



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**INFLUENCIA DEL pH EN EL CRECIMIENTO Y  
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA  
DE *FUSARIUM CULMORUM* EN PRESENCIA DE  
DI(2-ETILHEXIL)FTALATO (DEHF) EN  
FERMENTACIÓN LÍQUIDA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MONSERRAT LIZBETH PORTILLO OJEDA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ  
HERNÁNDEZ**

**ASESOR INTERNO:**

**BIÓL. MARICELA ARTEGA MEJÍA**



**México, CDMX.  
Abril, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"Todo experimento, si está concebido razonablemente, es una cita con la naturaleza a la que ésta asistirá puntualmente y, además, sin mentir o engañar"

- Laura Fermi

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, específicamente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por ser el centro de todas mis inspiraciones, por darme la oportunidad de conocer el mundo y por ser mi casa a lo largo de mi formación profesional.

A mi familia, mis padres y hermano, por su apoyo incondicional, por sufrir conmigo y apoyarme en los momentos más difíciles. Sobre todo por alentarme a continuar cuando sentía que se acababan mis fuerzas. Este logro es de ellos.

A mi asesora interna, Maricela Arteaga Mejía, por sus consejos, apoyo incondicional y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, donde el conocimiento, el trabajo duro y la pasión por cambiar la realidad de nuestro país son los pilares que lo sostienen.

A la Dra. Carmen Sánchez por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyarme más allá de sus responsabilidades como Directora de este trabajo. Por las observaciones que ayudaron a enriquecer esta tesis y por brindarme herramientas importantes en la redacción del artículo derivado de la misma. Por alentarme a nunca dejar de mejorar como persona y profesional. Por ser un ejemplo admirable de perseverancia, dedicación, mujer y científica.

Al M. en B. Ángel González Márquez por ser la persona que me guió a lo largo de esta investigación. Su asesoría y consejos hicieron posible el desarrollo del presente documento.

A todas las personas que me apoyaron durante mi estancia en Tlaxcala, especialmente a Lorena Ramírez y su madre, Olga Pérez por ofrecerme su casa y apoyo en los momentos más importantes de este trabajo.

A todos mis compañeros de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, porque de todos aprendí algo, y fue su ejemplo el que me inspiraba todos los días a dar lo mejor de mí. A aquellos que me ofrecieron su amistad, ustedes enriquecieron mi vida a lo largo de este camino.

A todos los que me ayudaron, de alguna forma, y me acompañaron durante mi estancia en el extranjero. La aventura más grande de mi vida habría sido poca cosa, sin aquellos que sufrieron y gozaron a mi lado.

A los integrantes del grupo “Atomic Zar”, por tener una misión tan noble y por enseñarme lo divertido y enriquecedor que es compartir el conocimiento. Porque aprendí más de lo que pude enseñar.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
3.1. El Género <i>Fusarium</i> .....	4
3.1.1. <i>Fusarium culmorum</i> .....	4
3.1.2. Actividad enzimática de <i>Fusarium culmorum</i> .....	6
3.1.3. Afectación del pH en el proceso enzimático de <i>F. culmorum</i> .....	6
3.2. Plastificantes.....	6
3.2.1. Ftalatos.....	7
3.2.2. DEHF.....	7
3.2.3. Toxicidad y regulación de DEHF.....	8
3.3. Degradación de DEHF a través de microorganismos.....	9
3.3.1. Degradación de DEHF por <i>F. culmorum</i> en fermentación líquida...9	
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	11
4.1. Degradación de ftalatos por hongos filamentosos.....	11
4.2. Crecimiento y actividad enzimática de hongos en presencia de DEHF.....	11
4.3. Influencia del pH en la actividad enzimática de hongos filamentosos.....	12
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	14
6.1. Objetivo general.....	14
6.2. Objetivos particulares.....	14
<b>7. HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>8. MÉTODOS</b> .....	16
8.1. Ceba.....	16
8.2. Fermentación.....	16
8.2.1. Medios de cultivo.....	16
8.2.2. Inoculación.....	16
8.2.3. Incubación.....	17
8.3. Separación de biomasa por filtración.....	17
8.4. Determinación de tasa de crecimiento específico.....	18
8.4.1. Evaluación de los parámetros cinéticos de crecimiento.....	18
8.5. Seguimiento de pH.....	18
8.6. Análisis de la actividad de esterasas.....	19
8.6.1. Evaluación de los parámetros cinéticos de producción de esterasas.....	19
8.7. Análisis zimográfico.....	19
<b>9. RESULTADOS</b> .....	20
9.1. Fermentación a pH 5.5.....	20
9.1.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.....	20

9.1.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases.....	20
9.1.3. Perfil de pH.....	21
9.1.4. Zimografía.....	22
9.2. Fermentación a pH 6.0.....	23
9.2.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.....	23
9.2.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases.....	23
9.2.3. Perfil de pH.....	24
9.2.4. Zimografía.....	25
9.3. Fermentación a pH 6.5.....	26
9.3.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.....	26
9.3.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases.....	26
9.3.3. Perfil de pH.....	27
9.3.4. Zimografía.....	28
9.4. Fermentación a pH 7.0.....	29
9.4.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.....	29
9.4.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases.....	29
9.4.3. Perfil de pH.....	30
9.4.4. Zimografía.....	31
9.5. Fermentación a pH 7.5.....	32
9.5.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.....	32
9.5.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases.....	32
9.5.3. Perfil de pH.....	33
9.5.4. Zimografía.....	34
9.6. Fermentación a pH 8.0.....	35
9.6.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.....	35
9.6.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases.....	35
9.6.3. Perfil de pH.....	36
9.6.4. Zimografía.....	37
9.7. Fermentación a pH 8.5.....	38
9.7.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.....	38
9.7.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases.....	38
9.7.3. Perfil de pH.....	39
9.7.4. Zimografía.....	40
9.8. Fermentación a pH 9.0.....	41
9.8.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.....	41

9.8.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases.....	41
9.8.3. Perfil de pH.....	42
9.8.4. Zimografía.....	43
9.9. Parámetros cinéticos de crecimiento.....	44
9.10. Parámetros cinéticos de actividad de esterases.....	46
<b>10. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>F. culmorum</i> .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de infección de <i>F. culmorum</i> .....	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b> Ruta de degradación de DEHF por <i>F. culmorum</i> .....	<b>10</b>
<b>Figura 4.</b> Cepa de <i>F. culmorum</i> .....	<b>16</b>
<b>Figura 5.</b> Inoculación del medio líquido con fragmentos de <i>F. culmorum</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Separación de biomasa y sobrenadante.....	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Producción de biomasa de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida.....	<b>20</b>
<b>Figura 8.</b> Actividad enzimática de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida.....	<b>21</b>
<b>Figura 9.</b> Rendimiento enzimático de <i>F. culmorum</i> con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida.....	<b>21</b>
<b>Figura 10.</b> Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida.....	<b>22</b>
<b>Figura 11.</b> Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida.....	<b>22</b>
<b>Figura 12.</b> Producción de biomasa de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida.....	<b>23</b>
<b>Figura 13.</b> Actividad enzimática de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida.....	<b>24</b>
<b>Figura 14.</b> Rendimiento enzimático de <i>F. culmorum</i> con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida.....	<b>24</b>
<b>Figura 15.</b> Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida.....	<b>25</b>
<b>Figura 16.</b> Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida.....	<b>25</b>
<b>Figura 17.</b> Producción de biomasa de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida.....	<b>26</b>
<b>Figura 18.</b> Actividad enzimática de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF con pH inicial de 6.5 en fermentación líquida.....	<b>27</b>
<b>Figura 19.</b> Rendimiento enzimático de <i>F. culmorum</i> con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida.....	<b>27</b>
<b>Figura 20.</b> Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida.....	<b>28</b>
<b>Figura 21.</b> Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida.....	<b>28</b>
<b>Figura 22.</b> Producción de biomasa de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida.....	<b>29</b>
<b>Figura 23.</b> Actividad enzimática de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida.....	<b>30</b>
<b>Figura 24.</b> Rendimiento enzimático de <i>F. culmorum</i> con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida.....	<b>30</b>



<b>Figura 25.</b> Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida.....	<b>31</b>
<b>Figura 26.</b> Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida.....	<b>31</b>
<b>Figura 27.</b> Producción de biomasa de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida.....	<b>32</b>
<b>Figura 28.</b> Actividad enzimática de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida.....	<b>33</b>
<b>Figura 29.</b> Rendimiento enzimático de <i>F. culmorum</i> con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida.....	<b>33</b>
<b>Figura 30.</b> Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida.....	<b>34</b>
<b>Figura 31.</b> Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida.....	<b>34</b>
<b>Figura 32.</b> Producción de biomasa de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida.....	<b>35</b>
<b>Figura 33.</b> Actividad enzimática de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida.....	<b>36</b>
<b>Figura 34.</b> Rendimiento enzimático de <i>F. culmorum</i> con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida.....	<b>36</b>
<b>Figura 35.</b> Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida.....	<b>37</b>
<b>Figura 36.</b> Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida.....	<b>37</b>
<b>Figura 37.</b> Producción de biomasa de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida.....	<b>38</b>
<b>Figura 38.</b> Actividad enzimática de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida.....	<b>39</b>
<b>Figura 39.</b> Rendimiento enzimático de <i>F. culmorum</i> con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida.....	<b>39</b>
<b>Figura 40.</b> Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida.....	<b>40</b>
<b>Figura 41.</b> Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida.....	<b>40</b>
<b>Figura 42.</b> Producción de biomasa de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida.....	<b>41</b>
<b>Figura 43.</b> Actividad enzimática de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida.....	<b>42</b>
<b>Figura 44.</b> Rendimiento enzimático de <i>F. culmorum</i> con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida.....	<b>42</b>
<b>Figura 45.</b> Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida.....	<b>43</b>

<b>Figura 46.</b> Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida.....	<b>43</b>
<b>Figura 47.</b> Biomasa máxima registrada en cada una de las fermentaciones.....	<b>44</b>
<b>Figura 48.</b> Tasa de crecimiento específica registrada en cada una de las fermentaciones.....	<b>44</b>
<b>Figura 49.</b> Actividad enzimática máxima registrada en cada una de las fermentaciones.....	<b>46</b>
<b>Figura 50.</b> Rendimiento enzimático máximo registrado en cada una de las fermentaciones.....	<b>46</b>
<b>Figura 51.</b> Productividad enzimática máxima registrada en cada una de las fermentaciones.....	<b>47</b>
<b>Figura 52.</b> Tasa específica de formación de enzima registrada en cada una de las fermentaciones.....	<b>47</b>
<b>Tabla 1.</b> Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de esterases de <i>F. culmorum</i> en presencia de DEHF en fermentación líquida.....	<b>45</b>
<b>Tabla 2.</b> Isoformas de las enzimas presentadas en cada una de las fermentaciones.....	<b>49</b>

## ABREVIATURAS

**E** - Actividad enzimática

**E<sub>max</sub>** - Actividad enzimática máxima

**DEHF** - Di (2-etilhexil) ftalato

**EEM** - Error Estadístico de la Media

**h** - Hora

**μ** - Velocidad específica de crecimiento

**μL** - Mictolítros

**μm** - Micrómetros

**mg** - Miligramos

**mM** - Mili Molar

**nm** - Nanómetros

**pH** - Potencial de hidrógeno

**pNPB** - p-nitrofenil butirato

**P<sub>RO</sub>** - Productividad enzimática

**q<sub>p</sub>** - Tasa específica de producción de enzima

**rpm** - Revoluciones por minuto

**SN** - Sobrenadante

**U** - Unidad enzimática de actividad de esterasa

**U/L** - Unidad enzimática de actividad de esterasa por litro

**X** - Biomasa

**X<sub>max</sub>** - Biomasa máxima

**Y<sub>E/X</sub>** - Rendimiento de la enzima por unidad de biomasa

## 1. RESUMEN

Los plastificantes son los agentes químicos que brindan flexibilidad a polímeros de alta dureza como el policloruro de vinilo (PVC) y los más utilizados en la industria son los derivados de ácido ftálico o ftalatos. El Di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) es el ftalato de mayor producción y un contaminante común en el ambiente, las investigaciones respecto a su toxicidad revelan que puede afectar el desarrollo gonadal en ambos sexos, se asocia a otras enfermedades y se reconoce como un disruptor endócrino. La tasa de degradación de DEHF sin la intervención de microorganismos es muy baja, es por ello que el metabolismo de bacterias y hongos es la vía principal para su tratamiento. El hongo filamentoso *Fusarium culmorum* es eficiente en la degradación de DEHF ya que es capaz de utilizarlo como fuente de carbono y energía. En este trabajo se observó cómo el pH inicial de la fermentación modifica el crecimiento y la actividad enzimática de *F. culmorum* cuando el DEHF es la única fuente de carbono. Se realizaron ocho fermentaciones a distintos valores de pH: 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0, muestreando por triplicado cada 12 h. Se agregó al medio en g/L: 1.0,  $K_2HPO_4$ ; 0.5,  $MgSO_4$ ; 0.5, KCl; 0.01,  $FeSO_4$  y 3.0,  $NaNO_3$  como fuente de nitrógeno. Se utilizaron 1000 mg DEHF/L como fuente de carbono. En condiciones de esterilidad se inoculó el medio y se colocó en una incubadora con agitación a 120 rpm y 25°C. Se determinó la tasa de crecimiento específico por peso seco de la biomasa a partir de la ecuación logística. La actividad específica de esterasas se calculó a partir la actividad enzimática, la cual se obtuvo a través de una determinación espectrofotométrica con una solución de p-nitrofenil butirato (pNPB) como sustrato y con los datos obtenidos se calcularon teóricamente los parámetros cinéticos de producción de esterasas. Se realizó el análisis zimográfico a través de electroforesis en gel al 12% de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El perfil de pH a lo largo de la fermentación fue medido a través de un potenciómetro cada 12 h. Al comparar el crecimiento se observó una mayor producción de biomasa en las fermentaciones a pH 5.5 y 6.5, sin embargo, tras el análisis estadístico (ANOVA) se puede afirmar con el 95% de confianza que la  $\mu$  obtenida a pH 5.5, 6.0, 6.5 y 8.0 son estadísticamente semejantes y significativamente superiores al resto. Así mismo la máxima producción, el mayor rendimiento, la máxima productividad y la más alta tasa de producción de la enzima se obtuvo también a pH inicial de 5.5 y 6.5. Ya que el DEHF es la única fuente de carbono disponible queda en evidencia la relación entre la actividad enzimática con respecto al crecimiento del organismo. Esto se refuerza con los resultados obtenidos en el resto de fermentaciones donde se observó un pobre crecimiento en aquellas donde la producción enzimática fue menor a las fermentaciones antes mencionadas. Las zimografías respaldan los datos obtenidos presentando cuatro isoenzimas a pH 5.5 y 6.5, cuando el resto de fermentaciones no alcanzaron ese número. Todo lo anterior refuerza el supuesto de que la actividad enzimática de *F. culmorum* determina su crecimiento cuando el DEHF es la única fuente de carbono y que la actividad enzimática a su vez está dada por el pH inicial del medio líquido donde se lleva a cabo la fermentación.

## 2. INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento, la producción de plásticos ha ido en aumento, sus propiedades y bajo costo, con respecto a otros materiales, han popularizado su uso. Actualmente los plásticos son utilizados en una amplia gama de productos y se requiere de éstos que tengan propiedades cada vez más variadas (Meeker, 2009). Para lograrlo se utilizan plastificantes; aditivos que se mezclan con los plásticos para brindarles flexibilidad, maleabilidad y resistencia. Los ésteres de ácido ftálico o ftalatos son plastificantes líquidos que se mezclan con los polímeros en una proporción que puede alcanzar el 40% del peso total del material (Bustamante-Montes, 2012). Los ftalatos son utilizados en la industria para la fabricación de una amplia gama de productos, que van desde los de cuidado personal como cosméticos y perfumes hasta recubrimientos de pisos, mangueras y material médico (Gao, 2015). El Di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) es el plastificante de mayor producción a nivel mundial y se mezcla con el policloruro de vinilo (PVC) para obtener productos médicos consumibles como mangueras, catéteres, bolsas de sangre y orina, entre otros. Los estudios realizados para conocer la toxicidad de DEHF coinciden en que puede afectar el desarrollo gonadal en ambos sexos, tener efectos teratogénicos, agravar otras enfermedades y es reconocido como disruptor endócrino (Bernard, 2014). La importancia de estudiar las vías de degradación de DEHF a través de microorganismos surge, además, de su toxicidad, por su amplia distribución en productos de consumo diario. Los ftalatos no forman enlaces covalentes en la matriz polimérica, por lo que pueden migrar fácilmente al entorno (Zhu *et al.*, 2016). Importantes investigaciones en México y en el extranjero se han realizado para proponer alternativas en la degradación de DEHF a través del metabolismo microbiano. Entre los microorganismos más estudiados se encuentran los fitopatógenos. Ellos secretan enzimas capaces de hidrolizar las sustancias complejas presentes en la cutina vegetal y, de manera análoga, hidrolizan los enlaces ésteres que componen a los ftalatos (Castro-Ochoa, 2010). Varias especies del género *Fusarium* han demostrado tener la capacidad de utilizar ftalatos como fuente de carbono y energía. Una investigación realizada en 2016 con *Fusarium culmorum* demuestra que puede degradar hasta 95% de una concentración total de 1000 mg de DEHF/L dentro de las primeras 60 h de fermentación (Ahuactzin-Pérez, 2016). Optimizar todos los parámetros de la degradación de DEHF a través de la actividad enzimática de *F. culmorum* es importante para futuras aplicaciones. En este trabajo se buscó determinar cuál es el pH al que se obtiene la más alta producción de biomasa y la mayor actividad de esterasas en fermentaciones ajustadas en un rango que va desde 5.5 a 9.0. El pH, es uno de los parámetros de más influencia en el crecimiento y la actividad enzimática de los microorganismos en su medio natural. En fermentaciones controladas en laboratorio ha demostrado ser un parámetro determinante en la producción enzimática (Robinson, 2015). Los intervalos de pH estudiados por otros autores para comparar el crecimiento y/o actividad enzimática son distintos en cada caso y se justifican por las condiciones particulares de cada investigación. En este trabajo se plantea un intervalo propio

---

que, por una parte, toma en cuenta los reportados por otros autores y al mismo tiempo contempla aquellos valores en los que se han realizado estudios previos de degradación de DEHF por *F. culmorum*.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 El género *Fusarium***

*Fusarium* es un género cosmopolita de hongos filamentosos, las especies que lo conforman poseen características que resultan muy importantes ecológicamente (Karlsson, 2016). Se trata de organismos de importancia agrícola, médica y económica; son capaces de infectar un número importante de plantas hospederas provocando pérdidas millonarias en cultivos y bajo condiciones específicas, invadir tejido vivo en humanos (Muhammed *et al.*, 2013; Manoj *et al.*, 2016). Dentro de éste género se encuentran algunos de los fitopatógenos más importantes a nivel mundial (Nagaraja, 2016). En plantas, la infección por *Fusarium* es potencialmente mortal; causa aborto de semillas, pudrición de éstas y de plántulas, causa tizón, clorosis, marchitez vascular, dobleces y reducción del crecimiento (Manoj *et al.*, 2016; Nagaraja, 2016). Al infectar, *Fusarium* penetra el tejido inter e intracelularmente, usando para esto último enzimas que degradan los compuestos de la pared celular (Lionetti *et al.*, 2015).

##### **3.1.1 *Fusarium culmorum***

Dentro de las especies fitopatógenas más importantes y más ampliamente distribuidas se encuentra *F. culmorum* (Karlsson, 2016). Éste es un organismo saprófito, parásito facultativo y ubicuo en suelos de todo el mundo (Schermer *et al.*, 2013; Karlsson, 2016). El tizón causado por *F. culmorum* es una de las enfermedades más dañinas en cultivos de cereales como trigo, cebada, avena, centeno, maíz y sorgo (Schermer *et al.*, 2013; Siou *et al.*, 2015). Las pérdidas en cultivos de las anteriores monocotiledóneas son las más importantes económicamente, sin embargo la infección por *F. culmorum* no se limita a este grupo (Nagaraja, 2016). Se ha aislado también de organismos como la remolacha azucarera, lino, clavel, frijol, espárrago, lúpulo, puerro, abeto rojo, fresa y el tubérculo de la papa (Schermer *et al.*, 2013). El ciclo de infección de *F. culmorum* se puede dividir en tres fases reconocibles: i) infección, cuando el hongo penetra la cutícula, ii) crecimiento, donde se observa un aumento en la biomasa fúngica acompañada de síntomas y iii) fase necrotrofica, en la que el patógeno coloniza el tejido interno (Powell *et al.*, 2017). *F. culmorum* es capaz de infectar en cualquier estado de desarrollo del hospedero; de hacerlo en etapa temprana produce muerte de plántulas, si lo hace en una etapa posterior puede provocar aborto de tallos y si es durante madurez causa aborto de semillas y disminuye el rendimiento y calidad de los granos (Nielsen *et al.*, 2014; Urban *et al.*, 2016). En la semilla *F. culmorum* ingresa a través de las fisuras que se forman durante la germinación atacando la raíz primaria y luego el culmo, ya en el tejido vegetal infecta primero por vía apoplástica y posteriormente penetra las células a través de la vía simplástica (Figura 2) (Schermer *et al.*, 2013; Krstanovic *et al.*, 2015). Aún cuando el organismo parasitado se elimina, *F. culmorum* es capaz de sobrevivir en el suelo hasta por cuatro años formando clamidiosporas (Figura 1) (Schermer *et al.*, 2013).

Penetrar la cutícula vegetal es una cualidad muy importante de *F. culmorum*, esto es posible gracias a la secreción de enzimas que le permiten romper los enlaces de las sustancias que la conforman (Valueva *et al.*, 2012). La cutina es una estructura rígida y un componente principal de la cutícula que protege la epidermis vegetal, está compuesta por ácidos grasos de cadena larga unidos entre sí por enlaces tipo éster (Castro-Ochoa, 2010). Las estererasas, indispensables para degradar la cutina, brindan al hongo su capacidad de infección y lo hacen un candidato para la degradación de sustancias cuyo enlace principal es el estérico (Castro-Ochoa, 2010; Valueva *et al.*, 2012).

