

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIEROS EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
AISLAMIENTO DE TAXONES DE HONGOS FILAMENTOSOS CAPACES
DE PRODUCIR AMILASAS A PARTIR DE TUBÉRCULOS DE USO
TRADICIONAL EN LA REGIÓN ANDINA**

**AUTORES:
JOSUETH RAFAEL MOLINA TUFÍÑO
DANIEL MIGOBAN SANMARTÍN AMBULUDÍ**


**TUTORA:
MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ**

Quito, marzo del 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotros Josueth Rafael Molina Tufiño y Daniel Migoban Sanmartín Ambuludí, con documento de identificación N° 1721030144 y 1721526182, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Aislamiento de Taxones de Hongos Filamentosos Capaces de producir amilasas a partir de tubérculos de uso tradicional en la Región Andina”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

(f).....

Josueth Rafael Molina Tufiño

C.I.:1721030144

(f).....

Daniel Migoban Sanmartín Ambuludí

C.I.: 1721526182

Quito, febrero del 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, Aislamiento de Taxones de Hongos Filamentosos capaces de producir Amilasas a partir de Tubérculos de uso tradicional en la Región Andina realizado por Josueth Rafael Molina Tufiño y Daniel Migoban Sanmartín Ambuludí, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero de 2016

(f) 

María Elena Maldonado Rodríguez

C.I.: 1707743157

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.Marco conceptual	3
1.1. Raíces y Tubérculos Andinos (RTAs).....	3
1.2. Oca (<i>Oxalis tuberosa</i> Molina 1810)	4
1.3. Mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón 1802).....	4
1.4. El almidón	7
1.5. Amilasas	9
1.5.1. α-amilasa (EC 3.2.1.1).....	10
1.5.2. β-amilasa (EC 3.2.1.2)	12
1.5.3. Glucoamilasa (EC 3.2.1.3)	13
1.6. Aplicaciones de las amilasas	15
1.7. Hongos filamentosos productores de amilasas	16
Capítulo 2. Materiales y métodos	18
2.1. Localización	18
2.2. Muestreo de los tubérculos de oca y mashua	18
2.3. Inducción a contaminación microbiana ambiental	19
2.4. Obtención de biomasa en sustrato líquido	19
2.5. Aislamiento de taxones de hongos filamentosos	20
2.6. Caracterización microbiológica y purificación de taxones.....	20
2.7. Selección de los mejores taxones	21
2.8. Identificación de los taxones seleccionados.	22
2.9. Formación de complejos enzimáticos fúngicos	22
2.10. Determinación de la cinética de crecimiento fúngico en el complejo enzimático.....	23

2.11. Determinación de la capacidad de degradación por cuantificación de azúcares reductores	23
2.12. Medición de pH.....	24
2.13. Conservación de los taxones	24
2.14. Análisis estadístico.....	24
Capítulo 3. Resultados y discusión	26
3.1. Muestreo de los tubérculos de oca y mashua	26
3.2. Inducción a contaminación microbiana ambiental	27
3.4. Aislamiento de taxones.....	31
3.5. Caracterización microbiológica y purificación de taxones.....	32
3.6. Selección de los mejores taxones	34
3.7. Identificación de los taxones seleccionados.	35
2.8. Formación de complejos enzimáticos fúngicos	38
3.8. Cinética de crecimiento fúngico en el complejo enzimático	40
3.9. Determinación de la capacidad de degradación	42
3.9.1. Selección de los mejores tratamientos	45
3.10. Medición del pH.....	48
Conclusiones	50
Recomendaciones	51
Referencias.....	52

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción taxonómica de la mashua y oca	5
Tabla 2. Composición química de diez líneas promisorias de mashua y oca, pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP).....	6
Tabla 3. Tamaño y forma de los gránulos de almidón de oca y mashua	7
Tabla 4. Contenido de amilosa/amilopectina, en el almidón de raíces y tubérculos andinos	8
Tabla 5. Comparación del porcentaje de almidón digerible de 5 especies de raíces y tubérculos andinos	10
Tabla 6. Fuentes de α -amilasas microbianas.....	12
Tabla 7. Fuentes de glucoamilasas microbianas	15
Tabla 8. Características de la parroquia Cochapamba, Saquisilí, Ecuador.....	18
Tabla 9. Medios de cultivo empleados para el aislamiento	20
Tabla 10. Posicionamiento geográfico de las zonas de muestreo de los tubérculos de oca y mashua, Cochapamba, Saquisilí.....	26
Tabla 11. Resultados de la evaluación de azúcares reductores (Prueba de Fehling) .	29
Tabla 12. Resultados de la evaluación de degradación de almidón (Prueba de Lugol)	30
Tabla 13. Resumen de los parámetros que se tomaron en cuenta para la selección de los ocho taxones fúngicos	34
Tabla 14. Géneros identificados de los taxones fúngicos seleccionados	35
Tabla 15. Descripción morfo-cultural y microscópica de los taxones fúngicos identificados.....	36

Tabla 16. Combinaciones para la formación de los complejos enzimáticos.....	39
Tabla 17. Resumen de los mejores tratamientos por horas evaluadas en la producción de azúcares reductores	47

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de la α -amilasas.....	11
Figura 2. Mecanismo de acción de la β -amilasa.	13
Figura 3. Mecanismos de acción de las glucoamilasas.....	14
Figura 4. Crecimiento fúngico presentes en los cortes de oca y mashua.....	28
Figura 5. Crecimiento de los taxones fúngicos en medio YPS.....	32
Figura 6. Crecimiento de los taxones fúngicos en medio YPS.....	33
Figura 7. Cinética de crecimiento de los mejores complejos.....	41
Figura 8. Producción de glucosa por los tratamientos.	43
Figura 9. Producción de maltosa por los tratamientos.	44
Figura 10. Variación pH.....	49

Resumen

Anualmente en la industria de procesamiento de raíces y tubérculos se generan grandes cantidades de almidón, los cuales no poseen una disposición final adecuada. Una alternativa, constituye la biotransformación del almidón en carbohidratos más simples, que da valor agregado a una sustancia catalogada en primera instancia como desecho. El objetivo de la investigación fue aislar hongos filamentosos capaces de producir amilasas a partir de tubérculos de oca (*Oxalis tuberosa*) y mashua (*Tropaeolum tuberosum*), recolectados en el cantón Saquisilí.

Se utilizó el medio específico YPS adicionando 5% de almidón de yuca y 5% de almidón de papa. Se seleccionaron 8 taxones que se agruparon en 4 géneros: *Mucor*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichocladium*. Se estableció 28 tratamientos a los cuales se determinó la cinética de crecimiento y producción de azúcares por un tiempo de 120 horas.

Los tratamientos T11, T5, T16 y T27 fueron los de mayor producción de azúcares totales en 110 g/L de almidón. La cinética de crecimiento evidenció que los complejos presentaron una fase de adaptación menor a 24 horas. Se determinó que, a mayor cantidad de biomasa, mayor producción de azúcares. Se concluye que T5 y T11 fueron los mejores tratamientos, ya que presentaron una producción de 42,1% y 41,5% respectivamente. Por tal razón estos tratamientos tienen importancia para futuras investigaciones, ya que pueden tener aplicación a gran escala.

Palabras clave: Almidón, hidrólisis, azúcares, taxones fúngicos.

Abstract

The industry of processing roots and tubers generated large amounts of starch annually, which disposal is inappropriate. Starch biotransformation into simple carbohydrates is one alternative that added value to a substance listed in first instance as waste. The research objective was to isolate filamentous fungi that are able to produce amylase from oca (*Oxalis tuberosa*) and mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum*), collected in Saquisilí canton.

Specific YPS medium adding 5% of yucca starch and 5% of potato starch was used. Eight taxa grouped into 4 genera: *Mucor*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichocladium* were selected. Twenty-eight treatments were established in which growth kinetics and sugar production was determined in a period of 120 hours.

T11, T5, T16 and T27 treatments were the most productive of total sugars at 110 g/L of starch. Growth kinetics showed that the treatments had an adaptation phase of less than 24 hours. It was determined that, the more amount of biomass, the more production of sugar. We concluded that T5 and T11 were the best treatments, since they presented a production of 42.1% and 41.5%, respectively. And for this reason, these treatments are important for future research because they can be applied on a large scale.

Keywords: starch, hydrolysis, sugar, fungal taxa.

Introducción

La Biotecnología ha logrado grandes avances en las últimas décadas, un propósito esencial de la misma radica en desarrollar procedimientos que permitan el aislamiento, selección de organismos y/o sus partes, con fines industriales. Esto sumado a la tendencia actual, que busca una producción más limpia, han abierto un extenso campo para la elaboración de productos biológicos más estables, confiables y de bajo impacto ambiental.

Anualmente en el sector industrial se generan grandes cantidades de residuos orgánicos, que no poseen una disposición final adecuada. Este es el caso del almidón, catalogado como desecho en industrias de procesamiento de raíces y tubérculos como papa (*Solanum tuberosum*) o yuca (*Manihot esculenta*) (Prada, 2012, págs. 184-185). Este polisacárido puede ser reutilizado mediante un tratamiento con amilasas y ser convertido en sustancias de interés (Adrio & Demain, 2008, pág. 45), con lo que se obtendrían beneficios de los materiales considerados en principio como residuos.

La producción de enzimas ha permitido optimizar procesos, además de ser amigables con el medio ambiente. Estas se obtienen de microorganismos que a través de procesos evolutivos se han especializado en descomponer diferentes tipos de sustratos (Segura & Navarrete, 2012, pág. 26). Dentro de los más empleados se encuentran los hongos filamentosos, pues crecen con rapidez, excretan gran variedad de enzimas y su biomasa en forma de micelio puede separarse con facilidad de los caldos de cultivo (Viniestra, 2003, pág. 18).

Las amilasas son enzimas hidrolíticas que han sustituido a la hidrólisis química, ya que poseen mayor especificidad, proporcionan un mejor control de los procesos y no generan productos indeseables; por lo que son empleadas en la elaboración de

productos alimenticios, combustibles, medicamentos, detergentes, entre otros (Morales & Sánchez, 2004, pág. 44).

De ahí la importancia de entender y aprovechar la capacidad productora de las enzimas presentes en microorganismos como los hongos, a través de la investigación para el desarrollo de un enfoque productivo con el fin de descubrir nuevos usos y aplicaciones en el sector industrial, disminuyendo costos, daños ambientales y obteniendo productos con altos estándares de calidad.

En el presente trabajo de investigación se ha considerado el uso de tubérculos autóctonos, ricos en almidón, como lo son la oca (*Oxalis tuberosa*) y mashua (*Tropaeolum tuberosum*). De esa manera es de nuestro interés trabajar con tubérculos, que permitirán el crecimiento de hongos filamentosos capaces de producir amilasas. En tal virtud el trabajo tiene como objetivos: aislar y seleccionar al menos 8 taxones de hongos filamentosos con capacidad productora de amilasas a partir de tubérculos de oca y mashua recolectados en el cantón Saquisilí, utilizando técnicas microbiológicas selectivas; identificar y caracterizar con ayuda de técnicas taxonómicas a los taxones aislados; determinar la mayor capacidad de degradación del almidón ejercida por complejos enzimáticos conformados por 2 hongos mediante pruebas de azúcares reductores y determinar la cinética de crecimiento de los hongos en el complejo enzimático. De la misma manera, se propone como hipótesis alternativa que: al menos un complejo comprendido por 2 taxones de hongos filamentosos es capaz de degradar almidón y producir azúcares reductores; mientras la hipótesis nula plantea que los complejos comprendidos por 2 taxones de hongos filamentosos no degradan almidón y por ende no producen azúcares reductores.

Capítulo 1.

Marco conceptual

1.1. Raíces y Tubérculos Andinos (RTAs)

“Más de 25 especies de raíces y tubérculos fueron domesticados por las poblaciones americanas antes del siglo XV, de éstas, 17 fueron domesticadas en las duras condiciones de la región andina” (Espín, y otros, 2001, pág. 49). Sin embargo, las tendencias nacionales de producción y consumo indican que estos cultivos están en continuo declive, ya que son rubros que en la mayoría de casos están destinados para el autoconsumo y sólo los pequeños remanentes son destinados para la venta. Este contexto deslució el gran potencial de los RTAs, pues poseen altos valores nutricionales (carbohidratos, fibra, proteínas), que se plantean como alternativas para la transformación industrial, fuente de metabolitos, entre otras (Barrera, Tapia, & Montero, 2004, pág. 13).

Entre los RTAs se incluyen la papa (*Solanum tuberosum*), melloco (*Ullucus tuberosus*), oca (*Oxalis tuberosa*), zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), achira (*Canna edulis*), miso (*Mirabilis expansa*), jícama (*Smallanthus sonchifolius*) (Espín, y otros, 2001, págs. 49-50), (Barrera, Tapia, & Montero, 2004, págs. 6-9).

Las áreas de mayor producción en Ecuador, se localizan principalmente en la región Sierra, en las zonas sub-páramo seco y sub-páramo húmedo. Entre los sitios de mayor producción se encuentran: Saquisilí, San Gabriel, Cristóbal Colón, Cebadas, Pilahuín, Cañar y Saraguro. Dentro los principales ecotipos de oca producidos se mencionan: blanco, amarillo y cambray (amarillo con pintas rosadas); mientras que en mashua se encuentran el ecotipo amarillo y sucusu mashua (amarillo con pintas

rosado-rojas) (Espinosa, Vaca, Abad, & Crissman, 1996, págs. 17-88). La descripción taxonómica de la oca y mashua se muestra en la tabla 1.

1.2. Oca (*Oxalis tuberosa* Molina 1810)

“La oca es una planta herbácea, perenne, con tallos erectos de donde nacen numerosos estolones que presentan engrosamientos terminales (tubérculos), que tienen formas alargadas, cilíndricas o cónicas” (Barrera, Tapia, & Montero, 2004, pág. 5). Presenta innumerables nombres comunes, por ejemplo: “miquichi”, “huasisai” “cuiba”, “quiba” o “ibia”. “Crece en suelos pobres y es tolerante a climas fríos. Su sabor dulce, consistencia harinosa y su alto contenido de proteínas hacen de este tubérculo un alimento muy nutritivo, popular entre la población andina” (Icochea, 1997, pág. 57).

1.3. Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón 1802)

“La mashua es una planta anual, rústica, herbácea, que se desarrolla bien a temperaturas bajas y en suelos pobres, además, es resistente a nematodos y otras plagas, razón por la cual, se siembra regularmente como cerco de protección de otros cultivos” (Manrique, y otros, 2013, pág. 1). Presenta innumerables nombres comunes, por ejemplo: “mashwua” “añu”, “isaño”, “cubio”, “yanaoca”. “Sus tubérculos tienen un elevado contenido de fibra, proteínas, carbohidratos, ácido ascórbico y calorías, asimismo contienen glucosinolatos, que al ser hidrolizados se convierten en isotiocianatos, responsables de otorgar el típico sabor picante” (Manrique, y otros, 2013, pág. 1).

