 321 por extracción con acetato de etilo, presento actividad inhibitoria frente a bacterias Grampositivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* (ATCC 25921) y No frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922), se consideran positivos debido a que el halo presenta en promedio un diámetro de 15mm, se considera sensible cuando presenta un halo mayor o igual a 15 mm, Indeterminado con un halo de 13-14 mm y resistente cuando el halo es menor o igual a 12 mm (NCCLS 2003), los resultados se relacionan en la Tabla 9, Figuras 44. Mientras que el extracto crudo de caldo no ejerce actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* (ATCC 25921)

**Tabla 10. Evaluación de la actividad antibacteriana en las fracciones petrol y CHCl<sub>3</sub> de la biomasa**

DIÁMETRO PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN EN mm (milímetros) A LAS 24 HORAS 1 $\mu$ /L			
BACTERIA	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. coli</i>
FRACCIONES			
<b>Fracción Petrol</b>	12 mm	13 mm	< 5.0 mm
<b>Control positivo</b>	22m.m	30mm	35mm
<b>Fracción CHCL3</b>	28m.m	25mm	13.5 mm
<b>Control positivo</b>	20mm	35mm	33mm



**Figura 45. Pruebas antibacterianas a. *S. aureus* b. *B. subtilis* y c. *E.coli* fracción PETROL extracto de biomasa**



**Figura 46. Pruebas antibacterianas a. *E.coli* b. *S. aureus* y c. *B. subtilis* fracción  $\text{CHCl}_3$**

Se determinó la actividad antibacteriana de la fracción PETROL y  $\text{CHCl}_3$ . Los datos encontrados para estas dos fracciones se consignan en la tabla 10. Se consideraron Indeterminados los halos con diámetro de 13-14 mm y resistentes los menores o iguales a 12 mm. La fracción  $\text{CHCl}_3$  mostró actividad inhibitoria para los microorganismos Grampositivos ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923 y ***Bacillus subtilis*** (ATCC 25921), Indeterminado para ***Escherichia coli*** (ATCC 25922). Se procedió a probar el extracto de la fracción  $\text{CHCl}_3$  de la biomasa a una concentración de  $0.5\mu\text{l}/50\mu\text{L}$ ; pero a esta concentración la fracción no presenta actividad antibacteriana, con ninguno de los microorganismos usados en la prueba. Como se aprecia en la tabla 11 y figura 47.

Los resultados permiten concluir que la fracción  $\text{CHCl}_3$  presentó actividad inhibitoria contra ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923 activa y contra ***Bacillus subtilis*** (ATCC 25921). Lo que sugiere una fuente de productos potenciales como antibacterianos frente a microorganismos Gram positivos aunque se trata de fracciones orgánicas, cuya composición se desconoce.

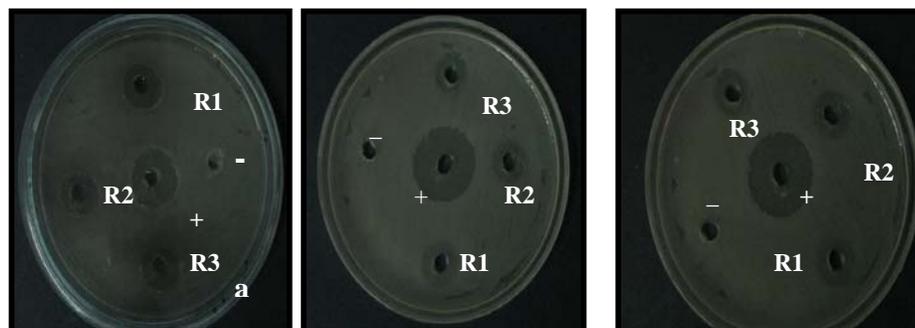
Lo anterior, está relacionado con las diferencias que existen entre estos dos grupos de bacterias en sus estructuras químicas de superficie; como son la estructura, composición y permeabilidad de la pared celular. Las bacterias Gramnegativas, contienen un alto porcentaje de lípidos (11-22%) que las bacterias Grampositivas (1-4%) (Berdy, 1995), esto hace que las bacterias

Gram positivas sean más permeables que las Gram negativas, permitiendo el paso de los compuestos a su interior. El control positivo para todas las sustancias ensayadas funcionó satisfactoriamente, ya que presentó un halo de inhibición sensible con los microorganismos probados como lo indica.