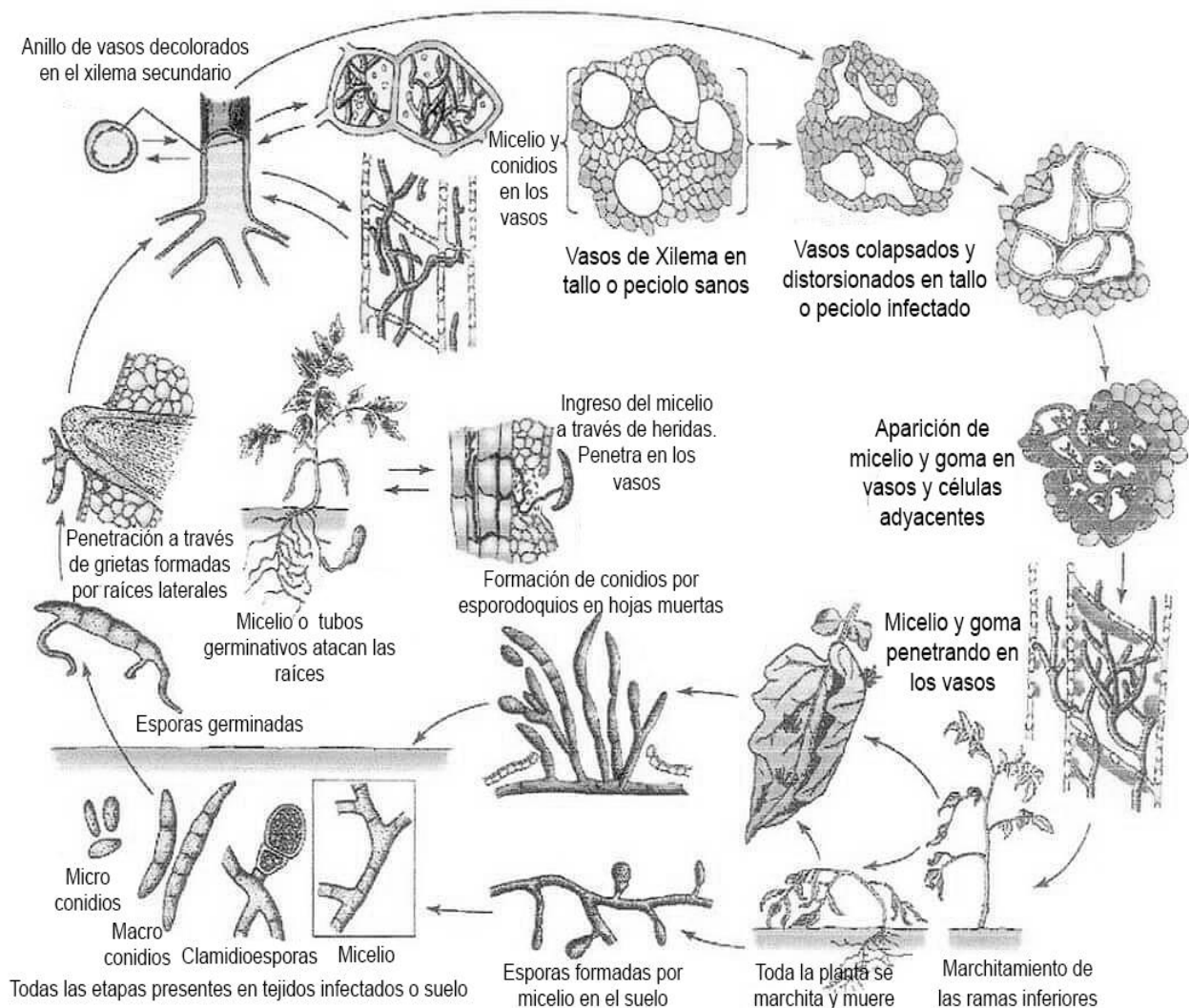


Figura 1. Ciclo de vida de *F. culmorum* (Modificado Agrios, 2005).



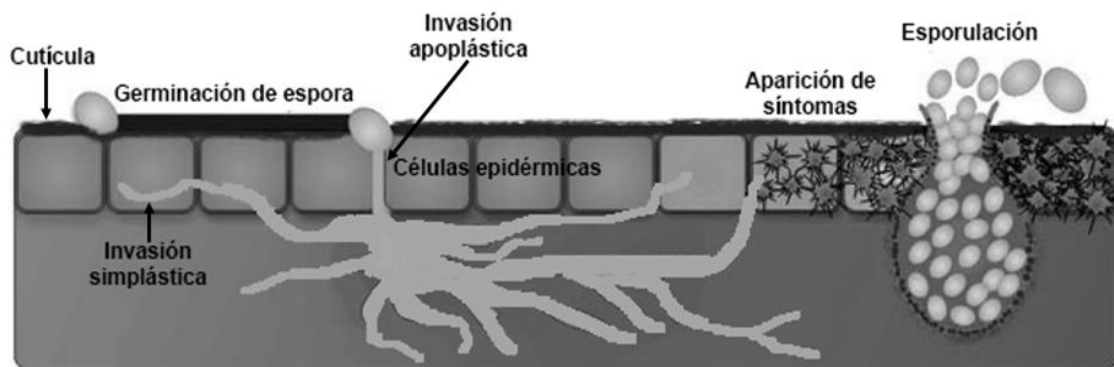


Figura 2. Mecanismo de infección de *F. culmorum* (Modificado de CropPro, 2014).

### 3.1.2 Actividad enzimática de *F. culmorum*

Las enzimas producidas por *F. culmorum* que ayudan a la degradación de la pared celular son pieza clave en su ciclo de vida (Leplat *et al.*, 2013). Estas enzimas extracelulares son expresadas y secretadas para la hidrólisis de la cutícula durante la infección de la planta, despolimerizándola (Castro-Ochoa, 2010; Ferrario *et al.*, 2016). Los ácidos grasos así liberados durante la hidrólisis enzimática se vuelven una fuente de carbono para el crecimiento y metabolismo celular (Ferrario *et al.*, 2016). La producción de éstas enzimas requiere inductores, los cuales pueden ser agregados al medio cuando se trabaja con fermentaciones *in vitro* (Leplat *et al.*, 2013).

### 3.1.3 Afectación del pH en el proceso enzimático de *F. culmorum*

La actividad enzimática de *F. culmorum* durante la fermentación depende de distintos factores, entre los más importantes se encuentran la fuente de carbono, la temperatura, la luz y el pH, este último afecta significativamente la actividad enzimática y mantiene la estabilidad estructural de la esterasa secretada (Valkonen, *et al.*, 2014; Colla *et al.*, 2015). El pH tiene un papel importante en el equilibrio químico de cualquier reacción, aumenta o disminuye la velocidad a la cual se obtiene el producto a partir del sustrato, mediante la enzima. Los cambios de pH alteran la ionización de los grupos, tanto en el sitio activo de la enzima como en el sustrato, lo que influye en su velocidad de unión (Robinson, 2015). La manera en que el pH afecta la estabilidad de enzimas es alterando las interacciones electrostáticas de su estructura proteica, provocando cambios en el estado de ionización de los aminoácidos, los cuales definen las estructuras secundarias y terciarias de la proteína y, por lo tanto, su actividad y estabilidad (Colla *et al.*, 2015; Luo, 2015).

## 3.2. Plastificantes

El plástico es el tercer material sintético más abundante hecho por el hombre y su uso se extiende considerablemente a todos los aspectos de nuestra vida (Geyer *et al.*, 2017; Meeker, 2009). El uso de polímeros sintéticos ha aumentado

considerablemente desde su aparición a principios del siglo XX y, actualmente, se espera que con ellos se pueda sustituir otro tipo de materiales, como el vidrio, metal o madera (Geyer *et al.*, 2017). El desarrollo tecnológico de las últimas décadas ha permitido la fabricación de productos plásticos con gran resistencia, durabilidad y versatilidad a un coste muy bajo (Meeker, 2009). Esto ha sido posible gracias a la adición de plastificantes, sustancias que contienen moléculas lubricantes y se añaden a los polímeros para cambiar sus propiedades (Rabek *et al.*, 2015). Los plastificantes se encuentran libres entre las cadenas del polímero permitiendo que éstas se muevan con facilidad modificando así el comportamiento mecánico del material resultante (Lim y Hoang, 2013; Rabek *et al.*, 2015). Los plastificantes generalmente son compuestos no volátiles, con un alto punto de ebullición y bajo peso molecular, se agregan al polímero para mejorar sus propiedades mecánicas como flexibilidad, maleabilidad y elasticidad sin alterar químicamente el material plastificado (Lim & Hoang, 2013).

### **3.2.1 Ftalatos**

Los ésteres de ácido ftálico, comúnmente conocidos como ftalatos, son los plastificantes más utilizados en la industria (Zhu *et al.*, 2016). El 87% de la producción mundial de plastificantes corresponde a éstas sustancias (Sheikh *et al.*, 2016). La producción de ftalatos ha aumentado rápidamente en las últimas décadas, en 1975 se producían cerca de 1.8 millones de toneladas, en 2009, 6.2 y para 2011 se producían más de 8 millones de toneladas en todo el mundo. (Gao, 2015).

Químicamente, los ftalatos son diésteres aromáticos que presentan dos cadenas laterales generalmente alifáticas lineales o ramificadas (Meeker, 2009). La aplicación de los ftalatos es muy variada, pero de forma general se pueden dividir en dos: los de alto peso molecular, que se utilizan principalmente como plastificantes en la fabricación de plástico de vinilo flexible que, a su vez, se utiliza en productos de consumo, suelos, revestimientos de paredes, productos de contacto con alimentos y dispositivos médicos, los de bajo peso molecular son utilizados como disolventes en productos de cuidado personal (perfumes, lociones, cosméticos, etc.) y en lacas, barnices y revestimientos (Meeker, 2009; Starling *et al.*, 2015; Sheikh *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016).

### **3.2.2 DEHF**

Se trata de un éster de ácido ftálico de alto peso molecular (390.57 g/mol) con dos cadenas alquilo de 8 carbonos cada una, es prácticamente insoluble en agua y soluble en aceites (Gao, 2015). El Di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) es el plastificante que más se sintetiza, alcanzando el 50% de la producción total mundial (Zhu *et al.*, 2016). Es mezclado con policloruro de vinilo (PVC) para la fabricación de una amplia gama de productos, entre los cuales se encuentran: material médico como bolsas de sangre y suero, catéteres, mangueras y otros, como juguetes y contenedores (Lin *et al.*, 2015).

Ya que los ftalatos no forman enlaces covalentes con los polímeros, el DEHF migra a los productos, a los consumidores y al medio circundante con facilidad, de forma que su presencia en el ambiente y organismos es tan común como preocupante (Li *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016). En la atmósfera se han hallado concentraciones de hasta 689 ng/m<sup>3</sup> en India, en agua dulce y sedimentos se han registrado hasta 450 µg/L en ríos de China, así mismo las concentraciones ascienden a 34800 µg/kg (peso seco) en sedimentos de Taiwán y, por último, la máxima concentración en suelos se halló en España en 2012 con 63000 µg/kg (Gao, 2015).

### 3.2.3 Toxicidad y regulación de DEHF

En humanos, el DEHF puede ingresar de manera directa e indirecta, por vía cutánea, por inhalación e ingestión (Li *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016). Estudios reportan que el DEHF es un disruptor endócrino que, junto con el Bisfenol A (BPA), pueden ser fácilmente encontrados en productos de consumo diario (Zhu *et al.*, 2016). En un estudio donde se muestrearon 72 alimentos comunes en un supermercado de Nueva York se encontró que el 74% de las muestras contenían DEHF proveniente de los empaques que los contenían (Sheikh *et al.*, 2016). En humanos, se relaciona la exposición a DEHF con asma, alergias y diabetes en adultos, así como déficit en el desarrollo neurológico y gonadal en niños (Starling *et al.*, 2015). La exposición a ftalatos en mujeres se ha relacionado con subfertilidad, endometriosis, leiomiomas, cáncer de mama, abortos espontáneos, gestación retrasada o pretérmino y complicaciones del embarazo, como anemia, toxemia y preeclampsia (Sheikh *et al.*, 2016; Jhons *et al.*, 2017). Adicionalmente, si existe exposición a DEHF durante la gestación éste es capaz de penetrar la placenta; se ha encontrado en el líquido amniótico así como en muestras de leche materna (Sharma *et al.*, 2014). La exposición a ftalatos en hombres se ha asociado con criptorquidia, hipospadias, ginecomastia, espermograma anormal y daño en el ADN espermático, niveles anormales de prolactina, LH, FSH, testosterona, índice de andrógenos libre, estradiol y globulina fijadora de hormonas sexuales (Sheikh *et al.*, 2016). La exposición a temprana edad influye en bajo conteo espermático, genitales masculinos reducidos, nacimiento prematuro, entre otros (Sharma *et al.*, 2014). En animales, la exposición a DEHF se caracteriza por malformaciones en órganos masculinos (epidídimo, conducto deferente, vesículas seminales, próstata, genitales externos), criptorquidia y reducción de fertilidad además de hepatotoxicidad y teratogénesis (Sharma *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Sheikh *et al.*, 2016).

Los plastificantes han sido causa de preocupación alrededor del mundo, la Unión Europea restringe el uso de éste plastificante en productos de puericultura y juguetes (ECB, 2008). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) enlista al DEHF en el número 737 de los 1,613 agentes tóxicos que integran la Lista de Prioridades Nacionales (PNL). Por su parte, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) enlista al DEHF en la NOM-052-SEMARNAT-2005 como uno de los residuos peligrosos resultado del desecho de productos químicos fuera de especificaciones o caducos (tóxicos crónicos).

### 3.3. Degradación de DEHF a través de microorganismos

La tasa de degradación por hidrólisis de los ftalatos de manera natural es significativamente baja, se ha calculado que DEHF puede hidrolizarse totalmente de forma natural a pH neutro en un periodo de aproximadamente 2000 años (Gao, 2015). Ya que la degradación de ésteres de ácido ftálico sin intervención microbiana es poco eficiente, se ha propuesto el uso de una amplia variedad de microorganismos (principalmente fitopatógenos), entre los que se incluyen bacterias y hongos filamentosos (López-López *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2017). Diversas investigaciones han arrojado aportes sobre la degradación de DEHF a través del metabolismo microbiano encontrando que existen microorganismos específicos que son capaces de utilizar éste plastificante como fuente de carbono y energía (Zhi-Dan, 2014; Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016).

#### 3.3.1. Degradación de DEHF por *F. culmorum* en fermentación líquida

El proceso de fermentación de *F. culmorum* en laboratorio puede llevarse a cabo en dos fases: líquida, que generalmente es un medio acuoso o sólida en el que se utiliza un material inerte como soporte. La fermentación en medio líquido es el más utilizado en la producción enzimática, ya que se trata de un medio en el que fácilmente se pueden controlar parámetros como temperatura y pH (Viniestra-González *et al.*, 2003; Colla *et al.*, 2015). Las esterasas producidas por *F. culmorum* inician con la hidrólisis de los enlaces éster que componen al DEHF (Luo, 2015). El mono (2-etilhexil) ftalato resultante podría derivar en ácido 6-etil-4-oxodeca-2-enoico (*Figura 3*) y, a través de una segunda hidrolización, obtener ácido 2,3-dihidroxitetranodioico que eventualmente puede derivar en 2,3-butanediol. Compuesto orgánico que también se puede obtener a través de las bacterias lácticas como metabolismo alternativo del piruvato (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016).

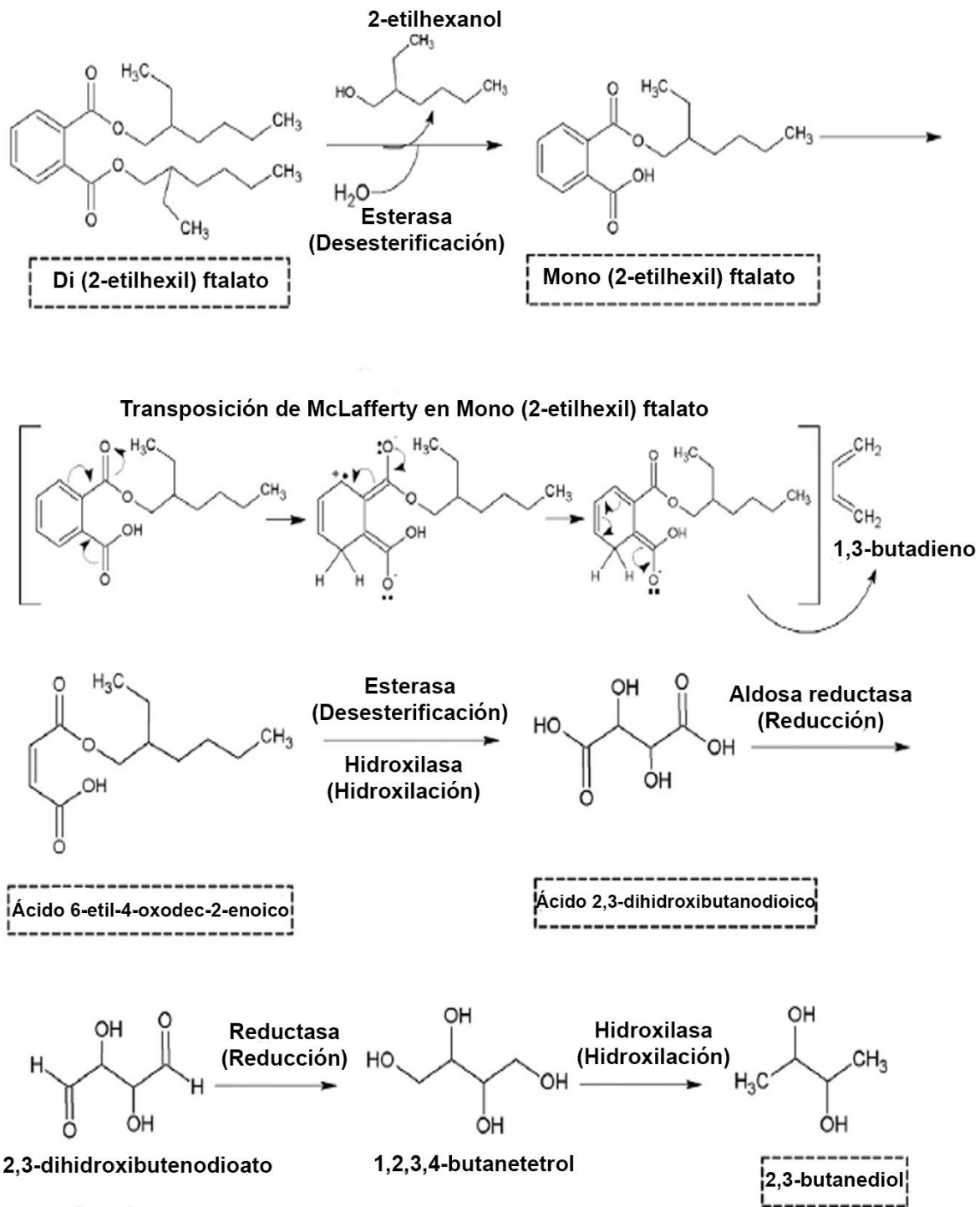


Figura 3. Ruta de degradación de DEHF por *F. culmorum* (Ahuactzin-Pérez et al., 2016).

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Degradación de ftalatos por hongos filamentosos

Kim *et al.* (2007) investigaron la degradación de Dibutil ftalato (DBF) (500 mg/L) por medio del metabolismo de *Fusarium oxysporum*. Se logró un consumo del 70% del ftalato dentro de las primeras 5 horas de fermentación, agregando cutinasas al medio nutritivo. Kim y Song (2009) estudiaron la relación entre el diámetro de pellet del hongo *Pleurotus ostreatus* y la degradación de dos plastificantes: benzilbutil ftalato (BBF) y dimetil ftalato (DMF). Los resultados que obtuvieron indican una proporcionalidad inversa entre el tamaño del pellet y la degradación de los plastificantes. Suárez-Segundo *et al.* (2013) estudiaron el crecimiento de *F. oxysporum*, *Mortierella alpina*, *Pleurotus pulmonarius*, dos cepas de *Pleurotus ostreatus* (Po 37 y Po 83) y *Pleurotus florida* en presencia de DEHF y DBF encontrando que la mayor producción de biomasa se obtuvo de *F. oxysporum* y *M. alpina* en la fermentación en presencia de DEHF en comparación con la fermentación control que contenía glucosa como fuente de carbono; así mismo, el resto de organismos presentó aumento de biomasa a lo largo de la fermentación en presencia de los plastificantes, aunque en algunos casos sin superar la biomasa obtenida en el control. Los autores concluyen que estos organismos son capaces de usar los plastificantes como única fuente de carbono. Por su parte Ahuactzin-Pérez *et al.* (2014) estudiaron el crecimiento de *Neurospora sitophyla*, *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus niger* en presencia de DBF (500 y 1000 mg/L). Reportaron un mayor crecimiento de hifas en *N. sitophyla* a concentración de 1000 mg de DBF/L. En esa investigación, además, se propone un método para calcular la degradación del plastificante a partir de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>). Ahuactzin-Pérez *et al.* (2018) nuevamente, estudiaron la capacidad de *F. culmorum* para utilizar DBF como fuente de carbono en concentraciones de 500 y 1000 mg/L. Los resultados obtenidos mostraron que la degradación del 99% del compuesto se logró a las 228 h, cuando la concentración fue de 500 mg de DBF/L y a las 168 h cuando la concentración fue de 1000 mg de DBF/L.

### 4.2. Crecimiento y actividad enzimática de hongos en presencia de DEHF

Pradeep *et al.* (2012) estudiaron la degradación *in situ* de DEHF usando tres especies de hongos de manera individual y en consorcio: *Aspergillus japonicus*, *Penicillium brocae* y *Purpureocillium lilacinum*. A diferencia de las fermentaciones individuales de los hongos, el consorcio logró consumir el plastificante en tres semanas y obtener su biomasa máxima a los 15 días de fermentación. Córdoba-Sosa *et al.* (2014) realizaron estudios con *Pleurotus ostreatus*, haciéndolo crecer con glucosa en presencia de DEHF a concentraciones de 750, 1200 y 1500 mg/L, donde la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) fue superior en 750 mg DEHF/L y la actividad enzimática máxima se obtuvo a 1500 mg DEHF/L con 67.5 U/L. Ahuactzin-Pérez *et al.* (2016) estudiaron la degradación de DEHF por *F. culmorum* y reportaron que el hongo es capaz de consumir el 95% de 1000 mg DEHF/L en solo 60 horas, se obtuvo una biomasa de hasta 5.1 g/L y una actividad enzimática máxima superior a

12000 U/L. Ahuactzin-Pérez *et al.* (2017) estudiaron la ruta de degradación de DEHF por *P. ostreatus*, donde utilizaron concentraciones de 500 y 1000 mg DEHF/L y se encontró que: en la fermentación con 1000 mg DEHF/L se produjo la máxima biomasa y a las 504 h se alcanzó el 100% de degradación. Ferrer-Parra *et al.* (2018) caracterizaron las esterasas de *F. culmorum* crecido en DEHF a concentraciones de 1500 y 2000 mg/L donde identificaron hasta seis isoformas de la enzima y una mayor producción de esterasas con la menor concentración de DEHF.

#### **4.3. Influencia del pH en la actividad enzimática de hongos filamentosos**

Pocos autores han relacionado el efecto del pH en la producción enzimática de hongos filamentosos. Fávero *et al.* (2013) estudiaron la producción enzimática de hongos endofíticos a través de un indicador colorimétrico de pH en fermentación líquida. Pudieron observar la hidrólisis de los enlaces ésteres del sustrato por las esterasas a través de colorimetría, la cual fue medida espectrofotométricamente. De este trabajo concluyeron que la actividad de esterasas se favoreció a pH 7.8 particularmente y también determinaron que las esterasas tienen un intervalo de actividad por hidrólisis que podría encontrarse entre 6.0 y 8.5, y el óptimo dependerá de estructura proteica de la esterasa. Luo *et al.* (2015) utilizaron la fermentación sólida para comparar la actividad enzimática de *Fusarium* sp. con dimetil isoftalato y dimetil tereftalato como única fuente de carbono en un intervalo de pH de 3.0 - 13.0, en ese estudio los investigadores determinan que la óptima producción enzimática se da a pH 8.0.