Tabla 1.

Descripción taxonómica de la mashua y oca

	Oca	Mashua
Reino:	Plantae	
Superdivisión:	Embryophyta	
División:	Tracheophyta	
Clase:	Magnoliopsida	
Superorden:	Rosanae	
Orden:	Brassicales	Oxalidales
Familia:	Tropaeolaceae	Oxalidaceae
Género:	Tropaeolum	Oxalis
Especie:	<i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón 1802	<i>Oxalis tuberosa</i> Molina 1810

Nota: Adaptado de *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS, 2015), por J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

Son varios los factores que influyen en la composición química de la oca y mashua, entre los principales a tener en cuenta se tienen: el tipo de suelo, clima, variabilidad genética, cantidad de agua, prácticas culturales (Espín, Villacrés, & Brito, 2004, págs. 91-92). En la siguiente tabla se aprecia la composición química de la oca y mashua.

Tabla 2.

Composición química de diez líneas promisorias de mashua y oca, pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP)

Parámetro	Mashua	Oca
Humedad (%)	88,70	77,73
Cenizas (%)	4,81	3,39
Proteína (%)	9,17	4,60
Fibra (%)	5,86	2,16
Carbohidrato Total (%)	75,40	88,19
Ca (%)	0,006	0,012
P (%)	0,32	0,14
Mg (%)	0,11	0,0065
K (%)	1,99	1,30
Cu (ppm)	9,00	2,25
Fe (ppm)	42,00	48,85
Mn (ppm)	7,00	5,35
Zn (ppm)	48,00	5,95
Almidón (%)	46,92	42,17
Azúcar Total (%)	42,81	9,68
Azúcares reductores (%)	35,83	7,62

Nota: Datos expresados en base seca y muestra entera. Basado en el valor promedio de 30 determinaciones por cada análisis. Adaptado de *Composición Química, Valor Nutricional y Usos Potenciales de siete especies de Raíces y Tubérculos Andinos* (Espín, y otros, 2001, pág. 55) por J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

1.4. El almidón

“Es el principal carbohidrato de reserva de los vegetales; está organizado en gránulos, cuya morfología, composición química y estructura son características de cada especie. Representa una fracción importante en gran número de productos agrícolas como: cereales (30-80%), leguminosas (25-50%), tubérculos (60-90%), entre otras” (Bello & Paredes, 1999, págs. 29-33).

La forma y tamaño del gránulo de almidón son determinantes en su procesamiento, ya que afecta la solubilidad en el medio y el poder de hidratación, del cual depende para la formación de una única fase homogénea (Medina & Salas, 2008, pág. 57). En la siguiente tabla se evidencia el tamaño y forma de los gránulos de la oca y mashua (Espín, y otros, 2001, pág. 58).

Tabla 3.

Tamaño y forma de los gránulos de almidón de oca y mashua

Tubérculo/ Raíz	Eje mayor (micras)	Eje menor (micras)	Forma
Oca	29,49 ± 2,48	20,13 ± 2,08	Ovoide
Mashua	15,60 ± 2,41	12,47 ± 1,87	Esférica

Nota: Basados en el tamaño y forma de los gránulos de la oca y la mashua, en base a la medición del diámetro de los ejes mayor y menor de 50 gránulos. Adaptado de *Composición Química, Valor Nutricional y Usos Potenciales de siete especies de Raíces y Tubérculos Andinos* (Espín, y otros, 2001, pág. 58) por J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

El almidón está constituido por dos moléculas: amilosa y amilopectina, que se encuentran formando un estado policristalino, que provoca insolubilidad en agua fría

y la resistencia a tratamientos químicos y enzimáticos (Mitsuiki, y otros, 2005, pág. 410).

Las moléculas de amilosa suponen aproximadamente la cuarta parte del almidón, son cadenas lineales de glucosa con uniones glicosídicas α -1,4. Las moléculas de amilopectina suponen aproximadamente tres cuartos de los polímeros de almidón. La cadena de glucosa de la amilopectina contiene uniones α -1,4 con ramificaciones α -1,6 cada 15 a 30 unidades de glucosa de la cadena (Vaclavick, 2002, págs. 46-48). En la siguiente tabla se muestra la relación amilosa/amilopectina de varios RTAs.

Tabla 4.

Contenido de amilosa/amilopectina, en el almidón de raíces y tubérculos andinos

Almidón	Porcentaje de amilosa (%)	Porcentaje de amilopectina (%)
Oca	29	71
Meloco	26	74
Mashua	27	73
Miso	21	79
Zanahoria Blanca	20	80
Papa	23	77
Achira	26	74

Nota: Tomado de *Composición Química, Valor Nutricional y Usos Potenciales de siete especies de Raíces y Tubérculos Andinos* (Espín, y otros, 2001, pág. 59).

Casi todas las industrias han encontrado algún uso para el almidón, ya que es un material barato y abundante (Calvo, 2010, párr. 2). Es utilizado como agente espesante, aglutinante, encapsulante, saborizante, estabilizante, sustituto de la grasa,

entre otros (Vaclavick, 2002, pág. 57), (Espinosa V. , 2008, pág. 19). Asimismo, utilizando enzimas específicas es usado como materia prima para obtener dextrinas, jarabes de glucosa, fructosa y de alta fructosa que son utilizados en alimentos, bebidas y productos farmacéuticos debido a su bajo valor calórico (CODIPSA, 2015). Además se pueden obtener almidones modificados, que presenten propiedades de acuerdo a las exigencias industriales como: almidones ácidos, almidones pre-gelatinizados, almidones que se hinchan en agua fría, entre otros (Vaclavick, 2002, págs. 56-57), (Badui, 2006, pág. 89). También se utiliza como sustrato para obtener enzimas industriales como α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasas, entre otras (CAR/PL, 2003, pág. 28).

1.5. Amilasas

Las amilasas son enzimas encargadas de hidrolizar los enlaces glucosídicos del almidón, generando productos de menor tamaño como dextrinas, o a su vez llegando a su forma monomérica original, dependiendo del grado de hidrólisis (Peña, 2009, pág. 33). Entre las más conocidas y estudiadas se mencionan a la alfa amilasa, beta amilasa y glucoamilasas (Calvo, 2010, págs. 12-13), (Mera & Carrera, 2005, pág. 1). En la siguiente tabla, se presentan resultados de la hidrólisis del almidón mediante el uso de enzimas amilasas, simulando los procesos digestivos que ocurren en los organismos (Espín, y otros, 2001, pág. 59).

Tabla 5.

Comparación del porcentaje de almidón digerible de 5 especies de raíces y tubérculos andinos

Especie	% Almidón Digerible
Oca	91,0
Zanahoria Blanca	96,0
Meloco	92,0
Mashua	96,0
Miso	97,0
Papa	90,0
Trigo	98,0

Nota: Tomado de *Composición Química, Valor Nutricional y Usos Potenciales de siete especies de Raíces y Tubérculos Andinos* (Espín, y otros, 2001, pág. 59).

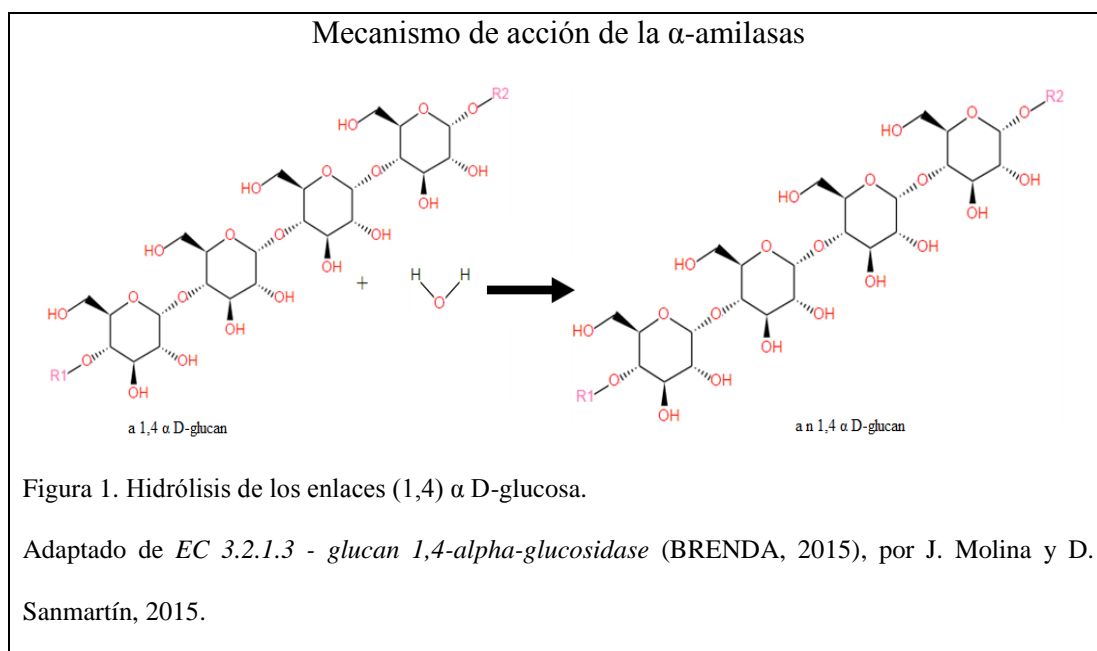
1.5.1. α -amilasa (EC 3.2.1.1)¹

“Son endo-enzimas también conocidas como 1,4- α -D-glucan-glucano hidrolasas” (IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2015), que actúan hidrolizando al azar los enlaces α 1-4 glucosídicos del interior del almidón, generando maltotriosa y maltosa a partir de la amilosa; y dextrinas, glucosa y maltosa a partir de la amilopectina (Peña, 2009), (Tripathi, Leggio, Mansfeld, Ulbrich-Hofmann, & Kayastha, 2007).

Las α -amilasas se pueden agrupar según el grado de hidrólisis en dos categorías: α -amilasas sacarificantes, que producen azúcares libres catalizando al almidón entre un 50-60%, y α -amilasas de licuefacción que descomponen al almidón en un 30-40%,

¹ Nomenclatura para la identificación de las enzimas basadas en los Números EC (Enzyme Commission numbers) desarrolladas por Biology Internacional Union of Biochemistry and Molecular IUBMB.

pero no producen azúcares libres (Leitão, 2011, pág. 6), (Tomasik & Horton, 2012, pág. 80).



Son dependientes de calcio, aunque el catión no esté integrado en el centro activo de la enzima, se encuentra fuertemente unido a la enzima y sólo pueden ser removidos a pH bajos por el uso de agentes quelantes, su completa remoción conlleva a una pérdida total de la actividad enzimática (Pedroza, 1999, págs. 18-19).

Son generalmente estables en un rango de pH 5,5 – 8,0, siendo 6,5 el valor óptimo para la α -amilasa bacteriana y pancreática (UChile, 2015, párr. 9). Según la temperatura a la que actúan, las α -amilasas pueden ser termoestables y/o termolábiles; las α -amilasas termoestables son las actúan en un rango de 60-110°C y la mayoría de ellas son de origen bacteriano. Mientras que las termolábiles actúan entre 20-55 °C y son de origen fúngico principalmente (Fogarty & Kelly, 1990, págs. 72-76). En la siguiente tabla se muestran diversas fuentes de α -amilasas.

Tabla 6.

Fuentes de α -amilasas microbianas

Fuente de Enzima	pH Óptimo	Temperatura Óptima (°C)	Referencia
<i>Bacillus megaterium</i>	5,5	75	David <i>et al.</i> (1987)
<i>Bacillus subtilis</i>	6,0-7,0	-	Orlando <i>et al.</i> (1983)
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	7,0	80	Obi & Odibo (1984)
<i>Candida antarctica</i>	4,2	62	De Mot & Verachtert (1987)
<i>Aspergillus kawachii I</i>	4,0-5,0	70	Mikami <i>et al.</i> (1987)
<i>Aspergillus kawachii II</i>	5,0	70	Mikami <i>et al.</i> (1987)
<i>Aspergillus awamori</i>	4,8-5,0	50	Bhella & Altosaar (1985)
<i>Paecilomyces</i> sp.	4,0	45	Zenin & Park (1983)
<i>Penicillium expansum</i>	4,5	60	Doyle <i>et al.</i> (1989)
<i>Penicillium amagasakiense</i>	4,5	50	Doyle <i>et al.</i> (1988)

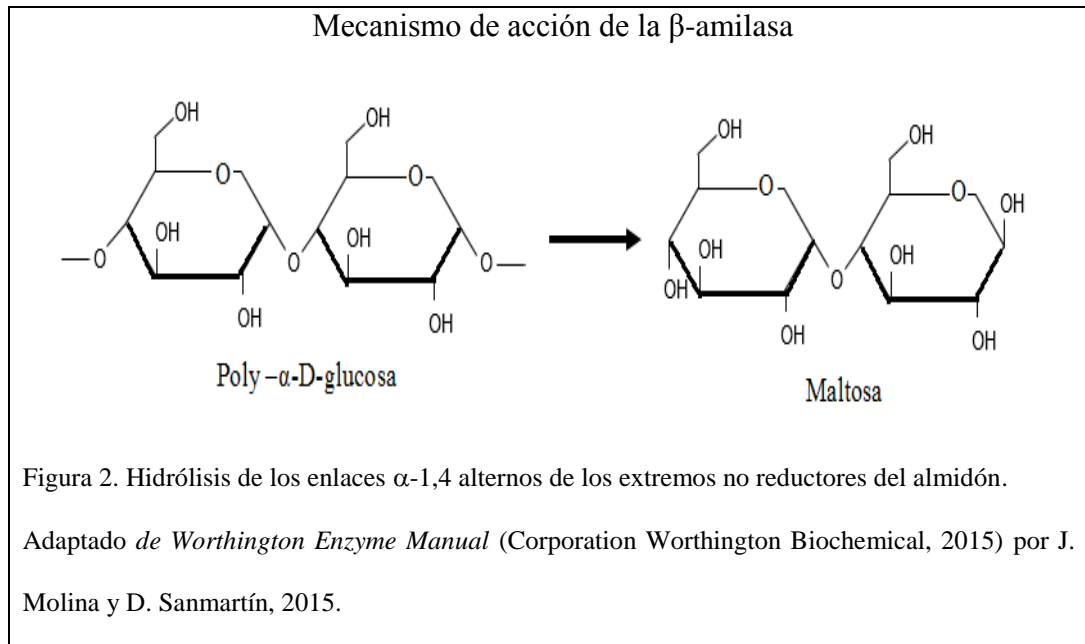
Nota: Adaptado de *Recent Advances in Microbial Amylases* (Fogarty & Kelly, 1990, pág. 74) por J.

Molina y D. Sanmartín, 2015.