El control negativo DMSO no presentó ningún tipo de reacción nociva para los microorganismos ensayados, se eligió como diluyente de los extractos ya que no influye en el crecimiento de las bacterias u hongos, evitando así la obtención de falsos positivos, por esta razón se tomó como control negativo y diluyente de todas las fracciones extractadas. (Dreyfuss, 1994)

**Tabla 11. Evaluación de la actividad antibacteriana en las fracciones CHCl<sub>3</sub> de la biomasa 0.5μ/ 50μL**

<b>DIÁMETRO PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN EN mm (milímetros) A LAS 24 HORAS a una concentración 0.5μ/ 50μL</b>			
<b>BACTERIA</b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>B. subtilis</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>
<b>FRACCIONES</b>			
<b>Fracción CHCl<sub>3</sub></b>	8.5mm	7mm	8 mm
<b>Control positivo</b>	35mm	40mm	33mm



**Figura 47. Pruebas antibacterianas a *S. aureus*. b. y c. *B. subtilis* *E.coli* fracción  $\text{CHCl}_3$  a una concentración de  $0.5\mu/ 50\mu\text{L}$**

- **Determinación de la concentración inhibidora mínimo CMI y CMB:** Teniendo en cuenta el tamaño del halo que no es significativo a esta concentración y debido al desconocimiento de difusión de la fracción  $\text{CHCl}_3$  se determinó la CMI y la CMB para ***S. aureus*** seleccionado por su importancia clínica y por los resultados mostrados (Koneman, 1999). Para ***S. aureus*** la CMI es de  $12.5 \mu\text{g/mL}$  y CMB  $25 \mu\text{g/mL}$ .

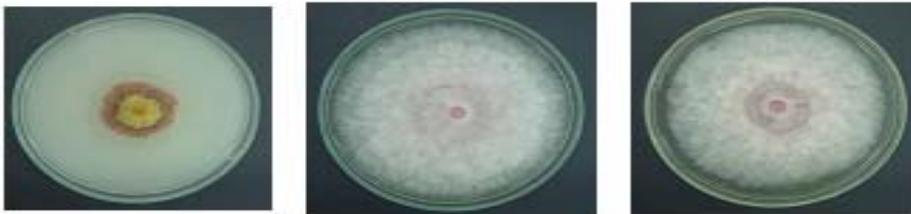
**Bioautobiografía** La fracción  $\text{CHCl}_3$  que dio positivos por el método anterior, se le realizó las contraplacas de la bioautografía se observó a simple vista la zona de inhibición. Se midieron los frentes de las bandas observadas de cada cromatograma y se determinó un  $R_f$  entre  $1.7\text{cm}$  y  $2.00\text{cm}$  para la fracción  $\text{CHCl}_3$ , en medio con suspensión de *S. aureus* figura 50 correspondiente a la región de macrólidos. (Hewit and Vincent, 1989).



**Figura 48. Zona de inhibición en bioautografía para *S. aureus***

#### **4.7 Actividad antifúngica.**

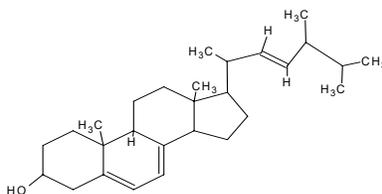
Los extractos totales de caldo de cultivo y biomasa de la fermentación probados frente a *Fusarium oxysporum* no presentaron actividad alguna a estos, crecieron apropiadamente en el medio de cultivo donde se difundió adecuadamente hacia la colonia fungosa, pero no ocasionó deformación alguna, lo que demuestra que no presenta actividad frente a los extractos probados. (Cole, 1999).



