

COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS TABASCO

PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**“PRODUCCIÓN DE ENDOPROTEASA ÁCIDA EXTRACELULAR (mrAE)
POR EL HONGO FITOPATÓGENO *Moniliophthora roreri* CULTIVADO EN
EL SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON BAGAZO DE
CAÑA DE AZÚCAR COMO SUSTRATO”**

PRESENTA:

MARÍA ISABEL SOBERANO MAYO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

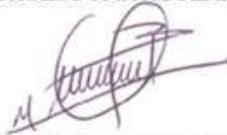
MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS TABASCO, JULIO 2012

La presente tesis, titulada: "Producción de endoproteasa ácida extracelular (mrAe) por el hongo *Moniliophthora roreri* cultivado en el sistema de fermentación en estado sólido con bagazo de caña de azúcar como sustrato", realizada por la alumna: María Isabel Soberano Mayo, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

CONSEJO PARTICULAR



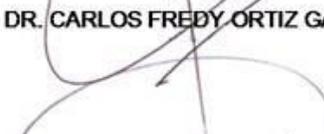
CONSEJERO DRA. CONSUELO BAUTISTA MUÑOZ



ASESOR DR. JULIÁN PÉREZ FLORES



ASESOR DR. CARLOS FREDY ORTIZ GARCÍA



ASESOR DR. XAVIER MIGUEL BOLDO LEÓN



ASESOR DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

H. Cárdenas, Tabasco. 16 de Julio de 2012

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la vida, llenarme de bendiciones, por la salud y la inteligencia y por cumplir otro de mis propósitos.

Por todo, gracias DIOS

Al Consejo **Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento otorgado durante el transcurso de la Maestría.

Al **Colegio de Postgraduados**, así como a las **Líneas de investigación No.2 “Agroecosistemas sustentables” y No.5 “Biotecnología microbiana, vegetal y animal”** por el financiamiento otorgado.

A los miembros mi consejo particular integrado por la **Dra. Consuelo Bautista Muñoz, Dr. Julián Pérez Flores, Dr. Carlos Fredy Ortiz García, Dr. Xavier Miguel Boldo León y Dr. David Espinosa Victoria**. Por darme el espacio de formar parte de su grupo de investigación durante la ejecución y realización de mi tesis, por proporcionarme las herramientas necesarias y por todo su tiempo y esfuerzos.

A los **laboratorios de Fitopatología, Ciencia Animal, Tecnología de Alimento, Cultivo de tejidos y Biología Molecular Campus Tabasco** y al Laboratorio de **Genómica de División Académica Ciencias de la Salud de la UJAT**. Por su contribución para la realización de esta tesis.

A mis compañeros de generación por su valiosa amistad: **Christian, Jorge, Anita, Érika, Toño, Omar, Facundo, Adrián, Marcos, Okendo, Julio, Hilda, Heidy, José Luis, Diógenes, Víctor, Julio, Juventino**. A **Francis e Ivana** por su amistad y por sus consejos.

Al **Dr. Julián Pérez Flores** por su valiosa amistad y por todos sus consejos.

Al **Dr. Juan Manuel Zaldívar, Dra. Ma. Elena Oporta y Dra. Luz** por todos sus consejos.

A los que fueron mis maestros: **Dra. Ma. Del Carmen, Dra. Luz del Carmen, Dr. Fredy, Dr. Saúl, Dr. Julián, Dr. Gustavo, Dr. Zaldívar, Dra. Ma. Elena, Dra. Consuelo, Dr. Jesús, Dr. Magdiel, Dr. Bucio**.

Al personal del colegio de Postgraduados por todas las facilidades otorgadas para la realización de mi maestría, así como su amistad y apoyo brindado:

Elsy, Celia, Arnulfo, Edith, y por todos sus consejos.

Al **M.C. Vinicio y Eder** por toda su ayuda.

Dedicatoria



A mis dos hijos Irvin y Alex

A esos cachitos de cielo, por ser los regalos más hermosos que la vida me ha dado. Por todo su amor y porque que son mi razón de ser para seguir adelante. Por ser tan valientes.

A mis queridos padres

Por todo el amor que me han dado, por todo su esfuerzo y por seguirme apoyando incondicionalmente, por sus consejos, por todo el sacrificio que hicieron para sacarnos adelante. Por ser uno de mis pilares para no caer.