1.5.2. β -amilasa (EC 3.2.1.2)

“Las β -amilasas son exo-enzimas también conocidas como 4- α -D-glucan-maltohidrolasas” (IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2015), que catalizan los enlaces α -1,4 alternos de los extremos no reductores del almidón causando la inversión de la configuración anomérica de la maltosa generada de alfa a beta, además esta enzima es incapaz de hidrolizar los

enlaces α -1,6 de la amilopectina, por lo que la degradación de estos sustratos es incompleta, produciendo 50-60% de β -maltosa y β -dextrina limitante (Leitão, 2011, pág. 6), (Kavanagh, 2011, pág. 195). También constituye el segundo paso para la producción de maltosa y está precedida por la licuefacción del almidón con α -amilasa (Pandey, y otros, 2000, pág. 98).

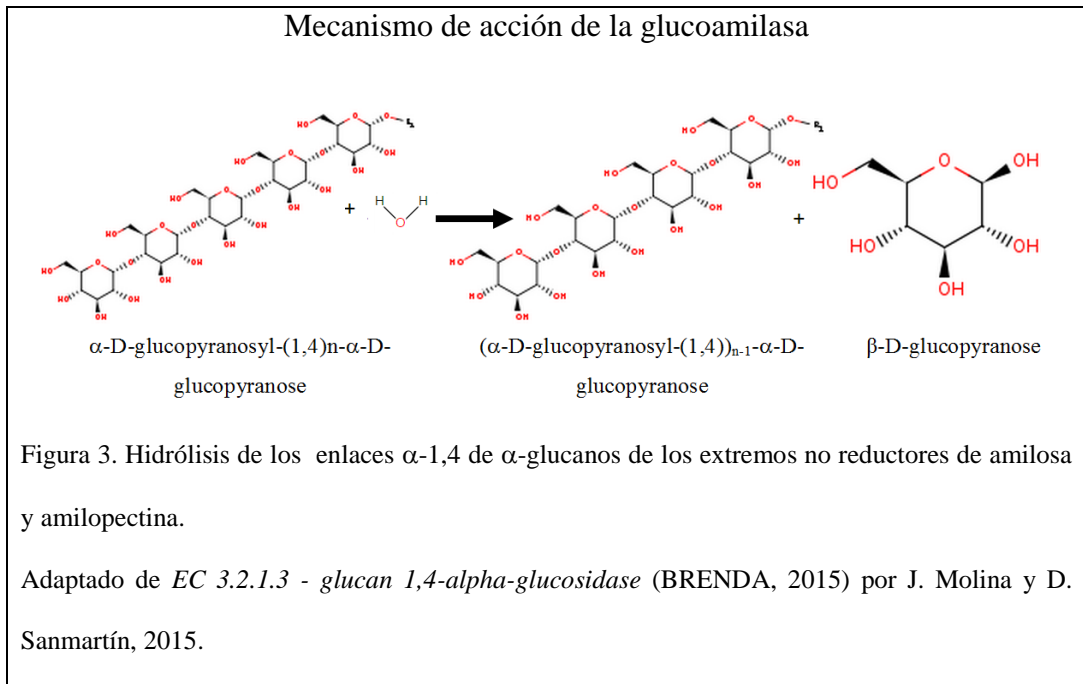


La β -amilasa no necesita de activador para actuar, pero es menos estable al calor, inactivándose a 70°C por 15 minutos, la temperatura óptima se encuentra alrededor de los 50-60 °C y su pH óptimo es de 5,5 (García, Quintero, & López, 2004, pág. 277), (UChile, 2015). Puede ser inhibida por varios compuestos, como el ácido indol-3-acético o el ácido ascórbico (Tomasik & Horton, 2012, págs. 99-100).

1.5.3. Glucoamilasa (EC 3.2.1.3)

“Las glucoamilasas son exo-amilasas también conocidas como 4- α -D-glucan-glucohidrolasas” (IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2015), actúan en los enlaces α -1,4 de α -glucanos de los extremos no

reductores de amilosa y amilopectina, además de los enlaces α -1,6 de amilopectina, a un ritmo muy lento. Durante la catálisis degradan preferentemente polisacáridos de alto peso molecular, dando como producto principal β -glucosa, también maltosa y β -dextrina limitante (Leitão, 2011, pág. 6), (Kavanagh, 2011, págs. 195-196), (Pandey, y otros, 2000, pág. 137).



La glucoamilasa se produce casi exclusivamente en los hongos y generalmente son secretadas como enzimas extracelulares. Tiene una actividad óptima en el intervalo de pH de 3,6 a 6,5 y presenta una temperatura óptima en el rango de 40 a 60°C (Kulp, 1975, pág. 76). En la siguiente tabla se encuentran diversas fuentes de glucoamilasas.

Tabla 7.

Fuentes de glucoamilasas microbianas

Fuente de Enzima	pH Óptimo	Temperatura Óptima (°C)	Referencia
<i>Bacillus sp. APC-9603</i>	4,5-6,0	60-70	Kawai <i>et al.</i> (1993)
<i>Thermus thermophilus</i>	6,2	85	Zdziebo & Synowiecki (2002)
<i>Aspergillus awamori</i>	-	55	Nigan & Singh (1995)
<i>Aspergillus niger</i>	5,5	55	Nigan & Singh (1995)
<i>Mucor rouxii</i>	-	50-60	Nigan & Singh (1995)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	5	65	Kobayashi <i>et al.</i> (2003)
<i>Penicillium oxalicum</i>	-	50	Nigan & Singh (1995)

Nota: Adaptado de *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Tomasik & Horton, 2012, pág. 113) por J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

1.6. Aplicaciones de las amilasas

La aplicación de las enzimas en el campo industrial está creciendo día a día, la α -amilasa, β -amilasa y glucoamilasa están entre las enzimas más importantes en el campo biotecnológico, debido a su aplicación en procesos industriales como textiles, papel, alimentación y fermentación (Pandey, y otros, 2000, pág. 135).

En la industria de alimentos son empleadas las α -amilasas en la elaboración del pan, debido a que rompen los enlaces del almidón presentes en la harina, produciendo azúcares simples, lo que favorece a las levaduras en la degradación, promoviendo la producción de gas y acelerando el proceso de fermentación, dando sabor al pan, y aumento de la masa (Souza & Magalhães, 2010, pág. 857), además retrasa el

envejecimiento en la panificación (Sivaramakrishnan, Gangadharan, Nampoothir, Soccol, & Pandey, 2006, pág. 181).

Las glucoamilasas son utilizadas en la maduración de frutas, por su conversión del almidón a glucosa, obteniendo un sabor exquisito en los zumos, volviéndolas más dulces, además reducen la turbidez (Sivaramakrishnan, Gangadharan, Nampoothir, Soccol, & Pandey, 2006, pág. 181). La β -amilasa es usada en la industria de alimentos y bebidas para la conversión del almidón a maltosa (Leitão, 2011, pág. 6). También son aplicadas como aditivos para eliminar impurezas a base de almidón, reducen la viscosidad del almidón para el revestimiento apropiado del papel, producción de jarabes de glucosa, glucosa cristalina, solubilización y sacarificación del almidón para la fermentación del alcohol en la industria cervecera (Sivaramakrishnan, Gangadharan, Nampoothir, Soccol, & Pandey, 2006, pág. 186).

1.7. Hongos filamentosos productores de amilasas

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas, quimioheterótrofos. Su estructura consta de un complejo llamado micelio, que a su vez está constituido por múltiples filamentos o hifas; presentan una pared celular rígida cuyo componente principal es la quitina (Arenas, 2003, pág. 17). Su reproducción se da por esporas, que pueden ser de origen sexual o asexual; las esporas de origen sexual son haploides y presentan un núcleo derivado de las células progenitoras; mientras las esporas asexuales se producen por simple diferenciación en la hifa de crecimiento (Moreno Z. , 2000), (Tortora, Funke, & Case, 2007, págs. 345-348), (Arias & Piñeros, 2008, pág. 16).

Los hongos filamentosos son empleados para obtener sustancias de interés como las enzimas, ya que son relativamente fáciles de manipular y cultivar a gran escala, además pueden adaptarse a condiciones mucho más severas que otros microorganismos (Tortora, Funke, & Case, 2007, pág. 354). Existen alrededor de ciento veinte mil especies de hongos aislados, muchos de ellos seleccionados por su capacidad de generar productos industriales importantes en el campo biotecnológico (Leitão, 2011). Aunque hay una gran variedad de hongos filamentosos capaces de producir amilasas, son pocos los taxones de los cuales se pueden obtener amilasas eficientes a nivel industrial. Dentro de los géneros más importantes se encuentran: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Le Mense, Corman, Van Lanen, & Langlykke, 1947, pág. 159), (Windish & Mhatre, 1965, págs. 273-279). Los hongos generan preferentemente exo-amilasas, debido a que degradan el almidón fuera de la célula, rompiendo las cadenas lineales y ramificadas, obteniendo cadenas cortas de glucosa que pueden ser absorbidas por los hongos (Ekunsaumi, 2007, pág. 1).

Cada tipo de hongo está encargado de producir diferentes tipos de amilasas, donde cada una cumple con una función específica. Los hongos productores de amilasas son importantes debido a sus procesos naturales en la degradación e hidrólisis de polisacáridos. En las últimas décadas se han implementado técnicas para la producción de amilasas aprovechando la gran cantidad de almidón existente en la naturaleza, además son una gran fuente de carbono y energía, siendo un ideal sustrato para los hongos, por lo que son capaces de producir una gran variedad de enzimas para degradar el almidón (Leitão, 2011).

Capítulo 2.

Materiales y métodos

2.1. Localización

Esta investigación se realizó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida, de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito, Campus El Girón.

2.2. Muestreo de los tubérculos de oca y mashua

La zona de muestreo escogida fue la parroquia de Cochapamba, ya que es una de las zonas con mayor producción de oca y mashua a nivel nacional. Las características de esta parroquia se encuentran en la siguiente tabla. De esta parroquia, se eligieron cuatro zonas de recolección, al azar, recolectando 500 gramos de cada muestra.

Para el posicionamiento geográfico se utilizó un GPS Garmin Etrex 30. Las muestras fueron trasladadas a los laboratorios de Ciencias de la Vida, en bolsas de plástico, y depositadas en un contenedor, por un tiempo aproximado de tres horas, hasta la preparación de las muestras para la inducción a contaminación ambiental.

Tabla 8.

Características de la parroquia Cochapamba, Saquisilí, Ecuador

Extensión	152 Km ²
Altitud promedio	3500 m.s.n.m
Vegetación	Páramo
Temperatura	6-12 °C
Población	Netamente indígena
Idioma	Quichua
Agricultura	Cebolla en rama, papa, oca, mashua, melloco
Ganadería	Ovino y Vacuno

Nota: Tomado de *Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquia Rural Cochapamba* (GAD Cochapamba, C, 2015).

2.3. Inducción a contaminación microbiana ambiental

Los tubérculos fueron lavados y cortados en tamaños entre 2-5 milímetros de grosor, luego se colocaron en recipientes plásticos y se ubicaron en lugares que presenten alta humedad y escasa luz, brindando las condiciones adecuadas para el crecimiento de hongos (Furci, 2007, pág. 22), dejándolos por un lapso de 15 días. Transcurrido el tiempo, se realizó una caracterización de la contaminación microbiana aparente de los cortes, los cuales presentaron estructuras fúngicas que se detallan en el anexo 1.

2.4. Obtención de biomasa en sustrato líquido

De la fase de inducción, se seleccionaron los recipientes con mayor contaminación aparente, se pesaron 20 gramos de los cortes de cada recipiente y se inocularon en frascos que contenían 250 ml de medio líquido constituido de YPS (Yeast Peptone Soluble Starch) modificado, adicionando 5% de Almidón de Yuca (*Manihot esculenta*) y 5% de Almidón de Papa (*Solanum tuberosum*), suministrando 110 g/L de almidón total. Los componentes del medio YPS modificado se muestran en el anexo 2. Posteriormente, fueron colocados en una incubadora con agitación Tecnal TE-420 a 120 rpm, y temperatura de 30 °C (Pasin, Benassi, Moreira, Jorge, & Polizeli, 2014, pág. 485), por un lapso de 120 horas.

A partir de las 48 horas de incubación, se realizaron pruebas para la determinación de producción de azúcares reductores utilizando el reactivo de Fehling (Múnera, 2008, págs. 11-12), y la prueba de Lugol para determinar la degradación del almidón (Moreno P. , 2014, pág. 2).

2.5. Aislamiento de taxones de hongos filamentosos

Se utilizaron tres medios específicos para el aislamiento de los taxones, a los cuales se adicionó antibióticos, como se muestra en la siguiente tabla, con el fin de inhibir el crecimiento de otros microorganismos presentes en las muestras, ya que las condiciones de crecimiento de los hongos filamentosos también son apropiadas para el crecimiento microbiano. La preparación de los medios se encuentra en el anexo 3.

Tabla 9.

Medios de cultivo empleados para el aislamiento

Medio de Cultivo	Antibiótico empleado	Código asignado
SDA (Sabouraud Dextrose Agar)	Cloranfenicol	SDA+C
SDA (Sabouraud Dextrose Agar)	Cloranfenicol y Gentamicina	SDA+C+G
YPS (Yeast Peptone Soluble Starch)	Cloranfenicol y Gentamicina	YPS+C+G

Nota: Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

Se tomó un mililitro de cada medio líquido fermentativo y se pasó a los medios sólidos utilizando asas de Digrafsky para su correcta diseminación. Se dejó en incubación a 30 °C, para lo cual se utilizó una incubadora Memmert BE-400.

2.6. Caracterización microbiológica y purificación de taxones

Se caracterizó los taxones obtenidos y fueron agrupados según las características morfo-culturales aparentes, las cuales se encuentran en el anexo 4. Una vez purificados, se evaluó la capacidad de asimilación del taxón fúngico, en función del

tiempo y velocidad de crecimiento en el medio específico YPS, que consistió en la siembra de los hongos purificados y la medición del crecimiento cada 24 horas hasta su máximo crecimiento, para lo cual se utilizó un calibrador pie de rey digital. Cabe mencionar que se asignó un código para la fácil identificación y trazabilidad de los taxones fúngicos, los que se detallan a continuación: código del lugar de muestreo, código del medio sólido con antibiótico y código del taxón aislado.

Se asignaron los siguientes códigos a las zonas de muestreo de la Parroquia Cochapamba: C1, C2, C3, C4, C5 y C6, además se asignó la letra O para los tubérculos de oca y M para los tubérculos de mashua. Con relación al medio sólido con antibióticos, los códigos asignados se indican en la tabla 9. El código del taxón aislado se obtuvo de la caracterización microbiológica, donde se señaló las posibles colonias con un número. Por ejemplo, en la codificación C1M-SDA+C-2, el taxón fúngico se obtuvo de la zona Cocha 2, del medio SDA adicionado cloranfenicol, y corresponde al segundo taxón encontrado en dicha caja.

2.7. Selección de los mejores taxones

Para realizar la selección de los ocho mejores taxones se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: Resultados de la evaluación de la formación de azúcares reductores (Prueba Fehling), y la degradación del almidón (Prueba Lugol); evaluación de la capacidad de asimilación de los taxones aislados en función del tiempo y velocidad de crecimiento; prioridad al sustrato específico con almidón (YPS).