**Figura 49. Actividad antifúngica a. Control Positivo b. Extracto c. Control Negativo**

## 5. CONCLUSIONES

- Según identificación realizada con base en características microscópicas y macroscópicas, la cepa SPG 321 es semejante a ***Mucor circinelloides***.
- La biomasa de la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* presenta actividad inhibitoria para los microorganismos Grampositivas ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923 y ***Bacillus subtilis*** (ATCC 25921), lo que sugiere una fuente de productos con potencial biotecnológico y colocan a esta cepa como un microorganismo promisorio.
- La cepa nativa de ***Mucor circinelloides*** SPG 321 reporta la presencia de los ácidos grasos: palmítico, palmitoléico, esteárico y oleico, resultados dados por la técnica de gases acoplado a masas CG-EM, que confirman la importancia de ***Mucor circinelloides*** y su potencial como hongo oleaginoso.
- La cepa nativa de ***Mucor circinelloides*** presento una curva típica de desarrollo al inocularse en el medio líquido PGS con idiofase que culmino a la hora 264.
- A partir del micelio de la cepa nativa de ***Mucor circinelloides*** SPG 321 se obtuvo el compuesto M.c B3 con una fórmula condensada C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O y una estructura química parcial de ergosterol.



- El extracto crudo de caldo de fermentación de la cepa SPG 321 de ***Mucor circinelloides*** no tienen propiedades antibacterianas contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis*.
- Los compuestos de mediana polaridad no presentaron actividad antibacteriana

## 6. RECOMENDACIONES

- Debido a la complejidad que existe entre el género *Mucor*, se recomienda, utilizar técnicas especializadas para la clasificación taxonómica (pruebas moleculares PCR) para la confirmación de la especie *circinelloides*.
- Optimizar el proceso de fermentación para continuar el estudio de composición química de la cepa SPG 321 particularmente la fracción CHCl<sub>3</sub> que presentó actividad antibacteriana en microorganismos grampositivos, partiendo de un mayor contenido de biomasa y caldo para asegurarse que el rendimiento de los compuestos sea más alto.
- Se recomienda evaluar otras opciones de fermentación para incrementar el rendimiento de los metabolitos con el fin de evitar que cantidades limitadas restrinjan la realización de pruebas espectroscópicas y antimicrobianas.
- Se recomienda ampliar el estudio en las fracciones de menor polaridad, que presentaron actividad antibacteriana

## BIBLIOGRAFIA

- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. AND BLACKWELL, M. (1996) Introductory Mycology, Fourth Edition. 1996. Pág. 26-42.
- ÁLVAREZ, M., ESCOBAR, F., GAST, F., MENDOZA, H., REPIZZO, A., Y VILLAREAL, H. (1997) Ecosistemas Terrestres. Bosque Seco Tropical, en Informe nacional sobre el estado de la biodiversidad, Bogotá, Eds. 1997. Pág. 129
- ANTCZAK, T., HILER, D., KRYSZYNOWICZ, A., SZCZESNA, M., BIELECKI, S., GALAS, E. (1999) "Activity of immobilized in situ intracellular lipase from *Mucor circinelloides* and *Mucor racemosus* in synthesis of sucrose esters". In: Bielecki S, Tramper J, Polak J, editors. Progress in biotechnology, vol. 17. Amsterdam: Elsevier. Pág. 221–8.
- ANTCZAK, T., GRACZYK, J., MIROSLAWA, G., SZCZESNA, A., STANISŁAW, B., (2001) " Activation of *Mucor circinelloides* lipase in organic medium". In: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 19–20. Pág 287–294
- AYALA, C., y BOZZI, B. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de la raíz de *Pentacalia corymbosa* (Benth) cuatr. Contra *Alternaria sp*, *Trichoderma* y *Fusarium oxysporum* Bogotá. 1998. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. for food use. Curr Opin Biotechnol Vol 11: Pág 478–483
- ARCHER, D. (2000). Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. Curr Opin Biotechnol 11:478–483
- BARNETT, H., and HUNTER, B., (1988). Illustrated Genera of imperfect fungi. New York: MacMillan.
- BAUER, A., *et al.*, (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. En: Am. J. Clin. Pathol. 1966; 45: Pág. 493.
- BAUGHMAN AND YA, LIU. (1995). Neural Networks in Bioprocessing and Chemical D.R. Enginnering, Academic Press, San Diego CA, 1995, pp 180-181.
- BECERRA, N, y SEGURA, I. Bogotá. (2003). Determinación de la actividad antimicrobiana de las partes aéreas (hojas y corteza) de *Bursera tomentosa* contra algunos fitopatógenos y patógenos del hombre. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- BENTLEY R (1997) Microbial secondary metabolites play important roles in medicine: prospects to discovery of new drugs. Perspect Biol Med 40: Pág 364–394

