



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: EVALUACIÓN CINÉTICA DE LA ENZIMA CELULASA OBTENIDA
DE MONILIA (*Moniliophthora roreri*) CRECIDA EN RESIDUOS SÓLIDOS DE
ZURO, CASCARILLA DE ARROZ Y CÁSCARA DEL CACAO**

AUTOR: NATALY VANESA SOLÍS SALAS

DIRECTOR: DR. CARLOS CHIRIBOGA M.Sc.

CODIRECTOR: DR. RODRIGO ÁVALOS

SANGOLQUÍ

2015

HOJA DE LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO

ELABORADO POR



Srta. Nataly Vanesa Solís Salas

DIRECTORA DE LA CARRERA



M.Sc. María Augusta Chávez

Sangolquí, mayo del 2015

CERTIFICACIÓN**Dr. Carlos Chiriboga MSc.****Dr. Rodrigo Ávalos**

Certifican que el trabajo titulado “**Evaluación cinética de la enzima Celulasa obtenida de Monilia (*Moniliophthora roreri*)** crecida en residuos sólidos de zuro, cascarilla de arroz y cáscara del cacao” fue realizado en su totalidad por la Srta. Nataly Vanesa Solís Salas, como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, en el Reglamento de Estudiantes.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y de un disco compacto, que contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Nataly Vanesa Solís Salas que lo entregue a la señora María Augusta Chávez, M. Sc, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, mayo del 2015.

**Dr. Carlos Chiriboga MSc.****DIRECTOR****Dr. Rodrigo Ávalos****CODIRECTOR**

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Nataly Vanesa Solís Salas

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Evaluación cinética de la enzima Celulasa obtenida de Monilia (*Moniliophthora roreri*) crecida en residuos sólidos de zuro, cascarilla de arroz y cáscara del cacao**” ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando todos los derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, mayo del 2015.



Nataly Vanesa Solís Salas

AUTORIZACIÓN

Yo, Nataly Vanesa Solís Salas

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, la publicación en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “**Evaluación cinética de la enzima Celulasa obtenida de Monilia (*Moniliophthora roreri*) crecida en residuos sólidos de zuro, cascarilla de arroz y cáscara del cacao**” cuyo contenido y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, mayo del 2015.



Nataly Vanesa Solís Salas

DEDICATORIA

A mis padres, Fernando y Azucena, a mis hermanas, Tania y Sarah, por su constante ayuda y paciencia.

A mis abuelitos, Rosa y Telmo, con quienes estuve los primeros años de mi vida.

A todas las personas que han estado junto a mí en el transcurso del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien me llena de bendiciones día a día.

A mis padres, Azucena y Fernando, por toda su comprensión, apoyo y confianza que me brindan en cada paso que doy, quienes me han formado como persona y me han ayudado a alcanzar mis metas.

A mis hermanas, Tania y Sarah que me han brindado su apoyo incondicional y han sido mi fuente de motivación durante todo el transcurso de mi vida.

A Stalin, quien se ha convertido en una persona importante en mi vida, gracias por la paciencia y apoyo.

Al Dr. Carlos Chiriboga y al Dr. Rodrigo Ávalos por la confianza que han depositado en mí, por su paciencia y por brindarme sus conocimientos.

Al Ing. Jaime Villacís, gracias por su ayuda en el desarrollo estadístico de mi tesis.

A todos mis amigos y compañeros con los que compartí momentos agradables durante mi carrera.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Formulación del Problema	2
1.3 Justificación.....	2
1.4 Objetivos de la Investigación	4
1.4.1 Objetivo General.....	4
1.4.2. Objetivos Específicos	4
1.5 Fundamentos Teóricos	5
1.5.1 Monilia (<i>Moniliophthora roreri</i>)	5
1.5.1.1 Clasificación Taxonómica	5
1.5.1.2 Signos y síntomas de la enfermedad.....	5
1.5.1.3 Ciclo de vida	6
1.5.1.4 Morfología. Características microscópicas y macroscópicas	8

1.5.1.5 Hospedero	9
1.5.2 Celulosa y enzimas Celulasas	10
1.5.2.1. Celulosa	10
1.5.2.2 Celulasa.....	11
1.5.2.3 Características y propiedades de las celulasas	12
1.5.3 Residuos de crecimiento	13
1.5.3.1 Cascarilla de arroz	13
1.5.3.2 Zuro de maíz	13
1.5.3.3 Cáscara del cacao.....	14
1.5.4 Extracción y Purificación de enzimas.....	15
1.5.5 Métodos de cuantificación enzimáticos	15
1.5.5.1 Espectrofotometría.....	15
1.5.6 Métodos de purificación enzimáticos	16
1.5.6.1. Purificación por precipitación con sal	16
1.5.7 Cinética Enzimática	17
1.5.7.1. Cinética de Michaelis-Menten	17
1.5.7.2. Linealización por Lineweaver-Burk	19
1.6 Hipótesis.....	19
CAPÍTULO II	20
MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 Participantes	20
2.2. Zona de estudio	20
2.3 Duración del estudio.....	21
2.4 Materiales	21

2.5.1.2 Aislamiento de <i>Moniliophthora roreri</i>	25
2.5.1.3 Caracterización morfológica y patológica (sintomatología) de <i>Moniliophthora roreri</i>	25
2.5.1.4 Conservación de <i>Monilia</i>	27
2.5.2 Actividad enzimática de la Celulasa.....	28
2.5.2.1 Pre-tratamiento de los residuos y de <i>Monilia</i>	28
2.5.2.2 Evaluación del crecimiento de <i>Monilia</i> en los residuos pre-tratados	30
2.5.2.3 Obtención de los extractos homogenizados (crudos)	31
2.5.2.4 Cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas en los extractos homogenizados utilizando CMC como sustrato específico.	32
2.5.2.5 Purificación del extracto enzimático por precipitación con Sulfato de Amonio.....	33
2.5.2.6 Cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas de los extractos purificados en CMC como sustrato específico.	34
2.5.2.7 Determinación de proteína total.....	34
2.5.2.8 Determinación de parámetros cinéticos.....	35
2.4 Diseño experimental.....	36
CAPÍTULO III.....	37
RESULTADOS.....	37
3.1 Aislamiento, Purificación y Caracterización de <i>Moniliophthora roreri</i>	37
3.1.1. Caracterización Macroscópica.....	37
3.1.2. Caracterización Microscópica.....	38
3.1.3. Prueba de sintomatología.....	39
3.1.4 Conservación de <i>Moniliophthora roreri</i>	42

3.2 Actividad enzimática de la Celulasa.....	42
3.2.1 Evaluación del crecimiento de Monilia en los residuos pre-tratados	42
3.2.2 Cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas de los extractos homogenizados en CMC como sustrato específico.....	44
3.2.3 Cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas en los extractos purificados	47
3.2.4 Determinación de proteína total.....	48
3.2.5 Determinación de parámetros cinéticos de los extractos homogenizados	51
3.2.6. Determinación de parámetros cinéticos de los extractos purificados	55
CAPITULO IV	59
DISCUSIÓN	59
CAPÍTULO V.....	63
CONCLUSIONES.....	63
CAPITULO VII.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	67

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de la Moniliasis (<i>Moniliophthora roreri</i>).....	7
Figura 2. Características macroscópicas de <i>Moniliophthora roreri</i>	8
Figura 3. Características microscópicas de <i>Moniliophthora roreri</i>	9
Figura 4. Estructura de una pared celular. Modelo de la asociación entre la celulosa, hemicelulosa y lignina	10
Figura 5. Estructura molecular de la celulosa	11
Figura 6. Curva de saturación de una enzima donde se puede observar la evolución de la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción.....	18
Figura 7. Gráfica de Lineweaver-Burk	19
Figura 8. Mazorcas de cacao con características morfológicas de Moniliasis.....	24
Figura 9. Metodología para la prueba de sintomatología. a. Materiales utilizados en la cámara de flujo. b. Cáscaras de cacao sanos cortados. c. frascos con las cáscaras de cacao esterilizados.....	27
Figura 10. Frascos de vidrio con el inóculo de Monilia.....	28
Figura 11. Primer pre-tratamiento de cascarilla de arroz y zuro. a. Molienda de los sustratos. b. Cascarilla de arroz molido. c. Zuro molido.....	29
Figura 12. Pre-tratamiento de la cáscara del cacao. a. Cortado y licuado. b. Cáscara de cacao cortado y licuado. c. Medición del peso.....	29
Figura 13. Segundo Pre-tratamiento de cascarilla de arroz y zuro. a. Lavado de cascarilla de arroz. b. Lavado de zuro.....	30
Figura 14. Frascos que contienen los sustratos utilizados (cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro) en el día de oxigenación del hongo.....	31
Figura 15. Producto obtenido después de la incubación y centrifugación de la fermentación del hongo en los sustratos.	32
Figura 16. Muestras obtenidas en la cuantificación colorimétrica de glucosa (a) y proteína total (b).....	34
Figura 17. Colonias obtenidas después de la purificación continua.	37
Figura 18. Caracterización de las colonias de <i>M. roreri</i> . a. Vista anterior. b.	

Vista posterior. c. Colonias a los 7 y 10 días (derecha a izquierda)	38
Figura 19. Caracterización microscópica de <i>M. roreri</i> . a. Lente 40X con suero fisiológico, hifas septadas	39
Figura 20. Caracterización microscópica de <i>M. roreri</i> . a y b. Lente 40X. Esporas o onidas redondas y ovoides.	39
Figura 21. Prueba de sintomatología a. Muestras de cacaos sanos. b. Frascos inoculados con Monilia. c. Primer día de inoculación. d. Quinto día de inoculación. e. Décimo día de la inoculación. f. Cáscaras de cacao al décimo quinto día de inoculación.	41
Figura 22. Siembra de Monilia después de la conservación con el Método Castellani. a. Conservado a temperatura ambiente. b. Conservado a 4°C	42
Figura 23. Curva de calibración obtenida para medir la concentración de glucosa.....	45
Figura 24. Actividad enzimática neta de los sustratos de cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro.....	46
Figura 25. Cristales obtenidos después del proceso de purificación . Cáscara de cacao (a). Cascarilla de arroz (b). Zuro (c).	48
Figura 26. Curva de calibración obtenida para medir la concentración de proteína.....	49
Figura 27. Proteína Total obtenida de los extractos homogenizados en los días de fermentación analizados	50
Figura 28. Representación gráfica de la actividad enzimática de la enzima Celulasa (extractos homogenizados).....	52
Figura 29. Representación gráfica de la actividad enzimática de la enzima Celulasa (extractos purificados).....	55

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Análisis químico de la composición de la cascarilla de arroz.....	13
Tabla 2. Composición química y contenido de nutrientes digestibles totales de algunos subproductos del cultivo de cereales	14
Tabla 3. Composición química de la cáscara de cacao	14
Tabla 4. Datos para la curva de calibración para la determinación de glucosa en el espectrofotómetro.....	32
Tabla 5. Datos para la curva de calibración de la determinación de proteínas totales en el espectrofotómetro.....	35
Tabla 6. Resultados de la prueba de sintomatología de Monilia sembradas en las cáscaras de cacao.....	40
Tabla 7. Observaciones físicas de cascarilla de arroz realizadas en los días de las tomas de muestra.....	43
Tabla 8. Observaciones físicas de cáscara de cacao realizadas en los días de las tomas de muestra.	43
Tabla 9. Observaciones físicas de zuro realizadas en los días de las tomas de muestra.	44
Tabla 10. Actividad enzimática neta de los extractos enzimáticos homogenizados.....	46
Tabla 11. Actividad enzimática neta de los extractos enzimáticos purificados.....	47
Tabla 12. Proteína total de los extractos enzimáticos obtenidos de los tres residuos en estudio.	50
Tabla 13. Dobles inversos de cascarilla de arroz	53
Tabla 14. Dobles inversos de cáscara de cacao.....	53
Tabla 15. Dobles inversos de zuro.	54
Tabla 16. Parámetros cinéticos de los extractos homogenizados.	55
Tabla 17. Dobles inversos de cascarilla de arroz.	56
Tabla 18. Dobles inversos de cáscara de cacao.....	56
Tabla 19. Dobles inversos de zuro.	57
Tabla 20. Parámetros cinéticos de los extractos purificados	57
Tabla 21. Grados de pureza.....	58

RESUMEN

El Ecuador genera gran cantidad de residuos orgánicos lignocelulósicos provenientes de la agroindustria de cacao, arroz y maíz, estos subproductos son ricos en celulosa y pueden ser utilizados en la fermentación sólida por hongos productores de enzimas. En este trabajo se aisló y caracterizó al hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* y se estudió la cinética de la celulasa producida por este hongo utilizando la cascarilla de arroz, la cáscara de cacao y el zuro como sustratos inductores de crecimiento durante un periodo de 20 días. Para evaluar los parámetros cinéticos de la enzima se utilizó como sustrato específico la Carboximetilcelulosa (CMC) a concentraciones del 0,5%, 1% y 1,5%; se trabajó con la cinética de Michaelis-Menten y la Linealización Lineweaver-Burk para evaluar la velocidad máxima, constante de Michaelis, actividad específica, la constante catalítica y el grado de pureza de los extractos enzimáticos sin purificar y purificados con sulfato de amonio, obteniéndose una mayor producción de enzimas en los días diez, quince y veinte, de la cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro, respectivamente; además hubo una mayor actividad enzimática en los extractos obtenidos de la cascarilla de arroz, mientras que la menor actividad enzimática fue en los extractos obtenidos del zuro. Finalmente, los mayores parámetros cinéticos fueron los que se obtuvo del extracto de cascarilla de arroz. Al realizar la etapa de purificación mediante la precipitación con sal de amonio al 45% y 55%, hubo un incremento en la actividad específica de la enzima en cada uno de los extractos en estudio.

PALABRAS CLAVES:

- **MONILIA**
- **CELULASA**
- **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**
- **PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA**
- **PARÁMETROS CINÉTICOS**

ABSTRACT

The Ecuador generates lots of lignocellulosic organic waste from agro-industrial products of cocoa, rice and corn; these products are rich in cellulose and can be used in the solid fermentation of fungi that produces enzymes. In this investigation, we isolated and characterized the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri* and we study the kinetics of cellulase produced by this fungus using rice husks, cocoa shell and cob as inducers growth substrates for a period of 20 days. To evaluate the kinetic parameters of the enzyme, we used as specific substrate the carboxymethylcellulose (CMC) at concentrations of 0.5%, 1% and 1.5%; worked with the Michaelis-Menten kinetic and Lineweaver-Burk linearization to evaluate the constant maximum speed, specific activity, the catalytic constant, without purity and purified with ammonium sulfate. We obtained a higher production of enzymes in the days ten, fifteen and twenty, of rice hulls, cocoa husk and cob, respectively, there was also an increased in the enzyme activity in extracts from rice husks, and while there was lower in the enzyme activity in extracts obtained from the cob. Finally, the biggest kinetic parameters were obtained from rice husk extract. By performing the purification step by precipitation with ammonium salt, there was an increase in the specific activity of the enzyme in each of the extracts under investigation.

KEY WORDS:

- **MONILIA**
- **CELLULASE**
- **ENZYME ACTIVITY**
- **ENZYME PURIFICATION**
- **KINETIC PARAMETERS**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

El conocimiento de los hongos y el interés por los mismos han ido aumentando durante mucho tiempo. Los estudios se han basado en el control de enfermedades de las plantas provocadas por los hongos, debido a que estos han causado grandes pérdidas en los cultivos. *Moniliophthora roreri* es un hongo que causa la Moniliasis, una enfermedad que ataca al cultivo de cacao, llegando a la pérdida de este hasta el 60% de la cosecha (Suarez Contreras & Rangel Riaño, 2014). Monilia es un hongo que produce la pudrición de la mazorca del cacao, por esta razón al degradar las paredes del fruto, se supone tener enzimas celulasas que degradan la celulosa.