A mi esposo

Por todo su amor, comprensión y cariño, por todos sus consejos y apoyo y por cuidarme siempre.

A mis hermanos

Por todo su amor y apoyo brindado.

A mi familia en general

Por el cariño y por sus buenos deseos.

CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
II.1. OBJETIVO GENERAL	
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
III. HIPÓTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
IV.1. Origen y distribución de la moniliasis del cacao	4
IV.2. Importancia económica	5
IV.3. Agente causal	6
IV.4. Morfología del hongo <i>Moniliophthora roreri</i>	7
IV.5. Descripción morfológica de <i>Moniliophthora roreri</i> in vitro	7
IV.6. Descripción morfológica del hongo <i>in vivo</i>	8
IV.7. Fase reproductiva sexual y asexual	8
IV.8. Ciclo de vida de <i>Moniliophthora roreri</i>	9
IV.9. Hospederos	10
IV.10. Síntomas de la enfermedad	11
V.10.1. Síntomas externos	11
IV.10.2. Síntomas internos	13
IV.11. Fuentes de inóculo	13
IV.12. Mecanismos de dispersión de <i>Moniliophthora roreri</i>	14
IV.13. Proteasas	15
IV.13.1. Proteólisis	16
IV.13.2. Clasificación de las proteasas	16
IV.13.2.1. De acuerdo al tipo de reacción que catalizan	18

IV.13.2.2. De acuerdo al pH óptimo	19
IV.13.2.3. Según su origen	21
IV.13.3. Proteasas aspárticas	25
IV.13.4. Aplicaciones de las proteasas	27
IV.13.5. Fermentación en estado sólido	28
V. JUSTIFICACIÓN	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	31
VI.1. Medios de cultivo	31
VI.2. Composición del sistema de fermentación en estado sólido (FES)	31
VI.3. Preparación del pre-inóculo	32
VI.4. Determinación del pH	32
VI.5. Determinación de la actividad enzimática de endoproteasa ácida	32
VI.6. Determinación de péptidos liberados por la técnica de Micro-Lowry	33
VI.7. Determinación de la proteína total	33
VI.8. Determinación de la biomasa de <i>M. roreri</i>	33
VI.9. Morfología de las esporas germinadas de <i>Moniliophthora roreri</i> cultivado en el sistema FES	34
VI.10. Diseño experimental	34
VII. RESULTADOS	35
VII.1. pH	35
VII.2. Determinación de la actividad enzimática de endoproteasa ácida mrAe	35
VII.3. Determinación de la biomasa de <i>M. roreri</i>	36
VII.4. Morfología celular de las esporas germinadas de <i>Moniliophthora roreri</i> cultivado bajo FES	39
VIII.DISCUSIÓN	42
IX. CONCLUSIONES	46
X. PERSPECTIVAS	47
XI. BIBLIOGRAFÍA	48
XII. ANEXOS	65