Otros autores han evaluado la influencia del pH solamente en el crecimiento de hongos filamentosos, tal como Jackson *et al.* (1992) que estudiaron el efecto del pH, la temperatura y el potencial hídrico en el crecimiento micelial de *Gliocladium virens* y tres especies de *Trichoderma* con la intención de evaluar cómo éstos parámetros afectan el desarrollo óptimo de éstas especies antagónicas de *Sclerotium cepivorum*, especie parásita de la cebolla. En el estudio, compararon el crecimiento de las cuatro cepas en fermentación sólida a pH de 2.5, 3.2, 3.8, 4.6, 5.5, 5.6, 6.8 y 7.4. Los resultados revelaron que a pH 5.6 se obtiene la mayor producción de biomasa de dos cepas de *Trichoderma*, por su parte, *G. virens*, así como la tercera cepa de *Trichoderma* produjeron mayor biomasa a pH 4.6. Así mismo, se encontró que en todos los casos, el pH de menor producción enzimática fue 7.4. Rousk *et al.* (2009) estudiaron el efecto del pH del suelo en el crecimiento de bacterias y hongos. El trabajo resalta la importancia de conocer las condiciones bajo las que se desarrollan los organismos edáficos. El gradiente natural de pH del suelo se encontró de 4.5 a 8.3 y los resultados obtenidos por los investigadores respecto al crecimiento micelial muestran un pico en la producción de biomasa entre pH 6.0 - 6.5, disminuyendo hacia los extremos de ambos lados (4.5 y 8.3).

## 5. JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones realizadas sobre la toxicidad de DEHF coinciden en que es un compuesto que afecta la salud de manera importante. Su presencia en el ambiente es ubicua ya que los productos que lo contienen son muy diversos, por lo que la exposición es generalizada y representa un riesgo para la población. En la actualidad, el metabolismo microbiano es la mejor y más rápida opción para degradar el DEHF. Los factores que influyen la actividad enzimática de *F. culmorum*, organismo capaz de consumir el 95% de DEHF en 60 h de fermentación, son diversos. Conocerlos y optimizarlos, ayudará a mejorar el proceso de degradación de una sustancia reconocida como disruptor endócrino. El pH es uno de los parámetros más importantes a considerar cuando se trata de fermentaciones *in vitro* para la obtención de enzimas, ya que de él depende la estabilidad enzimática, y la velocidad de reacción. Siendo el DEHF la única fuente de carbono disponible para el organismo, la actividad enzimática y crecimiento se relacionan estrechamente. Comparar fermentaciones de *F. culmorum* en presencia de DEHF ajustadas a distintos valores de pH ayudará a conocer el óptimo bajo el cual la actividad enzimática, el crecimiento, y con ello la degradación, se verán favorecidas a temperatura ambiente.



## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Determinar el pH inicial bajo el cual se obtiene mayor crecimiento y actividad enzimática de *F. culmorum* con di (2-etil hexil) ftalato (DEHF) como única fuente de carbono, en fermentación líquida.

### **6.2. Objetivos particulares**

Cuantificar la producción de biomasa de *F. culmorum* con DEHF como fuente de carbono a diferentes valores de pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0) en fermentación líquida.

Determinar la velocidad de crecimiento específica de *F. culmorum* con DEHF como fuente de carbono a diferentes valores de pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0) en fermentación líquida.

Cuantificar la actividad de esterasas de *F. culmorum* con DEHF como fuente de carbono a diferentes valores de pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0) en fermentación líquida.

Determinar los parámetros cinéticos de producción de esterasas, los cuales incluyen: el rendimiento de enzima por unidad de biomasa, la productividad enzimática y la tasa específica de producción enzimática de *F. culmorum* con DEHF como fuente de carbono a diferentes valores de pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0) en fermentación líquida.

Realizar electroforesis para observar la actividad enzimática (zimografía) del sobrenadante de *F. culmorum* con DEHF como fuente de carbono a diferentes valores de pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0) en fermentación líquida.

## 7. HIPÓTESIS

Si se ajusta el pH inicial de las fermentaciones donde crecerá *Fusarium culmorum* con di (2-etil hexil) ftalato (DEHF) como fuente de carbono. Se afectará el crecimiento y la producción de esterasas y se mostrará una afinidad por alguno de los valores de pH inicial del medio de cultivo.

## 8. MÉTODOS

### 8.1. Cepa

Se utilizó la cepa de *Fusarium culmorum* del cepario del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT). La propagación del hongo se realizó en agar Czapek, incubando a 25°C durante 7 días (Figura 4).



Figura 4. Cepa de *Fusarium culmorum*.

### 8.2. Fermentación

Se realizaron ocho fermentaciones en medio líquido a distintos valores de pH, cada fermentación duró diez días (240 h) y se muestreó cada 12 h por triplicado.

#### 8.2.1. Medios de cultivo

Se prepararon ocho medios de cultivo ajustando el valor de pH inicial a: 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0. El medio se preparó en solución acuosa agregando en g/L: 1.0,  $K_2HPO_4$ ; 0.5,  $MgSO_4$ ; 0.5, KCl; 0.01,  $FeSO_4$  y 3.0,  $NaNO_3$  como fuente de nitrógeno. Se usó en todas las fermentaciones 1000 mg de DEHF/L como fuente única de carbono. Se vertieron 50 mL de medio de cultivo en matraces de 125mL, los cuales, fueron esterilizados durante 15 minutos a 15 libras y 121°C.

#### 8.2.2. Inoculación

En condiciones de esterilidad se horadaron las cajas Petri que contienen la cepa propagada (se cortaron fragmentos de micelio de 4mm de diámetro). La cantidad de cajas horadadas dependió de la cantidad de fragmentos obtenidos de cada una; se utilizó únicamente micelio de la periferia de la caja asegurando así que el micelio

utilizado fuera joven y metabólicamente activo. Manteniendo las condiciones de esterilidad, se colocaron en cada matraz tres fragmentos de micelio de 4mm de diámetro (*Figura 5*).



*Figura 5.* Inoculación del medio líquido con fragmentos de *F. culmorum*.

### 8.2.3. Incubación

Se colocaron los matraces en una incubadora con agitación y temperatura controladas (120rpm y 25°C), por 240 h.

### 8.3. Separación de biomasa por filtración

Para separar el micelio del sobrenadante (SN) se utilizó papel filtro Whatman de 20-25 $\mu$ m de poro a peso constante, manteniéndolo libre de humedad durante 24 horas a 60°C. Usando una balanza analítica se registró el peso de cada fragmento de papel filtro debidamente identificado. Con ayuda de un matraz Kitasato y un embudo Buchner se pasó el contenido de los matraces a través del papel filtro (*Figura 6*). El micelio atrapado por el papel filtro se llevó a deshidratación a 60°C durante 24 horas y el SN recolectado en el matraz Kitasato fue almacenado en refrigeración para los análisis posteriores que corresponden a: determinación de actividad enzimática por espectrofotometría UV-visible y zimografía obtenida a través de electroforesis.



Figura 6. Separación del micelio y el sobrenadante.

#### 8.4. Determinación de la tasa de crecimiento específico

El papel filtro con el micelio se colocó en la estufa a 60°C por 24 horas para deshidratar. Posterior a la deshidratación, se tomó nuevamente el peso de cada papel filtro, el peso seco del micelio es el valor usado para determinar la tasa de crecimiento específico, por lo que se resta el peso del papel filtro tomado previamente. Para determinar la tasa de crecimiento se empleó la función logística a partir de la siguiente expresión:

$$dX/dt = \mu [1 - X/X_{\max}] X_0 \text{ o } X [X_{\max}/1 + Ce^{-\mu t}]$$

Donde  $X=X_0$  es la biomasa inicial,  $C=(X_{\max}-X_0)/X_0$ ,  $\mu$  es la tasa de crecimiento específica y  $X_{\max}$  es la biomasa máxima alcanzada cuando  $dX/dt = 0$  por  $X > 0$ . La biomasa fue calculada a partir del peso seco del micelio tras la deshidratación.

##### 8.4.1. Evaluación de los parámetros cinéticos de crecimiento

Se obtuvo, a partir de los datos de cada fermentación el valor de  $\mu$  que es la tasa de crecimiento específica y  $X_{\max}$  que es la biomasa máxima alcanzada.

#### 8.5. Seguimiento de pH

Para observar las variaciones a lo largo de la fermentación se determinó el valor de pH con ayuda de un potenciómetro después de filtrar el contenido de los matraces.

Este parámetro fue medido cada 12 horas durante las 240 horas que duró cada una de las fermentaciones.

## **8.6. Análisis de la actividad de esterasas**

La actividad de esterasas se obtuvo a través de una determinación espectrofotométrica. Se usó una solución de p-nitrofenil butirato (pNPB) como sustrato la cual se elaboró con: 10  $\mu\text{L}$  de pNPB en solución al 1.7% (v/v) con acetonitrilo, 790  $\mu\text{L}$  de buffer de acetato 50mM (pH 7.0), 0.04% de Triton X-100 (v/v) y 100  $\mu\text{L}$  de SN. Se aceleró la oxidación a baño María por 5 minutos a 37°C, deteniéndola con baño de hielo dando paso a la lectura a 405nm. Se tomó como una unidad enzimática de actividad de lacasa o esterasa (U) a la cantidad de enzima que produzca un incremento de 1 unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción (Ahuactzin-Pérez M. , 2016).

### **8.6.1. Evaluación de los parámetros cinéticos de producción de esterasas**

Teóricamente, el rendimiento enzimático fue definido como la actividad de enzima por unidad de biomasa producida por el hongo ( $Y_{E/X}$ ). Este valor fue calculado a partir del máximo de biomasa y de enzima en cada fermentación, también se calculó a lo largo de todas las fermentaciones para observar el rendimiento cada 12 h. Se estimó como la relación entre la actividad enzimática máxima obtenida durante el crecimiento exponencial ( $E_{\text{max}}$ ) y  $X_{\text{max}}$  obtenida al calcular biomasa. La productividad enzimática ( $P_{\text{RO}} = E_{\text{max}} / \text{tiempo}$ ) fue evaluada en el tiempo en que la actividad enzimática es máxima. La tasa específica de producción enzimática se calculó a partir de la ecuación:  $q_p = (\mu) (Y_{E/X})$  (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016).

## **8.7. Análisis zimográfico**

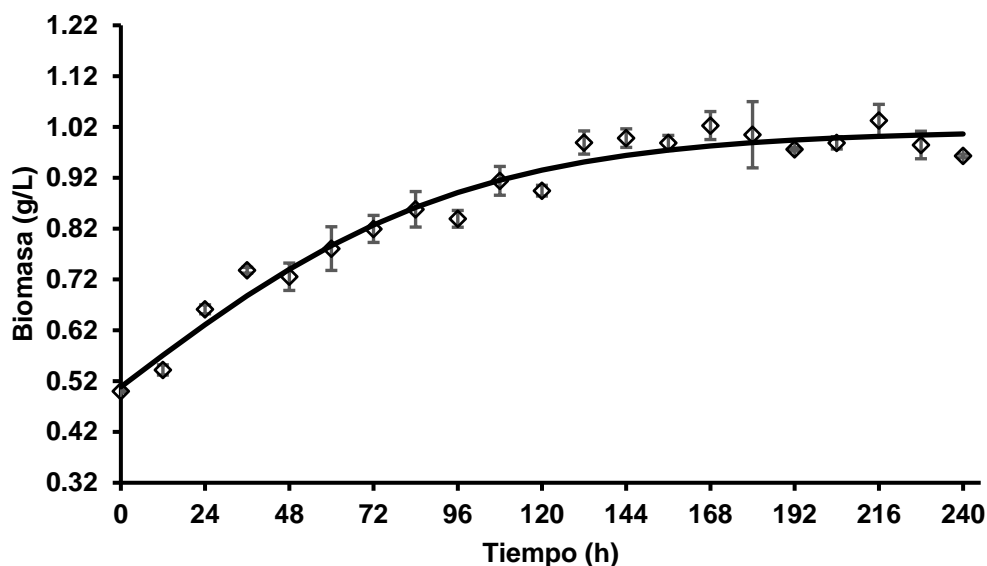
Se realizó zimografía para visualizar la actividad de esterasas a través de electroforesis en gel al 12% de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y al 4% para empaquetar las muestras. Se corrió una mezcla del SN con buffer de muestra sobre cada carril y se corrió el gel a 120 voltios. Una vez separada la muestra en su totalidad se retiraron las placas de gel y se sumergieron en una solución sustrato de  $\alpha$ -Naftil acetato 3mM, buffer Fast Red (Sigma) 1mM y buffer de fosfato 100mM durante 12 horas en agitación constante para el revelado.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Fermentación a pH 5.5

#### 9.1.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.

La producción de biomasa ( $X$ ) de *F. culmorum* expresada en g/L, obtenida a lo largo de la fermentación a pH inicial de 5.5 se muestra en la *Figura 7*, en ella se aprecia que el crecimiento exponencial de *F. culmorum* inicia desde las primeras horas de fermentación y alcanza la fase estacionaria cerca de las 132 h. A partir de los datos se obtuvo teóricamente el valor de  $\mu$  y  $X_{max}$  que corresponden a  $0.02 \text{ h}^{-1}$  y de  $1.032 \text{ g/L}$  respectivamente, la  $X_{max}$  se obtuvo a las 216 h.



*Figura 7.* Producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.1.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases

En la *Figura 8* se muestra la actividad de esterases de *F. culmorum* obtenida a partir de una solución sustrato de paranitrofenil butirato (pNB) a lo largo de la fermentación a pH inicial de 5.5 expresada en U/L. En la figura es apreciable la marcada actividad enzimática que aumenta desde las 48 h con un punto máximo de actividad ( $E_{max}$ ) de  $448.44 \text{ U/L}$  a las 204 h, y con ello se ha calculado el  $Y_{E/X}$  en  $444 \text{ UGX}^{-1}$ , así mismo, el valor de productividad enzimática ( $P_{RO}$ ) se calculó en  $2.2 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p$ ) es de  $8.9 \text{ Uh}^{-1}\text{gX}^{-1}$ . El rendimiento de la enzima respecto a la biomasa registrado a lo largo de la fermentación se muestra en la *Figura 9* donde se muestra una mayor producción enzimática con respecto a la biomasa dentro de las primeras 120 h.

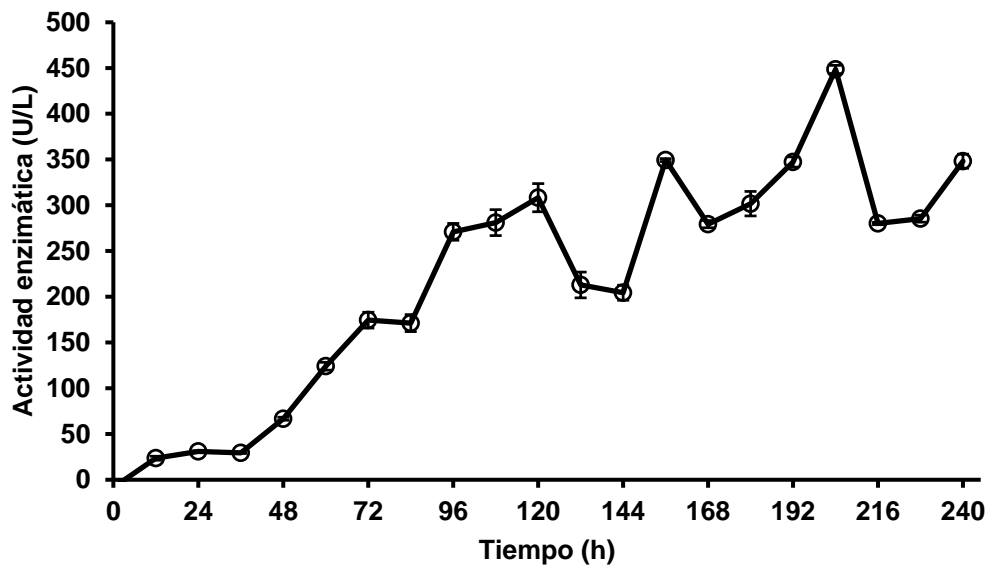


Figura 8. Actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

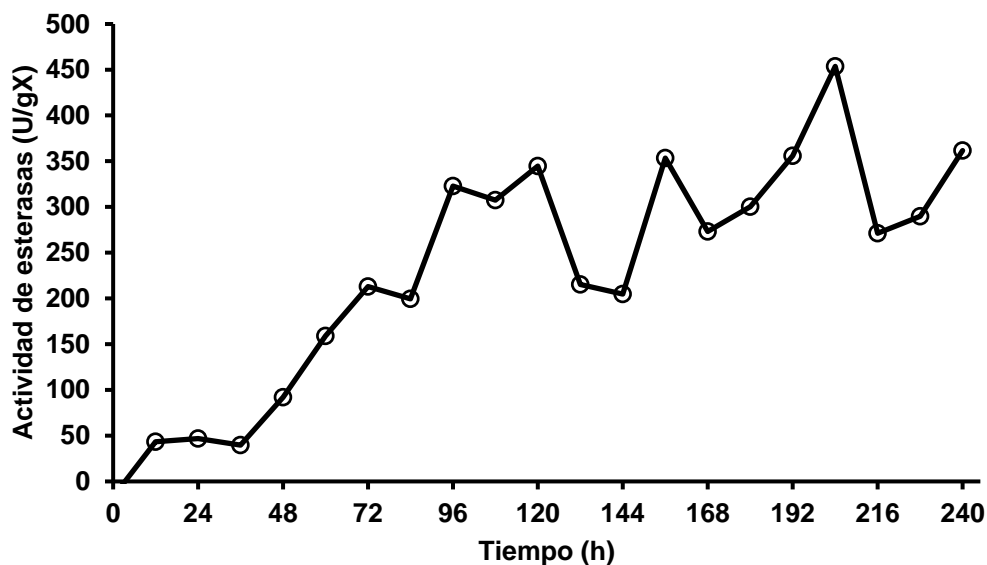


Figura 9. Rendimiento enzimático de *F. culmorum* con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida.

### 9.1.3. Perfil de pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo de la fermentación a pH inicial de 5.5 se muestran en la Figura 10, donde se aprecia que se alteró el pH del SN desde las primeras 12 h tendiendo ligeramente a la neutralidad, llegando a pH 6.57 a las 156 h.



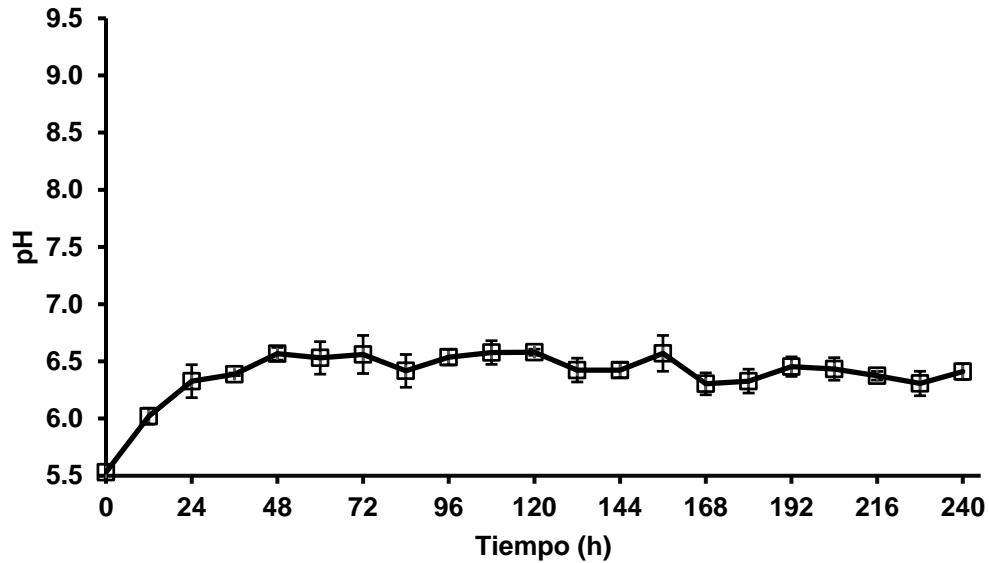


Figura 10. Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.1.4. Zimografía

En la Figura 11 se muestra la zimografía obtenida del SN de *F. culmorum* a pH inicial de 5.5. Se observa la presencia de cuatro isoenzimas: 10 kDa, 25 kDa, 37 kDa y 50 kDa aproximadamente. La banda de mayor actividad fue de 10 kDa, la cual aparece desde las 60 h y se mantiene durante el resto de la fermentación, la de 25 kDa se observa más tenue y se expresa desde las 48 h hasta el final de la fermentación. En los 37 kDa se observa actividad a las 204 y 216 h. Y por último se observa una banda a 50 kDa que aparece desde las 84 h y se mantiene hacia el final de la fermentación.

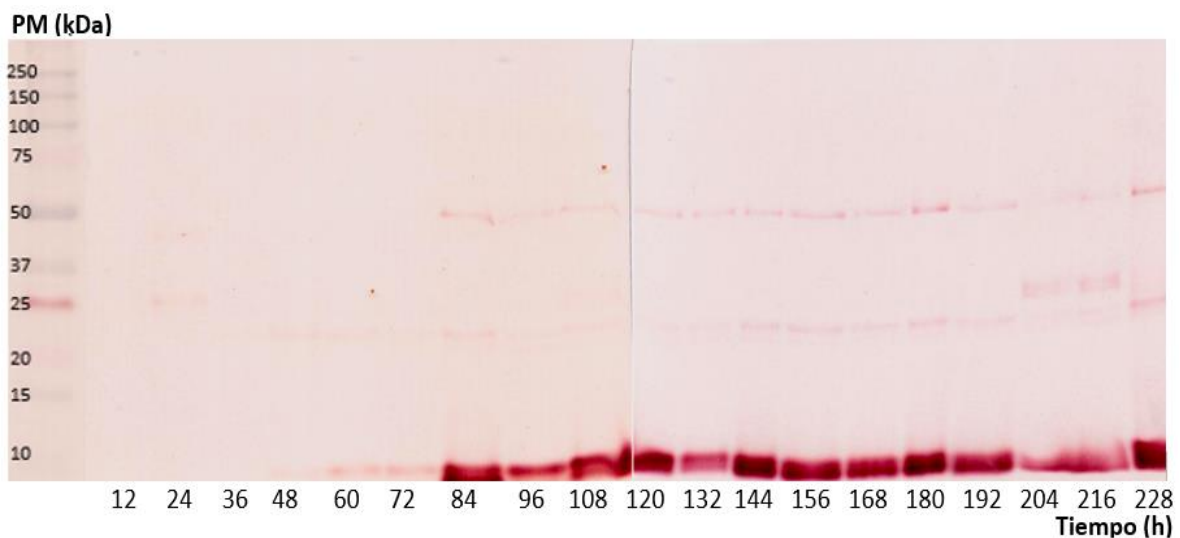
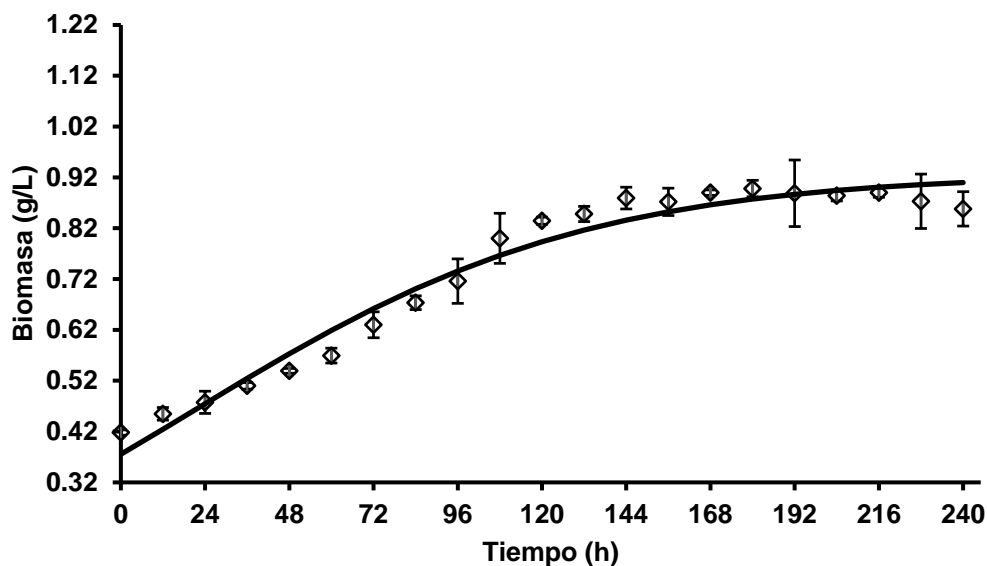


Figura 11. Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 5.5 en fermentación líquida.