Las enzimas han sido utilizadas en las industrias sin conocerse su modo de acción o su actividad catalítica (González A. , 2009). Aún suele emplearse una enzima útil producida por una bacteria o un hongo sin extraerla de las células debido a que las enzimas tienen actividades específicas. Estos procesos han ido evolucionando considerablemente dando origen a la "Ingeniería enzimática", debido a que se han desarrollado fuentes para producir enzimas de uso industrial y que permiten su aplicación en varios procesos (González A. , 2009). En la actualidad se producen a gran escala enzimas puras que tienen varias ventajas al ser utilizadas.

Con esto, hay una nueva tendencia industrial que es el de reemplazar enzimas que provienen de tejidos, por enzimas que son producidos por microorganismos seleccionados, los mismos que generan enzimas específicas. De este modo, los procesos de selección y adaptación han mejorado de manera considerable la producción de enzimas a partir de microorganismos.

En el Ecuador no hay datos de producción de enzimas a nivel industrial, y hay pocos estudios de producción a nivel de laboratorio, utilizando como medios de crecimiento los productos orgánicos de desecho agroindustriales.

1.2 Formulación del Problema

El Ecuador genera gran cantidad de residuos orgánicos lignocelulósicos provenientes de la agroindustria de cacao, arroz y maíz, debido a que su poder nutritivo es desconocido. Estos subproductos ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, pueden ser utilizados en fermentación sólida por hongos productores de enzimas, las mismas que son aplicadas en la industria como catalizadores para transformar desechos celulósicos en otros productos de interés, tales como bioetanol (Paredes, Álvarez, & Silva, 2010), así como en la industria de alimentos ó en la fabricación de balanceados, especialmente avícola. Hasta el día de hoy, en nuestro país, no se reportan muchos estudios sobre la producción de enzimas a nivel de laboratorio y a nivel industrial.

Por este motivo se ha planteado el siguiente problema:

¿Es posible tener mayor actividad enzimática de la enzima celulasa cuando se obtiene del hongo *Moniliophthora roreri* en los residuos de zuro, cascarilla de arroz y cáscara de cacao?

1.3 Justificación

En el Ecuador pocos hongos han sido objeto de explotación para el beneficio de la naturaleza. La Moniliasis es una enfermedad que es causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, considerada como uno de los factores limitantes de mayor impacto en la producción del cacao (Arévalo, 2004), debido a que ataca a las mazorcas del cacao, destruyendo las paredes celulares y entra hasta la semilla rompiendo las paredes celulares

de la cáscara de cacao; por su poder destructivo de la pared celular de la mazorca del cacao, se considera que este hongo es un excelente productor de enzimas celulasas que se clasifican en endoglucanasas, celobiohidrolasas o exoglucanasas y β -glucosidasas (Zhang & Zhang, 2013)

En el presente trabajo, la enzima de interés es la celulasa por su capacidad degradativa de la pared celular (celulosa), compuesto presente en las materias primas de la industria de balanceados para las aves de carne y postura, en la industria energética para la elaboración de biocombustibles de segunda generación (Martínez, Balcázar, Datán, & Folch, 2008), industria textil y alimenticia, además se aplica en la degradación de subproductos de la agroindustria que actualmente son fuentes de contaminación al medio ambiente.

Por lo citado anteriormente y su aplicación en la industria en general, las enzimas requieren que sean producidas a gran escala y bajo costo, por esta razón las enzimas de origen microbiano han ido reemplazando a las enzimas de origen vegetal y animal. La ventaja de esta producción es de su menor costo, menos tiempo de fabricación y mayor rendimiento (PQBio, 2007). Se puede lograr obtener enzimas puras, que tienen la ventaja sobre los productos de fermentación en la que la acción es más específica en su función catalítica, la actividad es predecible, controlable y puede utilizar concentraciones más elevadas del sustrato.

Los medios de crecimiento para *Monilia* fueron la cascarilla de arroz, la tusa del maíz (zuro) y las cáscaras del cacao. Cada uno de estos residuos produce una alta contaminación al ambiente porque son desechados o quemados. El maíz es uno de los cultivos más intensivos en nuestro país, especialmente en la región Costa, debido a que sus granos son utilizados como materia prima en la elaboración de balanceados. La mazorca o fruto, está formado por una parte central llamado zurro, donde se adhieren los granos de maíz. El zurro, o corazón, representan del 15 al 30 % del peso de la espiga (Garcés, 1987). Referente a la cascarilla de arroz en nuestro país se ha visto por

experiencia que simplemente es quemada al aire libre o arrojada a los ríos en grandes cantidades, más por desconocimiento de su poder nutritivo. La cáscara del cacao corresponde al 90% del fruto, siendo el principal desecho en la producción de cacao, éste representa un grave problema porque al ser usado como abono se convierten en una fuente significativa de enfermedades causada por varias especies del género *Phytophthora* como la mazorca negra (Baena & García, 2012).

Por estas razones se busca encontrar usos alternativos a estos desechos agroindustriales debido a los nutrientes que contienen, utilizándolos como fuente de crecimiento de *Monilia*, con la finalidad de obtener enzimas celulasas.

1.4 Objetivos de la Investigación

1.4.1 Objetivo General

Evaluar la cinética de la enzima Celulasa obtenida de *Monilia* (*Moniliophthora roreri*) crecida en residuos sólidos de zuro, cascarilla de arroz y cáscara del cacao.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Obtener el hongo *Monilia* purificado, a partir de las plantas de cacao.
- Determinar la cinética de producción de enzima del hongo *Monilia* en los residuos en estudio.
- Evaluar los parámetros cinéticos de la Celulasa en el sustrato específico Carboximetilcelulosa.
- Determinar los parámetros cinéticos de la Celulasa en Carboximetilcelulosa con una etapa de purificación.

1.5 Fundamentos Teóricos

1.5.1 Monilia (*Moniliophthora roreri*)

Monilia causa la Moniliasis o pudrición acuosa en el cacao, es un hongo parásito de las plantas neotropicales, también es una de las enfermedades más representativas en el cultivo del cacao (Suarez Contreras & Rangel Riaño, 2014).

1.5.1.1 Clasificación Taxonómica

Según la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2014), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Súper reino: Eukaryota

Reino: Fungi/grupo Metazoa

Subreino: Dikarya

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *roreri*

Nombre técnico: *Moniliophthora roreri* Evans

1.5.1.2 Signos y síntomas de la enfermedad

La susceptibilidad de las mazorcas de cacao al ataque de este hongo, varía con la edad de la mazorca y el cultivo, siendo mayor durante los primeros 90 días de desarrollo de la

mazorca. Las investigaciones han permitido determinar que los síntomas varían con la edad del fruto al momento de la infección, pero su desarrollo depende de las condiciones ambientales, especialmente de la temperatura y la variedad de cacao (Arévalo, 2004).

Los primeros síntomas aparecen como pequeños puntos de consistencia aceitosa de color café oscuro, después se forma una mancha necrótica de borde irregular, que crece rápidamente hasta cubrir totalmente la superficie del fruto. Poco tiempo después, las lesiones se cubren de una capa de micelio de color blanquecino, el estroma, sobre el cual ocurre una esporulación que usualmente es rápida, alrededor de 3 a 8 días después de que aparece la lesión. El color de los conidios varía de blanco a crema oscuro (González J. , 2007).

Cuando la infección ocurre en mazorcas tiernas frecuentemente se observa la aparición de un abultamiento o tumefacción de los tejidos del exocarpo, con una coloración más clara que el resto de la mazorca. Si el patógeno infecta frutos antes de la llegada a la madurez, estos frutos presentan un amarillamiento irregular dando la apariencia de una madurez parcial y prematura. En otras ocasiones, los frutos infectados llegan hasta la cosecha con una apariencia sana, sin embargo, al abrirlos, el interior está descompuesto (González J. , 2007).

1.5.1.3 Ciclo de vida

El ciclo del patógeno dura entre cincuenta y sesenta días, desde la infección hasta completar la esporulación. Las conidias se producen en cadenas en las superficies de las mazorcas enfermas que siguen siendo verdes, o en las mazorcas que están momificadas y de color negruzco (Estrella & Cedeño, 2012).

Las esporas de este patógeno son fácilmente dispersadas por el viento, el hombre y otros agentes hacia las mazorcas sanas donde se reinicia la enfermedad. La penetración se

realiza directamente a través del exocarpo y ocasionalmente por los estomas, avanzando intercelularmente, lo que facilita una esporulación interna de la mazorca (Estrella & Cedeño, 2012).

Una vez infectado el fruto, treinta días después empiezan aparecer los primeros síntomas iniciales de la enfermedad, a continuación se presentan unos puntos aceitosos que se atrofian y empiezan a formarse manchas de color marrón entre los quince a veinte días, después de esta etapa empieza a formarse una capa blanquecina que envuelve gradualmente todo el fruto y entre los tres a cuatro días se llena de esporas secas del hongo, tomando una coloración cremosa (Arévalo, 2004).

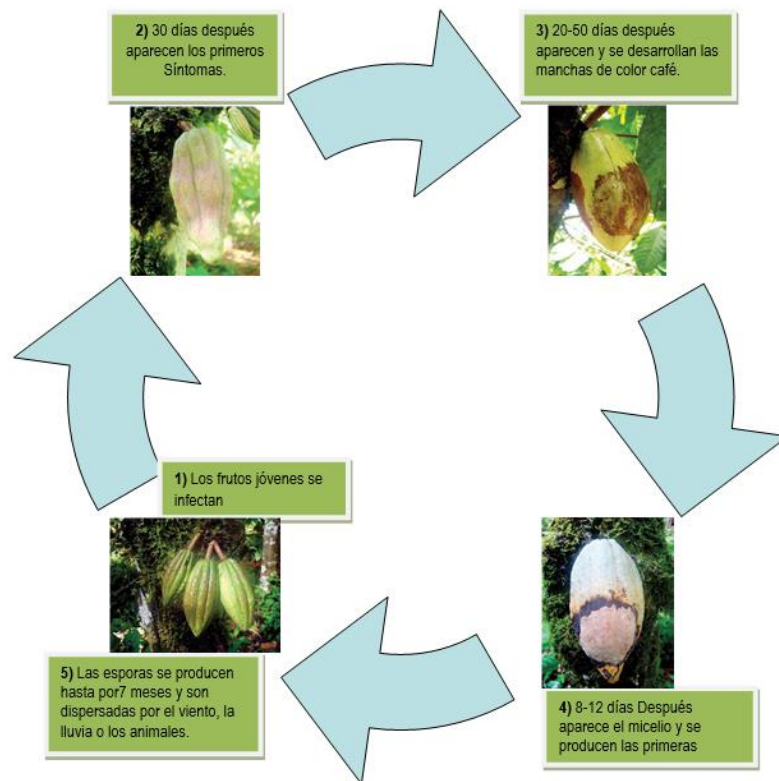


Figura 1. Ciclo de vida de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*)

FUENTE: (Phillips & Cerda, 2014)

1.5.1.4 Morfología. Características microscópicas y macroscópicas

1.5.1.4.1 Características macroscópicas

Las características externas son una necrosis, deformación y pudrición de las mazorcas. El cacao se caracteriza por un color café (chocolate), para cubrirse con una “felpa” de color blanca o crema (esporas del hongo). Los tejidos centrales, pulpa, semillas y la cascara están rodeados por una sustancia acuosa debido a la descomposición de ellos. También se presentan como abultamientos en la superficie de la mazorca (Sánchez & Garcés, 2012).



Figura 2. Características macroscópicas de *Moniliophthora roreri*

FUENTE: (Sánchez & Garcés, 2012)

1.5.1.4.2 Características microscópicas

Las colonias son de aspecto pulverulento con colores beige a marrón. En el microscopio se observa hifas hialinas septadas y conidias catenuladas ovoides o redondas (Lozada, Herrera, Perea, Stashenko, & Escobar, 2012) .

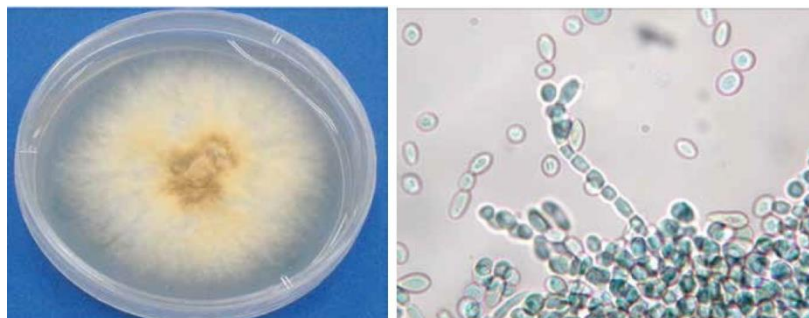


Figura 3. Características microscópicas de *Moniliophthora roreri*

FUENTE: (Lozada, Herrera, Perea, Stashenko, & Escobar, 2012)

1.5.1.5 Hospedero

En condiciones de campo, *M. roreri* afecta solamente los frutos de plantas de los géneros *Theobroma* y *Herrania*, ambos de la familia Sterculiaceae. Mediante inoculaciones artificiales se ha logrado infectar tallos de cacao, de donde ha sido posible aislarlo para las diferentes investigaciones tanto in vitro como in situ (Estrella & Cedeño, 2012). En la cascara del cacao se ubican las esporas del hongo cubriéndole con una “felpa de color blanco”.

1.5.1.5.1 Composición de la cáscara del cacao

Todas las plantas están compuestas por las células vegetales rodeadas por pared celular fina mecánicamente fuerte. Esta pared consta de una mezcla compleja de polisacáridos y otros polímeros (Figura 4). Las paredes celulares también contienen proteínas estructurales, celulosa, hemo y heteropolisacáridos, polímeros fenólicos, además de otros materiales que modifican las características físicas y químicas de la pared (Baena & García, 2012).

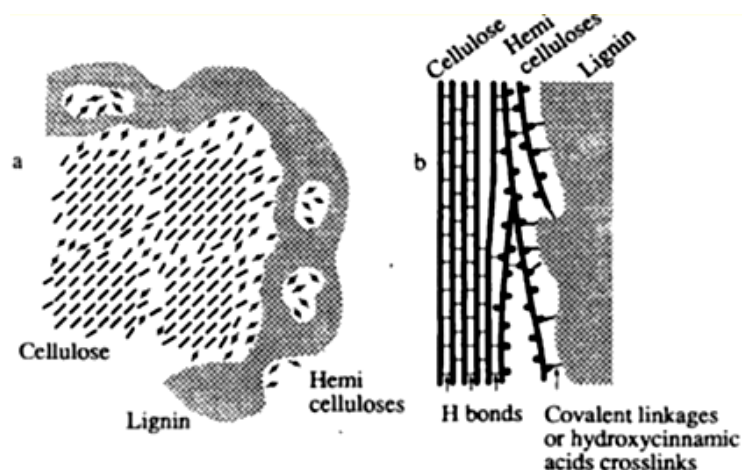


Figura 4. Estructura de una pared celular. Modelo de la asociación entre la celulosa, hemicelulosa y lignina

FUENTE: (Baena & García, 2012)

La cáscara del cacao posee un porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina de 17.39%, 6.38% y 32.40%, respectivamente (Baena & García, 2012).

1.5.2 Celulosa y enzimas Celulasas

1.5.2.1. Celulosa

La celulosa es el principal componente de la pared celular de la mayor parte de las plantas. Es un polisacárido formado por unidades de glucosa las cuales están unidas por enlaces β 1-4 glucosídicos de al menos 500 residuos de β -D-glucosa unidos covalentemente. Este tipo de configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cadenas no se presenta aisladas si no unidas entre sí mediante enlaces covalentes (figura 5), formando una estructura supramolecular cristalina, organizada, y resistente a hidrólisis. En la pared secundaria tiene su máximo desarrollo mientras que en la pared primaria son más cortas (Baena & García, 2012). Esta estructura se encuentra rodeada por polisacáridos hemicelulósicos que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, haciéndola aún más resistente a la hidrólisis química y

biológica. Pero no toda la estructura de la celulosa es cristalina, existen regiones amorfas con una composición heterogénea caracterizada por una variedad de enlaces las cuales son cruciales para la biodegradación de la celulosa. Además las fibras de celulosa contienen torceduras y espacios, en las cuales se forman microporos y capilares amplios que permiten la penetración de moléculas relativamente grandes, incluyendo a las enzimas celulolíticas (Gutiérrez, Moreno, & Montoya, 2014).