2.8. Identificación de los taxones seleccionados.

Se seleccionaron los ocho mejores taxones y se procedió a realizar la identificación a nivel de género, tomando en cuenta: morfología, características en el medio de cultivo y características a nivel microscópico, para lo cual se utilizó la técnica de cinta adhesiva, montaje por disección, y microcultivo (Koneman, y otros, 2008, págs. 1108-1117).

Asimismo, se utilizaron claves taxonómicas, en las que se tuvo en cuenta las características macro y microscópicas. La literatura empleada fue: Barnett & Hunter, (1972); Watanabe, (2002); Koneman, y otros, (2008). Igualmente, se emplearon bases de datos de organizaciones internacionales como: Mycology Online, (2016), Universidad de Antioquia (2011), Marine Lignicolours Fungi (2000), Telmeds (2009), Tormo-Universidad de Extremadura (2014). Para la identificación macroscópica se usó como medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y para la observación microscópica, se empleó un microscopio con cámara Micros Austria MCX-100.

2.9. Formación de complejos enzimáticos fúngicos

Los complejos enzimáticos estuvieron conformados por dos taxones fúngicos. Primero se realizó un raspado de cada uno de los hongos seleccionados y se colocó en 10 ml de agua destilada estéril, luego se llevó a agitación en vórtex por 15 minutos y se incubó por 2 horas. Posteriormente se determinó la cantidad de biomasa a colocar en el complejo utilizando el método de Neubauer (Cañedo & Ames, 2004, págs. 40-42). Se aplicó las fórmulas presentes en el anexo 6a para el conteo de esporas. Finalmente, se tomó 1,5 ml de cada suspensión del hongo y se colocó en 250 ml del medio líquido fermentativo (Carrera, 2009, pág. 55). El medio líquido

fermentativo estuvo conformado por medio YPS modificado, más 5% de Almidón de Yuca y 5% de Almidón de Papa, suministrando un total de 110 g/L de almidón.

2.10. Determinación de la cinética de crecimiento fúngico en el complejo enzimático

La cinética de crecimiento fue determinada por la técnica de peso seco. Se determinó cada 24 horas por 5 días, para lo cual, se retiraron alícuotas de 8 ml del medio fermentativo en tubos Falcon, se centrifugó a 4000 rpm en una centrífuga Hermle-7400 durante 20 minutos, se secó a 80 °C en una estufa Esco OFA-54-8 por 24 horas, finalmente se pesaron las muestras hasta peso constante (Konsoula & Liakopoulou, 2007, pág. 152), (Wang, 2009). La fórmula empleada para cuantificar el peso seco se encuentra en el anexo 6b.

2.11. Determinación de la capacidad de degradación por cuantificación de azúcares reductores

Se determinó por la formación de azúcares reductores mediante la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS). Se tomó 1 ml del medio fermentativo, cada 24 horas durante 5 días (Arratia, 2009, pág. 23). El proceso inició con una dilución 1 en 10 en agua bidestilada, debido a la alta viscosidad de las muestras, luego se colocó 1 ml de la muestra diluida y se centrifugó a 4000 rpm en una centrífuga Gemmy PLC-05 por 20 minutos. Posteriormente, se recuperó sólo el sobrenadante y se añadió 1 ml de DNS. El tubo con la mezcla, se calentó por 5 minutos en agua caliente y después se puso en agua fría, por el mismo lapso de tiempo (Bernfeld, 1955, págs. 149-150). Finalmente, las muestras se leyeron a una longitud de onda de 540 nm para glucosa y 520 nm para maltosa, utilizando un espectrofotómetro UV Shimadzu 1240 mini.

Para determinar la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra, se elaboró una curva de calibración utilizando como referencia glucosa y maltosa, que se encuentran en el anexo 7.

2.12. Medición de pH

La medición del pH de los complejos fúngicos se realizó cada 24 horas, durante 5 días, a partir de la inoculación en el medio líquido fermentativo, utilizando como tiempo inicial, el medio de cultivo puro. Se empleó un pH-metro Mettler Toledo SevenMulti, que previamente se calibró con los buffers pH 4, pH 7 y pH 10.

2.13. Conservación de los taxones

Los taxones se preservaron por crioconservación al utilizar el sistema de perlas CryoBank. El proceso se inició al retirar una muestra concentrada del hongo y colocarla en un vial que contiene el medio conservante, posteriormente se llevó a agitación en un vórtex por 1 minuto. Finalmente, con la ayuda de una aguja se removió el medio conservante que contiene el vial y se almacenó en un congelador New Brunswick C340 a una temperatura de -80 °C.

Para la activación de los taxones, se sacó una perla del vial usando una aguja estéril, y se pasó sobre la superficie del agar. Finalmente se desecha la perla utilizada y se devuelve el vial al congelador (Copan, 2015, pág. 1).

2.14. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó una estadística descriptiva utilizando el programa R versión 3.2.3, con lo que se determinó si existe una diferencia significativa entre los sustratos evaluados y el tiempo de producción de las amilasas.

Se empleó una prueba de Levene, para la determinación de la homogeneidad de los datos, además de un análisis de varianza, seguido de una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. De acuerdo a la prueba de Tukey los datos se agruparon y se seleccionan los mejores resultados, en base a las diferencias significativas menores a 0,05 para cada variable.

Capítulo 3.

Resultados y discusión

3.1. Muestreo de los tubérculos de Oca y Mashua

El posicionamiento geográfico de las cuatro zonas de muestreo, seleccionadas en la parroquia Cochapamba, cantón Saquisilí se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 10.

Posicionamiento geográfico de las zonas de muestreo de los tubérculos de oca y mashua, Cochapamba, Saquisilí

Código Muestreo	Tubérculo Muestreado	Altitud (m.s.n.m)	Coordenadas UTM (Universal Transversal de Mercator)	Observaciones
Cocha 1 - "C1"	Oca y Mashua	3638	17M 0750144 UTM 9907304	Cultivo orgánico
Cocha 2 - "C2"	Oca y Mashua	3469	17M 0750142 UTM 9907101	Cultivo orgánico, mashua presenta hongos
Cocha 3 - "C3"	Oca	3658	17M 0750097 UTM 9906860	Cultivo orgánico
Cocha 4 - "C4"	Oca	3680	17M 0750091 UTM 9907607	Cultivo orgánico
Cocha 5 - "C5"	Mashua	3718	17M 0749757 UTM 9907509	Uso de fertilizantes químicos
Cocha 6 - "C6"	Mashua	3692	17M 0749863 UTM 9907387	Cultivo orgánico

Nota: Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

Como se observa en la tabla, los tubérculos muestreados proceden tanto de cultivos orgánicos como de cultivos con adición de fertilizantes químicos. Esto es de particular interés, pues si bien la aplicación de fertilizantes aumenta la productividad de los cultivos, también supone graves consecuencias para el ambiente y los seres humanos. Barreto (2012) y Devaney (2013) mencionan que el uso desmedido de fertilizantes causa la erosión, salinización, acidez e infertilidad del suelo. Asimismo, Cubero y Vieira (1999), mencionan que sus componentes se pueden filtrar en el suelo, contaminando las fuentes de agua; o pueden volatilizarse, produciendo gases responsables del efecto invernadero. Ramón y Rodas (2007), mencionan que el uso de fertilizantes aumenta el riesgo de contraer enfermedades en los seres humanos por la ingestión de alimentos con alto contenido de metales pesados. Según Pérez, Rebollido y Martínez (2010) y Aruani y otros (2012), los cultivos orgánicos favorecen la actividad enzimática de los hongos filamentosos, ya que pueden descomponer y colonizar de mejor manera los suelos, aumentando la diversidad microbiana.

3.2. Inducción a contaminación microbiana ambiental

La mayor parte de la contaminación microbiana se debe a taxones fúngicos que a simple vista eran de color verde, blanco, café y gris, como se observan en la siguiente figura; confirmando que los hongos filamentosos preferentemente se desarrollan en lugares oscuros y húmedos (Furci, 2007, pág. 22).

Crecimiento fúngico presente en los cortes de oca y mashua

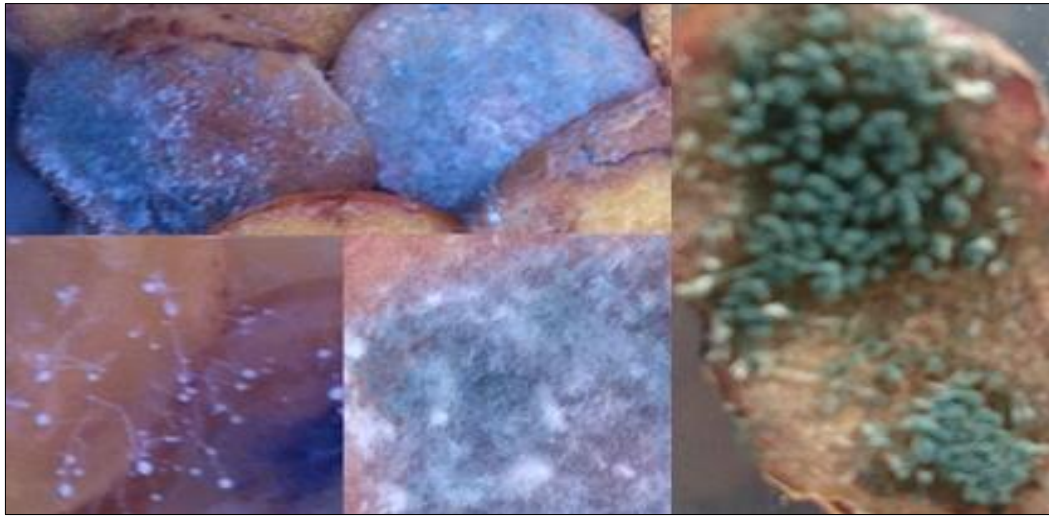


Figura 4. Crecimiento fúngico durante 15 días en los cortes de oca y mashua.

Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

Ames (1997) menciona que los hongos más frecuentes en suelos corresponden a los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, que presentan rápido crecimiento miceliar, de color blanco o gris, con esporangióforos largos y esporas abundantes. Otros géneros comunes son *Penicillium* y *Aspergillus* que se manifiestan con crecimientos aterciopelados de color verdoso, gris o gris azulado; con fiálides que forman una estructura ramificada. Otro género reportado es *Fusarium*, que muestra micelio de color blanco a café.

3.3. Obtención de biomasa en sustrato líquido

Las pruebas demostraron de manera cualitativa como a medida que pasaban las horas, ocurría una mayor degradación del almidón y se incrementaba la producción de azúcares reductores. En las siguientes tablas se evidencian los resultados de la prueba de Fehling y prueba de Lugol, respectivamente.

Tabla 11.

Resultados de la Evaluación de Azúcares Reductores (Prueba de Fehling)

Código chip		Nivel de producción de Cu ₂ O		
		Día 3	Día 4	Día 5
C2M	1	++	+++	+++
	2	+	++	+++
C2O	1	-	+	-
	2	+	+	+
C1O	1	+	++	++
	2	++	+++	+++
C1M	1	++	++	+++
	2	++	+++	+++
C5M	1	-	-	-
	2	-	-	-
C6M	1	+	-	-
	2	+	-	-
C3O	1	+	++	++
	2	+	+	-
C4O	1	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++

Nota: (-) Negativo; (+++) Mayor producción de Cu₂O, (++) Mediana producción de Cu₂O, (+)

Menor producción de Cu₂O. Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

Como se aprecia en la tabla anterior, las muestras C2M, C1O, C1M Y C4O permiten ubicar resultados óptimos, ya que presentaron una mayor precipitación e intensidad del color rojo ladrillo, considerado como positivo para la prueba de Fehling, confirmando que si existe la conversión del almidón en azúcares reductores por la presencia de los taxones fúngicos. Esto se debe a que el catión cúprico, presente en el reactivo de Fehling, reacciona con un grupo carbonilo libre presente en las muestras, reduciéndolo a óxido cuproso (Cu₂O), elemento responsable del color y precipitado

rojo ladrillo (COVENIN, 1996, pág. 1), (Múnera, 2008, págs. 11-12). Estos resultados coinciden con los reportados por Bermudes y Casquete (2011), los cuales determinaron la cantidad de azúcares reductores usando el reactivo de Fehling en la obtención de edulcorantes, a partir de almidón de arroz aplicando enzimas alfa y beta amilasas de origen vegetal.

Tabla 12.

Resultados de la Evaluación de Degradación de Almidón (Prueba de Lugol)

Código chip		Nivel de Degradación del Almidón en Azúcares simples		
		Día 3	Día 4	Día 5
C2M	1	+	+	+
	2	+	+	+
C2O	1	+	+	+
	2	+	+	+
C1O	1	+	+	+
	2	+	+	+
C1M	1	+	+	+
	2	+	+	+
C5M	1	-	+	+
	2	-	-	+
C6M	1	+	+	+
	2	+	+	+
C3O	1	+	+	+
	2	+	+	+
C4O	1	+	+	+
	2	+	+	+

Nota: (+) Positivo a la degradación de almidón; (-) Negativo a la degradación del almidón. Elaborado

por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

En la tabla anterior, se aprecia la degradación del almidón del medio fermentativo debido a su coloración blanquecina, lo que evidencia la hidrólisis total del almidón por los taxones fúngicos en el medio. La reacción entre el almidón y la solución de Lugol es una interacción no química, en la que se forma un compuesto de inclusión de yodo en el interior de las hélices de la amilosa, lo que produce el color azul-violeta característico (Moreno P. , 2014, pág. 2), (Aguilar, Carrillo, Díaz, Parreño, & Vallejo, 2014, párr. 2-6).

Los resultados coinciden con los reportados por Espitia (2009), que determinó la concentración de alfa y beta amilasas necesarias para la degradación del almidón de cebada sin maltear, para la producción de etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, demostrando una gran producción de azúcares reductores por la prueba de Fehling y la desaparición del característico color azul-violeta con el reactivo de Lugol.

3.4. Aislamiento de taxones

Se evidenció que la adición de cloranfenicol y gentamicina mostró resultados, ya que se presentó un crecimiento abundante de hongos filamentosos como lo indica el anexo 4. Según Prats (2005) al adicionar antibióticos de amplio espectro como el cloranfenicol y/o gentamicina se incrementa la selectividad, favoreciendo el crecimiento de hongos frente a bacterias.