## 9.2. Fermentación a pH 6.0

### 9.2.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.

La producción de biomasa ( $X$ ) de *F. culmorum* expresada en g/L, obtenida a lo largo de la fermentación a pH inicial de 6.0 se muestra en la *Figura 12*, en la que se aprecia el crecimiento exponencial de *F. culmorum* que inicia a partir del primer día de fermentación y alcanza la fase estacionaria a las 144 h. El valor calculado de  $\mu$  fue de  $0.018 \text{ h}^{-1}$  y el valor de  $X_{\text{max}}$  es de  $0.89 \text{ g/L}$  obtenida a las 180 h.



*Figura 12.* Producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

### 9.2.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases

En la *Figura 13* se muestra la actividad de esterases de *F. culmorum* obtenida a partir de una solución sustrato de paranitrofenil butirato (pNB) a lo largo de la fermentación a pH inicial de 6.0 expresada en U/L. En la figura se observa la actividad enzimática durante toda la fermentación, menor en comparación con la fermentación anterior siendo el punto máximo de actividad ( $E_{\text{max}}$ ) de  $222.5 \text{ U/L}$  a las 228 h, y con ello se ha calculado el  $Y_{E/X}$  en  $241.8 \text{ UGx}^{-1}$ . Así mismo, el valor de productividad enzimática ( $P_{\text{RO}}$ ) se calculó en  $1.05 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p$ ) es de  $4.4 \text{ Uh}^{-1}\text{gX}^{-1}$ . El rendimiento de la enzima respecto a la biomasa registrado durante la fermentación se muestra en la *Figura 14* donde la producción enzimática con respecto a la biomasa que alcanza las  $259 \text{ UGx}^{-1}$  a las 72 h.

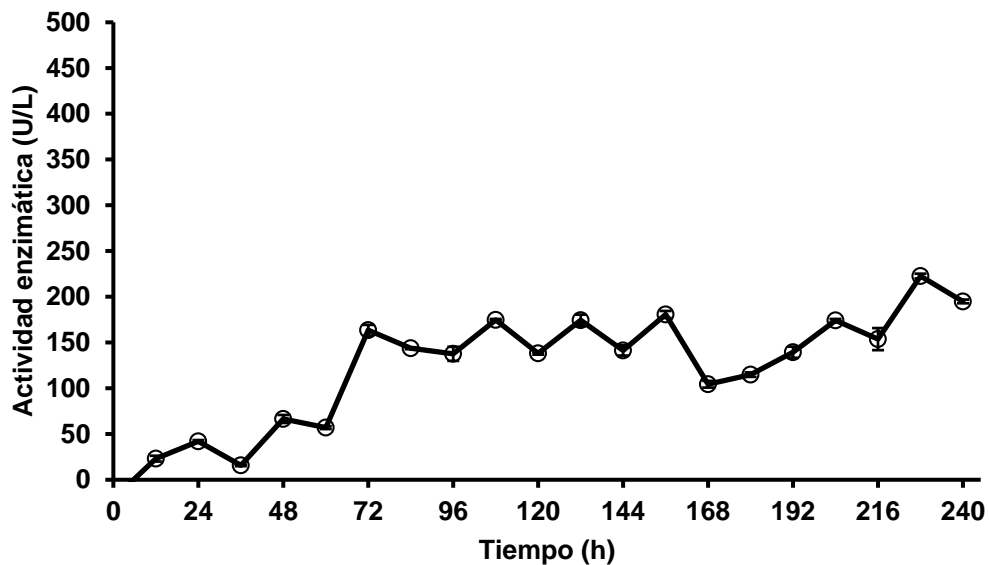


Figura 13. Actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

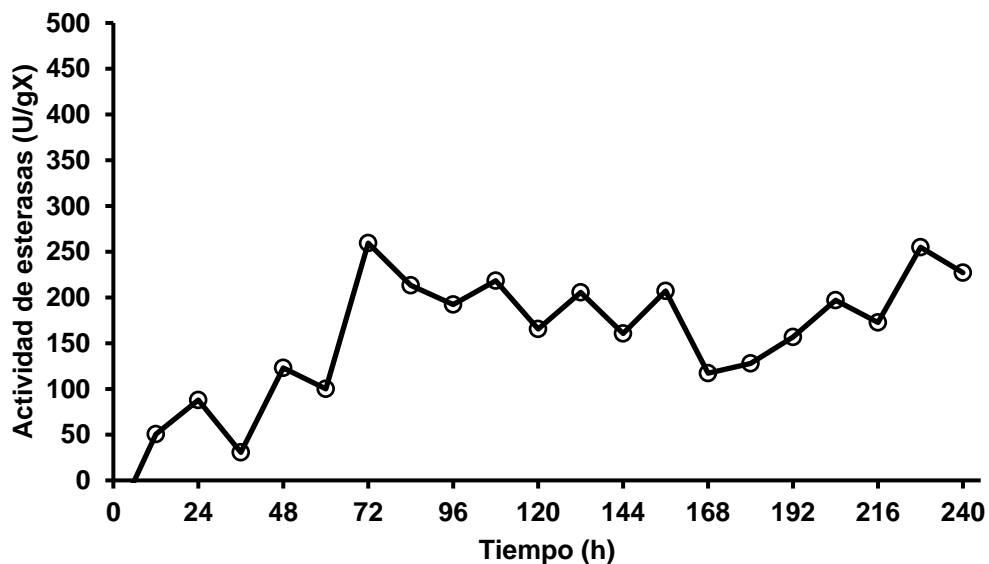


Figura 14. Rendimiento enzimático de *F. culmorum* con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida.

### 9.2.3. Perfil de pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo de la fermentación se muestran en la *Figura 15*, donde se aprecia que el SN se mantiene cercano al valor inicial, modificándose ligeramente llegando a pH 6.42 a las 72 y 132 h.

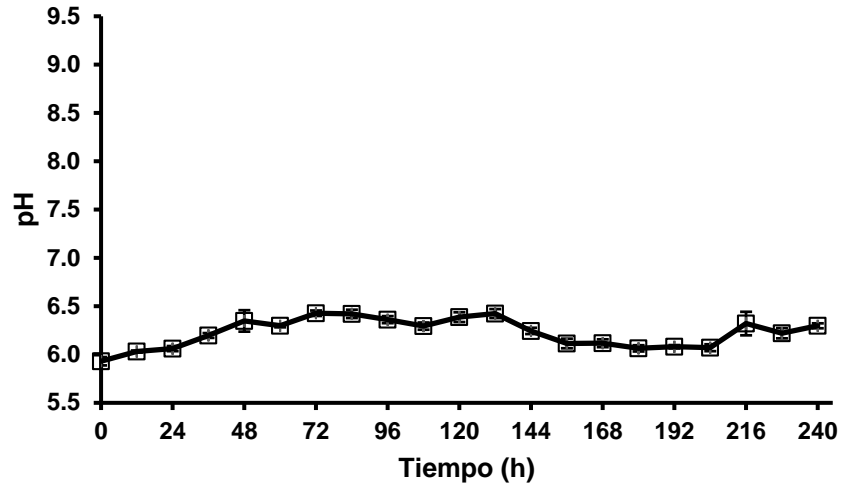


Figura 15. Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.2.4. Zimografía

En la Figura 16 se muestra la zimografía obtenida del SN de *F. culmorum* a pH inicial de 6.0. Se nota la presencia de tres isoenzimas: 25 kDa, 37 kDa y 50 kDa aproximadamente. La banda de 25 kDa aparece desde las 12 h y se mantiene durante el resto de la fermentación a diferencia de la banda de 50 kDa que aparece por primera vez a las 84 h y posteriormente a las 120 h para mantenerse hasta el final de la fermentación, la isoenzima de 37 kDa aparece solamente a las 216 h.

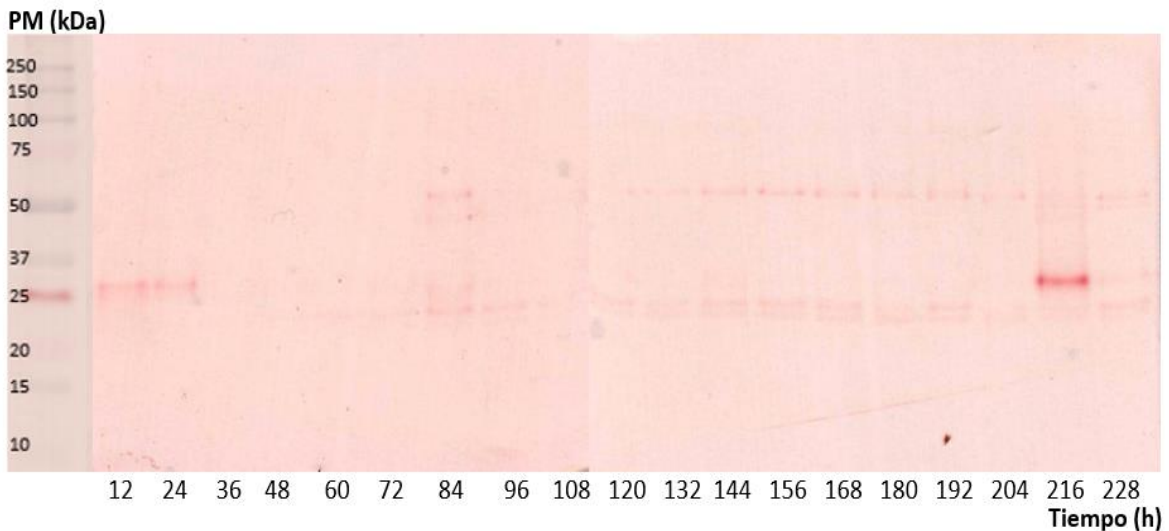
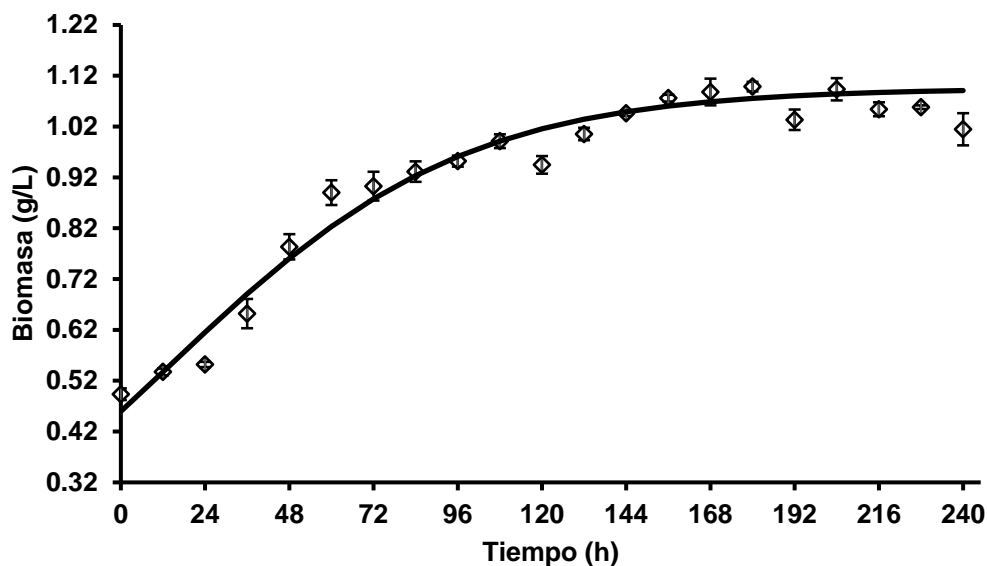


Figura 16. Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 6.0 en fermentación líquida.

### 9.3. Fermentación a pH 6.5

#### 9.3.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento.

La producción de biomasa ( $X$ ) de *F. culmorum* expresada en g/L, obtenida a lo largo de la fermentación a pH inicial de 6.5 se muestra en la *Figura 17*, en la cual se aprecia que el crecimiento exponencial inicia desde las 36 horas de fermentación alcanzando la fase estacionaria a las 156 h. El valor calculado de  $\mu$  fue de  $0.023 \text{ h}^{-1}$  y el de  $X_{\text{max}}$  es de 1.09 g/L obtenida a las 180 h.



*Figura 17.* Producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.3.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases

En la *Figura 18* se muestra la actividad de esterases de *F. culmorum* obtenida a partir de una solución sustrato de paranitrofenil butirato (pNB) a lo largo de la fermentación a pH inicial de 6.5 expresada en U/L. En la figura se observa que la actividad enzimática aumenta desde las 48 h llegando a un máximo de actividad ( $E_{\text{max}}$ ) de 429.8 U/L a las 216 h, y con ello se ha calculado el  $Y_{E/X}$  en  $394.3 \text{ UGx}^{-1}$ . Así mismo, el valor de productividad enzimática ( $P_{RO}$ ) se calculó en  $1.9 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p$ ) es de  $9.1 \text{ Uh}^{-1}\text{gX}^{-1}$ . El rendimiento de la enzima respecto a la biomasa registrado durante la fermentación se muestra en la *Figura 19* donde se observa que alcanza las  $407.8 \text{ UGx}^{-1}$  a las 216 h.

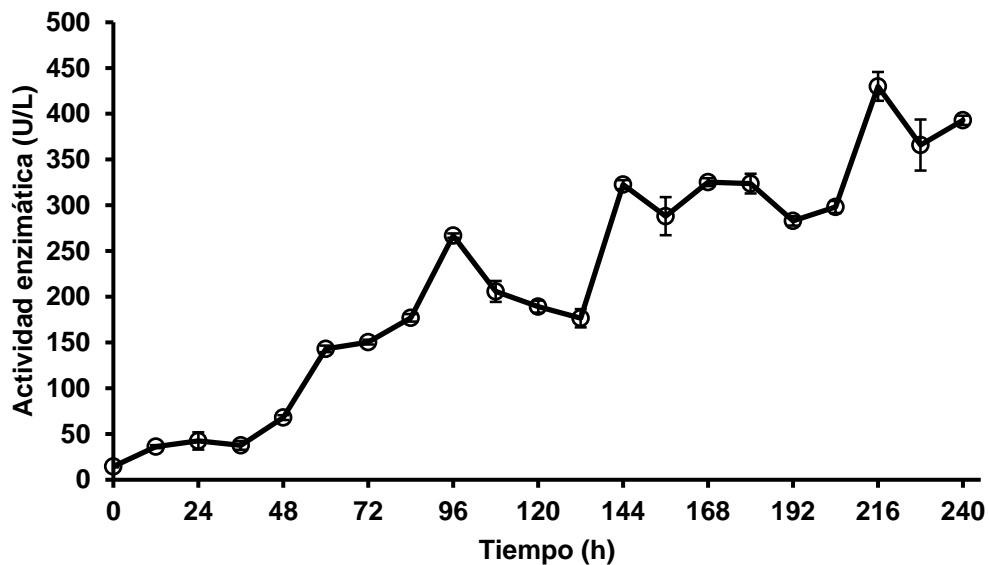


Figura 18. Actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

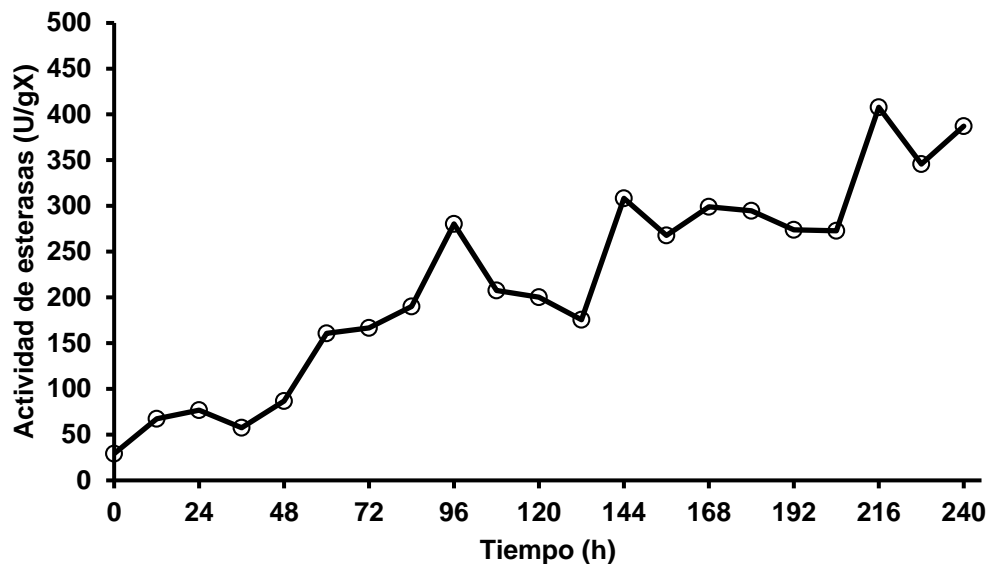


Figura 19. Rendimiento enzimático de *F. culmorum* con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida.

### 9.3.3. Perfil de pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo de la fermentación se muestran en la Figura 20, donde se puede apreciar que el SN se mantiene cercano al valor inicial, aunque tiende a la neutralidad a partir de las 24 h y la alcanza a las 156 y 168 h.

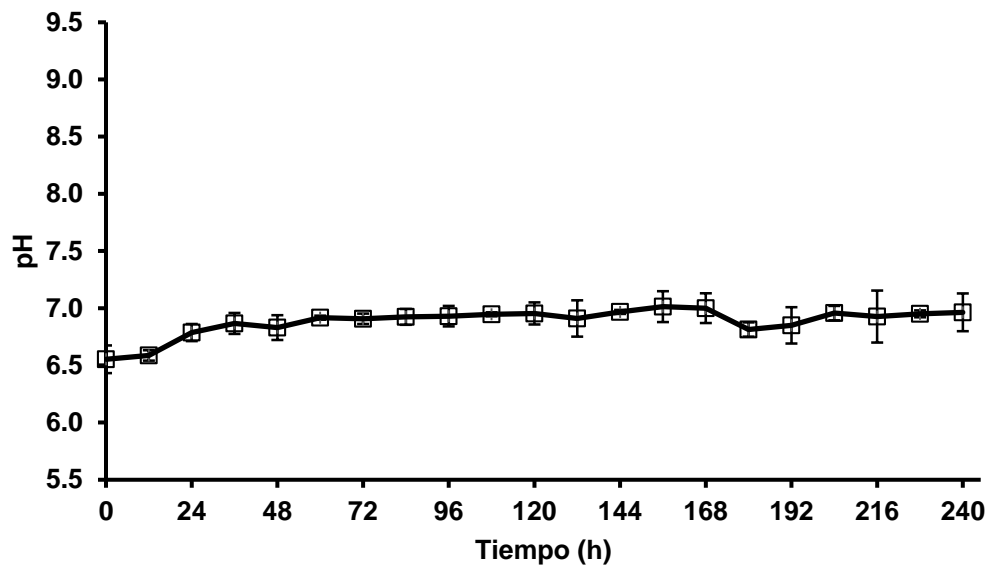


Figura 20. Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

### 9.3.4. Zimografía

En la *Figura 21* se muestra la zimografía obtenida del SN de *F. culmorum* a pH inicial de 6.5. Se observa la actividad de cuatro isoenzimas: 10 kDa, 25 kDa, 37 kDa y 50 kDa aproximadamente. La banda de mayor actividad fue de 10 kDa, la cual aparece desde las 72 h y se mantiene durante el resto de la fermentación. A los 25 kDa la banda se observa a las 72 h y de nuevo a las 120 h para continuar hasta el final de la fermentación. A los 37 kDa se observa actividad solamente a las 108 h y la banda de 50 kDa aparece levemente marcada desde las 72 h hasta el final de la fermentación.

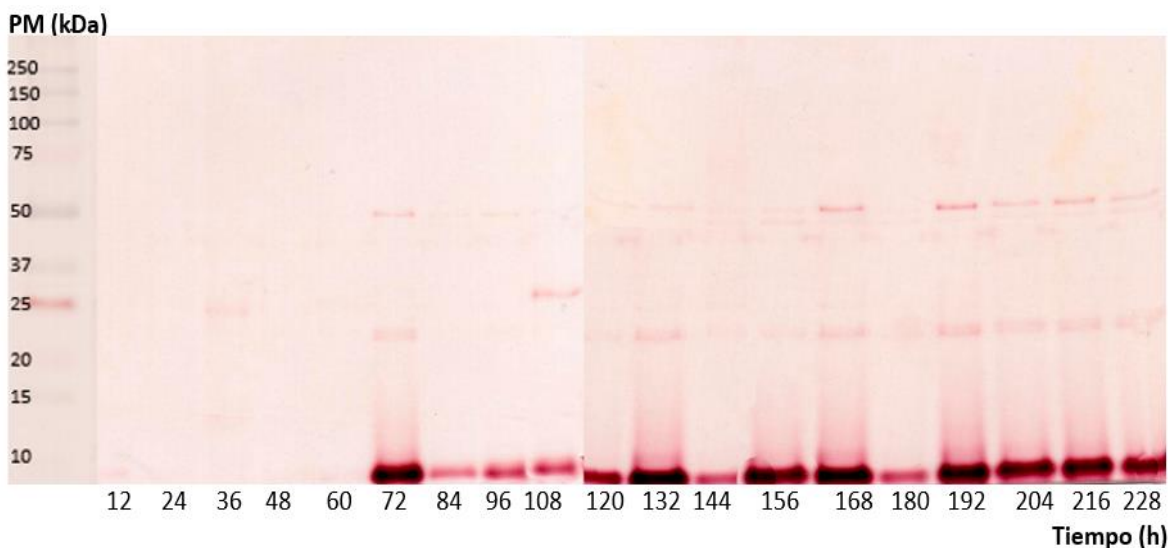
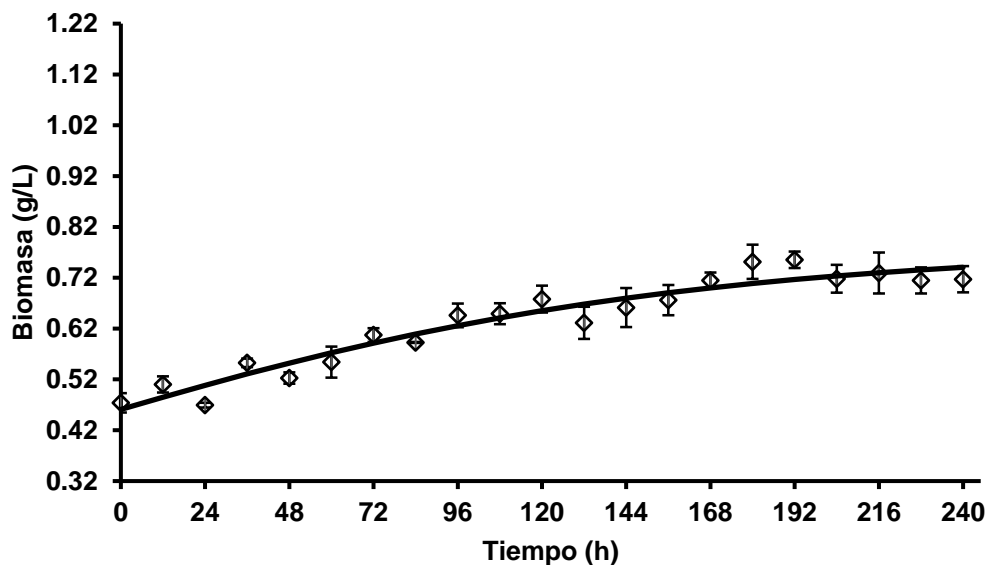


Figura 21. Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 6.5 en fermentación líquida.