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación de proteasas de acuerdo al tipo de reacción que catalizan (Rao <i>et al.</i> , 1998).	17
Cuadro 2. Proteasas seleccionadas por alineamiento múltiple (Rao <i>et al.</i> , 1998).	20
Cuadro 3. Efecto de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con y sin inóculo y los días de fermentación en el cambio de pH.	36
Cuadro 4. Efecto de los días de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con inóculo en la biomasa.	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Rango geográfico de <i>Moniliophthora roreri</i> .	5
Figura 2. Estructuras morfológicas de <i>Moniliophthora roreri</i> , mostrando: a) micelio septado y b) esporas con pared gruesa (Evans, 1981).	7
Figura 3. Ciclo de la enfermedad moniliasis (<i>Moniliophthora roreri</i>) del cacao (<i>T. cacao</i> L). En Tabasco, México (Torres <i>et al.</i> , 2006).	10
Figura 4. Síntomas externos de frutos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) infectados con <i>Moniliophthora roreri</i> : A. Fruto infectado en sus primeras etapas de desarrollo. B. Mazorca con gibas. C. Madurez prematura. D. Puntos aceitosos. E. Mancha chocolate con bordes irregulares que cubren total o parcialmente el fruto. F. Mazorca con micelio.	12
Figura 5. Síntomas internos de frutos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) infectados con <i>Moniliophthora roreri</i> : A. Frutos jóvenes infectados B. Necrosis en frutos infectados después de los 3 meses de edad C. Pudrición acuosa.	13
Figura 6. Participación de las proteasas en la hidrólisis de proteínas (Modificado de Mercado 2004).	16
Figura 7. Sitio activo de las proteasas. * Indica el sitio catalítico de las proteasas. + Indica el enlace escindible. S1 a Sn y S1' a Sn' son los subsitios específicos de la enzima. P1 a Pn y P1' a Pn' son los residuos sobre el sustrato ordenados por los subsitio sobre la enzima.	17
Figura 8. Mecanismo de acción de las proteasas aspárticas.	26
Figura 9. Morfología de <i>Moniliophthora roreri</i> MRO1 cultivado en medio mínimo mineral.	35
Figura 10. Comportamiento del pH y actividad enzimática específica de mrAe (Umg^{-1} proteína total) de <i>M. roreri</i> MRO1 cultivado bajo FES, utilizando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.	36
Figura 11. Estructuras conidiales formadas por <i>M. roreri</i> MRO1 cultivado en el sistema FES usando BCA como sustrato, durante 30 días de incubación.	40

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Fórmulas matemáticas	65
Anexo 2. Efecto de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con y sin inóculo y los días de fermentación en el cambio de pH.	66
Anexo 3. Determinación de la concentración de la Proteína total en mgml^{-1} de <i>M. roreri</i> MRO1 cultivado en el sistema de FES usando BCA como sustrato.	67
Anexo 4. Determinación de la actividad enzimática específica mrAe en U/mg^{-1} Proteína total de <i>M. roreri</i> MR01 cultivado en el sistema de FES usando BCA como sustrato.	69
Anexo 5. Valores de pH testigo y pH problema.	71

ABREVIATURAS

A_{660} : Absorbencia seiscientos sesenta nanómetros

α : alfa

BCA: Bagazo de caña de azúcar

$^{\circ}\text{C}$: Grados centígrados

EC: Comisión de enzimas

EC 3.4.23: Proteasas aspárticas

FEL: Fermentación en estado líquido

FES: Fermentación en estado sólido

FeSO_4 : Sulfato de hierro

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Sulfato de hierro amónico

gKg^{-1} : Gramos por kilogramo

HPO_4 : Ácido fosfórico

KH_2PO_4 : Fosfato di básico de potasio

KNO_3 : Nitrato de potasio

K_2HPO_4 : Fosfato monobásico de potasio

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Tartrato de sodio y potasio

mrAe: Endoproteasa ácida de *Moniliophthora roreri*

MRO1: Cepa 1 de *Moniliophthora roreri*

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Sulfato de magnesio heptahidratado

μm : Micras

Na_2SO_4 : Sulfato de sodio

NaCl : Cloruro de sodio

NH_4NO_3 : Nitrato de amonio

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Sulfato de amonio

pH: Potencial hidrógeno

S1 y S1', Sn y S': Subsitios de la enzima

P1 y P1', Pn y Pn': Residuo sobre el sustrato

Umg^{-1} proteína total: Unidades por miligramo de proteína total

%: Porcentaje

RESUMEN

“PRODUCCIÓN DE ENDOPROTEASA ÁCIDA EXTRACELULAR POR EL HONGO FITOPATÓGENO *Moniliophthora roreri* CULTIVADO EN EL SISTEMA DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO SUSTRATO”

María Isabel Soberano Mayo, MC.