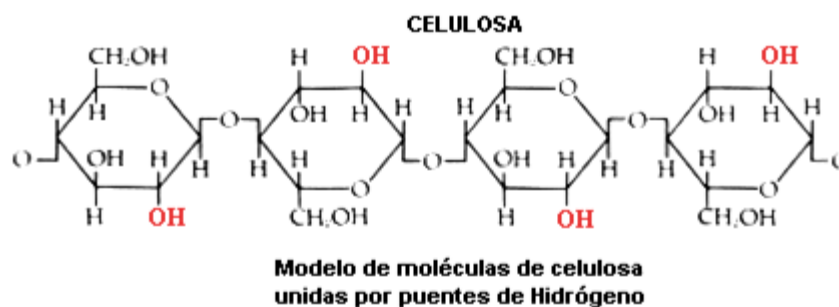


Figura 5. Estructura molecular de la celulosa

FUENTE: (Baena & García, 2012)

1.5.2.2 Celulasa

La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas conocidas como celulasas, que pertenecen a la superfamilia de las glucosil hidrolasas, llamadas así porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre 2 o más hidratos de carbono o entre estos y una fracción que no sea un hidrato de carbono (Gutiérrez, Moreno, & Montoya, 2014).

El sistema de celulasas típico incluye 3 tipos de enzimas: endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasas y las β -glucosidasas. Las endoglucanasas cortan al azar en el interior de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes y, en consecuencia, nuevos extremos de cadena. Las exoglucanasas actúan de una manera progresiva en los

extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa. Las glucosidasas hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa (Gutiérrez, Moreno, & Montoya, 2014).

1.5.2.3 Características y propiedades de las celulasas

Las características de las celulasas varían dependiendo de su origen. La mayoría de las celulasas microbianas estudiados han demostrado ser proteínas ácidas con un contenido significativo de hidratos de carbono. Los extractos de celulasa pueden descomponer las celulosas modificadas tales como carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa (Serva, 2014).

La estabilidad térmica y especificidad exacta de la celulasa por cada sustrato puede variar, sin embargo el pH óptimo de las preparaciones de las enzimas varía de 4 a 5; para su actividad catalítica la temperatura óptima es de 40 a 50 °C y el pH varía entre 5 y 7. Las celulasas se conservan a 4 °C (Serva, 2014).

Las endo- β -1, 4-glucanasas muestran una variación considerable en los pesos moleculares, que van desde 5.3 kDa a 55 kDa; en las exo-glucanasa y β -glucosidasa los pesos moleculares varían entre 50 kDa a 76 kDa. El peso molecular de celobiohidrolasa- β 1,4-glucano se midió a aproximadamente 42 kDa. Si las moléculas de celulasa son esféricas, su tamaño podría oscilar desde 25 a 80 Å de diámetro con una media de 60 Å. Si las enzimas son elipsoides, sus tamaños se van desde de 15 a 40 Å de ancho y de 80 a 250 Å de longitud, dando lugar a un tamaño medio de 35 Å \times 200 Å (Zhang & Zhang, 2013).

1.5.3 Residuos de crecimiento

1.5.3.1 Cascarilla de arroz

La cascarilla de arroz es un residuo vegetal constituido por celulosa y sílice, elementos que ayudan a su buen rendimiento como combustible. La cascarilla de arroz presenta una gran variedad de características fisicoquímicas. El alto contenido de sílice demostrado hace que su uso alimenticio en harinas para animales sea limitado. Uno de los elementos representativos de la cascarilla de arroz es la celulosa $(C_6H_{10}O_5)_n$ siendo el componente principal de las fibras de este subproducto agrícola (Valverde, Sarria, & Monteagudo, 2007)

Tabla 1

Análisis químico de la composición de la cascarilla de arroz

ELEMENTO	PORCENTAJE (%)
Fibra (Celulosa)	39.05
Lignina	22.80
Proteínas	3.56
Extracto no Nitrogenado	6.60
Extracto con éter	0.93

FUENTE: (Valverde, Sarria, & Monteagudo, 2007)

1.5.3.2 Zuro de maíz

El maíz es uno de los cultivos más representativos de nuestro país, debido a que sus granos son utilizados como materia prima en la elaboración de balanceados y otros agregados. La mazorca o fruto, está formado por una parte central llamado zuro, donde se adhieren los granos de maíz. El zuro, o corazón, representan del 15 al 30 % del peso de la

espiga (Garcés, 1987). El zuro es un subproducto del cultivo de maíz contiene un alto contenido en fibra.

Tabla 2

Composición química y contenido de nutrientes digestibles totales de algunos subproductos del cultivo de cereales.

Sub-producto	Materia Seca	Proteína Cruda	Fibra Cruda	Cenizas
Casca. de Arroz	96.6	4.1	38.2	7.7
Tuza de Maíz	82.8.	7.9	23.3	6.4

FUENTE: (Garcés, 1987)

1.5.3.3 Cáscara del cacao

El cacao (*Theobroma cacao*), Familia Sterculiaceae, es un producto altamente explotado. Su cultivo produce, desde la etapa de recolección hasta la de procesamiento, una serie de desechos constituidos por la cáscara del fruto y la pulpa de las semillas los cuales son ricos en azúcares y polisacáridos, entre otros (Crescente, Acosta, Guevara, & Estaba, 1999). El análisis químico de la cáscara del cacao se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3

Composición química de la cáscara de cacao

CONTENIDO DE:	RESULTADO (%)
Proteínas	8.69
Nitrógeno Total	1.39
Materia Orgánica	60.14
Humedad	15.25
K,Na,P,Mg,Ca,Zn.	Trazas

FUENTE: (Crescente, Acosta, Guevara, & Estaba, 1999)

1.5.4 Extracción y Purificación de enzimas

Las técnicas de extracción y purificación de proteínas se han convertido en procesos necesarios para la producción de enzimas a escala de laboratorio e industrial.

Las proteínas microbianas pueden clasificarse en proteínas extracelulares y proteínas intracelulares (ligadas o libres), las segundas necesitan un proceso de ruptura celular antes de la purificación enzimática. Hay dos métodos de extracción de enzimas, el primero son los métodos químicos, que incluyen la utilización de álcalis, lisozima, EDTA, detergentes (Tween, Tritón, etc.), shock osmótico; el segundo son los métodos físicos que incluyen sonicación congelación, cizallamiento, trituración y agitación (Wiseman, 1985).

1.5.5 Métodos de cuantificación enzimáticos

Para estudiar la actividad de una enzima o el contenido proteico se han desarrollado técnicas basados en la formación de complejos coloridos conociéndose cuantitativamente la concentración de proteínas, entre estos métodos tenemos Bradford, Lowry, Biuret acompañados del método Espectrofotométrico.

Utilizando el reactivo Biuret se puede también cuantificar las proteínas que al formar al complejo colorido tiene un máximo de absorción a 540 nm. Este es un método muy utilizado por ser sencillo, rápido y económico (Segal & Ortega, 2005). Para cuantificar la producción de enzimas en un sustrato comúnmente se utiliza el Espectrofotómetro.

1.5.5.1 Espectrofotometría

La espectrofotometría se refiere a los métodos cuantitativos de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se refiere a la medida de cantidades relativas de luz absorbida por una muestra, en función de la longitud

de onda. Cada componente de la solución tiene su patrón de absorción de luz característico. Comparando la longitud de onda y la intensidad del máximo de absorción de luz de una muestra versus soluciones estándar, es posible determinar la identidad y la concentración de componentes disueltos en la muestra (solución incógnita) (González J. M., 2008).

Para cualquier método colorimétrico es necesario realizar una curva patrón que sirva de apoyo en la determinación de la concentración de la proteína, la curva se elabora con una disolución de proteína cuya concentración es conocida, como la albumina de suero bovino (Segal & Ortega, 2005).

Esta es la forma más sencilla y común de analizar enzimas, y consiste en obtener curvas completas mediante el control directo y continuo de la reacción (Wiseman, 1985).

1.5.6 Métodos de purificación enzimáticos

Para purificar los extractos enzimáticos se han evaluado diferentes métodos como son: La cromatografía, filtración y ultrafiltración, purificación por precipitación.

1.5.6.1. Purificación por precipitación con sal

En general, la purificación por precipitación con sal es el método más utilizado para obtener enzimas. Este método depende de la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la proteína. Los grupos hidrofóbicos predominan en el interior de ésta, pero algunos se localizan en diferentes regiones de la superficie; el agua es puesta en contacto con la superficie, haciendo que estas regiones no queden expuestas; cuando la sal es agregada, el agua solventa los iones de la sal, y mientras la concentración de sal se incrementa, el agua es removida de los alrededores de la proteína, eventualmente exponiendo las regiones hidrofóbicas. Dichas regiones en las proteínas pueden interactuar mutuamente o

con las de otras moléculas, resultando en una aglomeración. De esta forma las proteínas con regiones hidrofóbicas más abundantes formarán agregados y se precipitarán más rápidamente que aquellas con pocas regiones resultando un fraccionamiento. Se ha mostrado que la mejor sal para la precipitación de proteínas es el sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, posibilita la diferenciación de fases después de un proceso de centrifugación. Esta sal no debe ser utilizada por encima de un pH de 8.0 debido a la acción buffer del amoníaco (Rojas, 2009).

1.5.7 Cinética Enzimática

La actividad de una enzima se determina a partir de la concentración de la enzima, de sustrato, cofactores, inhibidores, fuerza iónica, pH, temperatura. La cinética estudia la forma en que todos estos parámetros influyen en la actividad enzimática, proporcionando el conocimiento de la reacción y permitiendo su control (Wiseman, 1985).

1.5.7.1. Cinética de Michaelis-Menten

Esta ecuación permite describir de mejor manera a la cinética enzimática, y propone la formación de un complejo enzima-sustrato (Wiseman, 1985). La expresión de Michaelis–Menten es la siguiente:

$$v_o = V_{m\acute{a}x} \frac{S_o}{K_m + S_o}$$

La velocidad máxima (conocida la concentración de enzima), permite conocer la constante catalítica (K_{cat}) o número de cambio de una enzima, es decir el número de moles de sustrato transformado por mol de enzima en la unidad de tiempo (Núñez, 2001).

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{E_0}$$

La constante de Michaelis (K_m), representa la afinidad de la enzima por el sustrato y es una pseudocostante de disociación (Núñez, 2001).

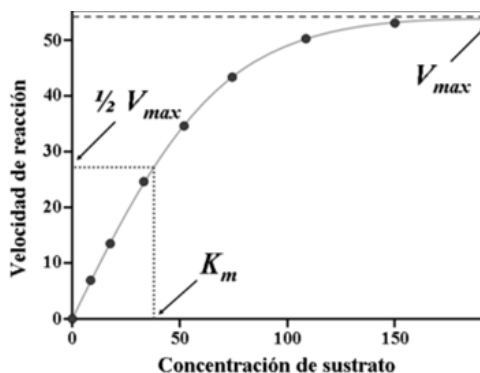


Figura 6. Curva de saturación de una enzima donde se puede observar la evolución de la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción

FUENTE: (Núñez, 2001)

La velocidad máxima se expresa como la actividad enzimática y se define como la cantidad de enzima que, en condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerza iónica, es capaz de transformar en sus productos respectivos un micromol de sustrato en un minuto, y se lo conoce con el nombre de unidad internacional (UI), y la actividad enzimática específica es referida para los mg de proteína (Núñez, 2001).

Otra unidad de medida de la actividad enzimática es el Katal que se define como la cantidad de actividad enzimática necesaria para convertir un mol de sustrato en producto por segundo (Wiseman, 1985).

Para determinar los parámetros cinéticos, $V_{m\acute{a}x}$ y K_m , se realizan los métodos de Linealización de Eadie Hofstee, Langmuir y Lineweaver-Burk. El método de Linealización de Lineweaver-Burk se utilizó en el presente trabajo.

1.5.7.2. Linealización por Lineweaver-Burk

Los valores de V_{max} y K_m se obtienen gráficamente una vez hecha la transposición en la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Al representar $1/S$ frente a $1/V_o$ se obtienen los valores de $-1/K_m$ y $1/V_{max}$ a partir de la intersección de $1/S$ y $1/v$ con los ejes. La pendiente de la línea es K_m/V_{max} . Esta es la representación de Lineweaver-Burk (Wiseman, 1985).

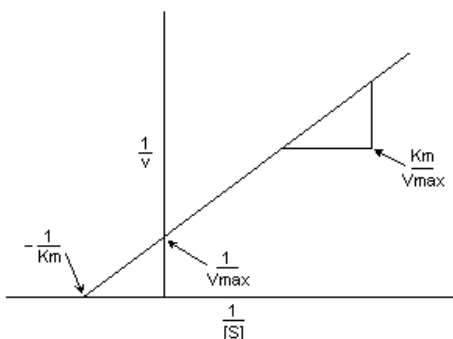


Figura 7. Gráfica de Lineweaver-Burk

FUENTE: (Núñez, 2001)

La gráfica de Lineweaver-Burk o del doble recíproco muestra el significado de los puntos de corte entre la recta y los ejes de coordenadas, y el gradiente de la velocidad.

1.6 Hipótesis

El hongo *Moniliophthora roreri* presenta mayor actividad enzimática en los extractos homogenizados y purificados, extraídos de la cascarilla de arroz.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente investigación contó con la participación del Dr. Carlos Chiriboga y el Dr. Rodrigo Ávalos como colaboradores científicos, adicionalmente se tuvo la colaboración del Ing. Jaime Villacís en el análisis estadístico.

2.2. Zona de estudio

La presente investigación se realizó en dos fases: la primera incluyó toma de muestras en el campo y aislamiento del hongo y la segunda incluyó la extracción y evaluación de la actividad enzimática de la celulasa

Primera fase:

Se tomó las muestras de cacao con y sin síntomas de *Monilia* en el recinto El Paraíso, ubicada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, que se encuentra al norte y al este de la provincia de Pichincha, de coordenadas 0°15'15" Sur y 79°10'19" Oeste, altitud de 625 msnm (Getamap.net, 2014).

Los residuos que se utilizaron son la cascarilla de arroz, el zuro y la cáscara del cacao. Los dos primeros se obtuvieron de la hacienda "La Promesa", Bucay, Cantón General Antonio Elizalde, Provincia de Guayas, al este de la Provincia del Guayas, de coordenadas 2°10'0" Sur y 79°6'0" Oeste, altitud de 604 msnm (Getamap.net, 2014).

El aislamiento, caracterización y purificación de *Monilia* se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Microbiología de la Carrera de Ingeniería

Agropecuaria, IASA I, Hacienda el Prado, de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, que se encuentra ubicado en la Parroquia San Fernando, Cantón Rumiñahui, de la Provincia Pichincha, al Oeste $78^{\circ}25'00''$, latitud Sur $0^{\circ}22'21''$ y Oeste $78^{\circ}26'00''$, latitud Sur $0^{\circ}22'46''$, altitud: 2748 msnm (Getamap.net, 2014).

Segunda fase:

La fase de extracción y evaluación cinética de la enzima celulasa se realizó en los laboratorios de Docencia de Biotecnología, de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, que se encuentra ubicado cerca de la ciudad de Sangolquí, en el Valle de los Chillos.

2.3 Duración del estudio

La fase de campo, recolección, aislamiento y crecimiento en los sustratos de *Monilia*, se desarrolló entre los meses agosto 2014 a febrero 2015; la fase de extracción y evaluación de la actividad enzimática se realizó en los meses de febrero a abril 2015, siendo concluido todo el estudio en el mes de mayo 2015.