## 9.4. Fermentación a pH 7.0

### 9.4.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento

La producción de biomasa ( $X$ ) de *F. culmorum* expresada en g/L, obtenida a lo largo de la fermentación a pH inicial de 7.0 se muestra en la *Figura 22*, se nota una escasa producción de biomasa en comparación con el resto de fermentaciones y un crecimiento exponencial que se diferencia poco de la fase estacionaria. El valor de  $\mu$  calculado para esta fermentación fue de  $0.01 \text{ h}^{-1}$  y el valor de  $X_{\text{max}}$  es de  $0.75 \text{ g/L}$  obtenida a las 192 h.



*Figura 22.* Producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

### 9.4.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases

En la *Figura 23* se muestra la actividad de esterases de *F. culmorum* obtenida a partir de una solución sustrato de paranitrofenil butirato (pNB) a lo largo de la fermentación a pH inicial de 7.0 expresada en U/L. En la figura se puede ver que existe actividad enzimática a lo largo de toda la fermentación, sin embargo ésta no supera las 150 U/L, llegando a un máximo de actividad ( $E_{\text{max}}$ ) de 139.3 U/L a las 120 h, y con ello se ha calculado el  $Y_{E/X}$  en  $181 \text{ UGx}^{-1}$ . Así mismo, el valor de productividad enzimática ( $P_{RO}$ ) se calculó en  $1.2 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p$ ) es de  $1.8 \text{ Uh}^{-1}\text{gX}^{-1}$ . En la *Figura 24* se muestra el comportamiento de la producción enzimática dada por unidad de biomasa donde se alcanza un máximo de  $208.4 \text{ UGx}^{-1}$  a las 72 h.



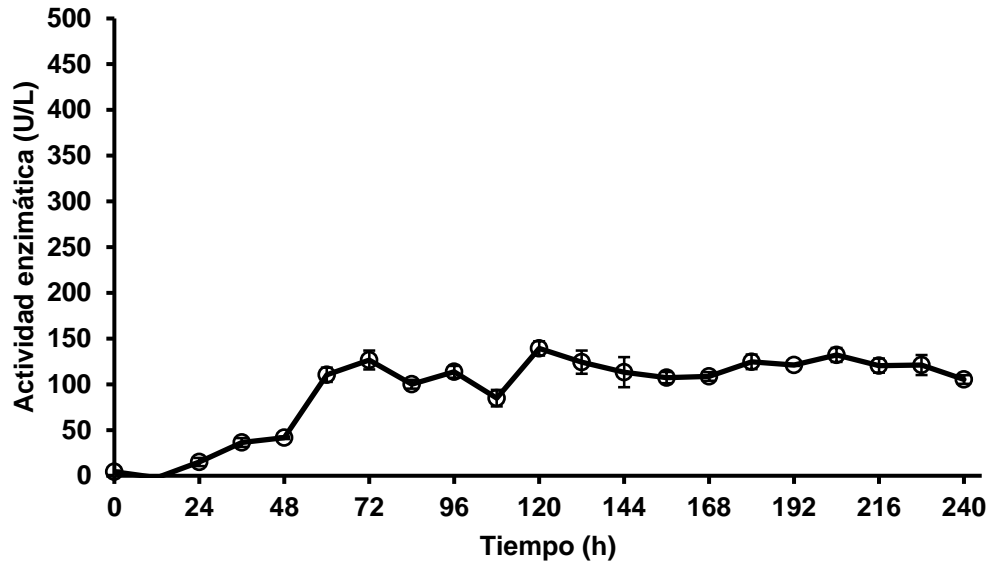


Figura 23. Actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

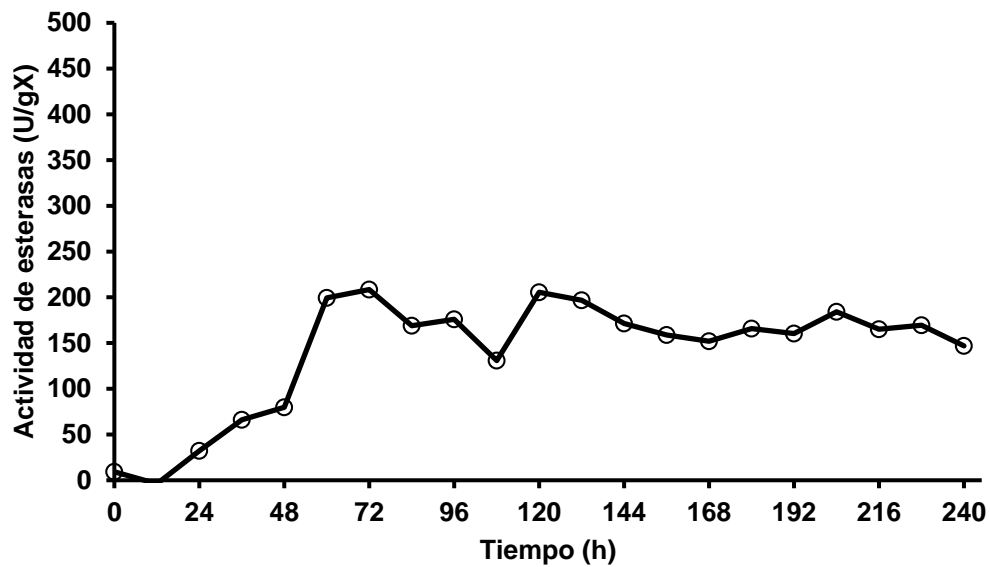


Figura 24. Rendimiento enzimático de *F. culmorum* con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida.

### 9.4.3. Perfil de pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo de la fermentación se muestran en la Figura 25, donde se aprecia que el SN se mantiene cercano al valor inicial, alcalinizándose ligeramente llegando a 7.4 en las últimas 24 h.

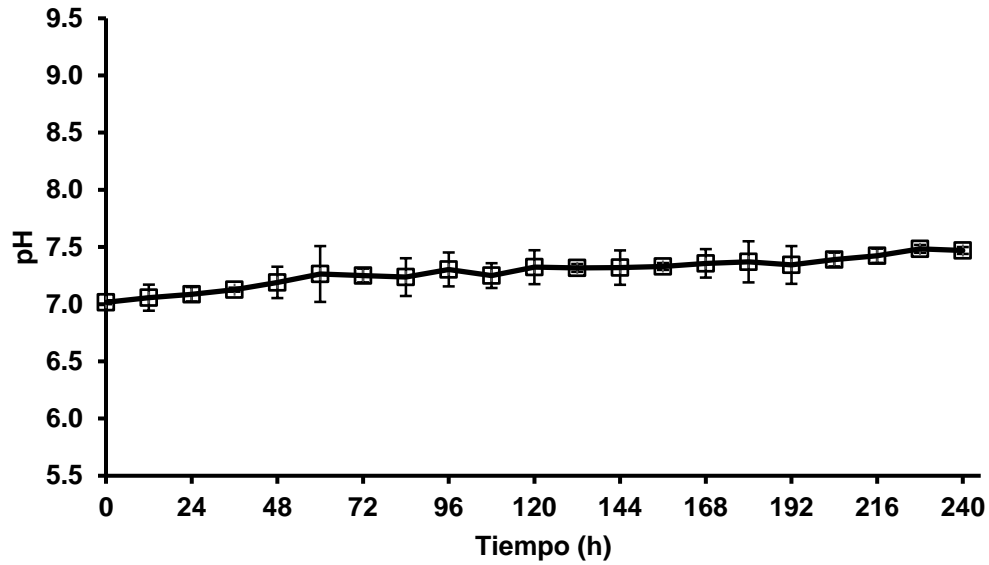


Figura 25. Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.4.4. Zimografía

En la Figura 26 se muestra la zimografía obtenida del SN de *F. culmorum* en el medio a pH inicial de 7.0. Se pueden observar dos isoenzimas: 10 kDa y 50 kDa aproximadamente. La primera aparece a partir de las 132 h hasta el final de la fermentación y la banda de 50 kDa aparece sólo el primer día de fermentación y posteriormente a partir de las 156 h.

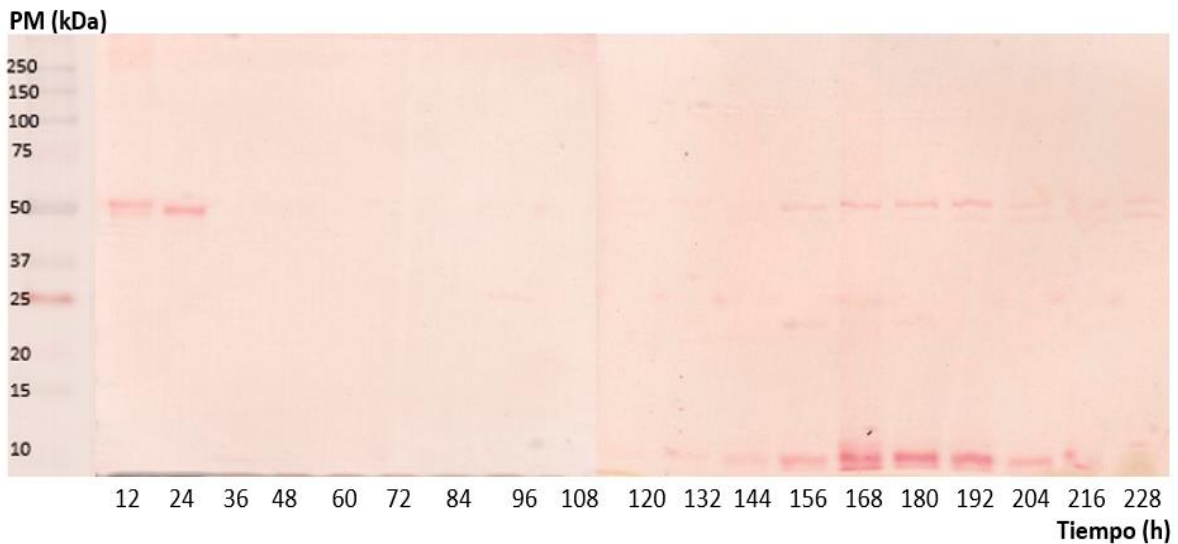
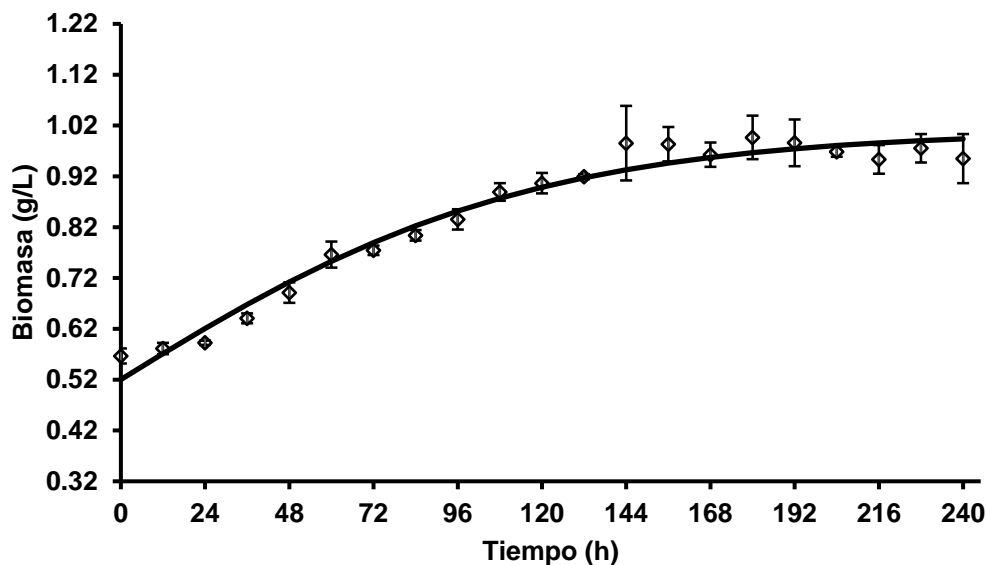


Figura 26. Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 7.0 en fermentación líquida.

## 9.5. Fermentación a pH 7.5

### 9.5.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento

La producción de biomasa ( $X$ ) de *F. culmorum* expresada en g/L, obtenida a lo largo de la fermentación a pH inicial de 7.5 se muestra en la *Figura 27*, en la que se aprecia el crecimiento exponencial de *F. culmorum* que inicia desde las 24 horas de fermentación y alcanza la fase estacionaria a las 144 h. El valor calculado de  $\mu$  en esta fermentación fue de  $0.016 \text{ h}^{-1}$  y el valor de  $X_{\text{max}}$  es de  $0.99 \text{ g/L}$  a las 180 h.



*Figura 27.* Producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

### 9.5.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases

En la *Figura 28* se muestra la actividad de esterases de *F. culmorum* obtenida a partir de una solución sustrato de paranitrofenil butirato (pNB) a lo largo de la fermentación a pH inicial de 7.5 expresada en U/L. En la figura se observa que existe actividad enzimática a lo largo de toda la fermentación, aumentando en el transcurso del tiempo, llegando a un máximo de actividad ( $E_{\text{max}}$ ) de  $293.6 \text{ U/L}$  a las 240 h, y con ello se ha calculado el  $Y_{E/X}$  en  $290.6 \text{ UGx}^{-1}$ . Así mismo, el valor de productividad enzimática ( $P_{RO}$ ) se calculó en  $1.2 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p$ ) es de  $4.6 \text{ Uh}^{-1}\text{gX}^{-1}$ . El rendimiento de la enzima respecto a la biomasa (E/X) registrado durante la fermentación se muestra en la *Figura 29* donde se aprecia que alcanza las  $293.6 \text{ UGx}^{-1}$  a las 240 h.

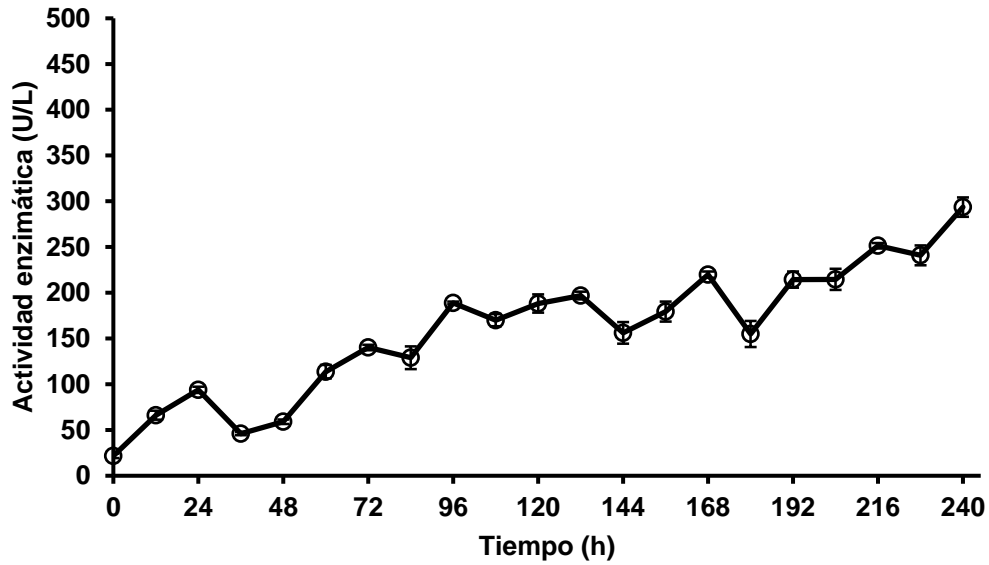


Figura 28. Actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

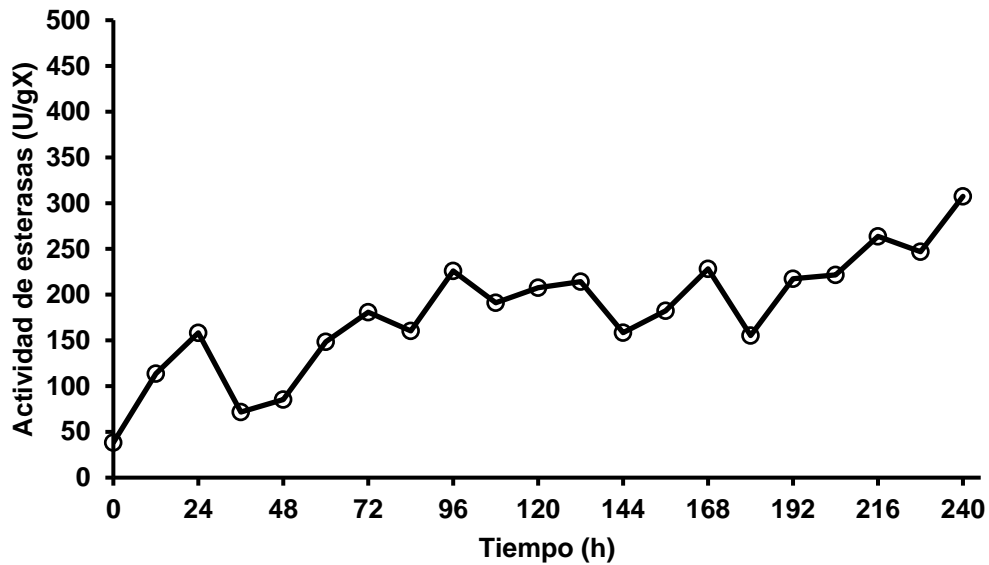


Figura 29. Rendimiento enzimático de *F. culmorum* con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida.

### 9.5.3. Perfil de pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo de la fermentación se muestran en la Figura 30, donde se aprecia que el pH del SN se mantiene cercano al valor inicial, aunque en algunos puntos se alcaliniza y llega a 8.0 entre las 120 y 156 h.

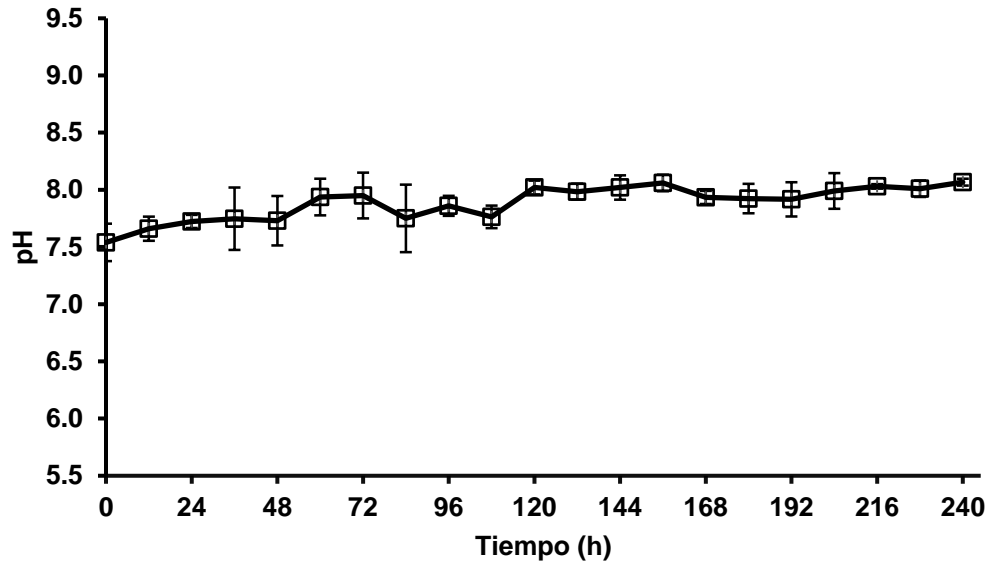


Figura 30. Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.5.4. Zimografía

En la *Figura 31* se presenta la zimografía obtenida del SN de *F. culmorum* en el medio a pH inicial de 7.5. Se puede observar la presencia de tres isoenzimas: 10 kDa, 25 kDa, y 50 kDa aproximadamente. La banda de mayor actividad fue de 10 kDa, la cual aparece desde las 60 h y se mantiene durante el resto de la fermentación. La banda de 25 kDa aparece desde las 144 h y hasta el final de la fermentación. Así mismo la banda de 50 kDa marcada levemente las primeras horas, se presenta a partir de las 72 h y se mantiene el resto de la fermentación.

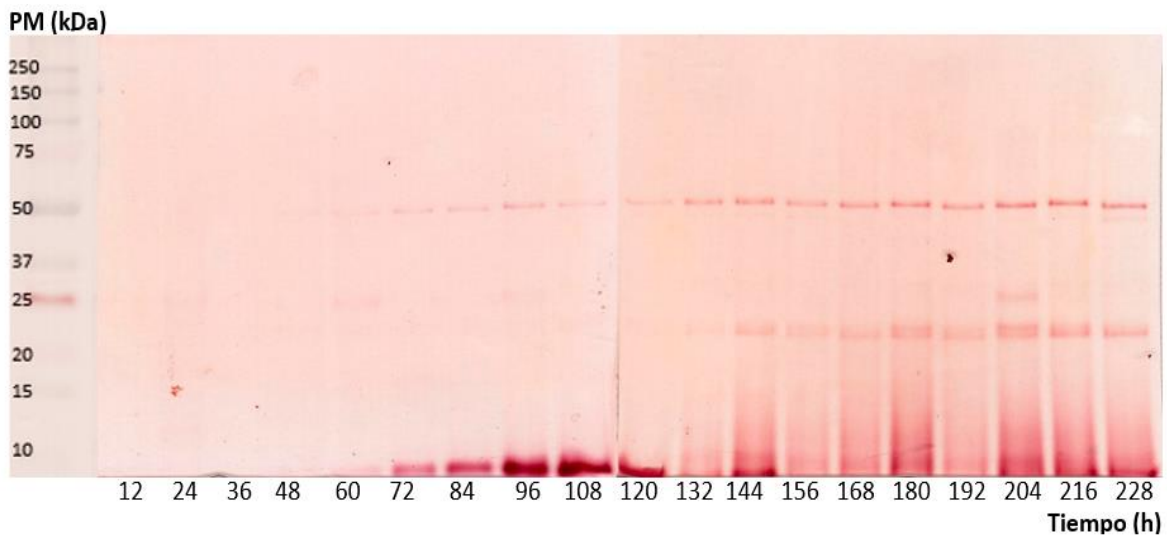
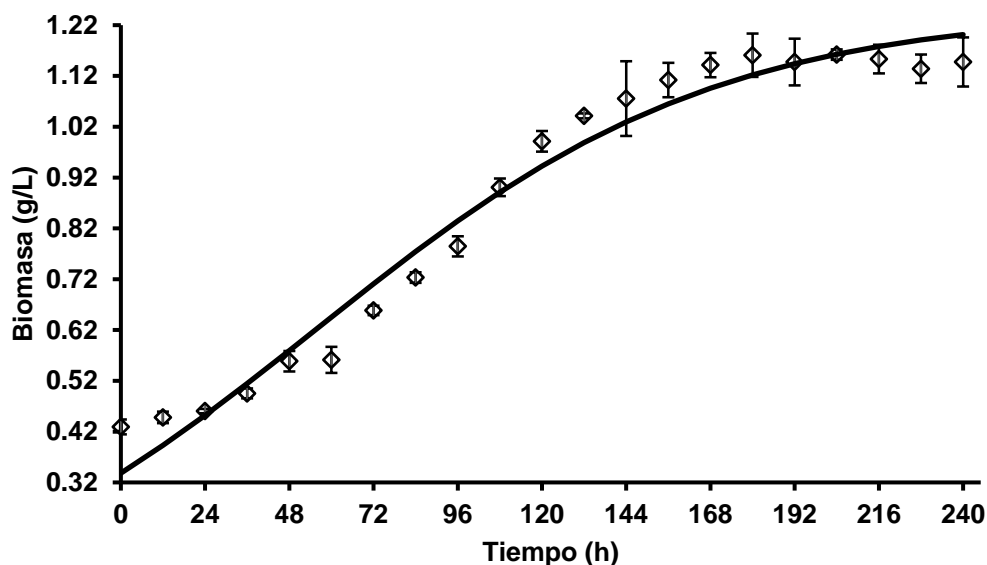


Figura 31. Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 7.5 en fermentación líquida.