- BENVENISTE, R. (1973). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Annu. Rev. Biochem.*, Pág 42-47
- BERDY J. (1995). *Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites In: Proceedings of 9th international symposium on the biology of actinomycetes*. Part I. Allerton, New York. Pág 3–23.
- CABRERA, CONSTANZA Y CHITIVA, ADRIANA. Bogotá (2001). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos del suelo del páramo de Guasca (Colombia) en zona de vegetación de frailejones. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- CARRANZA, L. (2005). Tesis de Grado: *Caracterización de metabolitos secundarios obtenidos a partir de las cepas nativas: Penicillium sp 8 y P. rubrum* sg 35. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- CARLILE, M., AND WATKINSON. (1996). *The fungi*. Academic Press, London, Great Britain. Pág 3, 122-139.
- CHANDRA, S., AND A. WOODGYER. (2002). Primary cutaneous zygomycosis due to *Mucor circinelloides*. *Australas. J. Dermatol.* 43: Pág 39–42
- COLE, M. “*Bioassay guided isolations of natural products*”. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Grupo de investigación de Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ). Bogotá, 1999. Pág. 49
- CRUEGER, W., Y CRUEGER, A. 1989. Manual de microbiología industrial. España; Editorial acribia, s.a. Pág 67- 85.
- DAZA ARAGÓN, PAOLA. Capacidad biotransformadora y actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios del *Aspergillus niger* 511. Bogotá, 2001, 64 p. Trabajo de grado (Maestría en Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias
- DE BAETS, S., VANDEDRINCK, S., VANDAMME, E. (2000). Vitamins and related biofactors, microbial production. *Encyclopedia of microbiology*. Academic, London, 4: Pág 837–853
- DEACON, J, W. (1993). *Introducción a la microbiología moderna*, Buenos Aires, Ed. LIMUSA; Pág. 35, 69
- DEMAIN, AL. (1996). Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SuttonB (ed) *A century of mycology*. Cambridge University Press, Cambridge, USA, 23 Pág 3–254
- DEMIAN, ARNOLD Y SOLOMON, N. (1986). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, Pág. 98-117