2.4 Materiales

Equipos e implementos. Los equipos que se utilizó en la elaboración de la presente tesis, fueron los siguientes:

- Autoclave (MARKET FORGET)
- Balanza analítica (ADAM)
- Incubadora
- Mechero bunsen y mechero de alcohol
- Microscopio

- Refrigeradora
- Centrifugadora (HETTICH)
- Incubador shaker (INNOVA 40)
- Espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC)
- Incubador baño maría (MEMMERT)
- PH metro (THERMO SCIENTIFIC)
- Papel whatman N.1 (CHEMICALLY PREPARED PAPER)
- Jeringas de 5 mL
- Tubos falcon 50 mL
- Celdas para espectrofotómetro
- Cámara de flujo laminar

Reactivos: Los reactivos que se utilizaron en el aislamiento del hongo y en la actividad enzimática de la celulasa, fueron los siguientes:

- Agua destilada esterilizada
- Agar papa dextrosa (PDA)
- Alcohol potable
- Eritromicina
- Hipoclorito de sodio al 10%
- Azul de lactofenol
- Solución salina al 0.85%
- Tween 20 al 0.1%
- Carboximetilcelulosa (CMC), solución al 0,5%, 1 %, 1.5%.
- Sal acetato de Sodio
- Ácido acético glacial
- Sulfato de amonio
- Albúmina sérica bovina
- Reactivo Biuret

Residuos: Los residuos agroindustriales que se utilizaron para el crecimiento del hongo fueron los siguientes:

- Cascarilla de arroz
- Cáscara de cacao
- Tusa del maíz (zuro)

Cristalería:

- Vasos de precipitación 250 mL, 500 mL
- Erlenmeyer 500 mL y 1000 mL
- Frascos de vidrio 125 mL
- Pipetas 1 mL, 10 mL
- Probetas 10 mL, 100 mL
- Varilla de vidrio estéril
- Cajas petri
- Buretas
- Soporte universal
- Envases de vidrio
- Tubos de vidrio con tapa rosca
- Balones aforados 10 mL, 50 mL, 250 mL

2.5. Métodos

2.5.1 Aislamiento, Purificación y Caracterización de *Moniliophthora roreri*

En la fase de campo se siguió una metodología adecuada para la recolección e identificación de mazorcas de cacao con Moniliasis, después, en la fase de laboratorio, se aisló y se caracterizó morfológicamente a *Moniliophthora roreri*.

2.5.1.1 Recolección e identificación de mazorcas con síntomas de Moniliasis

Se recolectaron un total de 10 mazorcas de cacao en fundas de papel que presentaban características morfológicas y patológicas de Moniliasis, de acuerdo a los criterios descritos en el capítulo I. Se seleccionaron mazorcas con los siguientes síntomas: momificadas, crecimiento micelial de color blanco y crema, manchas de color café, puntos aceitosos.



Figura 8. Mazorcas de cacao con características morfológicas de Moniliasis

2.5.1.2 Aislamiento de *Moniliophthora roreri*

Las mazorcas de cacao que se recolectaron fueron llevadas al laboratorio en donde se seleccionó la parte interna y externa de la corteza. Para desinfectar a las cortezas seleccionadas, se trabajó en la cámara de flujo laminar en donde se colocaron las muestras en hipoclorito de sodio al 10% y se dejó por aproximadamente dos minutos, seguidamente se lavaron con agua destilada estéril para quitar los residuos de hipoclorito y se esperó unos minutos para que se sequen las muestras. De las partes desinfectadas de la mazorca se realizaron cortes pequeños de las partes enfermas con un margen de tejido sano (Falconí, 1998). Las muestras desinfectadas y secas se sembraron en cajas Petri con el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) más antibiótico y se incubaron a 27°C. Las cajas Petri que presentaron contaminación fueron purificadas, tomando con el asa partes del medio con características macroscópicas de *Monilia*, fueron sembradas nuevamente en cajas Petri con Agar PDA y antibiótico e incubadas a 27°C. Se midió diariamente el crecimiento durante 8 días.

2.5.1.3 Caracterización morfológica y patológica (sintomatología) de *Moniliophthora roreri*

Se obtuvieron un total 10 colonias de hongo, estas fueron evaluadas microscópica y macroscópicamente, según las características de *Monilia*, descritas en el Capítulo I, después se realizaron pruebas de patogenicidad.

2.5.1.3.1 Caracterización macroscópica

Los cultivos purificados e incubados a 27°C que tuvieron un desarrollo de la colonia durante los 8 días fueron utilizados para la identificación macroscópica, teniendo en cuenta las características de crecimiento, apariencia, textura y color de las colonias hongo.

2.5.1.3.2 Caracterización microscópica

Los cultivos con crecimiento micelial fueron observados en el microscopio con lente de 40X y 100X. Primero se prepararon placas portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y otras con suero fisiológico, siguiendo el método descrito en (Arias & Piñeros, 2008), se tomó una cinta pegante de aproximadamente 4 cm de largo con el lado adhesivo hacia fuera y se presionó sobre la superficie de las colonias del hongo. Finalmente, la cinta con las estructuras fúngicas se colocó sobre el portaobjetos preparado. Se pudo observar la forma de las conidias.

2.5.1.3.3 Prueba de sintomatología

Se realizó esta prueba con el fin de observar la capacidad del hongo para reproducir los síntomas de la enfermedad sobre los frutos sanos que produce *Monilia*. Se emplearon tres mazorcas sanas, las cuales se les sometió a un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio al 6% y se realizó tres lavados con agua estéril destilada. Cuando los cacaos estuvieron desinfectados se cortaron en dos pedazos cada uno y se ubicaron en 6 frascos de vidrio esterilizados. Se realizaron las inoculaciones tomando trozos pequeños de medio con el hongo adherido. Las mazorcas inoculadas fueron incubadas a 27°C (figura 9). Y se evaluó la severidad externa durante 15 días, realizando observaciones diarias.

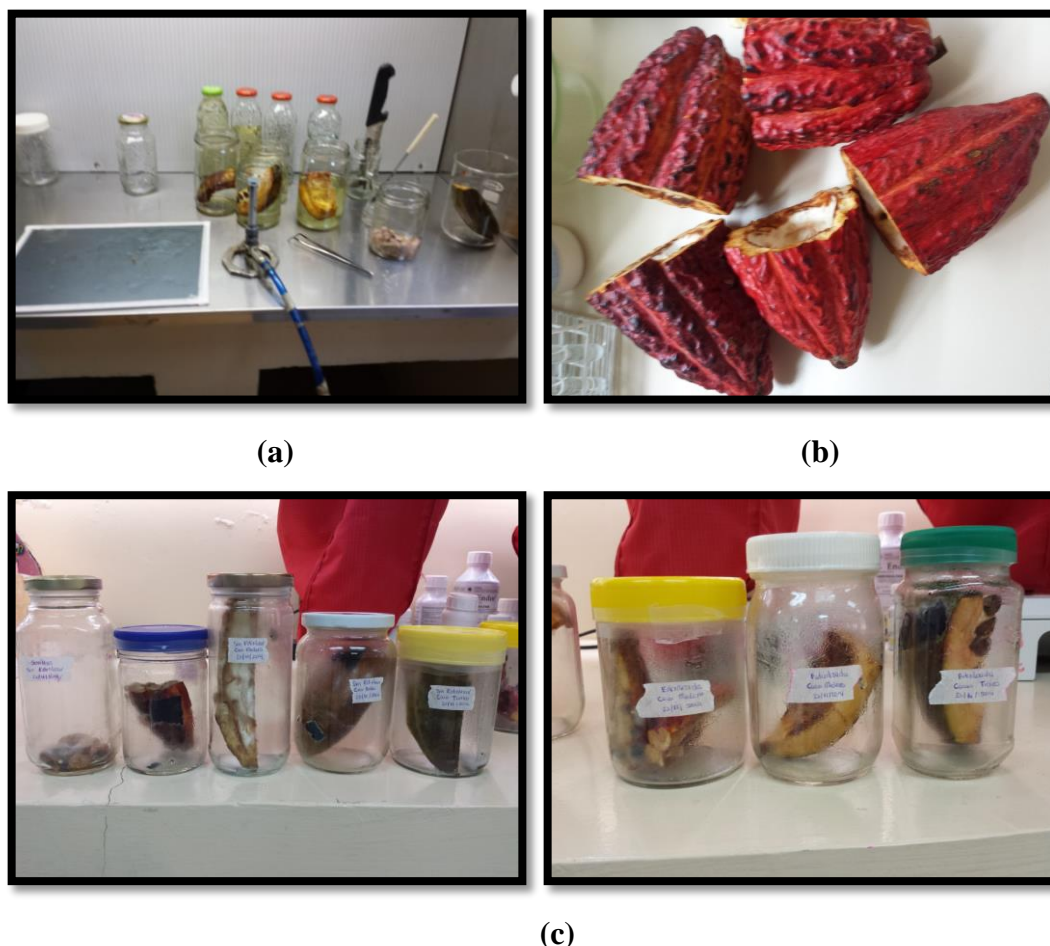


Figura 9. Metodología para la prueba de sintomatología. a. Materiales utilizados en la cámara de flujo. b. Cáscaras de cacao sanos cortados. c. frascos con las cáscaras de cacao esterilizados.

2.5.1.4 Conservación de Monilia

Para conservar a los hongos purificados y caracterizados se utilizó el método de Castellani, para lo cual, se autoclavó 9 mL de agua destilada a 121 °C durante 40 minutos en frascos de vidrio con tapa rosca. Después de esterilizar los frascos, se añadió a cada uno 1 mL del inóculo y se almacenaron en la incubadora a 27°C y en la refrigeradora a 4°C (Díaz & Lemes, 2009).

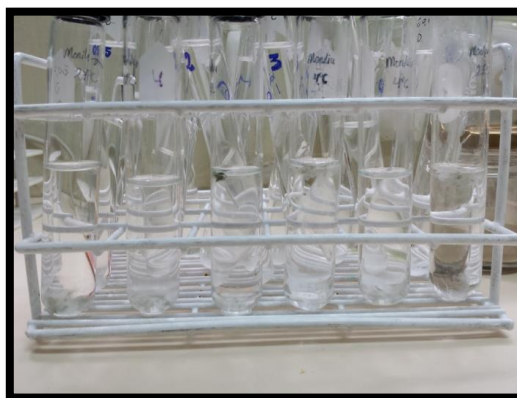


Figura 10. Frascos de vidrio con el inóculo de Monilia.

Cuando se caracterizó morfológicamente y se realizó la prueba de patogenicidad, se procedió a multiplicar a *Moniliophthora roreri* en medio PDA más antibiótico, para posteriormente sembrar en los sustratos de cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro con el fin de inducir el crecimiento del hongo mediante la producción de la enzima celulasa.

2.5.2 Actividad enzimática de la Celulasa

Para poder obtener las enzimas celulasas que son encargadas del proceso de degradación de la celulosa se procedió a sembrar el hongo purificado en los tres residuos de estudio. Una vez obtenido el complejo hongo-sustrato, se procedió a la extracción y evaluación de la actividad de la celulasa utilizando como sustrato específico para celulasa la Carboximetilcelulosa (CMC).

2.5.2.1 Pre-tratamiento de los residuos y de Monilia

Los residuos secos de cascarilla de arroz y el zuro, fueron molidos y tamizados para obtener un tamaño de partícula homogéneo, la cáscara de cacao fue cortada y licuada en trozos pequeños.



(a)



(b)



(c)

Figura 11. Primer pre-tratamiento de cascarilla de arroz y zuro. a. Molienda de los residuos. b. Cascarilla de arroz molido. c. Zuro molido



(a)



(b)



(c)

Figura 12. Pre-tratamiento de la cáscara del cacao. a. Cortado y licuado. b. Cáscara de cacao cortado y licuado. c. Medición del peso

Cascarilla de arroz: Previamente al autoclavado (121°C, 30 min), se pesó en dos frascos de vidrio 250 g de cascarilla de arroz y se los lavó a cada uno con agua destilada esterilizada hirviendo (aprox. 90°C). En la cámara de flujo laminar, se colocó en cada uno de los frascos de vidrio 15 g del sustrato esterilizado y se volvió a autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

Zuro: se realizó el mismo procedimiento de la cascarilla de arroz.

Cáscara del cacao: Se pesó 15 g de los trozos de la cáscara del cacao y se autoclavó a 121°C durante 45 minutos.



(a)

(b)

Figura 13. Segundo Pre-tratamiento de cascarilla de arroz y zuro. a. Lavado de cascarilla de arroz. b. Lavado de zuro

2.5.2.2 Evaluación del crecimiento de *Monilia* en los residuos pre-tratados

Una vez autoclavados los residuos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Con un bisturí se cortó el micelio del hongo crecido en el medio PDA, y con la ayuda de un asa estéril se adicionó el inóculo de *Monilia*. Se incubaron los frascos durante 20 días a una temperatura de 27°C, realizando agitaciones diarias de estos y dándoles oxígeno cada 48 horas.



Figura 14. Frascos que contienen los sustratos utilizados (cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro) en el día de oxigenación del hongo.

Se tomaron muestras en tubos falcon de 50 mL en los días 5, 7, 10, 13, 15 18 y 20 de fermentación, y se los guardo a 4°C. En estos días se realizaron observaciones físicas de los frascos sobre los cambios de los sustratos y de los micelios del hongo. Se midió el crecimiento micelial, la intensidad del olor de fermentación en un rango, presencia de gas y color del sustrato.

2.5.2.3 Obtención de los extractos homogenizados (crudos)

Una vez terminadas los días propuestos de fermentación, a los tubos falcon se le adicionó 25 mL de Tween 20 al 0.1% de concentración. Posteriormente, se procedió a agitar en una incubadora a 25°C por 2 horas a 150 rpm, después se centrifugaron las muestras a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C y se obtuvo el sobrenadante con una jeringa de 5 mL. Una vez obtenidos los extractos homogenizados (crudos), se realizó la medición de la actividad enzimática utilizando la Carboximetilcelulosa como sustrato específico, mediante la cuantificación con espectrofotometría.

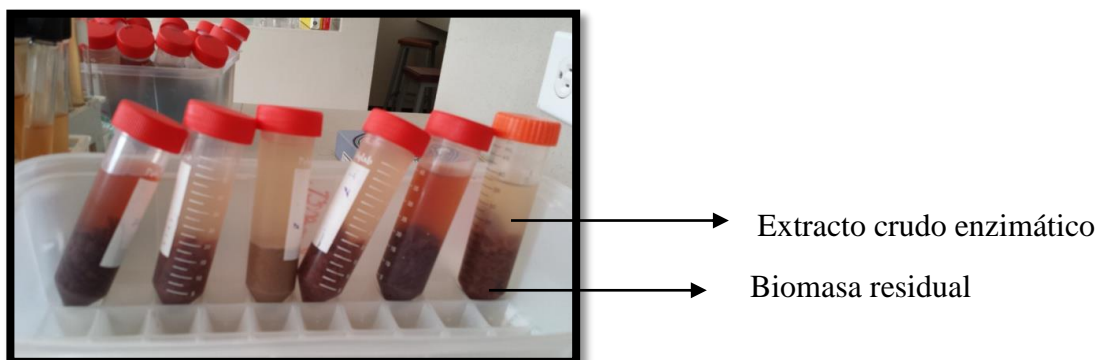


Figura 15. Producto obtenido después de la incubación y centrifugación de la fermentación del hongo en los sustratos.

2.5.2.4 Cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas en los extractos homogenizados utilizando CMC como sustrato específico.

Para determinar la actividad celulasa se utilizó el kit Glucose Liquicolor (HUMAN), el cual mide la concentración de formación de glucosa (azúcar reductor) en la reacción, Para la medición en el espectrofotómetro se preparó la siguiente curva de calibración:

Tabla 4

Datos para la curva de calibración para la determinación de glucosa en el espectrofotómetro.