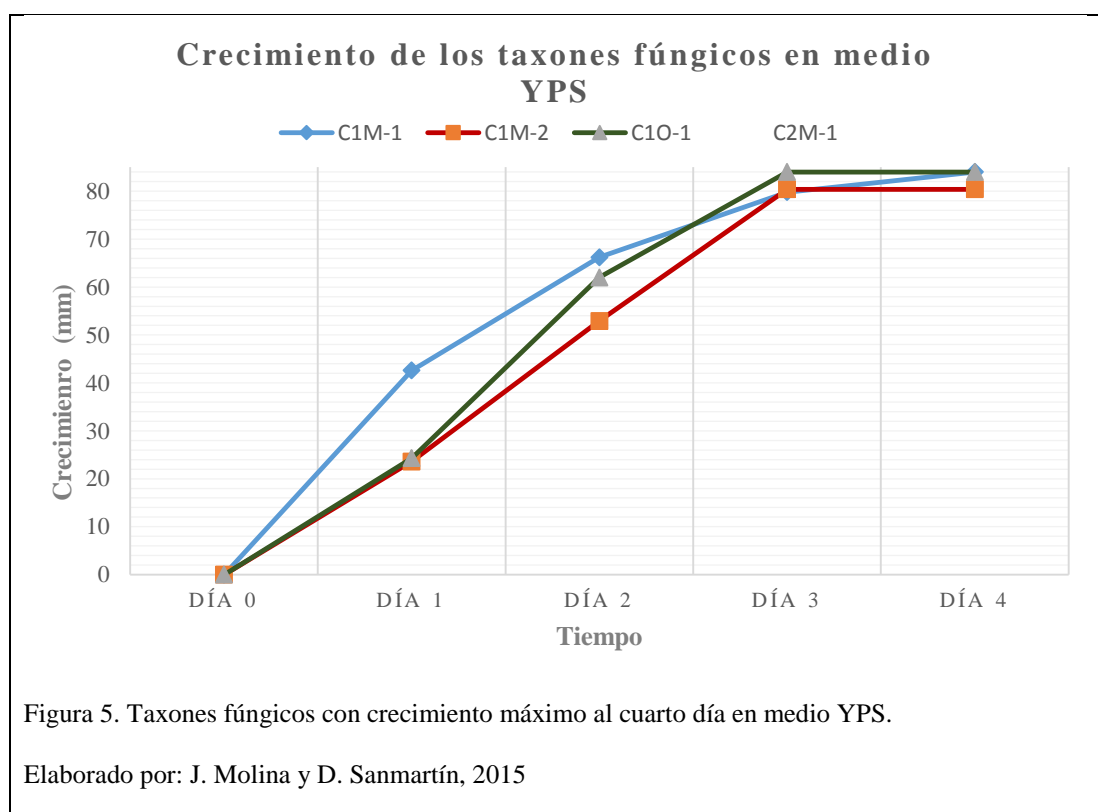
Sin embargo, la adición conjunta de cloranfenicol-gentamicina en el medio de cultivo mostró los mejores resultados. Según Dolan (1971), MacFaddin (1985) y Biomerieux (2011) al usarlos en combinación, se aumenta el espectro de acción, pues la presencia del cloranfenicol mejora la selectividad frente a algunas especies que pueden ser resistentes a la gentamicina (como *Streptococos*, *Proteus*, entre otros).

No obstante, el crecimiento de algunas especies de *Pseudomonas* se ve sólo ligeramente suprimido por la acción del cloranfenicol, mientras que la gentamicina es particularmente eficaz contra *Pseudomona aeruginosa*.

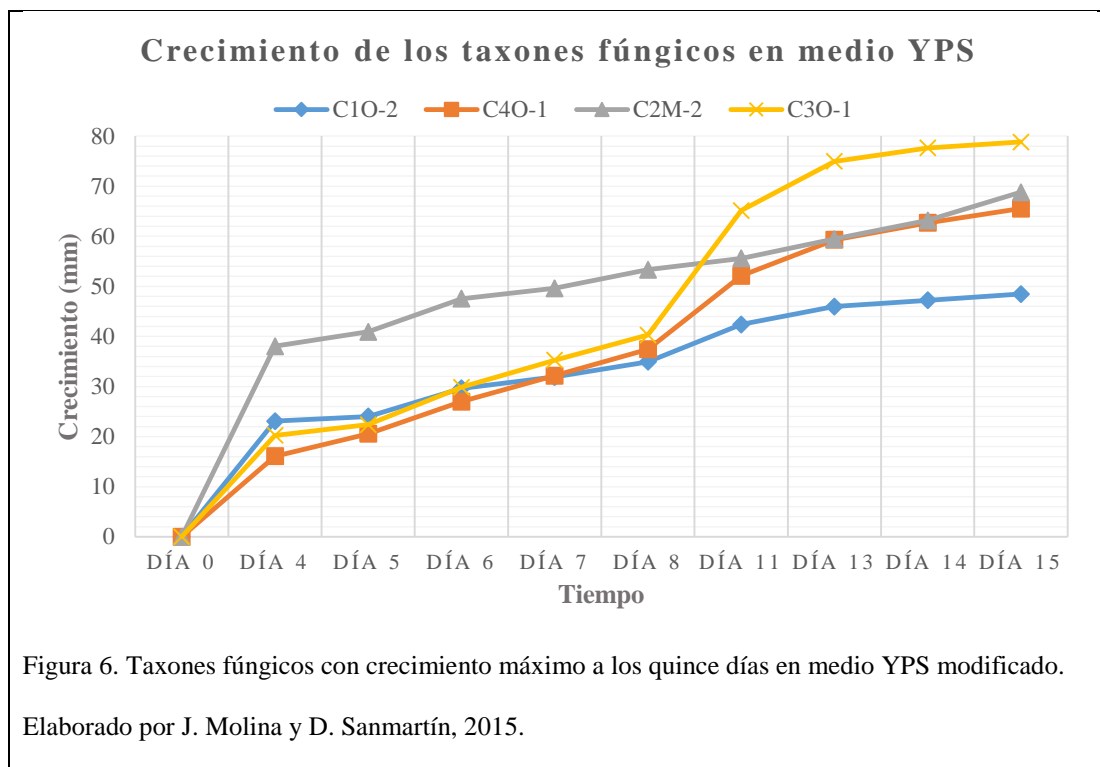
3.5. Caracterización microbiológica y purificación de taxones

Se realizó una caracterización microbiológica donde se aprecian diferentes colonias presentes en los medios específicos, como lo indica el anexo 4. La evaluación de la capacidad de asimilación del almidón por el taxón fúngico, en función del tiempo y velocidad de crecimiento en el medio específico YPS se encuentra en el anexo 5.

Las muestras C1M-1, C1M-2, C1O-1, C2M-1 presentaron los mejores resultados de crecimiento al cuarto día, como se observan en la siguiente figura.



Las muestras C1O2, C4O-1, C2M-2, C3O-1 presentaron mejores resultados de crecimiento a los quince días, como se observa en la siguiente figura.



El crecimiento de los taxones fúngicos presentó diferencias significativas, debido a que cada hongo asimila los nutrientes del medio de manera diferente. Los crecimientos obtenidos demuestran que el medio YPS contribuye al desarrollo de los taxones, como lo indica Atlas (2010), razón por la cual es el medio ideal para la producción de amilasas, como lo corrobora Jense, Olsen y Allerman (1988). Por tal motivo se afirma que los taxones fúngicos obtenidos tienen la capacidad de producción de enzimas amilolíticas.

Además, Jaen y otros (1986) mencionan que el pH, temperatura y el medio influyen en el comportamiento enzimático de los taxones, alterando sus procesos hidrolíticos, ya que períodos largos de hidrólisis pueden derivar en problemas de inhibición, causando acumulación de los productos. La lenta absorción de los nutrientes y la dificultad en la asimilación podrían ser causas para que los taxones fúngicos hayan tardado en desarrollarse.

3.6. Selección de los mejores taxones

La selección de los ocho taxones fúngicos se basó tomando en cuenta: Los resultados de la evaluación de la formación de azúcares reductores (Prueba Fehling) y la degradación del almidón (Prueba Lugol); evaluación de la capacidad de asimilación del almidón de los taxones aislados en función del tiempo y velocidad de crecimiento; prioridad al sustrato específico con almidón YPS, como se resume en la siguiente tabla.

Tabla 13.

Resumen de los parámetros que se tomaron en cuenta para la selección de los ocho taxones fúngicos

Hongo	Parámetros de selección		
	Prueba de Fehling	Prueba de Lugol	Crecimiento máximo promedio (mm)
C1M-1	+++	Positivo	79,8
C1M-2	+++	Positivo	84,0
C1O-1	+++	Positivo	84,0
C2M-1	+++	Positivo	82,5
C1O-2	+++	Positivo	48,5
C4O-1	+++	Positivo	65,5
C2M-2	+++	Positivo	68,8
C3O-1	++	Positivo	78,8

Nota: (+++) Mayor producción de Cu_2O , (++) Mediana producción de Cu_2O , (+) Menor producción

de Cu_2O . Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

3.7. Identificación de los taxones seleccionados.

Los ocho taxones fúngicos seleccionados fueron identificados, y corresponden a los géneros *Mucor*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichocladium*, como se muestran en la siguiente tabla y en el anexo 8.

Tabla 14.

Géneros Identificados de los taxones fúngicos seleccionados

Código	Género Identificado
C1M-1	<i>Mucor</i> sp. 1
C1M-2	<i>Mucor</i> sp. 2
C1O-1	<i>Mucor</i> sp. 3
C2M-1	<i>Mucor</i> sp. 4
C1O-2	<i>Penicillium</i> sp. 1
C4O-1	<i>Penicillium</i> sp. 2
C2M-2	<i>Trichocladium</i> sp.
C3O-1	<i>Fusarium</i> sp.

Nota: Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

En la siguiente tabla se indican las características morfo-culturales y microscópicas de los taxones fúngicos identificados.

Tabla 15.

Descripción morfo-cultural y microscópica de los taxones fúngicos identificados

Género Identificado	Descripción morfo-cultural	Descripción microscópica
<i>Mucor</i> sp. 1	Colonias blancas, volviéndose crema-grisáceas, algodonosas, laxas. Esporangióforos largos. Reverso crema-grisáceo. Rápido crecimiento, alcanzando 8,1 cm de diámetro al 4 día	Hifas aseptadas. Esporangios entre 18-54 μm , esporangiósporas elipsoides. No presenta rizoides, ni columela
<i>Mucor</i> sp. 2	Colonias blancas, volviéndose café-grisáceas, algodonosas, laxas. Esporangióforos largos. Reverso café-grisáceo. Rápido crecimiento, alcanzando 8,4 cm de diámetro	Hifas aseptadas, esporangióforos ramificados. Esporangios entre 20-39 μm . Esporangiósporas elipsoides. No presenta rizoides, ni columela
<i>Mucor</i> sp. 3	Colonias café claras, volviéndose café grisáceas, algodonosas, laxas. Esporangióforos largos. Reverso café. Rápido crecimiento, alcanzando 8,4 cm de diámetro al 4 día	Hifas aseptadas, esporangióforos ramificados. Esporangios entre 20-45 μm . Esporangiósporas elipsoides de color café. No presenta rizoides, ni columela
<i>Mucor</i> sp. 4	Colonias café claras, volviéndose negras, algodonosas, laxas. Esporangióforos cortos. Reverso incoloro. Rápido crecimiento, alcanzando 8,3 cm de diámetro al 4 día	Hifas aseptadas, esporangióforos ramificados. Esporangios entre 25-51 μm . Esporangiósporas elipsoides de color café oscuro. No presenta rizoides, ni columela
<i>Penicillium</i> sp. 1	Colonias verde-azuladas, con bordes blancos anchos, aterciopeladas, pulverulentas. Acumulación de esporangióforos en el centro de las	Conidióforos monoverticilados. Las fiálides nacen de las métulas y se encuentran en grupos de 3 a 6. Métulas delgadas. Las esporas se

	colonias. Reverso rojizo. Crecimiento lento, alcanzando 4,6 cm de diámetro en 15 días	forman en cadenas cortas de forma esférica
<i>Penicillium</i> sp. 2	Colonias verde-amarillentas, con bordes blancos delgados, aterciopeladas, pulverulentas. Acumulación de esporangióforos en el centro de las colonias. Reverso amarillento. Crecimiento lento, alcanzando 6,6 cm de diámetro en 15 días	Conidióforos poliverticilados. Las fiálides nacen sobre las métulas y tienen forma de botella. Métulas ensanchadas. Las esporas se forman en cadenas cortas de forma esférica
<i>Trichocladium</i> sp.	Colonias blancas, volviéndose café-verdosas, con bordes blancos anchos, algodonosas, concéntricas. Reverso café verdoso. Alcanzan un diámetro de 7,3 cm en 15 días	Conidióforos cortos o ausentes, hialinos o café pálido. Conidios café claro con dos o tres septos. Sus conidios incrementan su tamaño desde la base hasta el ápice
<i>Fusarium</i> sp.	Colonias blancas, volviéndose blanco-purpúreas, principalmente en el centro de la colonia. Aterciopeladas, concéntricas. Reverso púrpura intenso. Alcanzan un diámetro de 8,2 cm en 15 días	En los primeros días, presentan microconidios de 0-2 septos con tamaños ovoides y elipsoides. Luego de 15 días se observan los microconidios de 3-5 septos con forma fusiforme

Nota: Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín

Los géneros *Mucor* y *Penicillium* se encuentran dentro de los géneros reportados por Le Mense y otros (1947), Windish & Mhatre (1965) y Fogarty (1990), los cuales se encuentran entre los más empleados para obtener amilasas eficientes a escala industrial.

El género *Fusarium* como fuente de amilasas ha sido reportado por Alvarado (2010), Nwagu & Okolo (2011), Kumar, Yadav, Muthukumar & Garg (2013). Según Nwagu & Okolo (2011) la producción de amilasas por *Fusarium* está influenciada en gran medida por la fuente de carbono, nitrógeno y los minerales colocados en el medio de cultivo. Asimismo, Alvarado (2010) asegura que la producción de amilasas está influenciado principalmente por la presencia de fuentes orgánicas de nitrógeno o la combinación de las mismas con fuentes inorgánicas.

Seidl (2010) menciona que el género *Trichocladium* se puede aislar de muestras de suelo, madera, ambientes acuáticos o semi-acuáticos. La determinación de la capacidad amilolítica de *Trichocladium* ha sido reportada por Sharp (1975) y Pandev (2013), los cuales aislaron este género de restos de madera y de suelo de cultivos de papa, respectivamente, obteniendo resultados significativos.

2.8. Formación de complejos enzimáticos fúngicos

La cantidad de biomasa a colocar en el complejo fúngico fue determinada por el método de Neubauer que se detalla en el anexo 9. En la siguiente tabla, muestra todas las combinaciones realizadas entre los taxones seleccionados, dando un total de 28 complejos. Además, indica que para cada complejo se establece un tratamiento, que permitirá la interpretación adecuada de los resultados estadísticos.

Tabla 16.