Colegio de postgraduados, 2012

Las proteasas son enzimas industriales muy importantes y comprenden alrededor del 60% de las enzimas comerciales en el mundo. Dos terceras partes de estas proteasas son de fuentes microbianas, principalmente de origen fúngico. El presente trabajo tuvo como objetivos estudiar la cinética de producción de enzima endoproteasa ácida extracelular (mrAe) del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* MRO1, cultivado en sistema de fermentación en estado sólido (FES), utilizando como sustrato inductor bagazo de caña de azúcar (BCA), así como determinar la morfología del hongo. La actividad de mrAe fue determinada con albúmina sérica bovina como sustrato proteolítico. Los tratamientos (T) evaluados fueron los siguientes: T1: Bagazo de caña sin inóculo y; T2: bagazo de caña inoculados con *M. roreri*. Se evaluó la actividad enzimática de mrAe, biomasa, pH del medio de cultivo y la morfología de las esporas del hongo inoculadas, durante un periodo de 30 días de incubación. El nivel más alto de actividad enzimática específica de mrAe se registró a los 24 días después de la incubación con: 24.69 U mg^{-1} proteína total, pH del medio de cultivo de 6.07 y biomasa de 0.255g. La morfología de *M. roreri* MRO1 cultivado en el sistema FES, mostró esporas germinadas, de formación basal, hialinas, en su mayoría de forma ovoide o elipsoidales (E) y pocas de tipo globosa (G); esporas formando cadenas, hifas hialinas en estado joven, sin septos, septadas y pluriseptadas en etapa avanzada y finalmente, conidióforos ramificados que dan lugar a cadenas maduras de conidios.

Palabras clave: *Moniliophthora roreri*, endoproteasas, fermentación en estado sólido

ABSTRACT

PRODUCTION OF EXTRACELLULAR ACID ENDOPROTEASE FROM PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *Moniliophthora roreri* GROWN IN A SOLID STATE FERMENTATION USING SUGARCANE BAGASSE AS A SUBSTRATE

Proteases are the most important industrial enzyme and comprise about 60% of commercial enzymes in the world. Two third of the industrially produced proteases are from microbial source mainly of the fungal origin. The kinetics of extracellular acid endoproteases (mrAe) enzymes produced by of the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri* MRO1, grown in a solid state fermentation (SSF) using sugarcane bagasse (SCB) as a substrate, as well as the morphology of the fungus was studied. Activity of mrAe was determined with bovine serum albumin (BSA) as proteolytic substrate. The evaluated treatments (T) were: T1, uninoculated sugarcane bagasse; and T2, sugarcane bagasse inoculated with of *M. roreri* MRO1. Enzymatic activity of mrAe, biomass, medium pH and fungal cell morphology were evaluated over a period of 30 days of incubation. The highest enzymatic specific activity of mrAe was found on 24 days with 24.69 Umg⁻¹total protein was reached after and a pH of 6.07 and 0.255 g of biomass. Cell morphology formed of *M. roreri* MRO1 grown under SSF showed germinated spores, basal spores formation, hyaline, mostly ovoid or ellipsoidal (E) and some globose (G), spores in chains, hyaline hyphae when young, nonseptate, septates and multiseptate spores in advanced stage, and finally branched conidiophores, that triggered mature conidia chains.

Key words: *Moniliophthora roreri*, endoproteases, solid state fermentation

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos producen una amplia variedad de enzimas potencialmente útiles (Eliécer, 2003). Industrialmente, las enzimas más utilizadas son: proteasas, amilasas, carbohidrolasas y lipasas (Carrillo *et al.*, 2008). Desde el punto de vista económico, la producción de enzimas industriales en el 2010 generó ganancias de alrededor de 1600 millones de dólares, de los cuales el 60% fue debido a la venta de proteasas (Reyes *et al.*, 2011)

Las proteasas (EC 3.4) son enzimas cuya función catalítica es hidrolizar proteínas hasta péptidos cortos o aminoácidos libres (Guangrong *et al.*, 2008). Estas enzimas pueden ser cultivadas en grandes cantidades, en un tiempo relativamente corto por métodos de fermentación establecidos (Gupta *et al.*, 2002)

El uso de enzimas proteolíticas es relevante en biotecnología, especialmente en laproducción de hidrolizados de proteínas (Ubalde y Cantera, 2002; Vairo *et al.*, 2008) y elaboración de quesos (Prados *et al.*, 2007).

Los microorganismos son fuente importante de proteasas debido a su rápido crecimiento, y la facilidad con la que pueden ser manipulados genéticamente para generar nuevas enzimas con otras propiedades (Rao *et al.*, 1998 y Fang *et al.*, 2008). Su biomasa puede ser determinada fácilmente después del secado simple en hornos y pesado en balanza digital (Liu *et al.*, 2001).