- DORAN, P. (1998). Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. Editorial Acribia. Zaragoza, España, Pág 289-291
- DREYFUSS, M., Y CHAPELA, I. (1994). Potential of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals. The Discovery of Natural Products with therapeutic potential. Boston: Bitterworth-Heinemann.
- DUPREEZ, JC., IMMELMAN, M., KOCK, JLF., KILIAN, SG. (1999). Production of gammalinoleio, J., Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in food industry. Inf.Food Microbiol. 1999, 49: Pág 109-118.
- DUPRÉ, E., & C, ESPINOZA. (2000). Determinación de porcentajes de fecundación del ostión del norte *Argopecten purpuratus* utilizando espermatozoides criopreservados. Informe final, Proyecto DGIUCN. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Pág 29.
- ESTROHL, WR. (1997). Industrial antibiotics: today and the future. In: Strohl WR (ed) Biotechnology of antibiotics, 2nd Ed. Marcel Dekker, New York, Pág 1-47
- EVANS, C., & RATLEDGE, C. (1985). Possible regulatory roles of ATP: citrate lyase, malic enzyme and AMP deaminase in lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. Can J. Microbiol 31, 1000-1005.
- FENICAL, W., Y JENSEN, P. (1993). Marine biotechnology In: Pharmaceutical and bioactive natural products. New York: Plenum.
- GARCÉS DE GRANADA, EMIRA. (2003). Morfología y clasificación de los hongos, Bogotá, Ed. Universidad Nacional de Colombia. Pág 21
- GARCÍA RODRIGUEZ, JOSÉ. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. España: Juan J. Picazo, Pág 5.
- GILMAN, J. (1963). Manual de los Hongos del Suelo. México: Comp. Ed. Continental, 1963. Pág 572.
- GONZÁLEZ, C., RINALDI, M., SUGAR, A. (2002). Zygomycosis. En: Infect Dis Clin North Am. Vol 16 (4); Pág 895-914.
- HEWIT, W., AND VINCENT, S. (1989). Theory and Application of Microbiological Assay. Academic Press, Inc. San Diego. California.
- HOOG, D., GUARRO, S., GENE, J., AND FIGUERAS. (2000). *Zygomycota: Mucorales and Mortierellales*, In Atlas of clinical fungi. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. Pág. 60-124.
- IWEN, P., FREIFELD, A., SIGLER, L., AND TARANTOLO, S. 2005. Molecular identification of *Rhizomucor pusillus* as a cause of sinus-orbital zygomycosis in a patient with acute myelogenous leukemia. J. Clin. Microbiol. 43:5819- 5821

JAMES, P., WYNN, AIDIL, B., ABDUL, H., AND RATLEDGE, C. (1999). The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi *Microbiology* 145, 1911–1917

KENDRICK, A., & RATLEDGE, C. (1992). Desaturation of polyunsaturated fatty acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of the novel membrane-bound malic enzyme. *Eur J. Biochem* 209, 667±673.

KENDRICK B. The Fifth Kingdom. 2000, on-line, <http://www.mycology.com>.

KONEMAN, Elmer, *et al.*(1999). Diagnóstico Microbiológico. 3 ed. Editorial Panamericana, 1999. p. 612-613.

MADIGAN, MICHAEL., MARTINKO, JOHN., Y PARKER, JACK.(1998) Biología de los Microorganismos. Madrid: Prentice Hall Iberia. Pág 986 p.

MARTÍNEZ, OSCAR V. & VALENZUELA EDUARDO. (2003). Zygomycota Citados Para Chile. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Boletín Micológico Vol. 18 : 67 - 74

MAYEA, S., PADRÓN, J. (1983). Bacterias y hongos fitopatógenos. La Habana: Editorial Puebla.

MCNEIL, B., AND HARVEY, L. (1990). Fermentation: a practical approach. IRL Press, Oxford England, pp 131.

MEDINA BUELVAS, ANA. (Bogotá, 2001). Evaluación de la capacidad biotransformadora de la cepa nativa de *Fusarium oxysporum* sobre el beta-D-glucopiranosil-éster del ácido (-) 17-(beta-glucopiranosiloxil)-16-ol-kauran 19-oico e identificación de metabolitos secundarios. 66 p. Trabajo de grado (Maestría en Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

MILLER, G."Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of reducing sugar". (1959). Analytical Chemistry. Vol 31. pp 426-428

MONROY, A., Y MEZA, R., (2002). Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera microbiología Industrial. Bogotá D: C, Colombia pp 43

MOORE, AND LANDECKER, E. (1996). Fundamentals of Fungi. Fourth edition, Prentice Hall, New jersey, usa, pp 290-298.