N. TUBO	GLUCOSA (mM)	VOLUMEN (μL) GLUCOSA (mM)	REACTIVO KIT GLUCOSA (μL)
1	0,05	8,9	991,1
2	0,1	17,9	982.1
3	0,3	53,6	946.4
4	0,5	89,3	910.7
5	0,7	125	875
6	1	178,6	821.4
BLANCO	0,00	0,00	1000

Después de preparar los tubos en las celdas, se midió la absorbancia a 546 nm (especificación del kit).

Para medir la actividad enzimática de los extractos homogenizados en el espectrofotómetro, se mezcló 1,0 mL de una disolución de Carboximetilcelulosa al 0,5%, 1%, 1,5% p/v (sustrato específico de la enzima) en buffer acetato de sodio-ácido acético 60 mM pH = 6,5 con 0,5 mL de cada extracto enzimático obtenido en los días de estudio (5, 7, 10, 13, 15, 18 y 20) y se incubó a 45°C por 12 minutos (para la formación de glucosa). Después del tiempo de incubación, se introdujo inmediatamente en agua hirviendo para detener la reacción, se dejó enfriar en agua fría durante 5 minutos. A esta mezcla de reacción se le añadió 1 mL del reactivo del kit de glucosa. Finalmente en las celdas del espectrofotómetro se colocó 1 mL de la reacción con el kit, y se midió la absorbancia a 546 nm (midieron las muestras en el espectrofotómetro por triplicado para obtener la media que va a ser la actividad enzimática total).

Finalmente para calcular la concentración de glucosa producida por la reacción enzimática, se utilizó la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración.

2.5.2.5 Purificación del extracto enzimático por precipitación con Sulfato de Amonio.

Se seleccionaron las muestras con mayor actividad enzimática y se mezcló 1 mL del extracto homogenizado con 1 mL de una solución de sulfato de amonio con una concentración de 45% y 55%, respectivamente, se incubó durante 72 horas a una temperatura de 27°C. Este precipitado se disolvió en 100 µL de agua destilada para medir su nueva actividad enzimática utilizando la Carboximetilcelulosa como sustrato específico, debido a que se evidenció la formación de cristales.

2.5.2.6 Cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas de los extractos purificados en CMC como sustrato específico.

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el ítem 2.5.2.4.

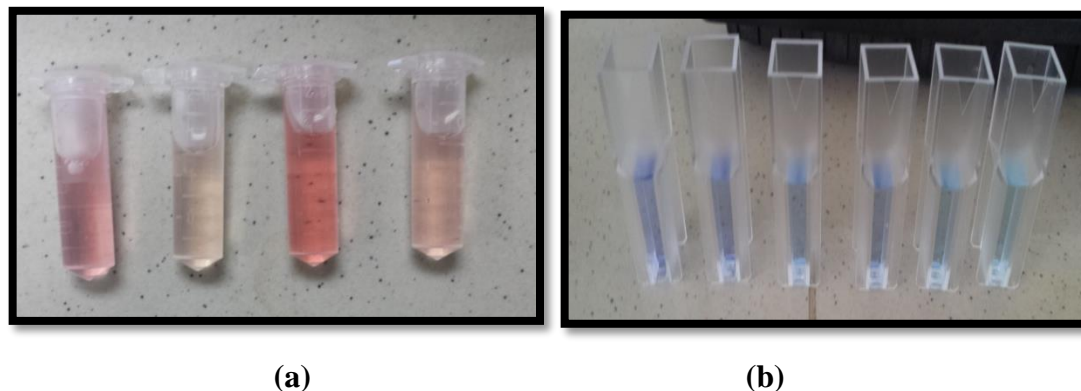


Figura 16. Muestras obtenidas en la cuantificación colorimétrica de glucosa (a) y proteína total (b)

2.5.2.7 Determinación de proteína total

Para realizar este ensayo se utilizó el método Biuret. Se preparó el reactivo Biuret con sulfato cúprico (12mM), tartrato de sodio y potasio (32mM), yoduro de potasio (30mM), y por último hidróxido de sodio (600mM), y se conservó en un lugar oscuro a una temperatura de 4°C, según las especificaciones de VALTEC diagnostics.

Para la medición en el espectrofotómetro se preparó la siguiente curva de calibración:

Tabla 5

Datos para la curva de calibración de la determinación de proteínas totales en el espectrofotómetro.

N. DE TUBO	PROTEÍNA (µg/mL)	VOLUMEN (µL) BSA (20 mg/mL)	VOLUMEN (µL) H ₂ O destilada	Agregar: REACTIVO BIURET (mL)
1	3000	90,00	510	1
2	2500	75,00	525	1
3	2000	60,00	540	1
4	1500	45,00	555	1
4	1000	30,00	570	1
6	500	15,00	585	1
BLANCO	0,00	0,00	600	1

Después de agregar el **reactivo** Biuret, se esperó 5 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro y se midió su Absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro.

Para el ensayo se observó dos veces cada muestra por triplicado, mezclando 0,5 mL de **cada** extracto enzimático obtenido en los días de estudio (5, 7, 10, 13, 15, 18, y 20) 1 mL del reactivo Biuret y se esperó 5 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro, se midió la absorbancia a 540 nm. La medición de la concentración de proteínas totales se calculó en todas las muestras mediante el uso de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración.

2.5.2.8 Determinación de parámetros cinéticos

Para obtener la actividad específica de la celulasa se dividió el resultado de la actividad total por los mg de proteína obtenidos de las proteínas totales. Posteriormente

se realizó el modelo de Michaelis-Mente y las gráficas de Linealización de Lineweaver-Burk para determinar la constante de Michaelis-Mente (k_m) y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), por último se calculó la constante catalítica (k_{cat}) y los grados de pureza.

2.4 Diseño experimental

Para la comparación de los tipos de sustratos y las concentraciones se realizó un análisis de varianza mediante modelos mixtos. Se modeló como un diseño completamente al azar en arreglo factorial. La cantidad de proteína y la actividad enzimática total mostraron varianzas crecientes en función del tiempo y entre sustratos. Cuando las varianzas mostraron heterogeneidad fueron consideradas en el modelo ya sea permitiendo varianzas heterogéneas entre tratamientos o agregando funciones de varianza y media. El supuesto de normalidad fue evaluado usando la prueba de Shapiro-Wilks. Las medias de los tratamientos se compararon usando la prueba LSD de Fisher ($p < 0.05$). Todos los análisis fueron realizados usando la librería `glmer` de R (R core team, 2013) a través de la interface implementada en INFOSTAT versión 2013 (Di Rienzo et al., 2013).

Se realizaron los análisis de las medias para determinar los valores de velocidad máxima, K_m , K_{cat} , grado de pureza, actividad específica, de la enzima.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Aislamiento, Purificación y Caracterización de *Moniliophthora roreri*

Se recolectaron un total de 10 mazorcas de cacao que presentaban las características morfológicas de *Monilia*. Una vez realizadas las siembras en PDA + antibiótico, y después de un proceso de purificación continuo, se obtuvieron colonias completamente purificadas (Figura 17).

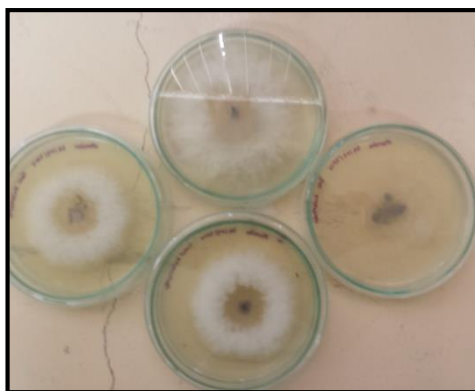


Figura 17. Colonias obtenidas después de la purificación continua.

La caracterización del hongo se basó en la descripción de la colonia (macroscópica) y en la estructura del hongo (microscópica).

3.1.1. Caracterización Macroscópica

Los primeros 7 días de crecimiento, las colonias mostraron un color blanquecino, más tarde el color cambió a café oscuro, y a los 10 días presentaban un color totalmente oscuro. El crecimiento del borde fue regular. La textura de las colonias fue en forma de algodón.

Después de 7 días presentaron un crecimiento radial de 8 cm de diámetro, es decir, casi la totalidad de la caja petri (Figura 18).

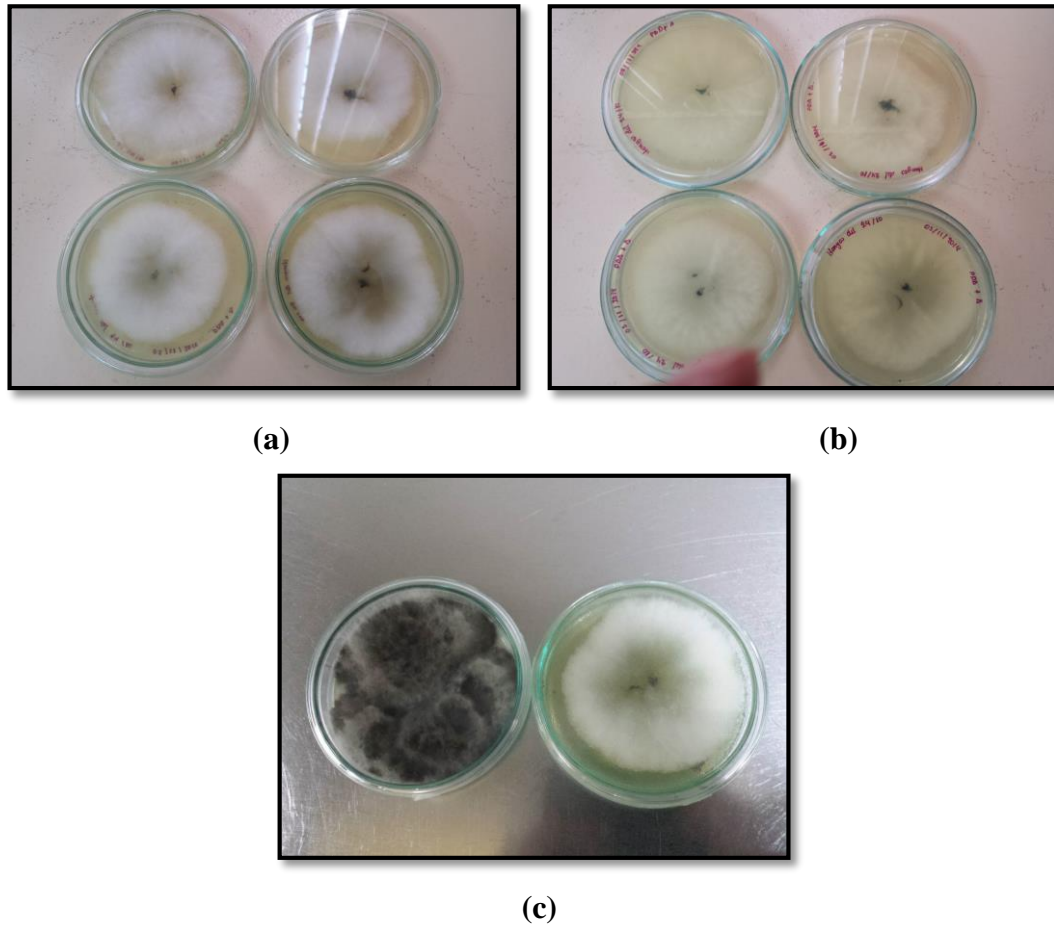


Figura 18. Caracterización de las colonias de *M. roreri*. a. Vista anterior. b. Vista posterior. c. Colonias a los 7 y 10 días (derecha a izquierda)

3.1.2. Caracterización Microscópica

En las figuras 19 y 20 se muestra las estructuras características de *Monilia* observadas con el lente de 40X y 100X, las cuales presentaban hifas divididas en septos, esporas esféricas o globosas y pocas fueron elipsoides.

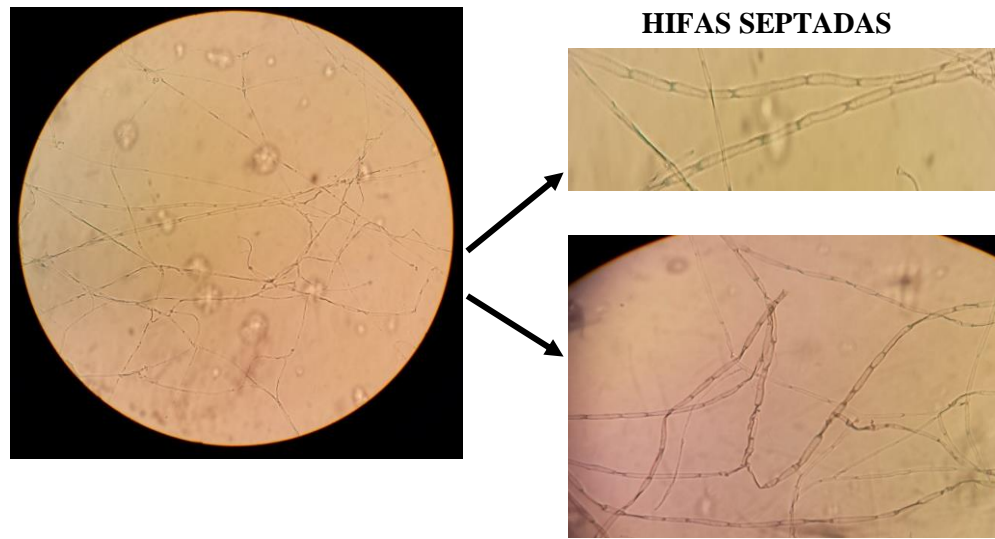


Figura 19. Caracterización microscópica de *M. roreri*. a. Lente 40X con suero fisiológico, hifas septadas

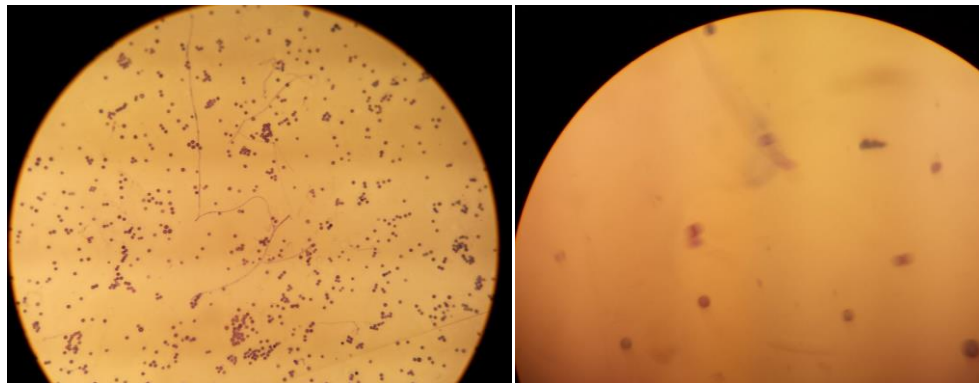


Figura 20. Caracterización microscópica de *M. roreri*. a y b. Lente 40X. Esporas ovoides y redondas.

3.1.3. Prueba de sintomatología

Se realizó la prueba de sintomatología para observar la capacidad del hongo de reproducir los síntomas de la enfermedad sobre los frutos sanos. Una vez realizadas las inoculaciones del hongo en las cáscaras de cacao, después de 24 horas se evidenció un cuadro sintomatológico con las características de la enfermedad, en 5 de los 6 frascos sembrados. Se evidenció la severidad externa y se resume en la siguiente tabla.

Tabla 6

Resultados de la prueba de sintomatología de Monilia sembradas en las cáscaras de cacao.

TIEMPO (días)	OBSERVACIONES
0	Cacaos sanos, sin manchas y esterilizados.
1	Aparición de una pequeña mancha café, bordes de la mancha definidos.
5	Crecimiento de micelio de color blanco, sobre la macha. Mancha de color café, aproximadamente en el 90% de la cáscara del cacao.
10	Cubrimiento total del micelio sobre la cáscara del cacao (cáscara momificada).
15	Cáscara de cacao totalmente en necrosis.