Combinaciones para la formación de los complejos enzimáticos

Combinación	Tratamiento	Complejo de taxones
1-2	T1	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Trichocladium</i> sp.
1-3	T2	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Mucor</i> sp. 3
1-4	T3	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Mucor</i> sp. 1
1-5	T4	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Mucor</i> sp. 2
1-6	T5	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp. 1
1-7	T6	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp. 2
1-8	T7	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Mucor</i> sp. 4
2-3	T8	<i>Trichocladium</i> sp. - <i>Mucor</i> sp. 3
2-4	T9	<i>Trichocladium</i> sp. - <i>Mucor</i> sp. 1
2-5	T10	<i>Trichocladium</i> sp. - <i>Mucor</i> sp. 2
2-6	T11	<i>Trichocladium</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp. 1
2-7	T12	<i>Trichocladium</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp. 2
2-8	T13	<i>Trichocladium</i> sp. - <i>Mucor</i> sp. 4
3-4	T14	<i>Mucor</i> sp. 3 - <i>Mucor</i> sp. 1
3-5	T15	<i>Mucor</i> sp. 3 - <i>Mucor</i> sp. 2
3-6	T16	<i>Mucor</i> sp. 3 - <i>Penicillium</i> sp. 1
3-7	T17	<i>Mucor</i> sp. 3 - <i>Penicillium</i> sp. 2
3-8	T18	<i>Mucor</i> sp. 3 - <i>Mucor</i> sp. 4
4-5	T19	<i>Mucor</i> sp. 1 - <i>Mucor</i> sp. 2
4-6	T20	<i>Mucor</i> sp. 1 - <i>Penicillium</i> sp. 1
4-7	T21	<i>Mucor</i> sp. 1 - <i>Penicillium</i> sp. 2
4-8	T22	<i>Mucor</i> sp. 1 - <i>Mucor</i> sp. 4
5-6	T23	<i>Mucor</i> sp. 2 - <i>Penicillium</i> sp. 1
5-7	T24	<i>Mucor</i> sp. 2 - <i>Penicillium</i> sp. 2
5-8	T25	<i>Mucor</i> sp. 2 - <i>Mucor</i> sp. 4
6-7	T26	<i>Penicillium</i> sp. 1 - <i>Penicillium</i> sp. 2
6-8	T27	<i>Penicillium</i> sp. 1 - <i>Mucor</i> sp. 4
7-8	T28	<i>Penicillium</i> sp. 2 - <i>Mucor</i> sp. 4

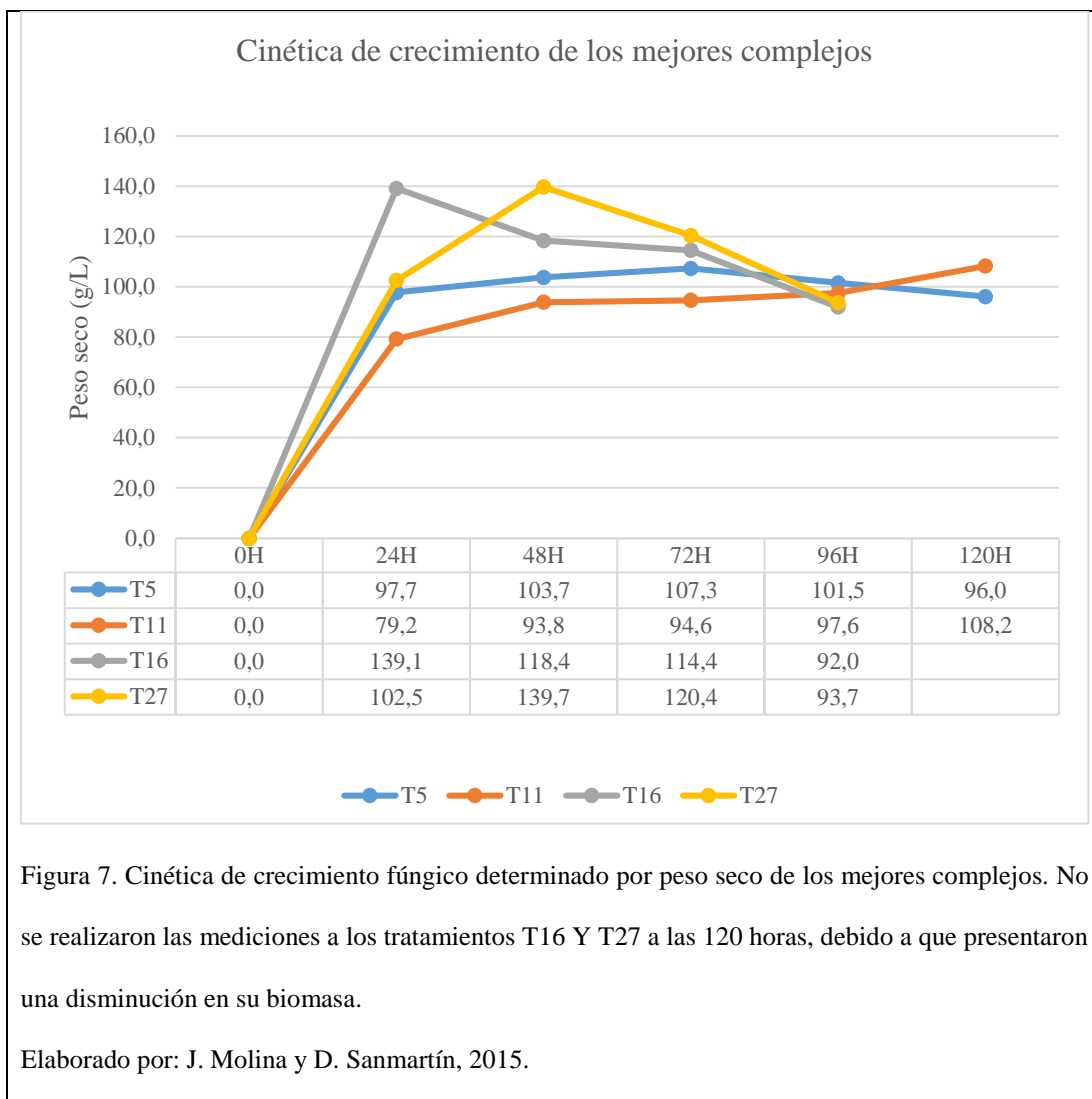
Nota: Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

El 50% de los complejos enzimáticos está formado por 4 especies del género *Mucor*; el 25% de los complejos está formado por 2 especies del género *Penicillium*; mientras que el 12,5% de los complejos corresponden al género *Fusarium* y *Trichocladium*, respectivamente.

Ochoa y Montoya (2010) mencionan que los complejos enzimáticos permiten realizar funciones difíciles que poblaciones individuales no podrían, además, esta asociación puede generar mayor resistencia a cambios ambientales. Funcionalmente, los miembros del complejo mantienen la compatibilidad metabólica y ecológica, ya que, según Codina-Escobar (2009) en vez de competir por el mismo nutriente, los microorganismos del complejo colaboran para llevar a cabo una transformación determinada, siempre y cuando las condiciones ambientales que se generan permitan que ellos coexistan cercanamente. Sin embargo, Morris y Blackwood (2007) mencionan que bajo condiciones hostiles pueden desarrollar estrategias de adaptación y/o mutación.

3.8. Cinética de Crecimiento Fúngico en el Complejo Enzimático

En la siguiente figura se muestra la cinética de crecimiento determinada por peso seco, de los mejores 4 tratamientos, además en el anexo 10 se encuentran los resultados de todos los tratamientos evaluados.



Se evidencia como los complejos fúngicos tuvieron una fase de adaptación muy corta, alcanzando la fase exponencial a las 24 horas, siendo T16 es el tratamiento de mayor biomasa, no obstante, el tratamiento decrece rápidamente a las 48 y 72 horas, llegando a la fase de muerte a las 96 horas. En los tratamientos T5 y T27 se observa que la fase exponencial se alcanza a las 24 horas, mientras que la fase estacionaria se da entre las 48 a 96 horas, alcanzando la fase de muerte a las 120 horas. En el tratamiento T11 se observa la fase exponencial a las 24 horas, además, se aprecia un incremento progresivo de biomasa hasta las 120 horas de evaluación.

Los resultados obtenidos en los tratamientos T5, T16 y T27 se corroboran con los obtenidos por Santander (2006) y Espitia (2009). El crecimiento del tratamiento T11 se asemeja al reportado por Martín (2010) y por Zeng y otros (2006) que trabajaron con especies del género *Penicillium*; mientras Reyes (2006) obtiene resultados similares con *Aspergillus*.

3.9. Determinación de la capacidad de degradación

Mediante los análisis estadísticos realizados, se aceptó la hipótesis alternativa ($P < 0.05$), ratificando que al menos un complejo comprendido por 2 taxones de hongos filamentosos es capaz de degradar almidón y producir azúcares reductores, debido a las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos; además mediante la prueba de Tukey se identificó los mejores tratamientos (ver anexo 11).

En las siguientes figuras, se observa los tratamientos versus el tiempo tanto para glucosa como para maltosa, donde se observa que cada taxón responde de manera distinta en cada combinación, debido a que producen azúcares reductores en distintas cantidades a lo largo del tiempo evaluado.

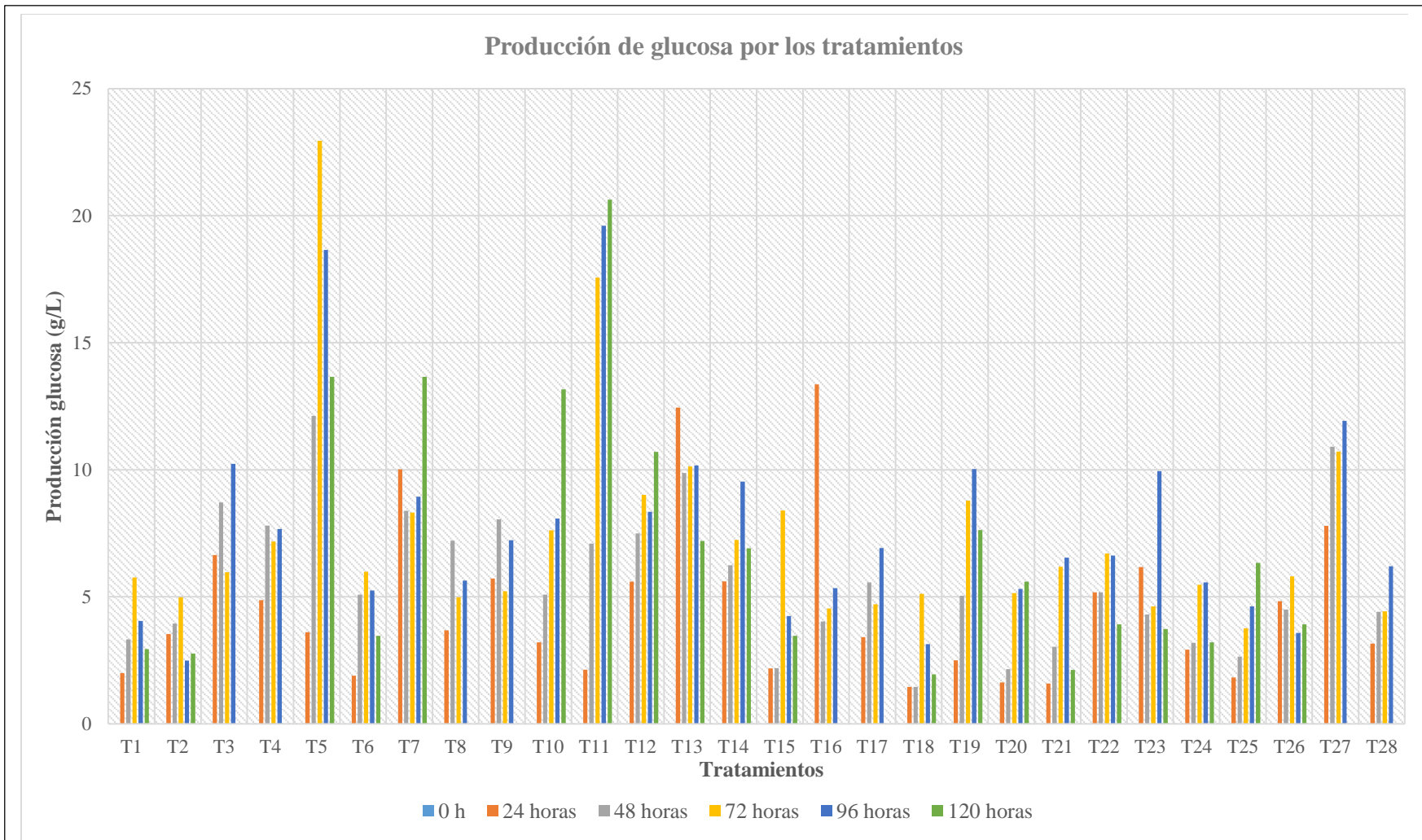


Figura 8. Producción de glucosa, todos los tratamientos versus el tiempo evaluado.

Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

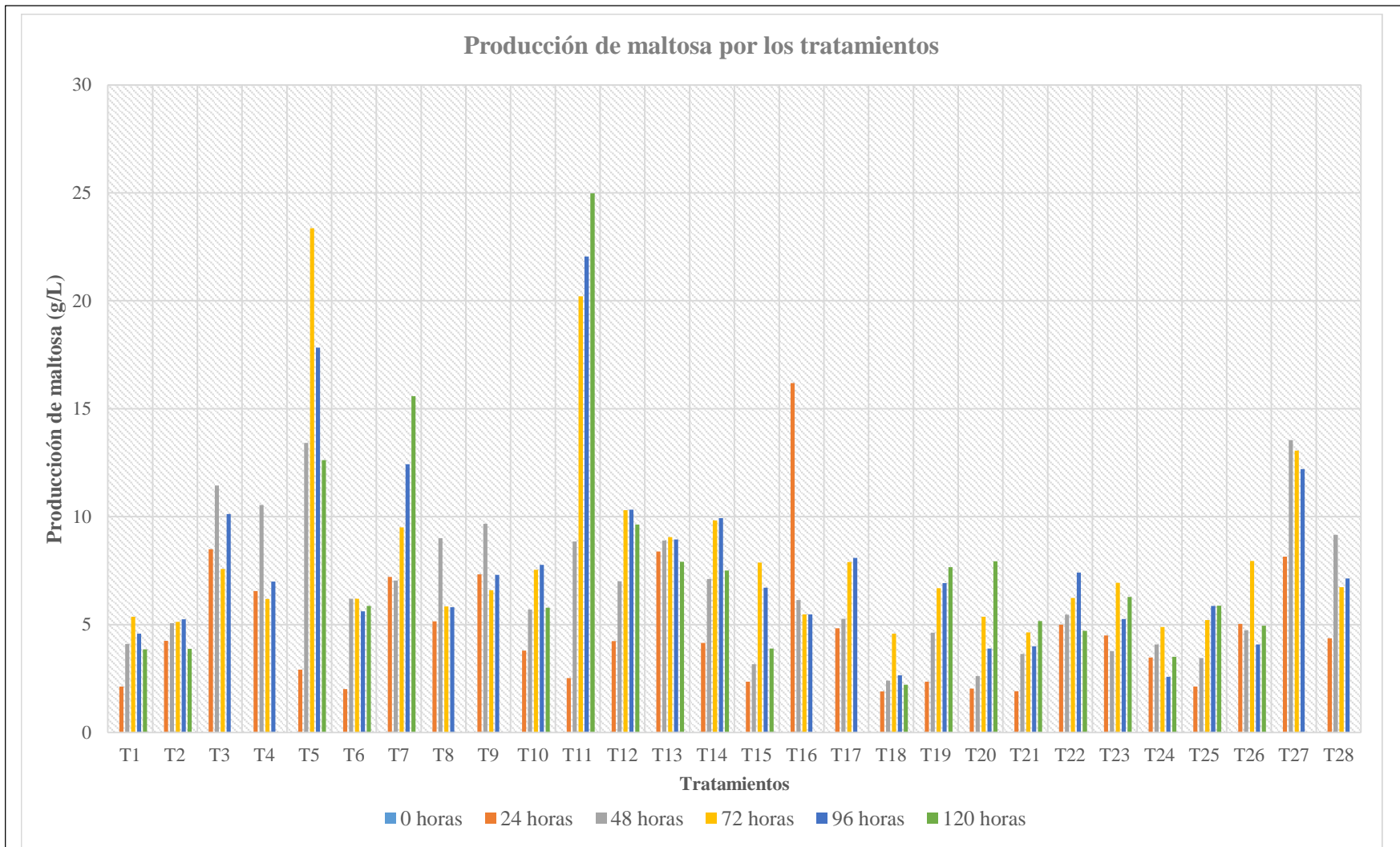


Figura 9. Producción de maltosa, todos los tratamientos versus el tiempo evaluado.

Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

3.9.1. Selección de los Mejores Tratamientos

Como se observa en las figuras 8 y 9, los complejos fúngicos mostraron diferencias significativas en la producción de azúcares reductores ($P < 0.05$), corroborando que la producción de azúcares reductores es estadísticamente significativa con un 95% de confianza.

El tratamiento con mayor producción a las 24 horas fue T16 conformado por *Mucor* sp. 3 - *Penicillium* sp. 1, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$), tanto para glucosa como maltosa, ya que produce 13,4 g/L y 16,2 g/L, respectivamente, lo que corresponde al 26, 9% del almidón total biodegradado. Sin embargo, a partir de las 48 horas, su producción baja gradualmente. La prueba de Tukey corrobora que T16 es el tratamiento con mayor producción de azúcares reductores.

El tratamiento con mayor producción de glucosa a las 48 horas fue T5, conformado por *Fusarium* sp. - *Penicillium* sp. 1, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$), ya que produce 12,1 g/L, a la vez que ocupa el segundo lugar en producción de maltosa, con 13,4 g/L, lo que corresponde al 23,2% del almidón total biodegradado. Además, es el tratamiento de mayor producción de glucosa y maltosa a las 72 horas ($P < 0.05$), con 23 g/L y 23,4 g/L respectivamente, lo que corresponde al 42,1% del almidón total biodegradado, lo que se confirma con la prueba de Tukey.

El tratamiento con mayor producción de maltosa a las 48 horas fue T27, conformado por *Penicillium* sp. 1 - *Mucor* sp. 4, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$), ya que produce 13, 5 g/L, a la vez que ocupa el segundo lugar en la producción de

glucosa con 10,9 g/L; lo que corresponde al 22,2% del almidón total biodegradado, lo que se confirma con la prueba de Tukey.

El tratamiento con mayor producción de glucosa y maltosa a las 96 y 120 horas fue T11, conformado por *Trichocladium* sp. - *Penicillium* sp. 1 mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$). A las 96 horas produce 19,6 g/L de glucosa y 22,1 g/L de maltosa, mientras que a las 120 horas produce 20,6 g/L de glucosa 24,98 de maltosa. Esto corresponde al 37,9% del almidón total degradado a las 96 horas, y al 41,5% de almidón degradado a las 120 horas. Estos resultados se ratifican mediante la prueba de Tukey.

En la siguiente tabla, se presenta un resumen de los mejores tratamientos por cada hora evaluada, en la cual se aprecia que la mayor producción de azúcares reductores totales se da a las 72 horas por el tratamiento T5, ya que presenta una producción de azúcares de 42,1 %, es decir que hidroliza el 57,9 % del almidón adicionado al medio. Además, cabe mencionar que el tratamiento T11 tiene una producción de azúcares reductores exponencial, ya que a las 120 horas no presenta una disminución en su producción, como lo indica las figuras 8 y 9.

Tabla 17.

Resumen de los mejores tratamientos por horas evaluadas en la producción de azúcares reductores

Tiempo (horas)	Tratamiento	Glucosa (%)	Maltosa (%)	Azúcares totales (%)	Complejo
24	T16	12,1	14,7	26,8	<i>Mucor</i> sp. 3 - <i>Penicillium</i> sp. 1
48	T5	11,0	12,2	23,2	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp. 1
48	T27	9,9	12,3	22,2	<i>Penicillium</i> sp. 1 - <i>Mucor</i> sp. 4
72	T5	20,9	21,2	42,1	<i>Fusarium</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp. 1
96	T11	17,8	20,1	37,9	<i>Trichocladium</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp. 1
120	T11	18,8	22,7	41,5	<i>Trichocladium</i> sp. - <i>Penicillium</i> sp. 1

Nota: Elaborado por: J. Molina y D. Sanmartín, 2015.

La hidrólisis del almidón a azúcares reductores se debe a enzimas amilasas (alfa-amilasa, beta-amilasa, glucoamilasas, entre otras) secretadas por los hongos filamentosos que conforman los complejos enzimáticos.

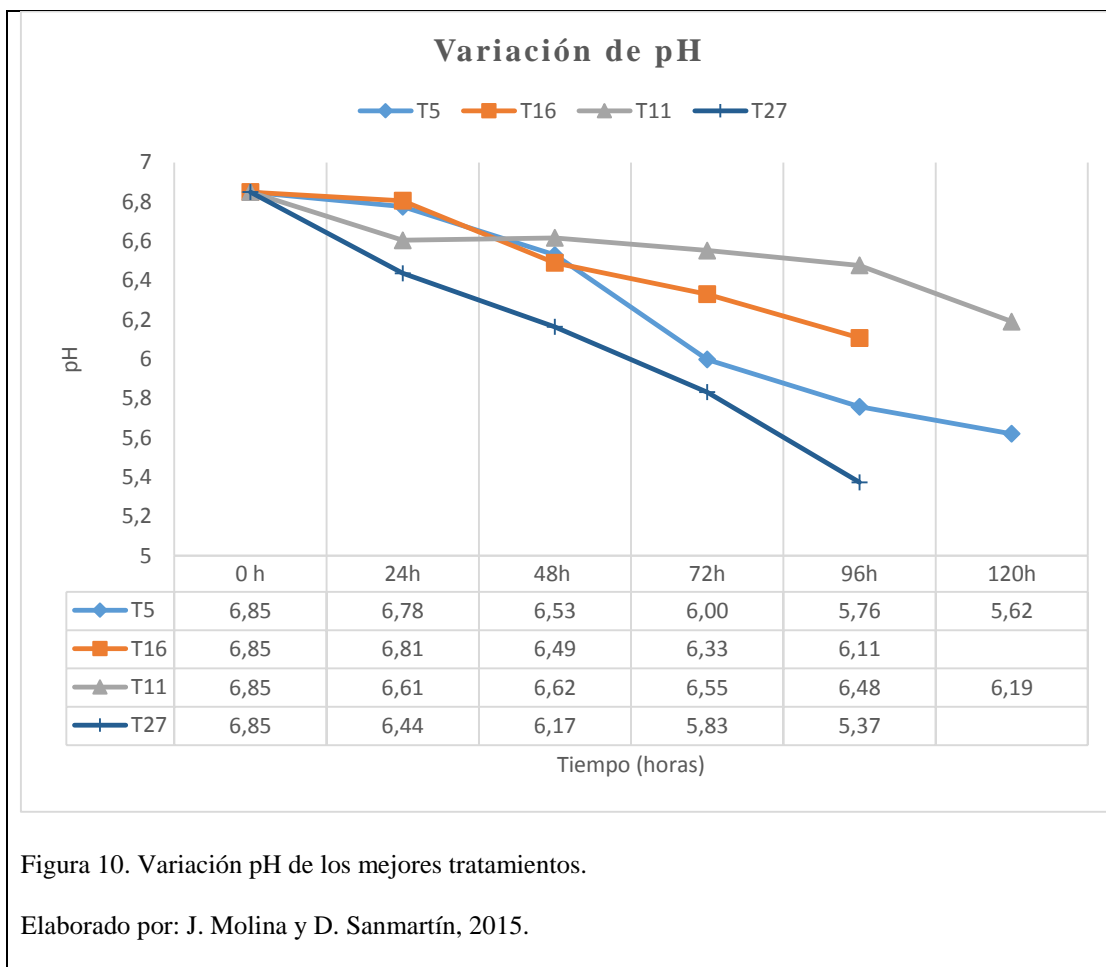
Con respecto a la relación biomasa - producción de azúcares reductores, todos los complejos fúngicos mostraron una fase de adaptación muy corta, como lo indica las figuras 8 y 9, lo que implica según Santander (2006) alcanzar en menor tiempo la

biomasa necesaria para iniciar la degradación del sustrato, lo cual permite optimizar procesos. Asimismo, a partir de las 48 horas, la biomasa de los complejos fúngicos muestra un comportamiento estacionario, donde los valores tienden a disminuir, esto según Glazer y Nikaido (1998) se debe a que la glucosa presente en el medio entra en un proceso glicolítico, seguido por un proceso fermentativo. Ekunsaumi (2007) y Espitia (2009) mencionan que se debe al agotamiento del sustrato, lo que se evidencia también en la disminución de la concentración de azúcares reductores al final del tiempo de evaluación, puesto que estos azúcares se encuentran disponibles en el medio, razón por la cual, son utilizados por los hongos como una fuente de carbono disponible.

Según Kolusheva y Marinova (2007), la caída de producción de azúcares reductores, se debe a que entre mayor sea la concentración de biomasa y menor sea el sustrato disponible, la tasa de reacción disminuye, considerando que hay menos lugares de reacción activos disponibles para hidrolizar el almidón, generando un limitante por exceso de enzimas.

3.10. Medición del pH

Como se puede apreciar en la siguiente figura, todas las muestras iniciaron con un pH ligeramente ácido de $6,85 \pm 0,05$. Según transcurría el tiempo, el pH fue variando de tal manera que el valor de pH más bajo fue 5,04 y el más alto fue 6,62. Los datos de pH de todos los tratamientos se encuentran en el anexo 12.



Se corrobora que los valores de pH estuvieron dentro del rango general de crecimiento para hongos filamentosos como lo reporta Vera (2004) siendo de 2 a 9. Además, coincide que las α -amilasas muestran una actividad óptima a pH 6,5 (UChile, 2015), las β -amilasas a pH 5,5 (García, Quintero, & López, 2004) y las glucoamilasas en un intervalo de pH de 3,6 a 6,5 (Kulp, 1975). Según Leitão (2011) a pH bajos los enlaces glucosídicos son fácilmente hidrolizados.

Conclusiones

Se aislaron 8 taxones de hongos filamentosos con capacidad productora de amilasas, a partir de tubérculos de oca y mashua recolectados en el cantón Saquisilí., utilizando técnicas microbiológicas selectivas (prueba de Fehling, prueba de Lugol, asimilación de los taxones en función del tiempo y velocidad de crecimiento en medio YPS), los cuales se identificaron mediante técnicas taxonómicas documentadas y prácticas (montaje por disección, cinta pegante y microcultivo), correspondiendo a los géneros: *Mucor*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichocladium*.

Los taxones fúngicos seleccionados poseen la capacidad de hidrolizar el almidón a azúcares reductores en diferentes cantidades a lo largo de tiempo evaluado. Los tratamientos: T16 (*Mucor sp.3* - *Penicillium sp.1*), T5 (*Fusarium sp.* - *Penicillium sp.1*), T27 (*Penicillium sp.1* - *Mucor sp.4*) y T11 (*Trichocladium sp.* - *Penicillium sp.1*), mostraron los mejores rendimientos en la producción de azúcares reductores.

La cinética de crecimiento de los hongos en el complejo evidenció, que todas las combinaciones presentaron una fase de adaptación menor a 24 horas. Asimismo, a partir de las 48 horas, la biomasa de los complejos fúngicos muestra un comportamiento estacionario, donde los valores tienden a disminuir, alcanzando la fase de muerte. Una excepción es el tratamiento T11, que muestra un incremento exponencial en su biomasa hasta las horas evaluadas.

Recomendaciones

Incrementar los tiempos de evaluación a la cinética de crecimiento y degradación del almidón al tratamiento T11 (*Trichocladium* sp. - *Penicillium* sp. 1), ya que presenta un rendimiento exponencial hasta las 120 horas evaluadas, con el fin de determinar su punto máximo de degradación.

Trabajar con diferentes condiciones de: temperatura, pH, agitación, hongos por complejo, concentración de sustrato que favorezcan la actividad catalítica de los complejos seleccionados, para determinar las mejores condiciones de producción.

Efectuar una identificación a nivel molecular, para reafirmar el género y determinar las especies de los taxones fúngicos obtenidos, así como su perfil metabólico y genético.

Realizar procesos de purificación de las enzimas para determinar exactamente que enzimas participan en los procesos hidrolíticos de degradación del almidón.

Establecer una comparación con cepas o enzimas certificadas en la producción de amilasas, para evaluar el rendimiento de los hongos obtenidos.

Referencias

- Adrio, J., & Demain, A. (2008). Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. *Molecular Biotechnology*, 38, 41-55.
- Alvarado, A. (2010). *Caracterización enzimática y molecular de cepas de Fusarium spp. aisladas de humanos, animales y plantas: Aproximación al modelo multihospedero*. Tesis de Grado, Bogotá.
- Arenas, R. (2003). *Micología Médica Ilustrada* (Segunda ed.). México D.F.: McGraw Hill.
- Arias, L., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos de Muestras de Suelo de los Páramos de Guasca y Cruz Verde*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Arratia, J. (2009). *Diversidad Genética de Levaduras involucradas en la fermentación del Mezcal Tamaulipeco*. Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa.
- Aruani, M. C., Gili, P., Machuca, Y., & Spera, N. (2012). Evaluación de las características físico-químicas y biológicas en dos suelos superficiales cultivados con pera (*Pyrus communis* L.) cv. Williams bajo manejo convencional. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 44(1), 77-84.
- ATCC. (2015). *ATCC medium: 435 Yeast extract-peptone-starch agar*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2015, de ATCC: <http://www.atcc.org/~media/645CE2D8666243CDA9DE097DA5A592F3.aspx>
- Atlas, R. (2010). *Handbook of Microbiological Media* (Cuarta ed.). (T. a. Group, Ed.) Washington, Estados Unidos: CRC Press.

- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos* (Cuarta ed.). (E. Quintanar, Ed.) México D.F., México: Pearson Educación.
- Barnett, L., & Hunter, B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi* (Segunda ed.). Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Barrera, V. H., Tapia, C. G., & Montero, A. R. (2004). *Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador*. Quito & Lima: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Barreto, E. (Noviembre de 2012). *Contaminación por Fertilizantes Químicos*. Obtenido de <http://contaminacionporfertilizantes.blogspot.com/>
- Bello, L., & Paredes, O. (Septiembre de 1999). El almidón: lo comemos pero no lo conocemos. *Ciencia*, 50(3), 29-33.
- Bermudes, J., & Casquete, J. (2011). *Elaboracion de Edulcorantes a partir de almidones aplicando enzimas alfa y beta amilasas de origen vegetal*. Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química, Guayaquil.
- Bernfeld, P. (1955). Amylases; alpha and beta Methods. *Enzymology*(1), 149-158.
- Bills, G., & Foster, M. (2004). Formulae for select materials used to isolate and study fungi and fungal allies. En G. Mueller, G. Bills, & M. Foster, *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods* (págs. 595-518). Elsevier.
- Biomerieux. (2011). *Catalogo de Medios de Cultivo*. Recuperado el 18 de Diciembre de 2015, de Biomerieux: http://www.biomerieux.com.mx/upload/CATALOGO_DE_PLACAS11.pdf
- BRENDA. (2 de July de 2015). *EC 3.2.1.3 - glucan 1,4-alpha-glucosidase*. (Schomburg, Editor) Recuperado el 03 de Septiembre de 2015, de BRENDA

The Comprehensive Enzyme Information System: <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.3>

Calvo, M. (2010). *Bioquímica de los Alimentos: Estructura del Almidón*. Obtenido de Sitio web de la Universidad de Zaragoza: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/almidon.html>

Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).

CAR/PL. (Octubre de 2003). *Aplicaciones de la Biotecnología en la Industria*. Barcelona, España.

Carrera, M. d. (2009). *Producción de Bacillus thuringiensis, Berliner a nivel de Laboratorio*. Facultad de Ciencias. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

CATIE, C. A. (2001). *Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos*. (A. Monzón, Ed.) Nicaragua.

CIP-Ames de Icochea, Teresa. (1997). *Enfermedades Fungosas y Bacterianas de Raíces y Tubérculos Andinos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.

Codina-Escobar, J. (2009). *Vanguardia*. Obtenido de Universidad de Antioquia.

CODIPSA. (2015). *Aplicaciones del Almidón*. Recuperado el 15 de Octubre de 2015, de Codipsa Web site: http://www.codipsa.com.py/aplicaciones_del_almidon.php

Copan. (2015). *CryoBank Bacterial Cultures Freezing Systems*. Recuperado el 23 de Octubre de 2015, de Copan Diagnostics Inc.: http://www.copanusa.com/files/5614/2418/6551/cryobank_guide.pdf

- Corporation Worthington Biochemical. (2015). *Worthington Enzyme Manual*.
Obtenido de Worthington Biochemical Corporation: <http://www.worthington-biochem.com/BA/default.html>
- COVENIN. (1996). Leche. Determinación de azúcares reductores: Método de Fehling. *Norma Venezolana 3219:1996*. Venezuela.
- Cubero, D., & Vieira, M. (1999). *Abono Orgánicos y Fertilizantes Químicos ¿Son compatibles con la agricultura?* Obtenido de Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica: http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_xi/a50-6907-III_061.pdf
- Devaney, E. (Octubre de 2013). *Los efectos ambientales de los fertilizantes químicos*. Obtenido de eHow en Español: http://www.ehowenespanol.com/efectos-ambientales-fertilizantes-quimicos-lista_434088/
- Dolan, C. (1971). Optimal combination and concentration of antibiotics in media for isolation of pathogenic fungi and Nocardia asteroides. *Applied Microbiology*, 195-197.
- Ekunsaumi, T. (2007). Laboratory production and assay of amylase by fungi and bacteria. *UW-Washington Contry*, 1.
- Espín, S., Brito, B., Villacrés, E., Rubio, A., Nieto, C., & Grijalva, J. (2001). Composición Química, Valor Nutricional y Usos Potenciales de siete especies de Raice y Tuberculos Andinos. *Acta Científica Ecuatoriana*, 7(1), 49-63.
- Espín, S., Villacrés, E., & Brito, B. (2004). Caracterización Físico-Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos. En V. Barrera, C. Tapia, & Á. Monteros, *Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y*

- tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)* (págs. 91-116). Quito, Lima.
- Espinosa, P., Vaca, R., Abad, J., & Crissman, C. (1996). *Raíces y Tubérculos Andinos Cultivos Marginados en el Ecuador*. Centro Internacional de la Papa, Departamento de Ciencias Sociales. Quito: ABYA-YALA.
- Espinosa, V. (2008). *Estudios Estructurales de Almidón de Fuentes No Convencionales: Mango (Mangifera indica L.) y Platano (Musa paradisiaca L.)*. Tesis de Grado, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Yautepec.
- Espitia, C. (2009). *Determinación de la Concentración de Alfa y Beta Amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Fogarty, W., & Kelly, C. (1990). Recent Advances in Microbial Amylases. En W. Fogarty, & C. Kelly, *Microbial Enzymes and Biotechnology* (Segunda ed., pág. 472). Elsevier Science Publishers.
- Furci, G. (2007). *Fungi Austral: Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile* (Primera ed.). Chile.
- GAD Cochapamba, C. (2015). *Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquia Rural Cochapamba*. Recuperado el 30 de Noviembre de 2015, de GAD Parroquial Cochapamba <http://cochapamba.gob.ec/cotopaxi/>
- García, M., Quintero, R., & López, A. (2004). *Biología Alimentaria* (Quinta ed.). México: LIMUSA.
- Glazer, A., & Nikaido, H. (1998). *Microbial Technology: Fundamentals of Applied Microbiology* (Primera ed.). Nueva York, Estados Unidos.

- Icochea, T. A. (1997). *Enfermedades Fungosas y Bacterianas de Raíces y Tubérculos Andinos*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- ITIS. (2015). *Integrated Taxonomic Information System*. Recuperado el 24 de Agosto de 2015, de ITIS Integrated Taxonomic Information System: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506375#
- IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (2015). *ExplorEnz*. Recuperado el 03 de Septiembre de 2015, de The Enzyme Database: <http://www.enzyme-database.org>
- Jaen , A., Álvarez, N., Angulo, S., & Moreno, M. (1986). *Actividad enzimática del complejo celulotico producido por Trichoderma reesei. Hidrolisis enzimática de la celulosa*. Madrid: Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.
- Jense, B., Olsen, J., & Allermann, K. (1988). Purification of extracellular amyolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Canadian journal of Microbiology*, 34, 218-223.
- Kavanagh, K. (2011). *Fungi - Biology and Applications* (Second ed.). The United States: John Wiley & Sons.
- Kolusheva, T., & Marinova, A. (2007). A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable alpha amylase. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 1(42), 93-96.
- Koneman, E., Allen, S., Winn, W., Procop, G., Schreckenberger, P., Janda, W., & Woods, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en Color* (Sexta ed.). (O. Giovanniello, D. Klajn, M. Preciado, A. Pertierra, & S. Rondinone, Trads.) Buenos Aire, Argentina: Editorial Médica Panamerica.

- Konsoula, Z., & Liakopoulou, K. (2007). Co-production of alfa-amylase and beta-amylase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*(98), 150-157.
- Kulp, K. (1975). Carbohydases. En G. Reed, *Enzymes in Food Processing* (pág. 590). Estados Unidos: Academic Press.
- Kumar, D., Yadav, K., Muthukumar, M., & Garg, N. (2013). Production and characterization of alpha amylase from mango kernel by *Fusarium solani* NAIMCC-F-02956 using submerged fermentation. *Journal of Environmental Biology*, 6(36), 1053-1058.
- Le Mense, E., Corman, J., Van Lanen, J., & Langlykke, A. (1947). Production of Mold Amylases in Submerged Culture. *Journal of Bacteriology*, 149-159.
- Leitão, A. L. (2011). *Mycofactories*. Lisboa, Portugal: Bentham Science Publishers.
- MacFaddin, J. (1985). *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Williams and Wilkins.
- Manrique, I., Arbizu, C., Vivanco, F., Gonzales, R., Ramírez, C., Chávez, O., . . . Ellis, D. (2013). *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav. *Colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa* (Primera ed.). Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa. doi:10.4160/9789290604310
- Martín Gonzáles, J. (2010). *Un autoinductor de la biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*: Caracterización molecular y estudio de la respuesta del proteoma a la adición de inductor*. Tesis Doctoral, Universidad de León, León.

- Medina, J., & Salas, J. (Mayo de 2008). Caracterización Morfológica del Gránulo de Almidón Nativo: Apariencia, forma, tamaño, y su distribución. *Revista de Ingeniería*(27), 65-62.
- Mera, I., & Carrera, J. (15 de Febrero de 2005). Obtención de glucosa a partir del almidón de yuca *Manihot sculenta*. *Universidad de Cauca. Facultad de Ciencias Agrarias, III*, 1-10.
- Mitsuiki, S., Mukae, K., Sakai, M., Goto, M., Hayashida, S., & Furukawa, K. (2005). Comparative characterization of raw starch hydrolyzing α -amylases from various *Bacillus* strains. *Enzyme and Microbial Technology*(37), 410-416.
- Morales, Y., & Sánchez, A. (2004). *Diseño conceptual y comparación técnica de los procesos de hidrólisis ácida y enzimática para la producción de glucosa a partir de almidón de yuca*. Universidad Industrial Santander, Bucaramanga.
- Moreno, P. (2014). *Reconocimiento de Glúcidos*. Recuperado el 05 de Diciembre de 2015, de Instituto de Educación Secundaria Felipe de Borbón-Departamento de Biología y Geología: http://pedropablomoreno.com/pedropablomoreno.com/BIO2-Practicas_files/4%20Reconocimiento%20de%20glu%CC%81cidos.pdf
- Moreno, Z. (2000). *Correlación de la tasa de crecimiento radial y la tasa de crecimiento específico de hongos filamentosos aislados de la planta *Espeletia barclayana**. Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Morris, S., & Blackwood, C. (2007). The Ecology of Soil Organisms. En P. Eldor (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* (Tercera ed.). Academic Press.

- Múnera, R. (Septiembre de 2008). Guía para Prácticas de Laboratorio de Bioquímica. *Guía para Prácticas de Laboratorio UNAD*. Bogotá, Colombia.
- NIO-Marine Lignicolours Fungi. (2000). *Marine Lignicolours Fungi*. Obtenido de National Institute of Oceanography: <http://www.niobioinformatics.in/fungi/Micro-cd/index.htm>
- Nwagu, T., & Okolo, B. (2011). Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium* sp: Isolated from Eastern Nigerian soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 4(54), 649-658. Obtenido de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132011000400002
- Ochoa, D., & Montoya, A. (2010). Consorcios microbianos: Metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión*, 2(18), 55-74.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 135-152.
- Pasin, T., Benassi, V., Moreira, E., Jorge, J., & Polizeli, M. (2014). Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* Culture Conditions. *British Biotechnology Journal*, 4(4), 482-498.
- Pedroza, A. (1999). *Producción de amilasa termoestable a partir de Thermus sp*. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Peña, A. (2009). *Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones soluble e insolubilizadas de alfa-amilasa (Aspergillus niger)*. Bucamaranga: Universidad Industrial de Santander.

- Pérez, B., Rebollido, R. R., & Martínez, S. J. (2010). Isolation and identification of fungi in compost from municipal solid waste. *Agro Sur*, 38(1), 1-7.
- Prada, R. (2012). Alternativa de Aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: El caso del almidón residual derivado de la industrialización de la papa. *Revista EAN(0072)*, 180-192.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Madrid, España: Médica Panamericana.
- Ramón, V., & Rodas, F. (2007). El Control Orgánico de Plagas y Enfermedades de los Cultivos y la Fertilización Natural del Suelo. *Guía práctica para los campesinos del bosque seco. Información para la conservación de los bosques secos de Perú y Ecuador*, 35. Obtenido de http://caminosostenible.org/wp-content/uploads/BIBLIOTECA/guia_contol_organico_plagas.pdf
- Reyes Ocampo, I. (2006). *Difusión y Crecimiento Microbiano de Aspergillus niger sobre un Medio Sólido*. Tesis de Grado, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
- Riquelme, C. (2011). *Estudio del Medio de Cultivo Melin-Norkrans (MMN) para el Crecimiento de Hongo Ectomicorrícico Rhizopus roseolus (Corda) Th. Fr.* Tesis Pregrado.
- Santander, M. (2006). *Optimización de las concentraciones de urea y fosfato de amonio en la producción de alcohol a partir de miel final y miel de caña de azúcar empleando Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de pre-grado, Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Microbiología, Bogotá.
- Segura, J., & Navarrete, R. (2012). Enzimas Microbianas para producir moléculas con potencial uso terapéutico, el caso del Xilitol. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, LXIX(600), 25-29.

- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothir, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). Alpha-Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments. *Food Technology Biotechnology*, 44(2), 173-181.
- Telmeds.org. (2009). *Atlas de Micología*. Obtenido de Telmeds.org: <http://www.telmeds.org/atlas/micologia/>
- Tomasik, P., & Horton, D. (2012). *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (First ed., Vol. 68). London: Academic Press.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología* (Novena ed.). Editorial Médica Ecuatoriana.
- Tripathi, P., Leggio, L. L., Mansfeld, J., Ulbrich-Hofmann, R., & Kayastha, A. M. (1 de March de 2007). Alpha Amylase from mung beans (*Vigna radiata*) – Correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling. *Science Direct*, 68, 1623-1631. doi:10.1016/j.phytochem.2007.04.006
- UChile. (2015). *Biblioteca Digital de la Universidad de Chile*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2015, de Universidad de Chile: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmacuticas/schmidth02/parte07/01.html
- UEX-Tormo Molina, Rafael. (29 de 08 de 2014). *Plantas y Hongos*. Obtenido de Universidad de Extremadura: <http://www.plantasyhongos.es/>
- UNI-Mycology Online. (04 de 02 de 2016). *Mycology Online*. Obtenido de The University of Adelaide: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>
- Universidad de Antioquía, UDEA. (2011). *Aprende en línea*. Obtenido de Universidad de Antioquia: <http://aprendeonline.udea.edu.co>
- Vaclavick, V. (2002). *Fundamentos de los Alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.

- Viniegra, G. (2003). Producción de Enzimas por *Aspergillus*. *BioTecnología*, 8(2), 18-30.
- Wang, N. S. (2009). *Experiment No. 9C: Measurements of Cell Biomass Concentration*. Recuperado el 2 de Noviembre de 2015, de Biochemical Engineering Laboratory. University of Maryland: <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab9c.htm>
- Watanabe, T. (2002). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* (Segunda ed.). Taylor & Francis.
- Windish, W., & Mhatre, N. (1965). Microbial Amylases. En W. Umbreit, *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 7, pág. 403). Academic Press.
- Zeng, G. M., Shi, J. G., Yuan, X. Z., Liu, J., Zhang, Z. B., Huang, G. H., . . . Liu, H. L. (3 de November de 2006). Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1451-1456.