Las enzimas se producen principalmente por dos procesos: fermentación en estado sólido (FES) y fermentación en estado líquido (FEL) (Sumantha *et al.*, 2006a) usando sustratos como salvado de trigo (Fernandez *et al.*, 1998; Couri *et al.*, 2000; Sandhya *et al.*, 2005), arroz cocido al vapor (Chou y Rwan, 1995), cáscara de mango y cáscara de plátano (Couri *et al.*, 2000), cáscara de lenteja, cáscara de arroz, tallo de algodón, maíz prensado (Akcan y Uyar, 2011), pulpa de café (Martínez, 1987; Bermúdez *et al.*, 1994), pajas de caña (Klibansky *et al.*, 1993), hojas de plátano (Guzmán *et al.*, 1993) paja de maíz (Acosta *et al.*, 1988), diferentes tipos de hierbas (Zhanxi y Zhanhua, 1997) y cáscara de cacao (Calvo y Sánchez, 1993; García, 1999; Ramos, 1999; Bermúdez *et al.*, 2001), entre otros.

La FES consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema. El agua se encuentra ligada en una forma compleja a la matriz sólida, ya sea adsorbida en la superficie de las partículas o atrapada dentro de la región capilar del sólido (Moo-Young *et al.*, 1983; Mudgett, 1986; Reid, 1989). Cuando los microorganismos son aerobios, es necesario alimentar al sistema con un determinado flujo de aire, el cual suministra oxígeno necesario y contrarresta el incremento de temperatura que se produce por la generación de calor metabólico. La FES ha adquirido interés debido a su utilidad en los tratamientos de residuos sólidos y en la producción de metabolitos secundarios. La producción de enzimas usando sustratos agro-biotecnológicos bajo FES ofrece ventajas en la productividad, costo-efectividad en el trabajo, tiempo y componentes del medio, además de ventajas ambientales (Pandey *et al.*, 2000; Soccol *et al.*, 2003).

Los procesos de FES son utilizados para la preparación de alimentos fermentados, cultivo de setas comestibles, composteo de forrajes y conservación de alimentos para ensilaje. Todos estos procesos requieren del conocimiento de parámetros como: características del crecimiento del microorganismo, temperatura, pH, intercambio gaseoso y estimación de biomasa. La selección de un sustrato para un proceso de FES puede incluir la evaluación de un gran número de materiales agrícolas, que permitan el crecimiento microbiano y la síntesis del producto de interés (Mudgett, 1986).

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de enzima endoproteasa ácida extracelular (mrAe) del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* cultivado en el sistema FES, usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor y registrar la morfología del hongo durante la cinética de producción de enzimas.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la producción de producción de enzima endoproteasa ácida extracelular (mrAe) del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* cultivado en el sistema FES, usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.

Estudiar la morfología del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* durante la producción de enzima endoproteasa ácida extracelular (mrAe) en el sistema FES, usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.

III. HIPÓTESIS

El hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* cultivado en un sistema FES, usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor produce enzima endoproteasa ácida extracelular (mrAe).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

IV.1. Origen y distribución de la moniliasis del cacao

El cultivo de cacao es un ecosistema altamente favorable para el desarrollo de enfermedades fúngicas (Fulton, 1989). A nivel mundial, estas enfermedades reducen el potencial del cultivo en casi un 30% de la producción anual y en algunas plantaciones las pérdidas son del 100% (Keane, 1992; Bowers *et al.*, 2001). Las tres enfermedades más destructivas del cacao reportadas desde 1989, son mancha negra, moniliasis y escoba de bruja (Fulton, 1989) causadas por *Phytophthora*, *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* respectivamente (Mondego *et al.*, 2008). En América Latina, el cultivo del cacao atraviesa por un grave problema fitosanitario causado por la diseminación de enfermedades tales como escoba de bruja y la moniliasis. Esta última, origina pérdidas que superan el 90% de la producción (Ramírez, 2007).

La moniliasis fue registrada inicialmente en Ecuador en 1914 (Ampuero, 1967; Barros, 1980) y posteriormente se diseminó a Colombia, Venezuela y Perú.

Phillips-Mora (2003b), mediante estudios de genética poblacional y el uso de marcadores moleculares, demostró que la región geográfica del noroeste de Colombia contiene una diversidad genética de *M. roreri* mayor a la encontrada en Ecuador, por lo que ubica a esta área como el centro de origen más probable.