En la Figura 20 se observan los cambios de las cáscaras de cacao por el crecimiento del hongo, demostrando los síntomas de la enfermedad.



(a)

(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 21. Prueba de sintomatología a. Muestras de cacao sanos. b. Frascos inoculados con *Monilia*. c. Primer día de inoculación. d. Quinto día de inoculación. e. Décimo día de la inoculación. f. Cáscaras de cacao al décimo quinto día de inoculación.

3.1.4 Conservación de *Moniliophthora roreri*

Para conservar a los hongos purificados y caracterizados se utilizó el método de Castellani y se almacenaron en la incubadora a 27°C y en la refrigeradora a 4°C. Después de 30 días de almacenamiento se los sembró en agar PDA + antibiótico, y se evidenció el crecimiento de los hongos que se mantuvieron a 27°C, mientras que los que estuvieron en el refrigerador a 4°C no hubo crecimiento.

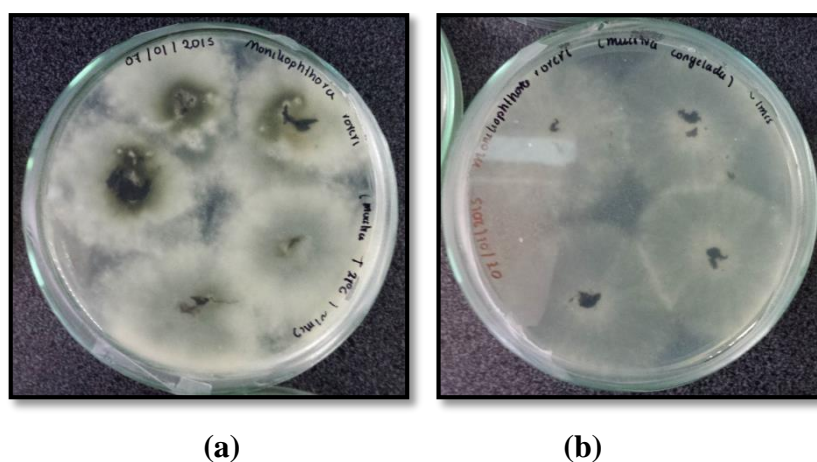


Figura 22. Siembra de Monilia después de la conservación con el Método Castellani. a. Conservado a temperatura ambiente. b. Conservado a 4°C

3.2 Actividad enzimática de la Celulasa

3.2.1 Evaluación del crecimiento de Monilia en los residuos pre-tratados

Para poder obtener los extractos enzimáticos en la cual se encuentran las enzimas celulasas que son encargadas del proceso de hidrólisis de la celulosa se procedió a sembrar el hongo purificado en los tres residuos de estudio, en los días de la evaluación de actividad enzimática se obtuvieron las siguientes características físicas:

Tabla 7

Observaciones físicas de cascarilla de arroz realizadas en los días de las tomas de muestra.

DIA	CRECIMIENTO MICELIAL	OLOR DE FERMENTACIÓN	PRESENCIA DE GAS	COLOR DE SUSTRATO
5	Medio	Bajo	Si	Sin cambio
7	Medio	Bajo	Si	Sin cambio
10	Alto	Medio	Si	Sin cambio
13	Alto	Medio	Si	Sin cambio
15	Alto	Medio	Si	Rosado/Amarillo
18	Alto	Bajo	No	Rosado/Amarillo
20	Medio	Bajo	No	Rosado/Amarillo

Tabla 8

Observaciones físicas de cáscara de cacao realizadas en los días de las tomas de muestra.

DIA	CRECIMIENTO MICELIAL	OLOR DE FERMENTACIÓN	PRESENCIA DE GAS	COLOR DE SUSTRATO
5	Alto	Medio	Si	Sin cambio
7	Alto	Medio	Si	Sin cambio
10	Alto	Medio	No	Sin cambio
13	Alto	Medio	Si	Sin cambio
15	Alto	Bajo	Si	Sin cambio
18	Alto	Bajo	No	Sin cambio
20	Alto	Medio	Si	Rosado

Tabla 9

Observaciones físicas de zuro realizadas en los días de las tomas de muestra.

DIA	CRECIMIENTO MICELIAL	OLOR DE FERMENTACIÓN	PRESENCIA DE GAS	COLOR DE SUSTRATO
5	Medio	Medio	Si	Sin cambio
7	Medio	Medio	Si	Sin cambio
10	Bajo	Medio	No	Sin cambio
13	Bajo	Medio	No	Sin cambio
15	Bajo	Bajo	No	Sin cambio
18	Bajo	Bajo	No	Rosado
20	Medio	Medio	Si	Rosado

Una vez obtenido el complejo hongo-sustrato de crecimiento, se procedió a la extracción y evaluación de la actividad de la celulasa, utilizando la Carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato específico para celulasas.

3.2.2 Cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas de los extractos homogenizados en CMC como sustrato específico

Después de la obtención de los extractos homogenizados se cuantificó la actividad enzimática de las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm, para ello se obtuvo la siguiente ecuación de la curva de calibración (Figura 23):

$$y=2,8604 x + 0,0392$$

$$R^2=0,9974$$

La ecuación de la curva obtenida se utilizó para calcular la actividad enzimática neta, considerando al eje de las abscisas como la concentración de glucosa producida y las ordenadas como la absorbancia con la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa producida [mM]} = \frac{A_{546} - 0,0392}{2,8604}$$

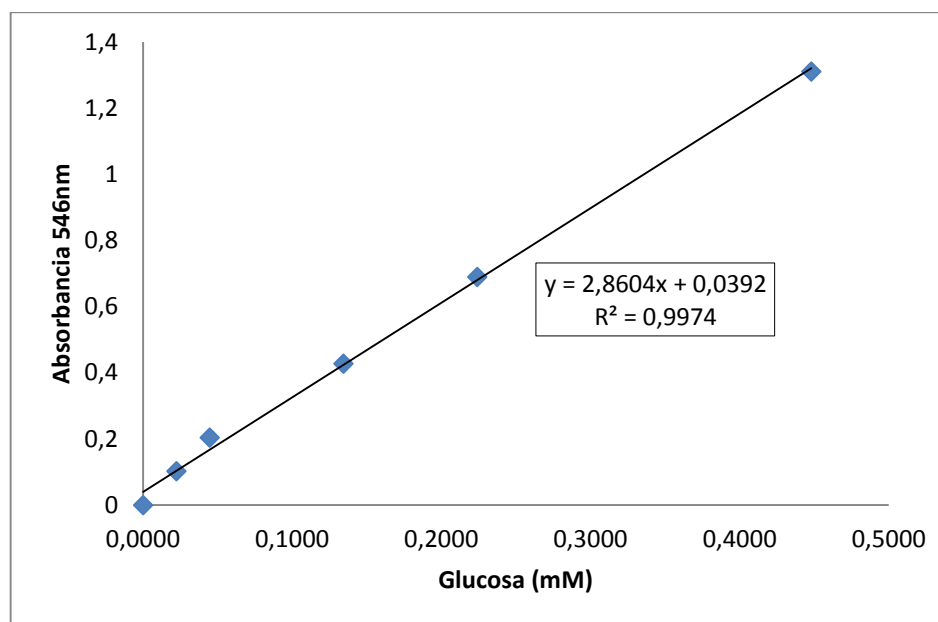


Figura 23. Curva de calibración obtenida para medir la concentración de glucosa.

En la figura 24, se detalla la actividad enzimática neta de los extractos homogenizados en los días de la fermentación. Se muestra que la mayor actividad enzimática del extracto de la cascarilla de arroz es al décimo día de fermentación con 34,78 UI en la cáscara del cacao es al décimo quinto día de fermentación con 13,66 UI y del zuro es al veinteavo día de fermentación con 54,78 UI, este último tiene la mayor actividad enzimática de los tres residuos agroindustriales que se utilizaron como medio de crecimiento del hongo (Ver Anexo A).

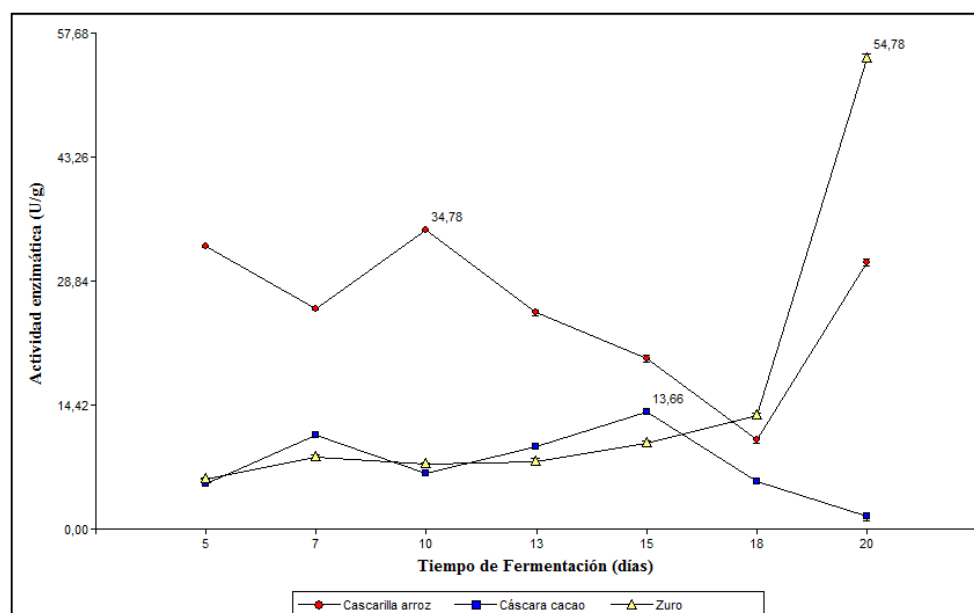


Figura 24. Actividad enzimática neta de los sustratos de cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro

Además se obtuvo las medias de la actividad enzimática neta de cada uno de los residuos utilizados para la fermentación, las cuales se muestran en la tabla 10.

Tabla 10.

Actividad enzimática neta de los extractos enzimáticos homogenizados

RESIDUO	Medias (raíz cuadrada)	Error estándar	Actividad enzimática neta (UI)
C. arroz	4,99	0,11 A	24,92
Zuro	3,58	0,11 B	12,80
C. cacao	2,64	0,11 C	6,97

En la tabla 10 muestra que la mayor actividad enzimática se obtiene del extracto enzimático de la cascarilla de arroz con un valor de 24,92 UI.

3.2.3 Cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas en los extractos purificados

Del análisis anterior se obtuvo el día de mayor actividad enzimática de cada sustrato de fermentación, día diez en la cascarilla de arroz, día quince en la cáscara de cacao y el día 20 en el zuro, se purificaron los extractos enzimáticos y se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 11.

Actividad enzimática neta de los extractos enzimáticos purificados

SUSTRATO	Actividad enzimática neta (UI)	Error estándar
C. arroz	34,84	1,65 A
C. cacao	26,10	1,65 B
Zuro	17,53	1,65 C

En la figura 25 se muestra los cristales obtenidos después de un proceso de purificación con sulfato de amonio saturado. Los cristales mostrados corresponden a los extractos obtenidos de la cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro.

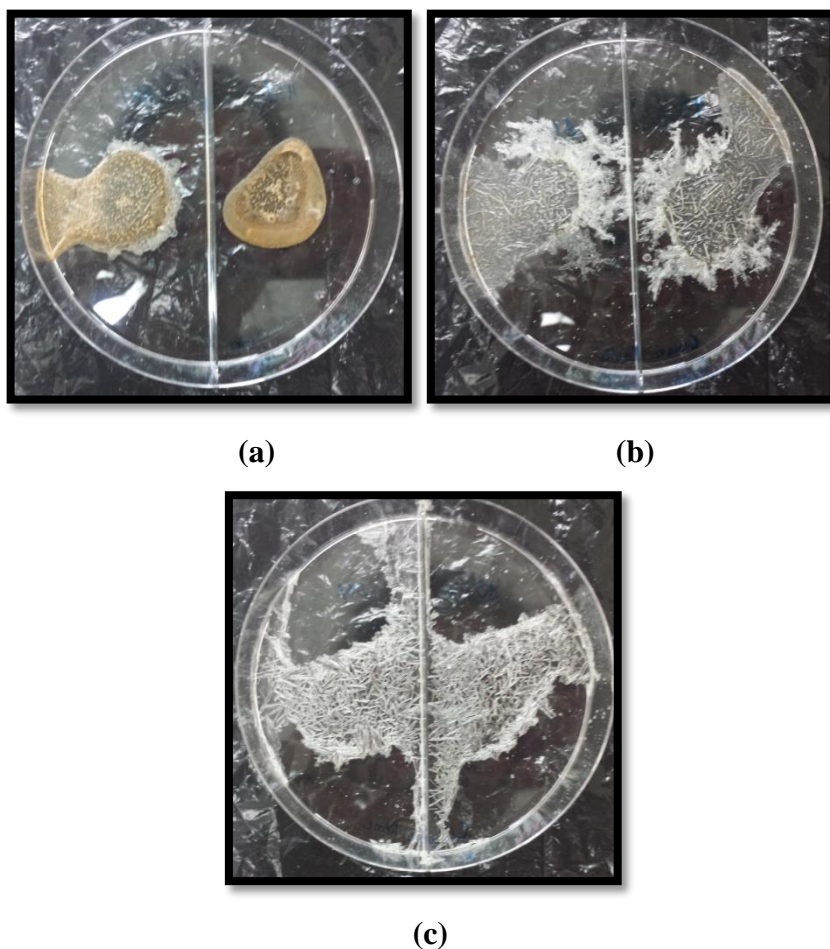


Figura 25. Cristales obtenidos después del proceso de purificación. Cáscara de cacao (a). Cascarilla de arroz (b). Zuro (c).