## 9.6. Fermentación a pH 8.0

### 9.6.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento

La producción de biomasa ( $X$ ) de *F. culmorum* expresada en g/L, obtenida a lo largo de la fermentación a pH inicial de 8.0 se muestra en la *Figura 32*, en ella se aprecia el crecimiento exponencial de *F. culmorum* que inicia desde las 36 horas de fermentación y alcanza la fase estacionaria a las 180 h. El valor calculado de  $\mu$  fue de  $0.017 \text{ h}^{-1}$  y el de  $X_{\text{max}}$  de  $1.24 \text{ g/L}$  obtenido a las 180 h, valor máximo obtenido de entre todas las fermentaciones realizadas hasta el momento.



*Figura 32.* Producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

### 9.6.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases

En la *Figura 33* se muestra la actividad de esterases de *F. culmorum* obtenida a partir de una solución sustrato de paranitrofenil butirato (pNB) a lo largo de la fermentación a pH inicial de 8.0 expresada en U/L. En la figura se observa que existe actividad enzimática a lo largo de toda la fermentación, aumentando en el transcurso del tiempo, llegando a un máximo de actividad ( $E_{\text{max}}$ ) de  $332.8 \text{ U/L}$  a las 192 h, y con ello se ha calculado el  $Y_{E/X}$  en  $268.4 \text{ UGx}^{-1}$ . Así mismo, el valor de productividad enzimática ( $P_{RO}$ ) se calculó en  $1.7 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p$ ) es de  $4.6 \text{ Uh}^{-1}\text{gX}^{-1}$ . El rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ( $E/X$ ) registrado durante la fermentación se muestra en la *Figura 34* donde se destaca el alto rendimiento de enzima dentro de las primeras 100 horas de fermentación, alcanzando un máximo de  $390.2 \text{ UGx}^{-1}$  a las 96 h.

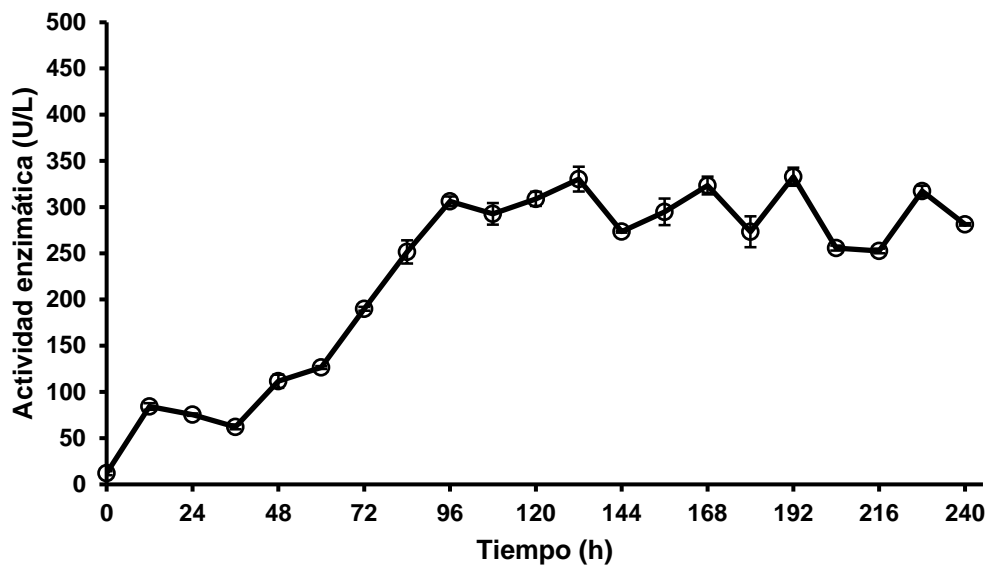


Figura 33. Actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

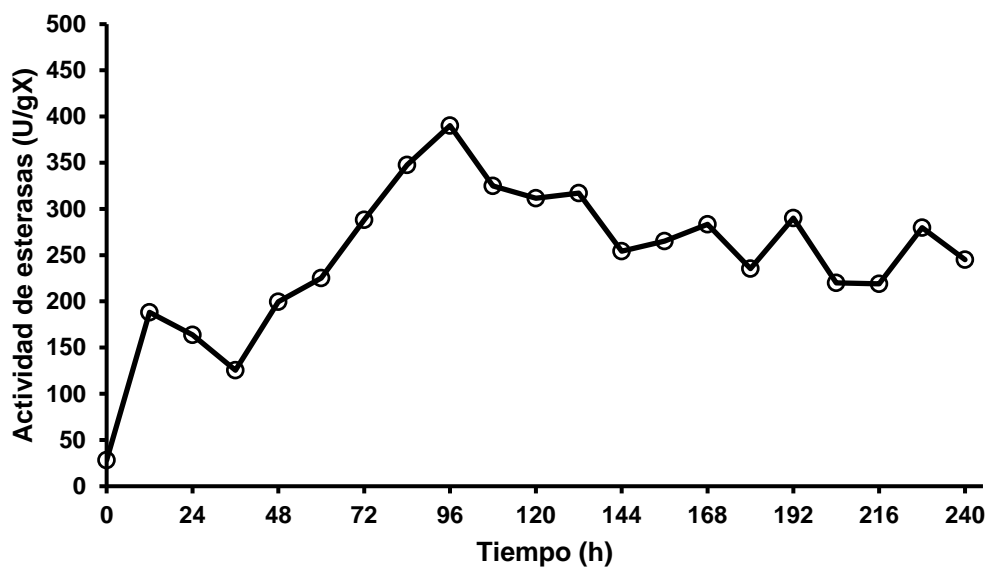


Figura 34. Rendimiento enzimático de *F. culmorum* con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida.

### 9.6.3. Perfil de pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo de la fermentación se muestran en la Figura 35, donde se aprecia que el SN se mantiene cercano al valor inicial.

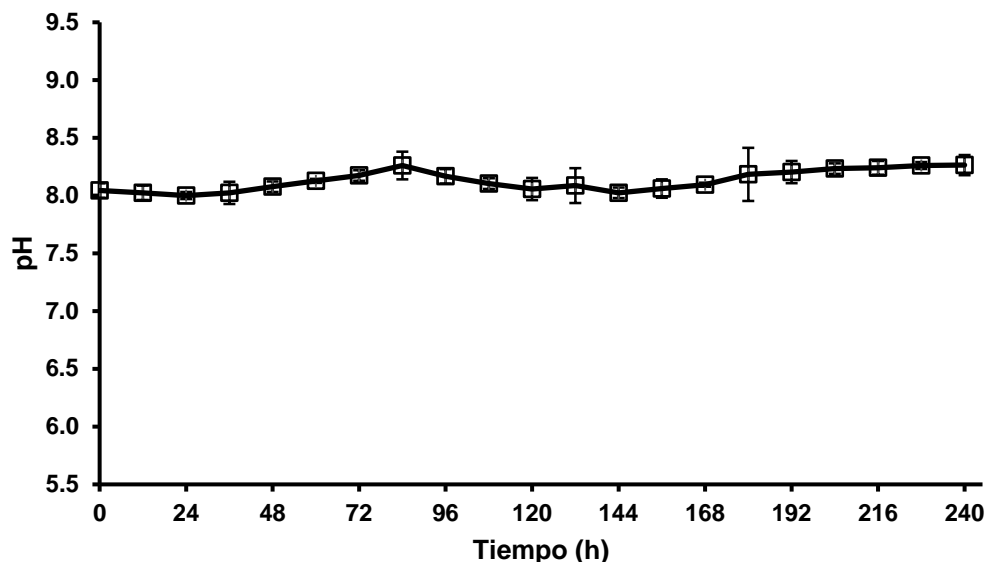


Figura 35. Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.6.4. Zimografía

En la *Figura 36* se presenta la zimografía obtenida del SN de *F. culmorum* en el medio a pH inicial de 8.0. Se observa la presencia de tres isoenzimas: 10 kDa, 25 kDa, y 50 kDa aproximadamente. La banda de mayor actividad fue de 10 kDa, la cual aparece desde las 36 h y se mantiene durante el resto de la fermentación. Por otra parte a 25 kDa se observa una tenue banda que aparece entre las 156 y 216 h. A 50 kDa se observa actividad que inicia desde las 72 h y se mantiene hasta el final de la fermentación.

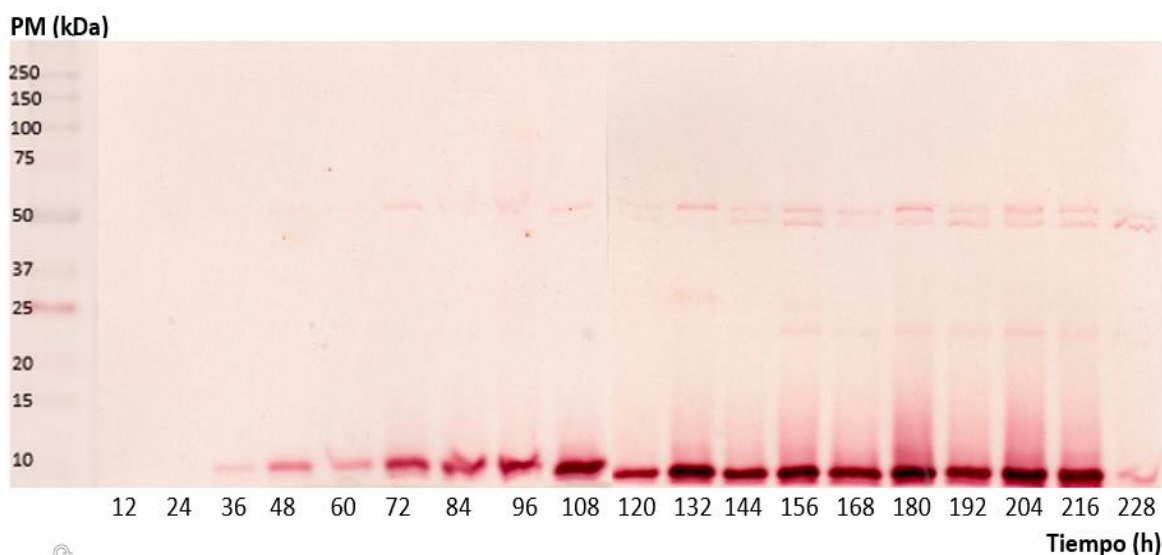


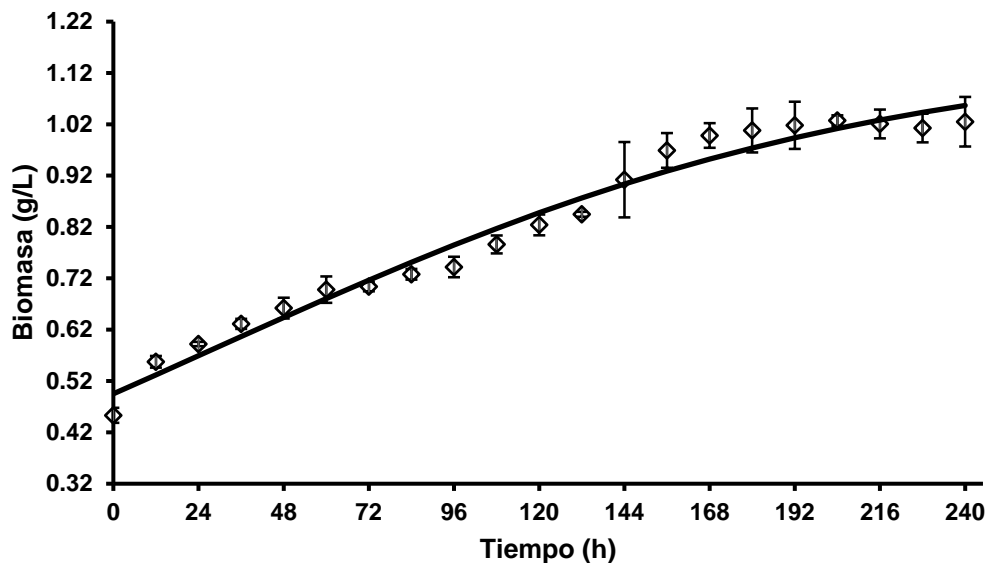
Figura 36. Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 8.0 en fermentación líquida.



## 9.7. Fermentación a pH 8.5

### 9.7.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento

La producción de biomasa ( $X$ ) de *F. culmorum* expresada en g/L, obtenida a lo largo de la fermentación a pH inicial de 8.5 se muestra en la *Figura 37*, en la cual se aprecia que el crecimiento exponencial de *F. culmorum* inicia desde las 12 horas de fermentación y alcanza la fase estacionaria a las 180 h. El valor de  $\mu$  en esta fermentación fue de  $0.01 \text{ h}^{-1}$  y el valor de  $X_{\text{max}}$  es de  $1.02 \text{ g/L}$  obtenida a las 204 horas.



*Figura 37.* Producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

### 9.7.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases

En la *Figura 38* se muestra la actividad de esterases de *F. culmorum* obtenida a partir de una solución sustrato de paranitrofenil butirato (pNB) a lo largo de la fermentación a pH inicial de 8.5 expresada en U/L. En la figura se aprecia actividad enzimática a lo largo de toda la fermentación, aumentando entre las 48 y 144 h, cuando ésta comienza a disminuir hacia el final de la fermentación, se obtuvo un máximo de actividad ( $E_{\text{max}}$ ) de  $216.2 \text{ U/L}$  a las 144 h, y con ello se ha calculado el  $Y_{E/X}$  en  $186.4 \text{ UGx}^{-1}$ . Así mismo, el valor de productividad enzimática ( $P_{RO}$ ) se calculó en  $1.5 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p$ ) es de  $1.9 \text{ Uh}^{-1}\text{gX}^{-1}$ . El rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ( $E/X$ ) registrado durante la fermentación se muestra en la *Figura 39* el rendimiento de enzima dentro de las primeras 140 h de fermentación alcanzando un máximo de  $251.3 \text{ UGx}^{-1}$  a las 132 h.

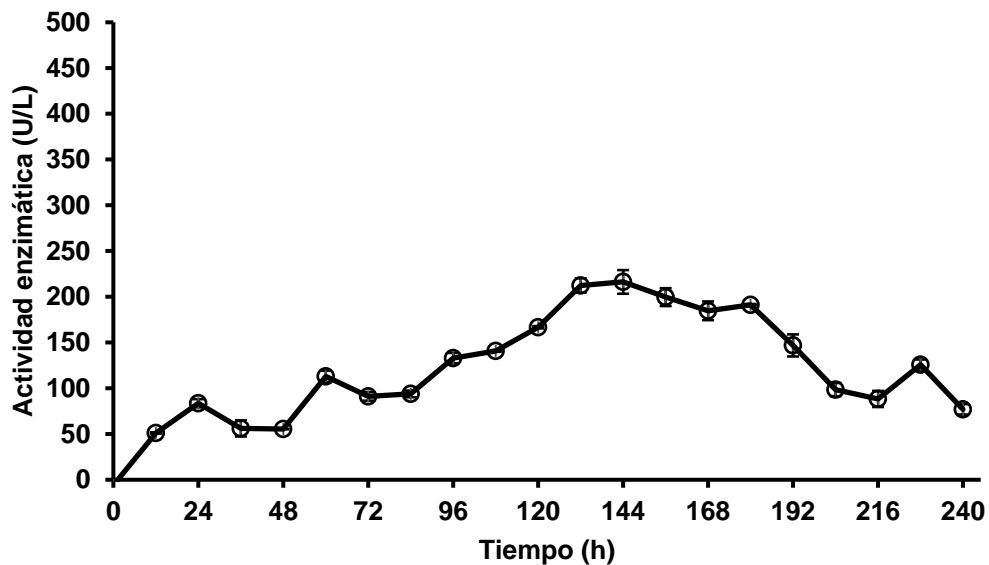


Figura 38. Actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

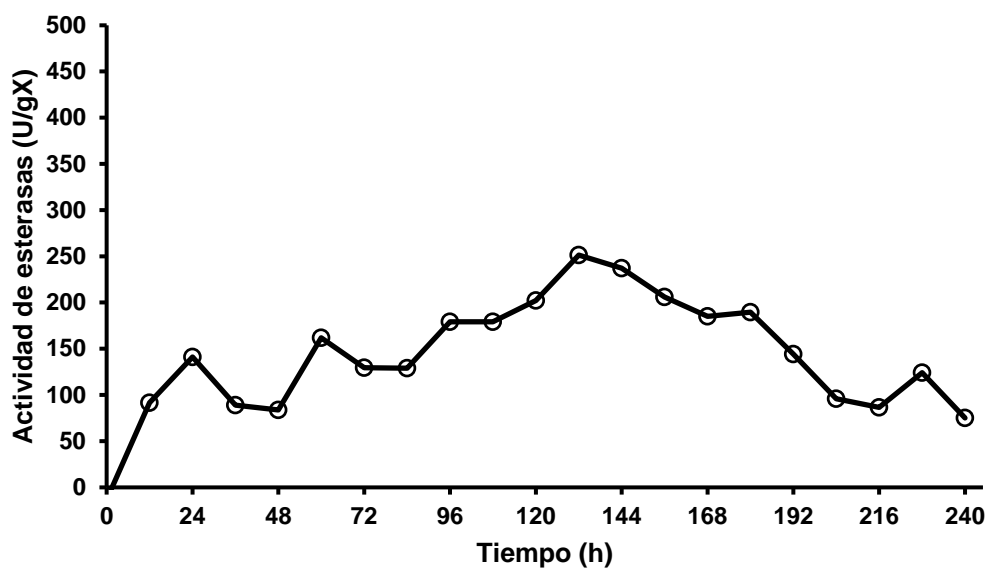


Figura 39. Rendimiento enzimático de *F. culmorum* con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida.

### 9.7.3. Perfil de pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo de la fermentación se muestran en la Figura 40, donde se puede apreciar que el SN se mantiene cercano al valor inicial, aunque varía ligeramente llegando a 8.6 a las 108 h y a 8.3 a las 180 h.

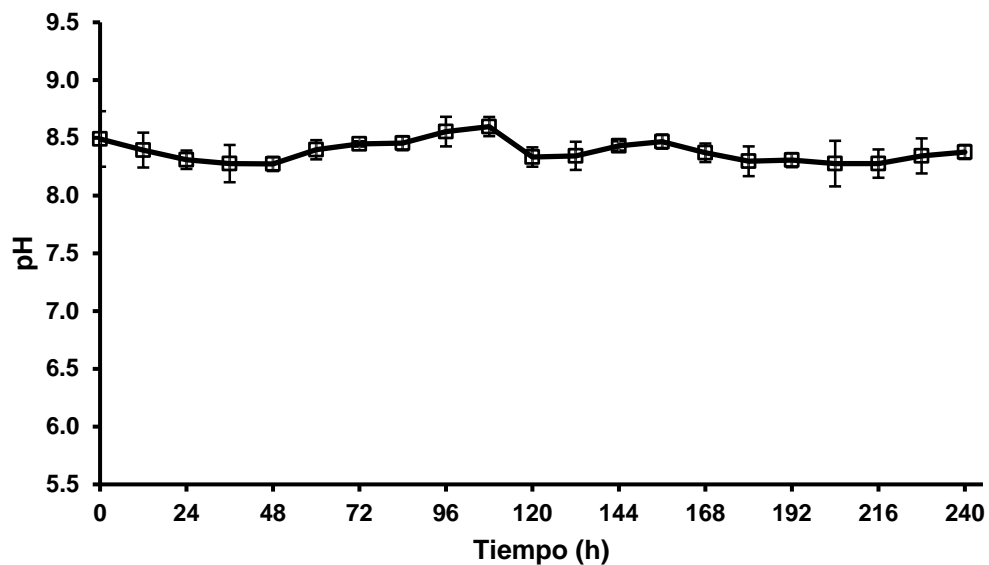


Figura 40. Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.7.4. Zimografía

En la *Figura 41* se presenta la zimografía obtenida del SN de *F. culmorum* en el medio a pH inicial de 8.5. Se observa la presencia de dos isoenzimas: 25 kDa, y 50 kDa aproximadamente. La banda de 25 kDa, aparece muy tenue a las 12 h y a partir de las 108 h. A 50 kDa la banda se aprecia desde las 108 h y se mantiene durante el resto de la fermentación.

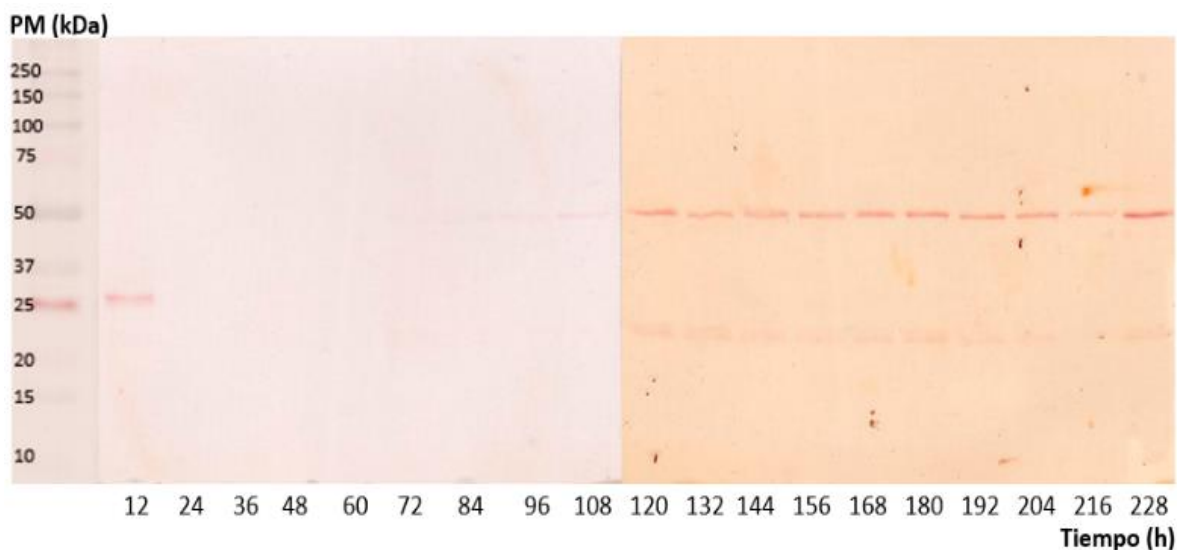
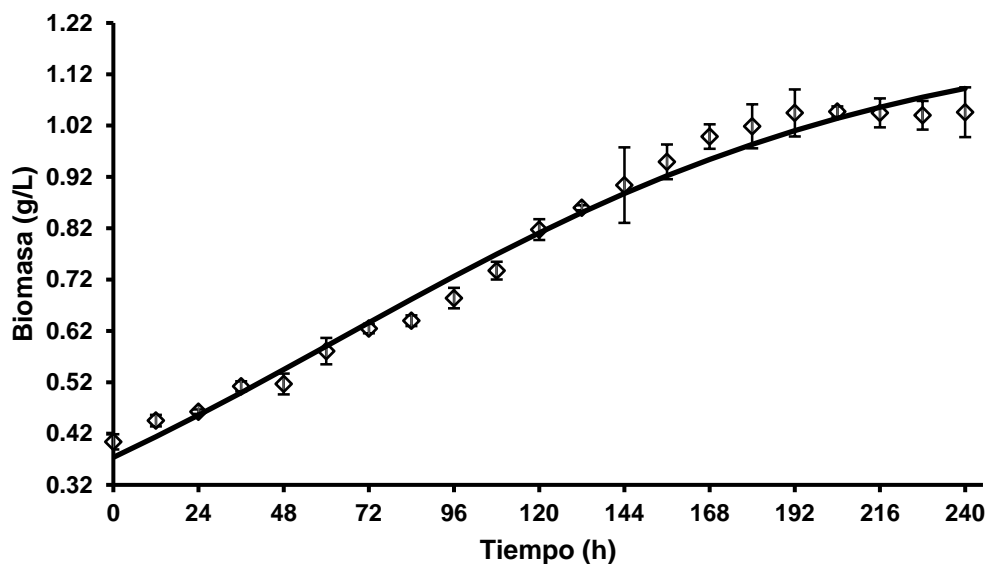


Figura 41. Perfil zimográfico obtenido de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 8.5 en fermentación líquida.