Actualmente la distribución de *M. roreri*, se restringe a América. En un periodo de casi 200 años, la enfermedad ha sido reportada en 11 países (Phillips-Mora *et al.*, 2007), iniciando en Colombia en 1817 (Phillips-Mora, 2003a), Ecuador en 1917 (Rorer, 1918) y Venezuela en 1941 (Muller, 1941). La aparición de *M. roreri* en Panamá en 1956 (Orellana, 1956), marcó una expansión geográfica significativa del hongo y éste ha sido dispersado a través de Mesoamérica (Phillips-Mora *et al.*, 2007). Durante los últimos 50 años, *M. roreri* se dispersó más de 2500 km abarcando siete países: Costa Rica en 1978 (Enríquez y Suárez, 1978), Nicaragua en 1980 (López y Enríquez, 1980), Perú en 1988 (Hernández *et al.*, 1990), Honduras en 1997 (Porrás y Enríquez, 1998), Guatemala en el 2002 (Phillips-Mora y Wikilson, 2007), Belice en el 2004 (Phillips-Mora *et al.*, 2006b) y México en el 2005 (Phillips-Mora *et al.*, 2006a), alcanzando así el límite norte del cultivo del cacao en el continente americano (Fig. 1).

Los niveles altos de incidencia (> 80%), la amplia y rápida dispersión de la enfermedad en el área y la frecuente presencia de frutos momificados indican que la moniliasis llegó a México al menos un año antes de la detección (Ortiz, 2005). Cuando la moniliasis se detectó en México, se determinó que al menos 1000 ha ya estaban infectadas en Pichucalco, Juárez y Ostoacán en Chiapas y Huimanguillo en Tabasco (Phillips-Mora *et al.*, 2007).



Figura 1. Rango geográfico de *Moniliophthora roreri* (Phillips-Mora, 2003a)

IV.2. Importancia económica

La moniliasis es una enfermedad que causa la pudrición de las mazorcas del cacao. Es también llamada “pringue”, “helada”, “enfermedad palúdica”, “pudrición acuosa de la mazorca”, “mancha chocolate”, “enfermedad de Quevedo”, dependiendo del país y la región donde se presente (López *et al.*, 2006). Es considerada la enfermedad más destructiva del cultivo en Latinoamérica (Sánchez *et al.*, 2003) y el principal problema fitosanitario que enfrenta la producción cacaotera (López *et al.*, 2006).

La enfermedad ocasiona pérdidas del 10% al 100% (Rorer, 1926; Katip, 1994), dependiendo de factores como el tiempo que la enfermedad está presente en el sitio, la edad de la plantación, el manejo del cultivo y de la enfermedad, la presencia de plantaciones vecinas afectadas, condiciones ambientales, las medidas de control que se apliquen, y las variedades cultivadas. En plantaciones ubicadas en zonas húmedas, con poca tecnificación y sin control, es frecuente observar pérdidas superiores al 90%

(López *et al.*, 2006), lo que ha conducido al total abandono de las plantaciones en algunos países (Krauss y Soberanis, 2001; Enríquez *et al.*, 1982).

La moniliasis del cacao ha sido reportada como dos veces más destructiva que la mancha negra causada por *Phytophthora* spp. (Desrosiers y Díaz, 1957) y más dañina y difícil de controlar que la enfermedad de escoba de bruja causada por *M. pernicioso* (Aránzazu, 2000). Esto porque el primer síntoma de infección es a menudo la ocurrencia de lesiones con abundante esporulación externa que facilita su dispersión (Madisson *et al.*, 1995). Sin embargo, bajo condiciones culturales óptimas de manejo, control y germoplasma mejorado, los daños disminuyen considerablemente, y esta situación genera una alternativa para el desarrollo del cultivo del cacao en áreas infestadas por la enfermedad (López *et al.*, 2006).