3.2.4 Determinación de proteína total

Para la determinación de proteínas totales se utilizó el método colorimétrico Biuret, para lo cual se obtuvo la siguiente ecuación de la curva de calibración (Figura 26):

$$y=0,0001 x - 0,007$$

$$R^2=0,9946$$

La ecuación de la curva obtenida se utilizó para calcular las proteínas totales, considerando al eje de las abscisas como la concentración de proteína total y al eje de las ordenadas como la absorbancia con la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína total } [\mu\text{g/mL}] = \frac{A_{540} + 0,007}{0,0001}$$

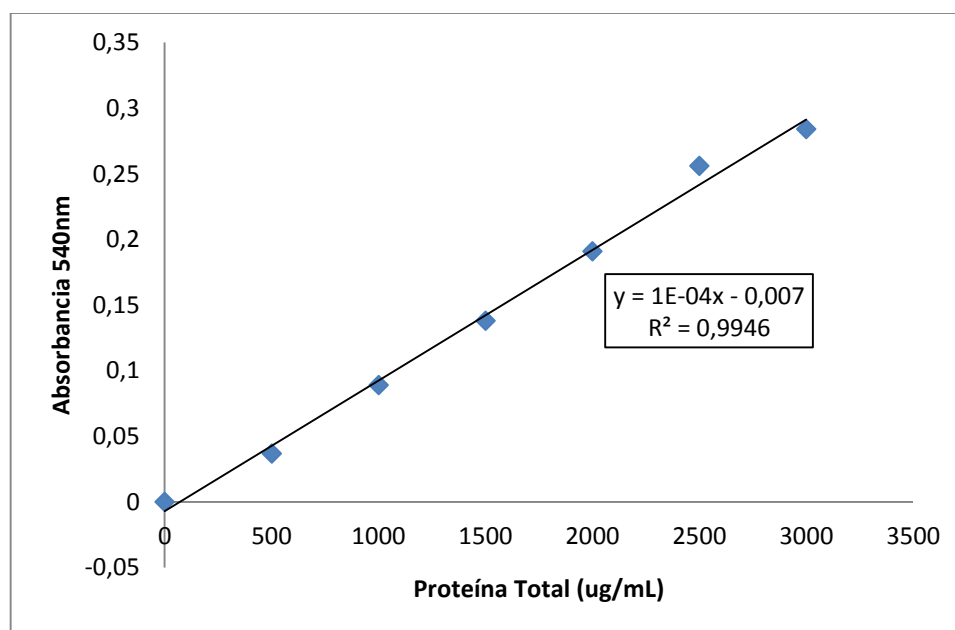


Figura 26. Curva de calibración obtenida para medir la concentración de proteína

A continuación se detalla la concentración de proteína total de los extractos homogenizados de los sustratos obtenidos en los días de fermentación analizados:

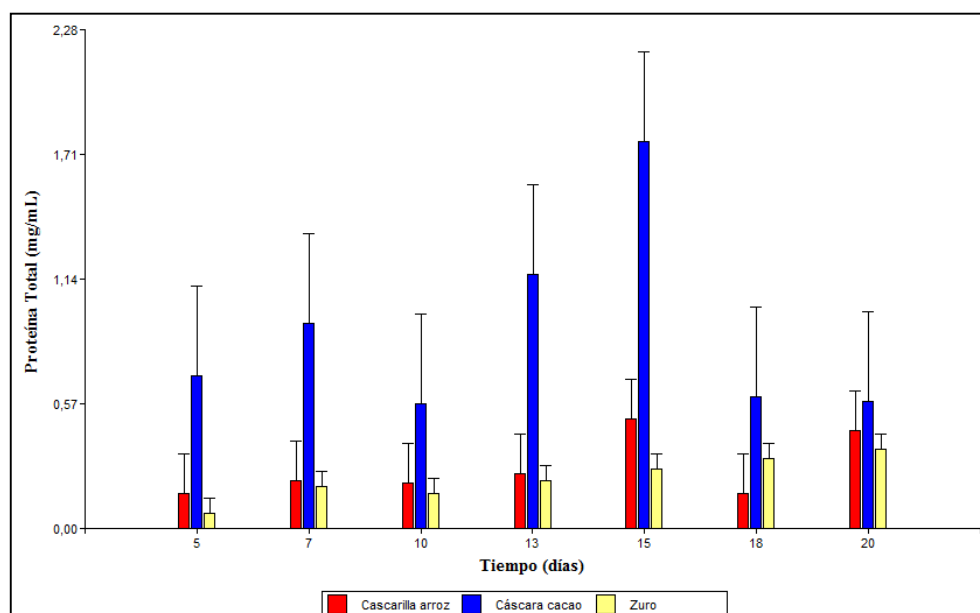


Figura 27. Proteína Total obtenida de los extractos homogenizados en los días de fermentación analizados

En la Figura 27, podemos observar que la mayor concentración de proteína total corresponde al extracto enzimático obtenido de la cáscara de cacao, siendo en el día quince el de mayor producción. Los extractos enzimáticos obtenidos de la cascarilla de arroz y zuro muestran tener una cantidad de proteína total similar con menor producción que el de la cáscara de cacao. En la tabla 12 se muestran las medias de proteína total obtenidas de los extractos enzimáticos producidas de cada sustrato.

Tabla 12.

Proteína total de los extractos enzimáticos obtenidos de los tres extractos en estudio

RESIDUO	PROTEÍNA TOTAL [mg/mL]	Error estándar	PROTEÍNA TOTAL DEL EXTRACTO [mg/5mL]
Cacao	0,905	0,155 A	4,525
Arroz	0,277	0,070 B	1,385
Zuro	0,228	0,026 B	1,14

Los miligramos de proteína total se utilizan para determinar la actividad específica de la enzima celulasa, que es uno de los parámetros cinéticos enzimáticos obtenidos.

3.2.5 Determinación de parámetros cinéticos de los extractos homogenizados

Para evaluar la actividad de la celulasa se utilizó como sustrato específico la Carboximetilcelulosa (CMC) variando la concentración de CMC a 0.5; 1; 1.5 (%) a temperatura (45°C), tiempo (10 min) y pH (6,7) constante.

Una vez analizados los datos obtenidos de actividad enzimática neta y de proteína total en el programa estadístico InfoStat, se observan los valores de velocidad (actividad enzimática) de la Celulasa con la variación de concentración de sustrato (CMC) mencionados anteriormente. Cabe resaltar que la mayor actividad enzimática corresponde al extracto enzimático obtenido de la cascarilla de arroz con un valor de 24.92 UI, mientras que los extractos enzimáticos obtenidos de zuro y de la cáscara de cacao muestran una actividad de 12,80 UI y 6,97 UI, respectivamente (Tabla 11).

Con los datos analizados en el programa estadístico InfoStat se realizó la representación gráfica de la velocidad de reacción con respecto a la variación de concentración de CMC (sustrato específico), dando como resultado la hipérbola de la ecuación de Michaelis-Menten (Figura 28).

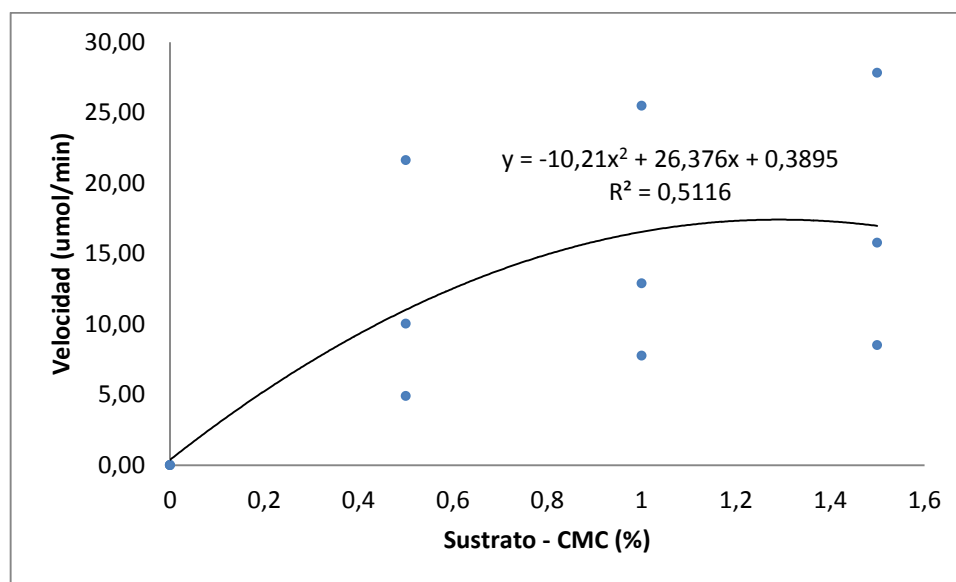


Figura 28. Representación gráfica de la actividad enzimática de la Celulasa (extractos homogenizados)

En la Figura 28 se observa la cinética de reacción de la enzima celulasa. A una concentración de sustrato CMC de 1% muestra aproximadamente la máxima actividad enzimática y si se aumenta la concentración de CMC la velocidad no varía, mientras que a una concentración de sustrato al 0,5%, la actividad enzimática de la Celulasa es menor.

Al realizar el análisis en el programa estadístico InfoStat se comprueba lo dicho anteriormente, porque a una concentración de CMC del 1% y 1,5% no son significativamente diferentes (Anexo B), lo que quiere decir que si se utiliza estas dos concentraciones la velocidad van a hacer aproximadamente las mismas.

Modelo de Linealización: Lineweaver-Burk en el extracto homogenizado

El modelo de Linealización de Lineweaver-Burk se basa en los dobles inversos de la ecuación de Michaelis-Menten, y representa la ecuación de una línea recta ($y = mx + b$), que se utiliza para determinar los parámetros cinéticos.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S_o} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

En donde:

$$y = \frac{1}{V_o}; \quad x = \frac{1}{S_o}; \quad m = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}}; \quad b = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

En las tablas 13, 14 y 15 se detallan los dobles inversos de las actividades enzimáticas de los sustratos de cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro:

Tabla 13.

Dobles inversos de cascarilla de arroz

CASCARILLA DE ARROZ				
So (M)	V _o [μmol/min]		1/So	1/V _o
0,021	21,63		47,619	0,046
0,042	25,50		23,810	0,039
0,062	27,82		16,129	0,036

Con la cascarilla de arroz se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0,0003x + 0,0311; \quad R^2 = 0,9934$$

Tabla 14.

Dobles inversos de cáscara de cacao

CÁSCARA DE CACAO				
So (M)	V _o [μmol/min]		1/So	1/V _o
0,021	4,92		47,619	0,203
0,042	7,76		23,810	0,129
0,062	8,51		16,129	0,118

Con la cáscara de cacao se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0,0028x + 0,0675 ; R^2 = 0,9868$$

Tabla 15.

Dobles inversos de zuro

ZURO				
So (M)	Vo [μmol/min]		1/So	1/Vo
0,021	10,04		47,619	0,100
0,042	12,90		23,810	0,078
0,062	15,78		16,129	0,063

Con el zuro se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0,0011x + 0,0481 ; R^2 = 0,9743$$

Una vez obtenidas las ecuaciones lineales de los tres sustratos en estudio se calculó Km y Vmáx y con las siguientes ecuaciones se obtuvieron los parámetros cinéticos de la celulasa (tabla 16):

- Constante catalítica (Kcat):

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E_T]}$$

- Actividad específica (AE):

$$Ae = \frac{\text{Actividad enzimática neta (U)}}{\text{Proteína total (mg)}}$$

El peso molecular de la celulasa se obtuvo de datos bibliográficos, mencionados en el capítulo I.

Tabla 16.

Parámetros cinéticos de los extractos homogenizados obtenidos de la Linealización

RESIDUOS	V _{máx} [μmol/min]	K _m [M]	K _{cat} [min ⁻¹]	Actividad enzimática total homogenizado (UI)	Proteína total del extracto [mg]	AE [UI/mg]
Cascarilla de arroz	32,15	0,01	10335,69	321,54	1,385	232,16
Cáscara de cacao	14,81	0,04	4762,07	148,15	4,525	32,74
Zuro	20,79	0,02	6682,75	207,90	1,140	182,37

3.2.6. Determinación de parámetros cinéticos de los extractos purificados

Con los datos analizados en el programa estadístico InfoStat se realizó la representación gráfica de la velocidad de reacción con respecto a la variación de concentración, dando como resultado el modelo de Michaelis-Menten (Figura 29).

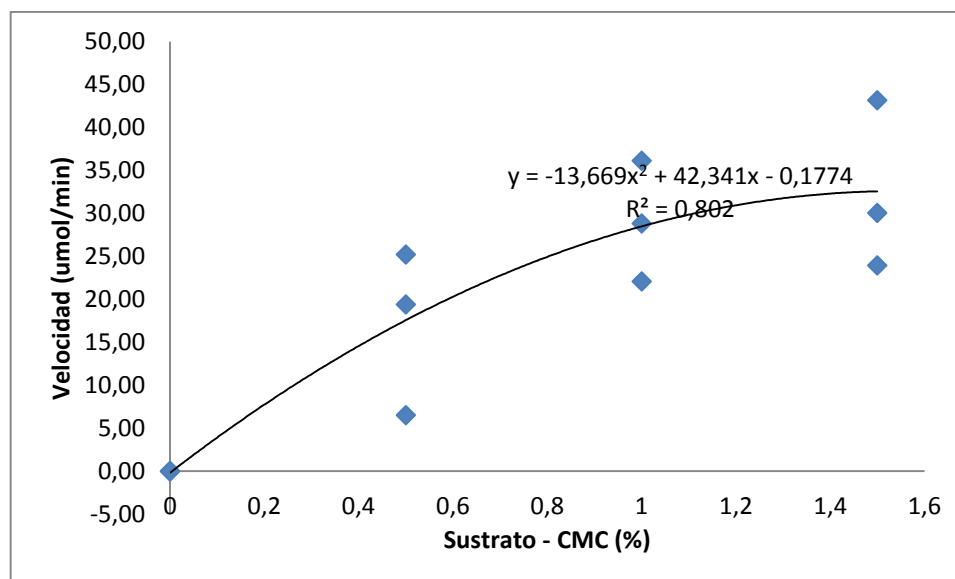


Figura 29. Representación gráfica de la actividad enzimática de la Celulasa (extractos purificados)

En la Figura 29 se observa el modelo de reacción de la enzima celulasa después de una etapa de purificación. A una concentración de sustrato CMC de 0,5% la actividad enzimática es menor, mientras que a una concentración de sustrato del 1% y 1.5% muestra aproximadamente la máxima actividad enzimática y la velocidad no varía.

Modelo de Linealización: Lineweaver-Burk en el extracto purificado

En las tablas 17, 18 y 19 se detallan los dobles inversos de las actividades enzimáticas de los sustratos de cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro, después de la etapa de purificación.

Tabla 17.

Dobles inversos de cascarilla de arroz

CASCARILLA DE ARROZ				
So (M)	Vo [μmol/min]		1/So	1/Vo
0,021	25,21		47,619	0,040
0,042	36,15		23,810	0,028
0,062	43,17		16,129	0,023

En la cascarilla de arroz se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0,005x + 0,015 ; R^2 = 0,999$$

Tabla 18.

Dobles inversos de cáscara de cacao

CÁSCARA DE CACAO				
So (M)	Vo [μmol/min]		1/So	1/Vo
0,021	19,40		47,619	0,052
0,042	28,83		23,810	0,035
0,062	30,07		16,129	0,033

En la cáscara de cacao se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0,0006x + 0,022 ; R^2 = 0,9729$$

Tabla 19.

Dobles inversos de zuro

ZURO				
So (M)	Vo [$\mu\text{mol}/\text{min}$]		1/So	1/Vo
0,021	6,52		47,619	0,153
0,042	8,11		23,810	0,123
0,062	10,96		16,129	0,091

En el zuro se obtuvo la siguiente ecuación lineal:

$$y = 0,0018x + 0,0699 ; R^2 = 0,909$$

Una vez obtenidas las ecuaciones lineales después de la etapa de purificación y con las ecuaciones descritas anteriormente se calculó los parámetros cinéticos especificados en la tabla 20.

Tabla 20.

Parámetros cinéticos de los extractos purificados obtenidos de la Linealización

RESIDUOS	V _{máx} [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	K _m [M]	K _{cat} [min^{-1}]	Actividad enzimática total purificado (UI)	Proteína total purificado [mg]	AE [UI/mg]
Cascarilla de arroz	66,23	0,03	21287,42	662,25	0,277	2388,48
Cáscara de cacao	45,45	0,03	14610,91	454,55	0,905	502,53
Zuro	14,31	0,03	4598,57	143,06	0,228	628,33

La tabla 21 muestra el grado de pureza de la enzima de los extractos homogenizados y purificados obtenidos de la cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro.

Tabla 21

Grados de pureza

RESIDUOS	AE [UI/mg] Extracto homogenizado	AE [UI/mg] Extracto purificado	Grado de Pureza
Cascarilla de arroz	232,16	2388,48	10,29
Cáscara de cacao	32,74	502,53	15,35
Zuro	182,37	628,33	3,45

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

Moniliophthora roreri es un hongo cuyas esporas infectan exclusivamente los frutos del cacao (Phillips & Cerda, 2014), al aislar y purificar el hongo en el medio PDA obtenido de muestras de mazorcas de cacao con signos y síntomas de la enfermedad (figura 18) , se obtuvo en el laboratorio aproximadamente un 90% de crecimiento a los 7 días de inoculación en el medio con un color blanquecino y textura algodonosa, que según (Arbelaez, 2010) es morfología característica de Monilia, a los 10 días de inoculación, el micelio formado cambió a color negro, porque el medio de cultivo no tenía nutrientes adicionales, selectivo para Monilia (Sánchez H. , 2011). Según (Arbelaez, 2010) el color de micelio puede variar de crema a café, dependiendo de la especie.