## 9.8. Fermentación a pH 9.0

### 9.8.1. Biomasa y parámetros cinéticos de crecimiento

La producción de biomasa ( $X$ ) de *F. culmorum* expresada en g/L, obtenida a lo largo de la fermentación a pH inicial de 9.0 se muestra en la *Figura 42*, en la cual se nota el crecimiento exponencial de *F. culmorum* desde las 12 horas de fermentación y alcanza la fase estacionaria a las 192 h. El valor de  $\mu$  en esta fermentación fue de  $0.012 \text{ h}^{-1}$  y el valor de  $X_{\text{max}}$  es de 1.05 g/L obtenida a las 204 horas.



*Figura 42.* Producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

### 9.8.2. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de producción de esterases

En la *Figura 43* se muestra la actividad de esterases de *F. culmorum* obtenida a partir de una solución sustrato de paranitrofenil butirato (pNB) a lo largo de la fermentación a pH inicial de 9.0 expresada en U/L. En ella se puede ver que hay actividad enzimática a lo largo de toda la fermentación, aumentando entre las 96 y 192 h, cuando ésta comienza a disminuir hacia el final de la fermentación, se obtuvo un máximo de actividad ( $E_{\text{max}}$ ) de 205.1 U/L a las 192 h, y con ello se ha calculado el  $Y_{E/X}$  en  $169.5 \text{ UGx}^{-1}$ . Así mismo, el valor de productividad enzimática ( $P_{RO}$ ) se calculó en  $1.1 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$  y la tasa específica de formación de la enzima ( $q_p$ ) es de  $2.0 \text{ Uh}^{-1}\text{gX}^{-1}$ . El rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ( $E/X$ ) registrado durante la fermentación se muestra en la *Figura 44* donde se destaca el alto rendimiento de enzima dentro de las primeras horas de fermentación, alcanzando un máximo de  $212.5 \text{ UGx}^{-1}$  a las 24 h.

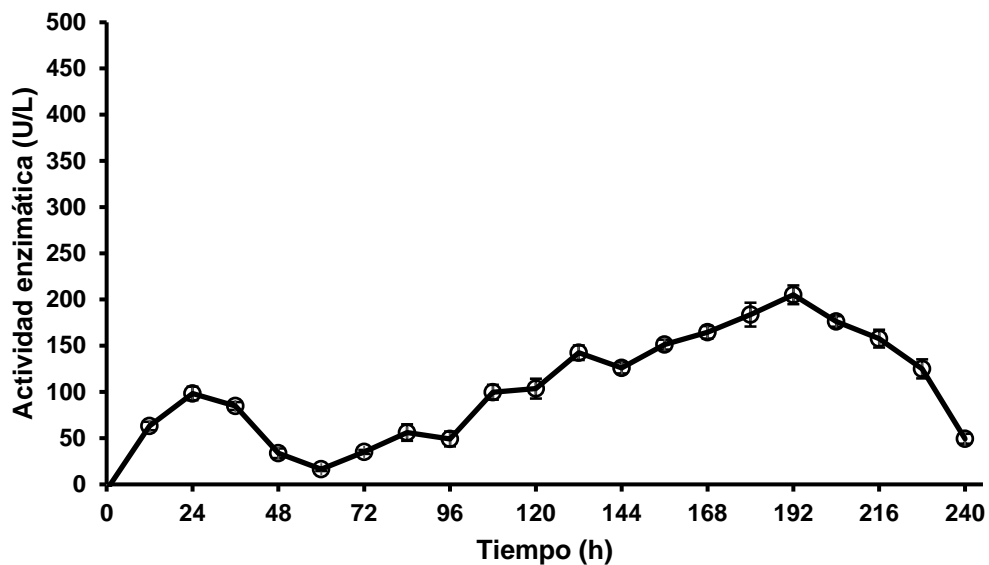


Figura 43. Actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

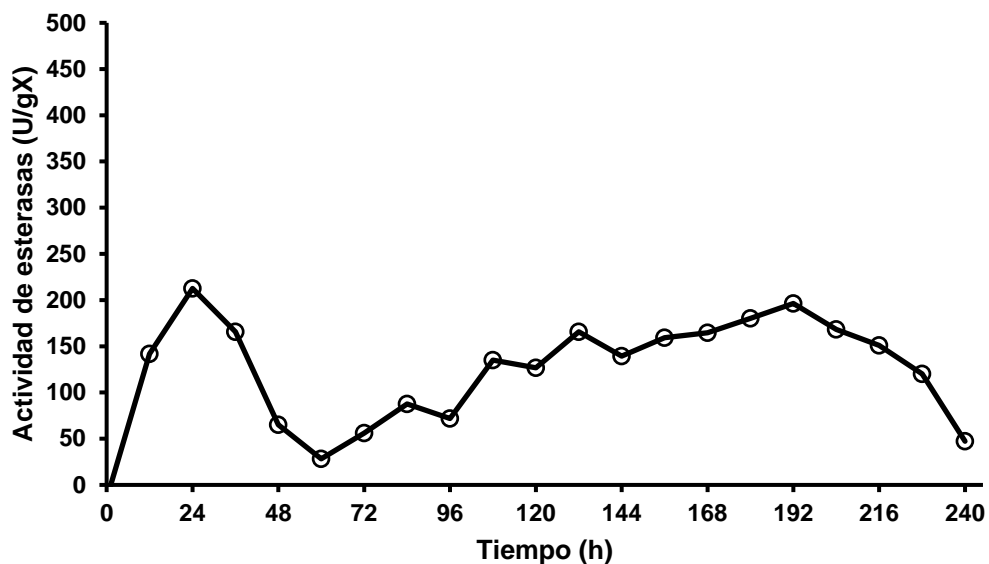


Figura 44. Rendimiento enzimático de *F. culmorum* con respecto a la biomasa en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida.

### 9.8.3. Perfil de pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo de la fermentación se muestran en la Figura 45, donde se aprecia que el SN se mantiene cercano al valor inicial, variando ligeramente llegando a 9.4 a las 180 h.

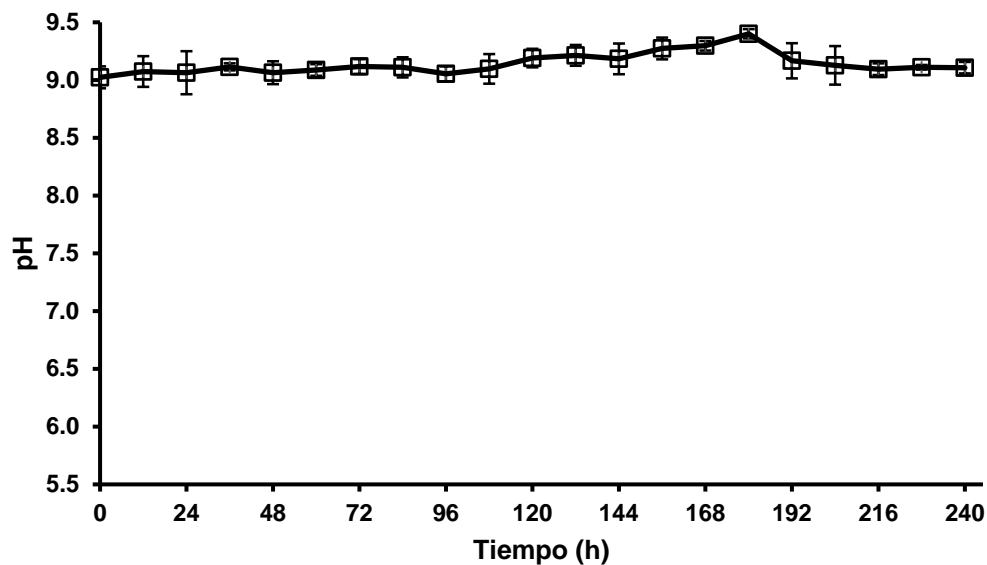


Figura 45. Perfil de pH obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida. Las barras de error son el EEM de muestreos por triplicado.

#### 9.8.4. Zimografía

En la Figura 46 se presenta la zimografía obtenida del SN de *F. culmorum* en el medio a pH inicial de 9.0. Se observa la presencia de dos isoenzimas: 25 kDa y 50 kDa aproximadamente. El primero presenta un ligero bandeo desde las 120 y hasta las 150 h. A 50 kDa el bandeo aparece desde las 48 h y se mantiene durante el resto de la fermentación.

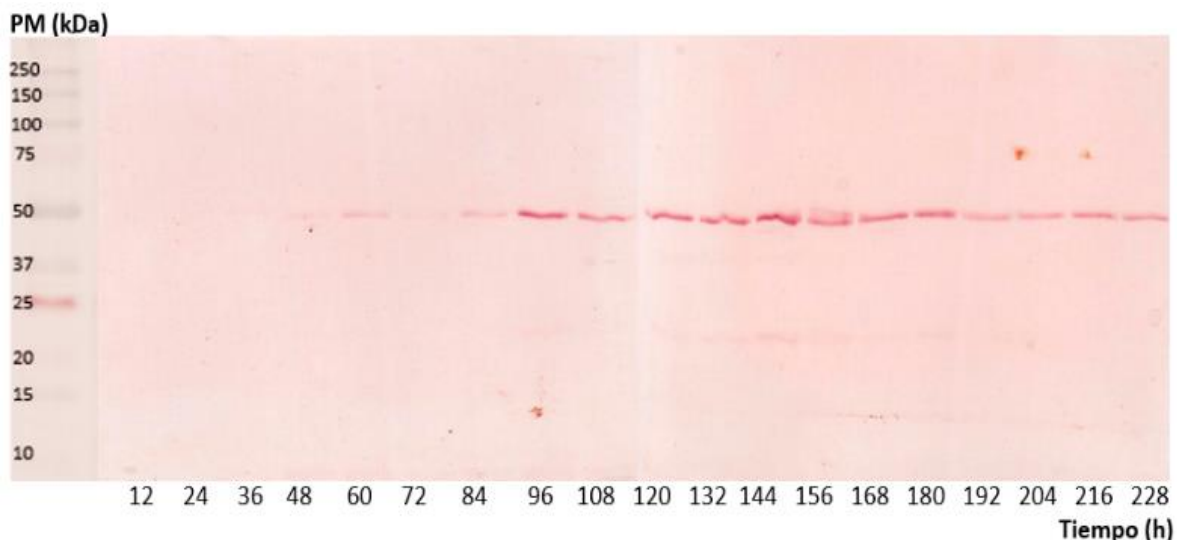
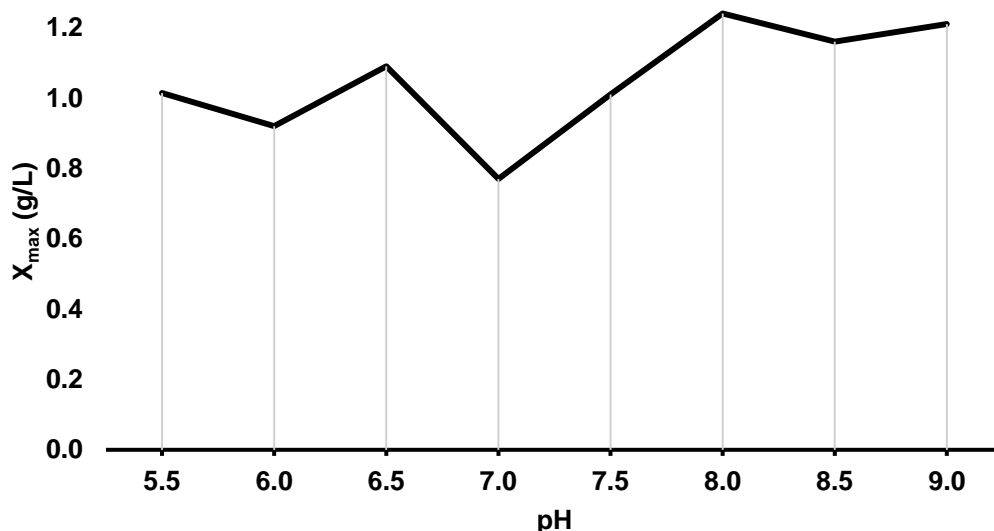


Figura 46. Perfil zimográfico obtenido a lo largo de la fermentación de *F. culmorum* en presencia de DEHF a pH inicial de 9.0 en fermentación líquida.

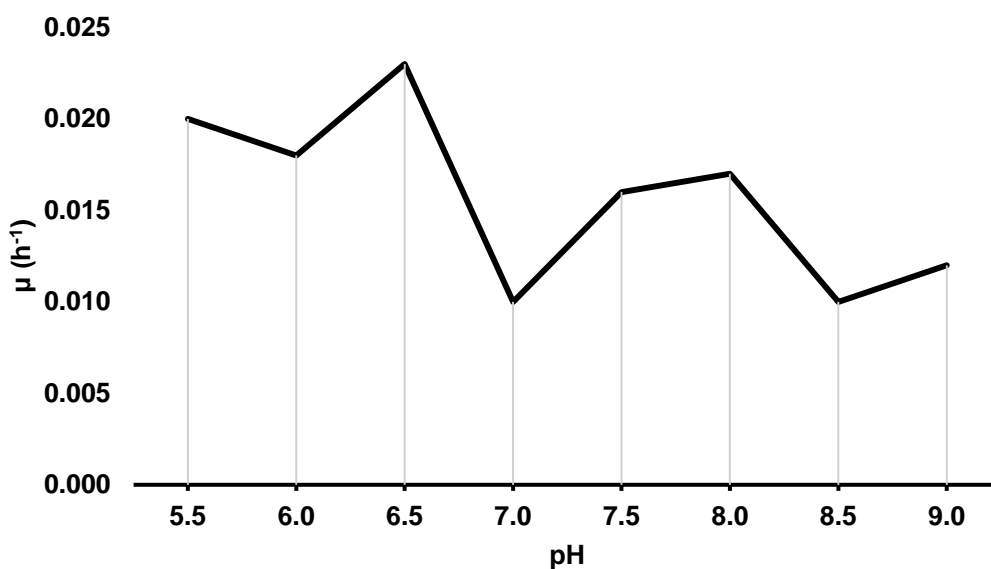
### 9.9. Parámetros cinéticos de crecimiento

Los valores de la biomasa máxima ( $X_{max}$ ) obtenida en cada una de las fermentaciones se muestran gráficamente en la *Figura 47* y se comparan en la *Tabla 1*. Se destaca una mayor producción de biomasa hacia valores de pH alcalinos donde se alcanza el valor máximo (8.0). Por otra parte, pH neutro se registró la menor producción de biomasa.



*Figura 47.* Biomasa máxima registrada en cada una de las fermentaciones.

La tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) obtenida para cada una de las fermentaciones se muestra gráficamente en la *Figura 48* y se comparan en la *Tabla 1*. Los datos obtenidos a valores de pH ácidos son superiores a los registrados a valores alcalinos. Nuevamente, el valor mínimo se obtuvo a pH 7.0



*Figura 48.* Tasa de crecimiento específica registrada en cada una de las fermentaciones.

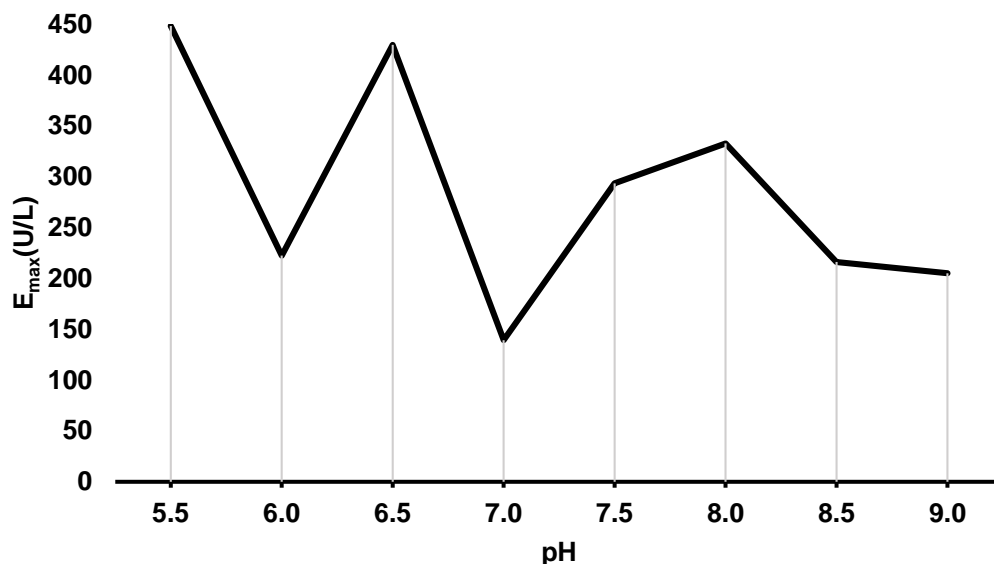
Tabla 1. Parámetros cinéticos de crecimiento y producción de esterases de *F. culmorum* en presencia de DEHF en fermentación líquida. Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra (a, b, c, d) son significativamente diferentes.

Parámetro	pH							
	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.02 <sup>a</sup> (0.002)	0.018 <sup>a</sup> (0.001)	0.023 <sup>a</sup> (0.001)	0.01 <sup>b</sup> (0.001)	0.016 <sup>b</sup> (0.001)	0.017 <sup>a</sup> (0.001)	0.01 <sup>b</sup> (0.001)	0.012 <sup>b</sup> (0.001)
$X_{max}$ (g/L)	1.014 <sup>b</sup> (0.002)	0.92 <sup>c</sup> (0.001)	1.09 <sup>a</sup> (0.002)	0.77 <sup>c</sup> (0.001)	1.01 <sup>b</sup> (0.001)	1.24 <sup>a</sup> (0.002)	1.16 <sup>a</sup> (0.001)	1.21 <sup>a</sup> (0.001)
$E_{max}$ (U/L)	448.4 <sup>a</sup> (49)	222.5 <sup>c</sup> (35)	429.8 <sup>a</sup> (45)	139.3 <sup>d</sup> (22)	293.5 <sup>b</sup> (37)	332.8 <sup>b</sup> (38)	216.2 <sup>c</sup> (25)	205.1 <sup>c</sup> (24)
$Y_{E/X}$ (U Gx <sup>-1</sup> )	444 <sup>a</sup> (68)	241.8 <sup>b</sup> (32)	394.3 <sup>a</sup> (41)	181 <sup>c</sup> (21)	290.6 <sup>b</sup> (34)	268.4 <sup>b</sup> (33)	186.4 <sup>c</sup> (23)	169.5 <sup>c</sup> (18)
$P_{RO}$ (UL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2.2 <sup>a</sup> (0.002)	1 <sup>c</sup> (0.001)	1.9 <sup>a</sup> (0.001)	1.2 <sup>c</sup> (0.002)	1.2 <sup>c</sup> (0.001)	1.7 <sup>b</sup> (0.002)	1.5 <sup>b</sup> (0.001)	1.1 <sup>c</sup> (0.001)
$q_p$ (U h <sup>-1</sup> gX <sup>-1</sup> )	8.9 <sup>a</sup> (0.006)	4.4 <sup>b</sup> (0.004)	9.1 <sup>a</sup> (0.006)	1.8 <sup>c</sup> (0.002)	4.6 <sup>b</sup> (0.003)	4.6 <sup>b</sup> (0.003)	1.9 <sup>c</sup> (0.001)	2 <sup>c</sup> (0.001)



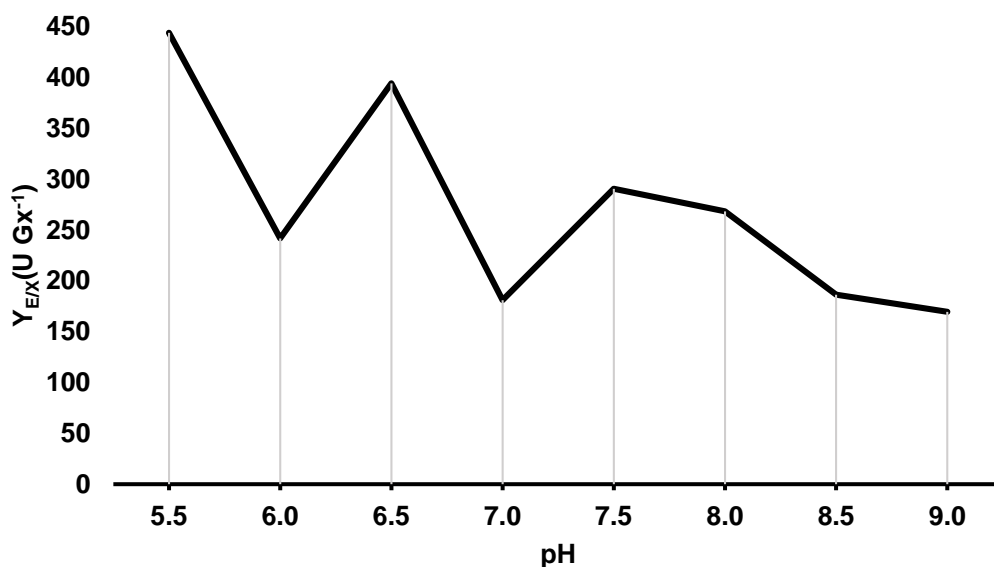
### 8.1. Parámetros cinéticos de actividad de esterasas

Los valores máximos de enzima ( $E_{max}$ ) obtenidos en cada una de las fermentaciones se muestran gráficamente en la *Figura 49* y se comparan en la *Tabla 1*. A pH 5.5 y 6.5 se obtuvieron los valores máximos de este parámetro, y a 7.0 el valor mínimo.