NICKIN, J. (2000). Mycology lectura course. School of Biological and chemical sciences, Birkbeck College, University of London. (En línea): <http://224mycology/1htm> (consultado en Mayo 2008)

OWEN, P. (1991). Biotecnología de la Fermentación. Editorial Acribia. Zaragoza España., pp. 27-45-.

PATRICK, SCHWARZ., STEPHANE, BRETAGNE., JEAN-CHARLES, GANTIER., DEA, GARCIA., OLIVIER, LORTHOLARY., FRANCOISE, DROMER., AND ERIC, DANNAOUI. (2006). “*Identificación molecular de Zygomycetes de Cultura*”. Journal of Clinical Microbiology, p. 340–349 Vol. 44, No. 2

PITT, JOHN AND HOCKING, (1985). A. Fungi and Food spoilage. Sydney: Academic Press, 1985

SAMSON, R., HOEKSTRA, E., VAN OORCHOT, C. (1981). Introduction to food-borne fungi. C.B.S. Institute of the royal netherlands academy of arts and sciences. Pág. 66-67

SCHÜßLER, A., SCHWARZOTT, D., & WALKER, C. (2001). A new fungal, phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105:1413-1421

SCRAGG, A. (1997). Biotecnología para Ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos. México: LIMUSA. Pág. 192-193.

SCRIBAN, RENE. (1985). Biotecnología. México: El Manual Moderno, 1985. p. 132- 165

LITTLE, G AND GORDON, M. 1967. Survival fungus Cultures Maintained Under mineral oil for twelve years. Mycologia. 59: 733-736.

MIROSAWA, SZCZESNA, ANTCZAK, TADEUSZ., MAGDALENA, PIOTROWICZ., WASIAK, MAŁGORZATA., RZYSKA, NINA, BINKOWSKA., STANISAW, BIELECKI.(2002). Activation of *Mucor circinelloides* lipase in organic medium. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 19–20 287–294

NCCLS. National Comité for Clinical laboratory Standard. Performance Standars for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Document M2-A8. 2003. Nacional Comité for Clinical laboratory Standard Vol 23 (1). Wayne. Pennsylvania

RIBES, J. A., VANOVER-SAMS, AND D. J. BAKER. (2000). Zygomycetes in human disease. Clin. Microbiol. Rev. 13:236–301.

RÍOS, J., AND RECIO, M. (1989). A review of some Antimicrobial Compounds Isolated from Medicinal Plants Reported in the Literature. En: Phytotherapy Research, vol. 3 Nro. 4, p. 117-125

SILVA, TORRES., Y MARTÍNEZ, GARRE. (2006). "Distinct white-collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*" Mol. Microbiol 61:1023-27. Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Campus de Espinardo. Universidad de Murcia.

STHAL, P., Y KLUG, M. (1996). "Characterization and differentiation of Filamentous Fungi based on Fatty Acids composition" Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62 No.11 págs. 4136-1446.

TEICHMANN, A; DUTTA, P; STAFFAS, A Y JAGERSTAD, M. (2007). "Sterol and Vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation". LWT 40 815-822.

TORO, M DÍAZ, A. & PIAZZE, F. (1993). Microhongos filamentosos y levaduriformes asociados a pimienta negra (*Piper nigrum* L.). Boletín Micológico 8:77 – 83

TORRENEGRA, RUBÉN. 2000 Introducción al análisis químico moderno. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas. Departamento de química

VELEZ, P., POSADA, F., MARIN, P., GONZÁLEZ, M., OSORIO, E. Y BUSTILLO, A. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. CENICAFE. Págs. 103.

VINING, LC. TABER, WA. (1979). Ergot alkaloids. In: Rose AH(Ed) Economic microbiology, vol 3. Secondary products of metabolism. Academic, London. Pág 389–420

WAINWRIGHT, M. (1992). Introducción a la biotecnología de los hongos , Zaragoza, Ed. Acribia S.A.