Las estructuras de las hifas observadas presentaron las mismas características que en el estudio de (Villavicencio, 2010), las cuales muestran septos y esporas de forma globosa y elipsoides (figura 19 y 20).

Los síntomas característicos de la enfermedad evaluados se presentan en la figura 21 y en la tabla 6 las cuales mostraron un avance diario en la infección de las cáscaras de cacao por las esporas del hongo causando manchas de color café y crecimiento de micelio blanquecino, con aparición de manchas aceitosas. Aproximadamente a los 20 días de crecimiento las cáscaras estaban completamente deformadas y secas, según (Sánchez & Garcés, 2012) estos son los síntomas característicos de la Moniliasis, y el tiempo de desarrollo de la enfermedad varía según la edad del fruto.

Cuando se obtuvo la cepa purificada, se procedió a inocular en los residuos de cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro para la fermentación, las cuales poseen celulosa, la misma que sirve como fuente de carbono para el crecimiento del hongo. Con

estos sustratos se indujo el crecimiento del microorganismo. Hubo un rápido crecimiento de *Monilia* en la cáscara de cacao, debido a que este posee los nutrientes necesarios para su desarrollo. Al séptimo día de fermentación en la cascarilla de arroz hubo un mejor acoplamiento del hongo, mientras que en el zuro el hongo tardó en crecer, debido a que este último contiene aproximadamente solo el 8% de celulosa (Garcés, 1987). Debido a la fermentación que producía el microorganismo en los sustratos, hubo presencia de gas CO₂ en cada uno de ellos.

Como la fermentación se realizó en sustratos sólidos, se utilizó Tween 20 al 0,1% para obtener el extracto homogenizado debido a que los detergentes no iónicos a una baja concentración han sido reportados con frecuencia para mejorar la hidrólisis enzimática pre-tratada, según (Zhou, Chen, Qi, Zhao, & Liu, 2015).

Para que haya una mejor utilización del desperdicio celulósico, es necesario realizar pre-tratamientos a los sustratos. En los tres sustratos utilizados se realizaron dos etapas de pre-tratamiento, el mecánico y con agua caliente, con el fin de dissociar el complejo celulosa – lignina y disminuir la presencia de sustancias que dificulten la hidrólisis. Según (Hendriks & Zeeman, 2009) el pre-tratamiento mecánico permite la reducción del tamaño de partícula y la cristalinidad, con el fin de incrementar la superficie disponible y la reducción de grado de polimerización, el rendimiento de la hidrólisis depende el tipo de biomasa y de tipo de molido; el pre-tratamiento con agua caliente tiene como objetivo solubilizar principalmente la hemicelulosa para hacer que la celulosa sea más accesible y evitar la formación de inhibidores.

La determinación de actividad enzimática es una forma de medir la cantidad de enzima que se forma durante la fermentación sólida en un sustrato determinado (Paredes, Álvarez, & Silva), en este estudio se utilizó como sustrato específico la Carboximetilcelulosa y se evidenció que a una concentración de este sustrato del 0,5% la actividad enzimática es baja, con concentraciones del 1 y 1,5% aumenta la velocidad, con esto se determinó la cinética del comportamiento de la enzima (figura 28 y 29) las mismas

que se asemeja a un comportamiento hiperbólico. Al realizar el análisis en el programa estadístico InfoStat se comprueba que las concentraciones de CMC del 1% y 1,5% no son significativamente diferentes, lo que quiere decir que para obtener la máxima velocidad de reacción, la concentración de sustrato debe estar en el rango de 1 al 1,5%.

La mejor interacción cepa-sustrato de la cual se pueda obtener un extracto enzimático con una máxima actividad, es la cascarilla de arroz con una media actividad enzimática neta de 24,92 UI en extracto homogenizado y 34,84 UI en extracto purificado (Tabla 10 y 11). Hay que recalcar que los resultados del análisis con el programa estadístico InfoStat, muestran una diferencia significativa para los tres extractos en estudio, lo que se entiende que para obtener la mayor actividad enzimática si depende del extracto a utilizar. Cabe mencionar que la cáscara de cacao en el día 20 aumentó considerablemente su actividad enzimática, 54,78 UI (figura 24).

Para obtener los parámetros cinéticos se realizó la Linealización de Lineweaver-Burk que se basa en los dobles inversos de la ecuación de Michaelis-Menten, de los extractos homogenizados y de los extractos purificados (Tabla 16 y 20 respectivamente). Estos resultados muestran que al realizar una etapa de purificación hay un incremento en la actividad enzimática aumentando la cantidad de sustrato consumido por unidad de tiempo.

La cascarilla de arroz tuvo los mayores parámetros cinéticos al compararlos con la cáscara de cacao y zuro, obteniendo los siguientes resultados, U : 321.54 UI y 662,25 UI, K_{cat} : 10335,9 min^{-1} y 21287,42 min^{-1} , A_e : 232,16 UI/mg y 2388,48 UI/mg, de los extractos homogenizados y de los extractos purificados respectivamente, demostrando que este extracto existió una mayor concentración de la enzima celulasa. Al tener un mayor número de recambio (K_{cat}) hay un mayor número de moles de sustrato transformado por mol de enzima en la unidad de tiempo (Núñez, 2001).

La constante de Michaelis (K_m), representa la afinidad de la enzima por el sustrato (Núñez, 2001) y es característico del mismo; en este estudio se utilizó el mismo sustrato

específico, la Carboximetilcelulosa, por lo tanto el Km tiene aproximadamente el mismo valor, tanto en los extractos homogenizados y los extractos purificados.

El grado de pureza en la etapa inicial es 1 pero al momento que se realizó la purificación se perdió las proteínas contaminantes y se obtuvo 10,29 en la cascarilla de arroz, 15, 35 en la cáscara de cacao y 3,45 en el zuro, esto significa que la actividad específica aumentó en cada uno de los sustratos en estudio (tabla 21).

Estos resultados muestran que *Monilia* produce mayor cantidad de celulasas, comparados con los resultados obtenidos de (Rueda, 2015) con *Bacillus subtilis*, ya que los parámetros cinéticos que obtuvo fueron una velocidad máxima de 129,77 UI, actividad específica de 263,75 UI/mg y Kcat: 1165,79 min⁻¹.

Además, según (Rueda, 2015), *Bacillus subtilis* produce mayor concentración de celulasas en el zuro, en este estudio se demostró que *Moniliophthora roreri* produce mayor cantidad de estas enzimas cuando crece en la cascarilla de arroz.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Se obtuvo enzimas celulasas por fermentación del hongo *Monilia* en los residuos de cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro, siendo la mejor fuente enzimática la cascarilla de arroz que produjo un extracto enzimático con la máxima actividad media de 321.54 UI y 662,25 UI, homogenizados y purificado, respectivamente.
- La actividad enzimática neta en los días de la fermentación muestra que el mayor corresponde al décimo día de fermentación en la cascarilla de arroz con 34,78 UI, décimo quinto día de fermentación en la cáscara de cacao con 13,66 UI y al veinteavo día de fermentación con 54,78 UI, en el zuro.
- Se determinó que en los extractos homogenizados, a una concentración de Carboximetilcelulosa (sustrato específico de la Celulasa) de 0,021 M (0,5%) la velocidad es de 21,63 $\mu\text{mol}/\text{min}$, 4,92 $\mu\text{mol}/\text{min}$ y 10,04 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en la cascarilla de arroz, cáscara de cacao y zuro, respectivamente, a medida que aumenta el sustrato específico (CMC) la velocidad aumenta hasta un máximo de 32,15 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en la cascarilla de arroz, 14,81 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en la cáscara de cacao y 20,79 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en el zuro; por lo que se concluye que a la concentración de 0,062 M (1,5%) de sustrato el enzima encontró su máxima actividad, llegando obtener la gráficamente la hipérbola de Michaelis-Menten (figura 28).
- Se determinó que en los extractos purificados, a una concentración de Carboximetilcelulosa de 0,021 M (0,5%) la velocidad es de 25,21 $\mu\text{mol}/\text{min}$, 19,40 $\mu\text{mol}/\text{min}$ y 6,52 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en la cascarilla de arroz, cáscara de cacao y

zuro, respectivamente, a medida que aumenta el sustrato específico (CMC) la velocidad aumenta hasta un máximo de 66,23 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en la cascarilla de arroz, 45,45 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en la cáscara de cacao y 14,31 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en el zuro; por lo que se concluye que, al igual que en los extractos homogenizados, la concentración de 0,062 M (1,5%) de sustrato el enzima encontró su máxima actividad, llegando obtener la gráficamente la hipérbola de Michaelis-Menten (figura 29).

- La velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato hasta que llega a la concentración del 1,5%, en la cual la velocidad es constante, que representa la parte asintótica de la hipérbola representados en los gráficos anteriormente citados.
- Los parámetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$) obtenidos de los extractos homogenizados aumentaron considerablemente al realizar la purificación con sal de amonio (tabla 16 y 20), por esta razón al realizar estudios de actividad enzimática es importante cumplir necesariamente con al menos una etapa de purificación.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- Utilizar el hongo *Monilia* máximo a los 20 días después de su caracterización, para realizar las inoculaciones en los sustratos en los que va a crecer el hongo.
- Realizar análisis sobre todos los métodos de conservación de *Monilia* para obtener resultados mejores sobre su crecimiento después de un largo periodo de su siembra en los sustratos.
- Realizar ensayos para verificar la mayor actividad enzimática con los mismos sustratos y el mismo hongo variando parámetros en el crecimiento del hongo en el sustrato, como la temperatura de incubación en la fermentación, pH y humedad del sustrato, área superficial de siembra en el sustrato, agitación, entre otros.
- Probar otros métodos para la obtención de los extractos homogenizados, como ruptura celular, realizando métodos químicos (utilización de otro detergente no iónico), o los métodos físicos (como la congelación, sonicación o el cizallamiento).
- Realizar ensayos para el análisis de la biomasa residual de la obtención del extracto homogenizado enzimático.
- Verificar la temperatura óptima de reacción y el tiempo para la incubación con el sustrato indicador, que en este caso fue la Carboximetilcelulosa (CMC), en los ensayos de actividad enzimática.

- Realizar ensayos de actividad enzimática variando el buffer y el pH para la reacción de la enzima con la Carboximetilcelulosa, además variando la concentración de CMC.
- Realizar análisis de las enzimas obtenidas en la aplicación industrial o en la aplicación de degradación de otros subproductos industriales, con la proteína purificada.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Arbelaez, L. (2010). Análisis de la diversidad intraespecie de *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. por medio de marcadores morfológicos y genéticos. *Bacteriología-Universidad Nacional de Colombia*, Medellín, Colombia.
- Arévalo, E. (2004). *Cacao: Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la Amazonía peruana*. Lima: Instituto de Cultivos Tropicales.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. Bogotá, Colombia.: Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.
- Baena, L., & García, N. (2012). *Obtención y caracterización de Fibra dietaría a partir de cascarilla de las semillas tostadas de Theobroma cacao de una industria chocolatera colombiana*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Crescente, O., Acosta, M., Guevara, M., & Estaba, A. (1999). Aprovechamiento de los desechos de cacao (*Theobroma cacao* l.). *Departamento de Química-Universidad de Oriente*, 11-28.
- Díaz, A., & Lemes, T. (2009). Conservación de la cepa *Lecanicillium lecanii* en agua destilada estéril. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe*, 33-35.
- Estrella, E., & Cedeño, J. (2012). *Medidas de Control de bajo impacto ambiental para mitigar la moniliasis (Moniliophthora roreri Cif y Par. Evans et al.) en cacao híbrido nacional x trinitario en Santo Domingo de los Tsáchilas*. Santo Domingo: Carrera de Ingeniería Agropecuaria. ESPE-IASA II.

- Falconí, C. (1998). *Fitopatología Práctica*. Sangolquí, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército. Ciencias Agropecuarias.
- Garcés, N. (1987). *Cultivos de la Sierra*. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador. Ciencias Agronómicas.
- Getamap.net. (01 de 22 de 2014). Obtenido de Maps from all over the world: <http://www.getamap.net/latitudeandlongitude.html>
- González, A. (2009). *Producción de enzimas en la Industria Láctea (Lactasa y Renina)*. Zipaquira: Ingeniería de Alimentos.
- González, J. (2007). *Identificación de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de cacao (Theobroma cacao l) en la finca Bulbuxya, San Miguel Panan Suchitepequez*. Guatemala: Tesis Ing. Agrónomo. Universidad San Carlos de Guatemala.
- González, J. M. (2008). *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico*. España: Médica Panamericana.
- Gutiérrez, I., Moreno, N., & Montoya, D. (2014). Mecanismos de regulación de la hidrólisis enzimática de la celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 12.
- Hendriks, A., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresouruce Technology*, 10-18.
- Lozada, B., Herrera, V., Perea, J., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de Lippia sobre Moniliophthora roreri (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (Theobroma cacao L.). *Acta Agronómica, Universidad Nacional de Colombia*, 188-210.
- Martínez, C., Balcázar, E., Datán, E., & Folch, J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 119-131.

NCBI. (23 de Noviembre de 2014). Obtenido de National Center for Biotechnology Information:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=221103>

Núñez, I. (2001). *Enzimología*. Madrid, España: Ediciones Pirámide.

Paredes, D., Álvarez, M., & Silva, M. (2010). Obtención de enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano. *Revista Tecnológica ESPOL*, 81-88.

Paredes, D., Álvarez, M., & Silva, M. (2010). Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica ESPOL*, 81-88.

Phillips, W., & Cerda, R. (8 de Febrero de 2014). *Catálogo enfermedades del cacao en Centroamérica*. Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A7372E/A7372E.PDF>

PQBio. (21 de Abril de 2007). Obtenido de Programa Educativo de ArgenBio: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=1>

Rojas, V. (2009). *Evaluación de métodos de extracción y purificación de enzimas pectinolíticas obtenidas por fermentación en estado semisólido de Aspergillus niger*. Medellín, Colombia: Grupo de Investigación en Procesos Ambientales y Biotecnológicos.

Rueda, A. (2015). Evaluación de la actividad enzimática de la celulasa obtenida y purificada de Bacillus subtilis crecido en los sustratos cascarilla de arroz, cascarilla de avena y zuro. *Escuela Politécnica del Ejército*.

Sánchez, F., & Garcés, F. (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 249-258.

- Sánchez, H. (2011). Determination Extracellular activity enzymatic of endo-1,3 (4) - B-glucanase and gene amplification from *Moniliophthora roreri*. *Colegio de Postgraduados*, H.Cárdenas Tab, México.
- Segal, C., & Ortega, G. (2005). *Manual de prácticas de Biología Molecular de la célula I*. México: Publidsa.
- Serva. (2014). Obtenido de Electrophoresis.GMBH. Cellulases: <http://fe.rmutl.ac.th/2012/wp-content/uploads/Cellulase.pdf>
- Suarez Contreras, L. Y., & Rangel Riaño, A. L. (2014). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Open Journal Systems*, 12.24.
- Suarez, L. (2014). Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Open Journal Systems*, 12-24.
- Valverde, A., Sarria, B., & Monteagudo, J. (2007). Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascaarilla de arroz. *Scientia et Technica*, 255-261.
- Villavicencio, M. (2010). Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco Provincias de la Costa Ecuatoriana. *Escuela Superior Politécnica del Litoral*, Guayaquil, Ecuador.
- Wiseman, A. (1985). *Manual de Biotecnología de las Enzimas*. Zaragoza, España: Acribia.
- Zhang, X.-Z., & Zhang, Y.-H. (2013). Cellulases: Characteristics, sources, production and applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for sustainable production of Fuels, Chemicals and Polymers*, 131-146.
- Zhou, Y., Chen, H., Qi, F., Zhao, X., & Liu, D. (2015). Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. *ELSEVIER. Bioresource Technology*, 136-143.