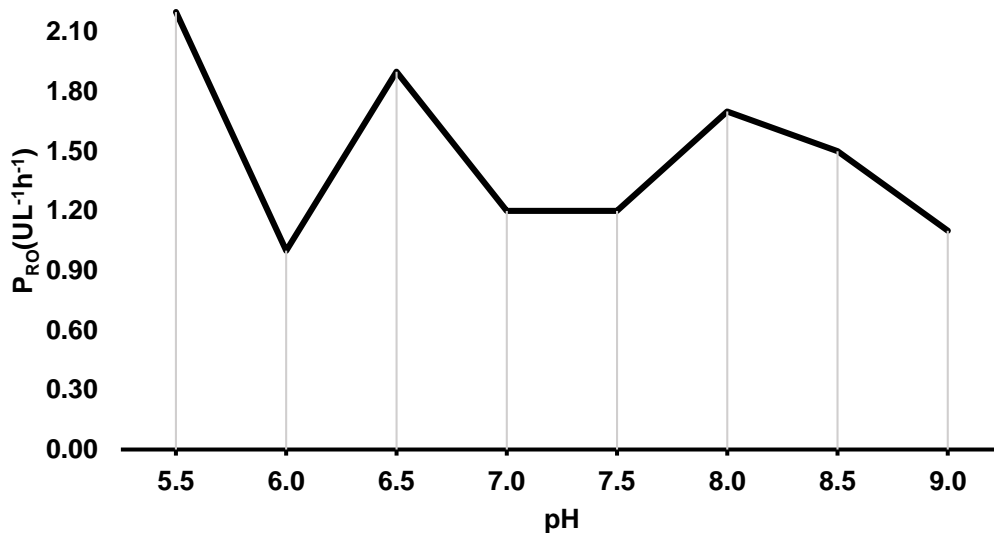
*Figura 49.* Actividad enzimática máxima registrada en cada una de las fermentaciones.

Los datos calculados de rendimiento enzimático ( $Y_{E/X}$ ) a partir de la actividad máxima de esterasas de cada fermentación se muestran en la *Figura 5* y se comparan en la *Tabla 1*. Se observa una coincidencia con la figura obtenida a partir de la  $E_{max}$ ; donde los valores máximos son 5.5 y 6.5, sin embargo, los valores mínimos de rendimiento enzimático son 7.0, 8.5 y 9.0.



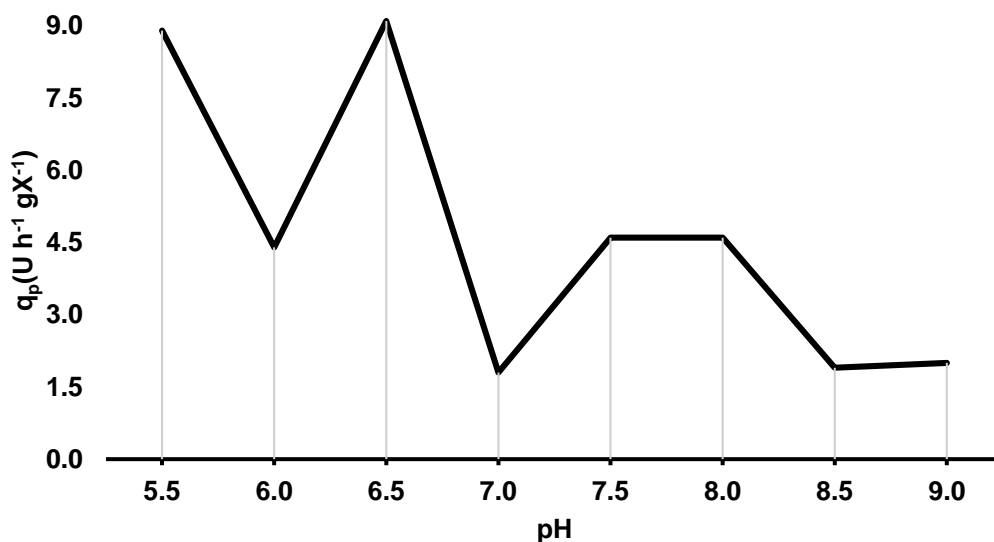
*Figura 50.* Rendimiento enzimático máximo registrado en cada una de las fermentaciones.

La productividad enzimática ( $P_{RO}$ ), obtenida a partir de los valores máximos de actividad enzimática y biomasa registrados en cada fermentación, se muestran gráficamente en la *Figura 51* y se comparan estadísticamente en la *Tabla 1*. Los valores máximos en este parámetro se obtuvieron a pH 5.5, 6.5 y 8.0. Los mínimos, 6.0, 7.0, 7.5 y 9.0.



*Figura 51.* Productividad enzimática máxima registrada en cada una de las fermentaciones.

La tasa específica de formación de enzima calculada para cada fermentación se muestra gráficamente en la *Figura 52*, los datos se comparan en la *Tabla 1*. En la figura se observa que los valores más altos corresponden a las fermentaciones llevadas a cabo a pH 5.5 y 6.5, mientras que los valores mínimos se obtuvieron a pH 7.0, 8.5 y 9.0.



*Figura 52.* Tasa específica de formación de enzima registrada en cada una de las fermentaciones.

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La producción de biomasa presentó un comportamiento marcado de acuerdo al pH inicial de la fermentación. Las curvas de crecimiento obtenidas en las fermentaciones a pH 5.5, 6.0, 6.5 y 7.0 se caracterizaron por una fase exponencial corta, seguida de una marcada fase estacionaria, la cual comienza entre las 132 y 144 h. Ahuactzin-Pérez *et al.* (2016) reportó fermentaciones ajustadas a pH inicial de 6.5 donde obtuvo curvas de crecimiento de comportamiento similar: una fase estacionaria que inicia entre las 120 y 132 h. Si bien, la biomasa producida es inferior en este caso, la coincidencia nos indica que el ciclo vital del hongo presenta el mismo comportamiento pese a que el medio no esté enriquecido con una fuente alternativa de carbono, como en el caso de la investigación citada. Las fermentaciones a pH alcalino: 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0, por su parte, mostraron una fase exponencial prolongada, aquí, se obtuvo el registro máximo de biomasa (pH 8.0). La fase estacionaria, más corta que el resto de las fermentaciones, comenzó entre las 168 y 180 h. Los valores de pH óptimos registrados para el crecimiento de *F. culmorum* coinciden a valores inferiores a 7.0, sin embargo, Frans *et al.* (2017) reconocen que algunas cepas de *Fusarium* no se ven afectadas en el crecimiento, a pH alcalino.

En general, la actividad y el rendimiento enzimático en las fermentaciones pH ácido (5.5, 6.0 y 6.5) y a 7.5, mostraron una tendencia ascendente hacia el final de la fermentación. A pH 7.0, 8.0, 8.5 y 9.0, por otro lado, se observó un aumento en las primeras horas, llegando a un punto máximo a partir del cual disminuyen los valores de actividad. Se considera que la producción de biomasa, dependió totalmente de la actividad enzimática de *F. culmorum*. Las isoformas; moléculas que, aunque difieren en propiedades como el peso molecular, cumplen con la funcionalidad de una esterasa, son visibles a través de los zimogramas. En ellos, se puede observar la presencia de una isoforma que se mantuvo constante en todas las fermentaciones, con un peso aproximado de 50 kDa (*Tabla 2*). Luo *et al.* (2012) reporta la presencia de una esterasa de 47 kDa aproximadamente durante la degradación de dimetil tereftalato a través de *Fusarium* sp. Ferrer-Parra *et al.* (2018), al caracterizar las esterases obtenidas de *F. culmorum* en altas concentraciones de DEHF, hace mención de una esterasa del mismo peso molecular aproximado. En ambas investigaciones se relaciona a esta enzima con la degradación de ftalatos. Así mismo, se obtuvo una mayor cantidad de isoformas a pH 5.5 y 6.5; si se considera que ellas son indicadores de actividad enzimática, se podría justificar la elevada producción de biomasa obtenida en ambas fermentaciones. Estos resultados coinciden con los datos graficados en las *Figuras 8, 9, 18 y 19* que corresponden a la actividad enzimática y a la producción de enzima por unidad de biomasa de las fermentaciones llevadas a cabo a pH 5.5 y 6.5, las cuales muestran gráficamente una superioridad respecto al resto de las fermentaciones. Así mismo, a 5.5 y 6.5 se obtuvieron los valores máximos de enzima ( $E_{max}$ ), de rendimiento teórico de la enzima respecto a la biomasa ( $Y_{E/X}$ ), de

Tabla 2. Isoformas de las enzimas presentadas en cada una de las fermentaciones.

pH	kDa			
	10	25	37	50
5.5	X	X	X	X
6		X	X	X
6.5	X	X	X	X
7	X			X
7.5	X	X		X
8	X	X		X
8.5		X		X
9		X		X

productividad máxima de actividad de enzimas ( $P_{RO}$ ) y de tasa específica de formación de enzima ( $q_p$ ). En todos los casos, el análisis estadístico ANOVA muestra, con un 95% de confianza, que son estadísticamente semejantes entre sí y significativamente distintos al resto de las fermentaciones (Tabla 1). Estos resultados confirman los obtenidos por Colla *et al.*, (2015) quienes determinaron que existe una mayor estabilidad de enzimas, que se traduce en una óptima actividad, en fermentación líquida a pH ácido. De la misma manera, las fermentaciones con los valores mínimos de actividad enzimática en U/L así como de rendimiento enzimático ( $Y_{E/X}$ ) (Figuras 23, 24, 38, 39, 43 y 44) coinciden con las fermentaciones donde se expresó la mínima cantidad de isoenzimas, siendo éstas las que se llevaron a cabo a pH 7.0, 8.5 y 9.0. La fermentación a pH 7.0 presentó además los valores mínimos de  $E_{max}$  y  $q_p$ , y a pH 9.0 se registró el valor mínimo de  $P_{RO}$ . Se debe destacar que en la fermentación a pH 8.0 el rendimiento obtenido fue superior a todas las fermentaciones, aunque sólo dentro de las primeras 100 h (Figura 34), la importancia de este dato radica en la investigación llevada a cabo por Ahuactzin-Pérez *et al.*, (2016), donde lograron cuantificar la cantidad de DEHF consumida por *F. culmorum* y encontraron que dentro de las primeras 60 h *F. culmorum* hubo consumido el 95% del plastificante. Por otra parte Luo *et al.*, (2015) determinaron a través de fermentación líquida que el pH óptimo para la producción de esterases de *Fusarium* sp. en presencia de plastificantes es de 8.0, estas fermentaciones tenían una duración de cerca de 60 h. Respecto a la producción de biomasa, de manera gráfica se observa en la Figura 32 que en la fermentación a pH 8.0 se alcanza una  $X_{max}$  de 1.24 g/L superior al resto de fermentaciones, esta alta producción puede ser resultado del alto rendimiento enzimático durante las primeras horas de fermentación referida anteriormente. Si bien la fermentación a pH 8.0 registró la biomasa máxima no es así con la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) calculada para esta fermentación en  $0.017 \text{ h}^{-1}$  la cual resulta inferior a la obtenida a pH 5.5 y 6.5 ( $0.020$  y  $0.023 \text{ h}^{-1}$  respectivamente). Sin embargo, tras el análisis estadístico (ANOVA) se puede afirmar con el 95% de confianza que la  $\mu$  obtenida a pH 5.5, 6.0, 6.5 y 8.0 son significativamente superiores al resto (Tabla 1). Todo lo anterior refuerza el supuesto de que la actividad enzimática de *F. culmorum*

determina su crecimiento cuando el DEHF es la única fuente de carbono y que la actividad enzimática a su vez está dada por el pH inicial del medio líquido donde se lleva a cabo la fermentación. Por último, los valores pH se mantuvieron constantes en las fermentaciones a pH inicial de 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0, aquellas donde el pH inicial es inferior a 7.0 mostraban una tendencia a la neutralidad. Fávero y colaboradores (2013) reportan una estabilidad enzimática de esterasas a pH alcalino lo que podría influir en un efecto amortiguador que impide el cambio elevado de pH en valores superiores a 7.0.

## 10. CONCLUSIONES

El pH inicial del medio influye aumentando la velocidad de crecimiento y actividad enzimática a valores de pH inferiores a 7.0, siendo los valores alcalinos convenientes en la producción de biomasa, pero los menos favorecedores en la velocidad de crecimiento y actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF en fermentación líquida.

Se presentó un máximo en la producción de biomasa a pH 6.5, 8.0, 8.5 y 9.0. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento es significativamente superior a pH 5.5, 6.0, 6.5 y 8.0. De tal forma que los valores alcalinos optimizaron el crecimiento, y los valores ácidos, la velocidad de producción de biomasa de *F. culmorum* en presencia de DEHF en fermentación líquida.

Se cuantificó un máximo de actividad enzimática a pH 5.5 y 6.5. Con ello, se obtuvieron los parámetros cinéticos de actividad de esterasas, los cuales también presentaron superioridad a pH 5.5 y 6.5. Con lo que se concluye que a estos valores de pH se obtiene la óptima actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF en fermentación líquida.

En el análisis zimográfico se observó la presencia de cuatro isoenzimas a pH 5.5 y 6.5, en el resto de las fermentaciones no se alcanzó este número de isoformas. Por tanto, se concluye que el pH inicial de 5.5 y 6.5 es óptimo para la expresión de esterasas de *F. culmorum* en presencia de DEHF en fermentación líquida.

El análisis estadístico divide los datos en grupos de pH a los que se favorece, el crecimiento por un lado, y la actividad enzimática por otro. Sin embargo, el valor de pH que se encuentra en cada uno de los grupos favorecidos, es 6.5.

El pH óptimo para el crecimiento y actividad enzimática de *F. culmorum* en presencia de DEHF en fermentación líquida a temperatura ambiente, es 6.5.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuitl-Beristain, S., García-Dávila, J., Santacruz-Juárez, E., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruíz, M., & Sánchez, C. (2018). A novel biodegradation pathway of the endocrine-disruptor di(2-ethyl hexyl) phthalate by *Pleurotus ostreatus* based on quantum chemical investigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 494-499.
- Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuitl-Beristain, S., García-Dávila, J., Santacruz-Juárez, E., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruíz, M., & Sánchez, C. (2018). Mineralization of high concentrations of the endocrine disruptor dibutyl phthalate by *Fusarium culmorum*. *3 Biotech*.
- Ahuactzin-Pérez, M., Tlecuitl-Beristain, S., García-Dávila, J., Santacruz-Juárez, E., González-Pérez, M., Gutiérrez-Ruíz, M., & Sánchez, C. (2016). Degradation of di(2-ethylhexyl)phthalate by *Fusarium culmorum*: Kinetics, enzymatic activities and biodegradation pathway based on quantum chemical modeling. *Science of the environment*, 1183-1193.
- Ahuactzin-Pérez, M., Torres, J., Rodríguez-Pastrana, B., Soriano-Santos, J., Díaz-Godínez, G., Díaz-Godínez, R., & Tlecuitl-Beristain, S. (2014). Fungal biodegradation of dibutyl phthalate and toxicity of its breakdown products on the basis of fungal and bacterial growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- ATSDR. (2001). *Toxicological profile for Di-n-butyl phthalate*. Atlanta: U.S. Department of health and human services.
- Bernard, L. (2014). Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices: A review. *Talanta*, 39-54.
- Castro-Ochoa, D. (2010). Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16-25.
- Colla, L., Ficanha, A., Rizzardi, J., Bertolin, T., Oliveira, C., & Vieira, J. (2015). Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Research International*, 1-9.
- Córdoba-Sosa, G., Torres, J., Ahuactzin-Pérez, M., Díaz, G., Díaz, R., & Sánchez, C. (2014). Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di (2-ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 96-103.

- European Chemicals Bureau (ECB) (2008). *European Union Risk Assessment Report bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)*. Luxemburg: Institute of Health and Consumer Protection (IHCP) .
- Fávero, H., Rabal, C., Batista de Mdeiros, J., Araújo, A., Siqueira, D., Lopes, H., & Trevisan, H. (2013). Endophytic fungi producing of esterases: Evaluation in vitro of the enzymatic activity using pH indicator. *Brazilian Journal of Microbiology*, 923-926.
- Ferrario, V., Pellis, A., Cespugli, M., Guebitz, G., & Gardossi, L. (2016). Nature Inspired Solutions for Polymers: Will Cutinase Enzymes Make Polyesters and Polyamides Greener *Catalysts*.
- Ferrer-Parra, L., López-Nicolás, D., Martínez-Castillo, R., Montiel-Cina, J., Morales-Hernández, A., Ocaña-Romo, E., Sánchez, C. (2018 ). Partial characterization of esterases from *Fusarium culmorum* grown in media supplemented with di (2-ethyl hexyl phthalate) in solid-state and submerged fermentation. *Mexican Journal of Biotechnology*, 82-94.
- Frans, M., Aerts, R., Van Laethem, S., Ceusters, J. (2017) Environmental effects on growth and sporulation of *Fusarium* spp. causing internal fruit rot in bell pepper. *European Journal of Plant Pathology*.
- Gao, D.-W. (2015). Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of the total environment*, 986-1001.
- Geyer, R., Jambeck, J., & Law, K. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 1-5.
- Jackson, A., Whipps, J., & Lynch, J. (1992). Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 494-501.
- Jhons, L., Ferguson, K., Cantonwine, D., McElrath, T., Mukherjee, B., & Meeker, J. (2017). Urinary BPA and Phthalate Metabolite Concentrations and Plasma Vitamin D Levels in Pregnant Women: A Repeated Measures Analysis. *Environmental Health Perspectives* , 1-9.
- Karlsson, I. (2016). Genus-Specific Primers for Study of *Fusarium* Communities in Field Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 491-501.
- Kim, Y. (2007). Enhanced degradation and toxicity reduction of dihexyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Journal of Applied Microbiology*, 221-228.
- Kim, Y.-M., & Song, H.-G. (2009). Effect of the Fungal pellet on enzyme activities involved in Phthalate degradation. *The Journal of Microbiology*, 420-424.



- Krstanovic, V., Mastanjevic, K., Velic, N., Pleadin, J., Persi, N., & Spanic, V. (2015). The influence of *Fusarium culmorum* contamination level on deoxynivalenol content in wheat, malt and beer . *Romanian Biotechnological Letters*, 10901-10910.
- Kumar, V., Sharma, N., & Maitra, S. (2017). Comparative study on the degradation of dibutyl phthalate by two newly isolated *Pseudomonas* sp. V21b and *Comamonas* sp. 51F. *Biotechnology Reports*, 1-10.
- Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., & Steinberg, C. (2013). Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 97-111.
- Li, L., Liu, J.-C., Lai, F.-N., Lui, H.-Q., Zhang, X.-F., Dyce, P., Chen, H. (2016). Di (2-ethylhexyl) Phthalate Exposure Impairs Growth of Antral Follicle in Mice. *PLoS ONE*, 1-18.
- Lim , H., & Hoang, S. (2013 ). Plasticizer Effects on Physical–Mechanical Properties of Solvent Cast Soluplus® Films. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 903-910.
- Lin, H., Yuan, K., Li, L., Liu, S., Li, S., Hu, G., Ge, R.-S. (2015). In Utero Exposure to Diethylhexyl Phthalate Affects Rat Brain Development: A Behavioral and Genomic Approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13696-13710.
- Lionetti, V., Giancaspro, A., Fabri, E., Giove, S., Reem, N., Zabolina, O., Bellincampi, D. (2015). Cell wall traits as potential resources to improve resistance of durum wheat against *Fusarium graminearum*. *BioMed Central*, 2-15.
- López-López, O., Cerdán, M., & González, M. (2014). New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. *Current Protein and Peptide Science*, 445-455.
- Luo, Z., *et al.* (2012). Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate. *Process Biochemistry*, 687-693.
- Luo, Z. *et al.* (2015). Purification and characterization of an intracellular esterase from a marine *Fusarium* fungal species showing phthalate diesterase activity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 7-12.
- Manoj Shinga, I., Kakoty, Y., Gopalan Unni, B., Das , J., & Chandra Kalita, M. (2016). Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 99-105.

- Meeker, J. e. (2009). Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical transactions of the royal society*, 2097-2113.
- Muhammed, M., Anagnostou, T., Desalermos, A., Kourkoumpetis, T., Carneiro, H., Glavis-Bloom, J., Mylonakis, E. (2013). *Fusarium* Infection: Report of 26 Cases and Review of 97 Cases From the Literature. *Medicine*, 305-3016.
- Nagaraja, H. (2016). Diversity of toxic and phytopathogenic *Fusarium* species occurring on cereals grown in Karnataka state, India. *Biotech*, 491-501.
- Nielsen, L., Cook, D., & Ray, R. (2014). The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *International Journal of Food Microbiology*, 38-49.
- Obanor, F. (2010). *Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis. *British Mycological Society*, 753-765.
- Powell, J., Carere, J., Fitzgerald, T., Stiller, J., Covarelli, L., Xu, Q., Kazan, K. (2017). The *Fusarium* crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum* triggers a suite of transcriptional and metabolic changes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany*, 853-867.
- Pradeep, S. (2011). Mycelial fungi remediate di(2-ethylhexyl)phthalate, the hazardous plasticizer in PVC blood storage bag. *Journal of Hazardous Materials*, 70-77.
- Rabek, C., Van Stelle, R., Dziubla, T., & Puleo, D. (2015). The Effect of Plasticizers on the Erosion and Mechanical Properties of Polymeric Films. *Journal of Biomater Applied*, 1-24.
- Rousk, J., Brookes, P., & Bååth, E. (2009). Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1589-1596.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., & Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 323-341.
- Sharma, S., Ashley, J., Hodgson, A., & Nisker, J. (2014). Views of pregnant women and clinicians regarding discussion of exposure to phthalate plasticizers. *Reproductive Health*, 1-8.
- Sheikh, I., Turki, R., Abuzenadah, A., Damanhour, G., & Beg, M. (2016). Endocrine Disruption: Computational Perspectives on Human Sex Hormone-Binding Globulin and Phthalate Plasticizers. *PLoS ONE*, 1-13.
- Siou, D., Gélisse, S., Laval, V., Suffert, F., & Lannou, C. (2015). Mutual Exclusion between Fungal Species of the *Fusarium* Head Blight Complex in a Wheat Spike. *Applied and Environmental Microbiology*, 4682-4689.

- Starling, A., Engel, L., Calafat, A., Koutros, S., Satagopan, J., Yang, G., Xiao-Ou, S. (2015). Predictors and long-term reproducibility of urinary phthalate metabolites in middle-aged men and women living in urban Shanghai. *Environment International*, 94-106.
- Suárez-Segundo, J., Vázquez-López, D., Torres-García, J., Ahuactzin-Perez, M., Montiel-Martínez, M., Tecuítli-Beristain, S., & Sánchez, C. (2013). Crecimiento de colonias y ultraestructura de hifas de hongos filamentosos cultivados en dibutilftalato y di(2-etilhexil) ftalato. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 499-504.
- Urban, M., King, R., Andongabo, A., Maheswari, U., Pedro, H., Kersey, P., & Hammond-Kosack, K. (2016). First Draft Genome Sequence of a UK Strain (UK99) of *Fusarium culmorum*. *Genome Announcements*, 1-16.
- Valueva, T., Kudryavtseva, N., Sofin, A., Revina, T., Gvozdeva, E., & Ievleva, E. (2012). Comparative Analyses of Exoproteinases Produced by Three Phytopathogenic Microorganisms. *Journal of Pathogens*, 1-9.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C., Romero-Gomez, S., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 157-167.
- Zhi-Dan, W. (2014). Biodegradation and kinetic analysis of phthalates by an *Arthrobacter* strain isolated from constructed wetland soil. *Environmental Biotechnology*.
- Zhu, L., Lu, J., Tang, X., Fu, G., Duan, P., Quan, C., Shi, Y. (2016). Di-(2-ethylhexyl) phthalate Induces Apoptosis of GC-2spd Cells via TR4/Bcl-2 Pathway . *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 18-24.