WEITZMAN, I., S. WHITTIER, J. C., MCKITRICH, AND P. DELLA-LATTA. (1995). Zygosporos: the last word in identification of rare or atypical zygomycetes isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. Vol 33; p781–783.

WIEDERMANN B L. (1998). Zygomycosis. En: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, Ralph D. Feigin, James D. Cherry editors. 4<sup>th</sup> edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia. Pág: 2354-60.

WYNN, J. P., & C, RATLEDGE. (1997). Malic enzyme is a major source of NADPH for lipid accumulation by *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 143, 253±257.

WYNN, J. P., KENDRICK, A. & RATLEDGE, C. (1997). Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids* 32, 605±610.

YEPES, A., GALINDO, P., FANDIÑO, M., CASTILLO, E., RINCÓN, N Y RIVERA, H. (2005) Aproximación al estado de investigación científica y técnica sobre medio ambiente con énfasis en biodiversidad. Bogotá,.

<http://www.vscht.cz/kch/galerie/houby.htm>; Septiembre 2008

<http://biojmlorca.blogia.com/temas/articulos-cientificos.php>; Marzo 2007

<http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis> , junio 2007

[www.indexfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp), Octubre 2007

## ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVO

### AGAR EXTRACTO DE MALTA (MERCK)

Composición (g/litro)

Extracto de Malta	30,0
Peptona de harina de soja	3,0
Agar-agar	15,0

pH : 5,6

Disolver 48 g/L, esterilizar con cuidado en autoclave (10 minutos a 121°C).

### AGAR CZAPEK-DOX (MERCK)

Composición (g/litro)

Sacarosa	30,0
Nitrato sódico	3,0
Sulfato de magnesio	0,5
Cloruro potásico	0,5
Sulfato de hierro (II)	0,01
Hidrógenofosfato dipotásico	1,0
Agar-agar	13,0

Disolver 48 g/L, esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C) y verter en placas. Las placas con medio de cultivo son ligeramente turbias.

### AGAR PDA (PAPA DEXTROSA AGAR) (MERCK)

Composición (g/litro)

Infusión de papa (preparada a partir de 200 g de papa)	4,0
D(+)glucosa	20,0
Agar-agar	15,0

pH : 5,6

Disolver 39 g/L y esterilizar en autoclave (15 min. A 121°C).

### AGAR DEXTROSA SABOREAUD (PRONADISA)

Composición (g/litro)

Dextrosa	40,0
Mezcla de peptonas	10,0
Agar	15,0
pH :	5,6

Disolver 65 g en 1 L de agua destilada, calentar en un baño de agua hirviendo. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

### **AGAR MÜELLER-HINTON (MERCK)**

Composición (g/litro)

Infusión de carne	2,0
Hidrolizado de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar-agar	13,0

pH : 7,4

Disolver 21 g/L, esterilizar en autoclave (15 min. a 121°C).

### **MEDIO LÍQUIDO PGS**

Composición (g/litro)

Papa	400
Glucosa	20
Sulfato de amonio	3

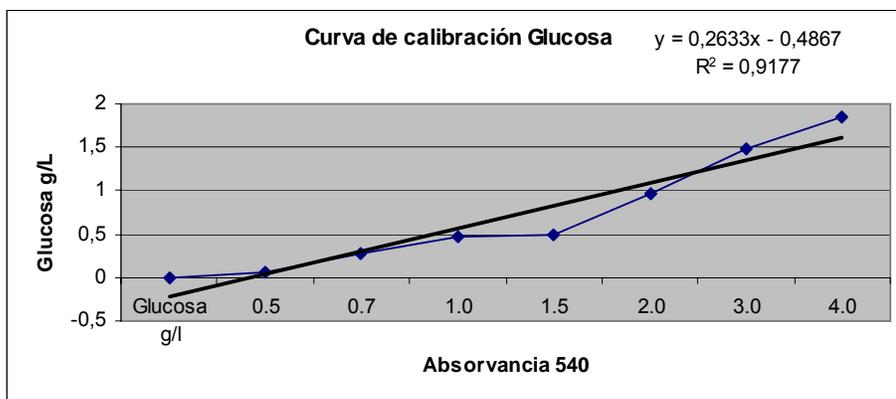
## ANEXO B. MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5 DINITROSALICILICO

Existen diferentes métodos analíticos para medir la cantidad de azúcar en una solución. En la mayoría de ellos se mide la concentración de aquellos azúcares que tienen en su estructura química grupos funcionales aldehídos, los cuales son capaces de oxidarse en presencia de algunas sustancias químicas, dando como resultado productos cromogénicos. Es de notar que en este caso se registran los grupos reducibles que puedan estar en la estructura monosacárido, disacárido y oligosacárido. Esto conlleva a obtener una concentración relativa de los productos formados y registrados expresados en equivalentes de glucosa. La proporcionalidad del color es directamente proporcional a la cantidad de azúcar.

Tabla 1. Protocolo del método del ácido 3,5 dinitrosalicílico.

<b>Cantidad en mililitros (ml)</b>	<b>Blanco</b>	<b>Muestra</b>
Muestra	-	0.25
Reactivo DNS	0.25	0.25
Agua destilada	0.50	0.25
<b>Ebullir durante 5 minutos</b>		
Llevar a hielo durante 5 minutos		
Agua destilada	2.5	2.5
<b>Leer inmediatamente en espectrofotómetro a 540 nm</b>		

## ANEXO C. CURVA DE CALIBRACIÓN DE GLUCOSA



Glucosa g/l	Absorvancia 540		
0.5	0,015	0,092	0,091
0.7	0,252	0,288	0,276
1.0	0,532	0,525	0,334
1.5	0,532	0,525	0,434
2.0	0,883	0,961	1,026
3.0	1,497	1,458	1,464
4.0	1,999	1,689	1,88

Glucosa g/l	Absorvancia 540 promedio
0.5	0,066
0.7	0,272
1.0	0,464
1.5	0,497
2.0	0,957
3.0	1,473
4.0	1,856

## ANEXO D

### Datos cinéticos cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides*

TIEMPO (H)	Biomasa mg/L	glucosa mg/L	1/T	lnS /So	So - S	ln (1+a (So-S))
12	0,033	3,86	0,083333	0	0	0
24	0,035	3,56	0,041667	-0,080907	0,3	0,00257668
48	0,13	3,73	0,020833	-0,034259	0,13	0,00111738
72	0,17	2,41	0,013889	-0,47104	1,45	0,01239289
84	0,25	2,6	0,011905	-0,395156	1,26	0,01077771
96	0,34	2,6	0,010417	-0,395156	1,26	0,01077771
72	0,36	2,22	0,013889	-0,55316	1,64	0,01400546
96	0,49	2,45	0,010417	-0,454579	1,41	0,01205307
108	0,56	0,59	0,009259	-1,8783	3,27	0,02773384
120	0,54	1,15	0,008333	-1,210905	2,71	0,02303856
144	0,54	1,15	0,006944	-1,210905	2,71	0,02303856
168	0,81	1,15	0,005952	-1,210905	2,71	0,02303856
192	0,9	0,95	0,005208	-1,40196	2,91	0,02471798
216	1,01	0,82	0,00463	-1,549118	3,04	0,02580809
240	1,24	0,42	0,004167	-2,218168	3,44	0,02915484
264	1,23	0,2	0,003788	-2,960105	3,66	0,03099079
288	1,15	0,05	0,003472	-4,346399	3,81	0,03224064
312	1,35	0,05	0,003205	-4,346399	3,81	0,03224064
336	1,57	0,03	0,002976	-4,857225	3,83	0,03240717
360	1,55	0,02	0,002778	-5,26269	3,84	0,03249042
384	1,66	0,02	0,002604	-5,26269	3,84	0,03249042