IV.3. Taxonomía

En la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov) (2011), se encuentra disponible la clasificación taxonómica siguiente:

Súper reino: Eukaryota

Reino: Fungi/grupo Metazoa

Subreino: Dikarya

Phylum: Basidiomycota

Clase: Agaricomycetes

Subclase: Agaricomycetidae

Orden: Agaricales

Familia: Marasmiaceae

Género: *Moniliophthora*

Especie: *roreri*

Sinónimo: *Crinipellis roreri* var. *roreri*

IV.4. Morfología del hongo *Moniliophthora roreri*

El estado perfecto (sexual) de *M. roreri* se desconoce, por lo que se cree que su reproducción se realiza sólo asexualmente por conidios. Sin embargo, Thorold (1975), Kranz *et al.* (1978) y Evans *et al.* (1978), describen que el hongo posee hifas hialinas y septadas, las septas sin conexiones de gancho pero con doliporo, de 1.5 a 5 μm de ancho (Fig. 2). Las conidias, se producen en cadenas con maduración basipétala (Evans, 1981) y se desprenden fácilmente del micelio; su pared es gruesa y son amarillo-pálido o café cuando forman masa de esporas, su forma varía de globosa a elipsoidal, y miden de 7 a 10 μm de ancho por 9 a 14 μm de largo. Los conidióforos son más o menos verticales, ligeramente ramificados, ocasionalmente aislados y erectos y forman cadenas de cuatro a diez conidias.

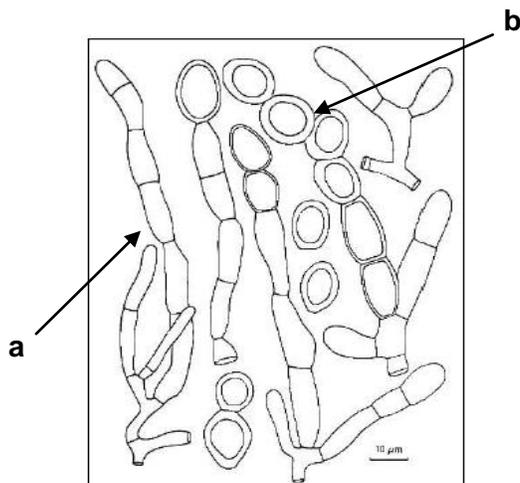


Figura 2. Estructuras morfológicas de *Moniliophthora roreri*, mostrando: a) micelio septado y b) esporas con pared gruesa (Evans, 1981)

IV.5. Descripción morfológica de *Moniliophthora roreri* *in vitro*

Las colonias de *M. roreri* alcanzan un diámetro de 8 a 15 mm después de dos semanas, y muestran un borde levemente levantado (Fig. 3A). El crecimiento en forma de tapete de aspecto lanoso a fieltro (Fig. 3B), de color salmón pálido a rosa beige, finalmente se vuelve de color beige canela a arcilla, o localmente café lanoso a chabacano pálido (Fig. 3C). No produce olor. En la zona avanzada, la hifa es hialina, de pared delgada, septada y algunas veces es levemente irregular con hinchamientos de 1.5 a 5 μm de ancho. Los conidióforos ramificados dan lugar a cadenas maduras de

conidios, de color amarillo pálido y de color café en masa (Fig. 3D). Las temperaturas de crecimiento óptimas son de 25 a 26 °C y máximo 33 °C (Evans *et al.*, 1978).

IV.6. Descripción morfológica del hongo *in vivo*

Las mazorcas jóvenes pueden desarrollar hinchamientos pronunciados, pero los síntomas pueden estar totalmente ausentes hasta la formación de la lesión que va de 45 a 90 días después de la penetración. Esta puede ser considerada como la fase biotrófica. La fase necrotrófica en la cual se desarrollan rápidamente lesiones irregulares con apariencia chocolate a café oscuro, que se unen gradualmente hasta cubrir la superficie entera de las mazorcas infectadas. En una etapa tardía, predominan hundimientos limitados y lesiones de color café oscuro que se extiende sobre la superficie de la mazorca y tres a siete días después se cubre con una densa capa polvorienta de esporas florecientes de color blanco a crema y posteriormente, cambian a gris o café (Evans *et al.*, 1978).

Los síntomas internos varían con la edad y variedad de la mazorca. Los tejidos en la cámara pueden ser recolocados y desorganizados por sustancias acuosas o gelatinosas, de aquí proviene el nombre de “pudrición acuosa. Los granos están a menudo unidos y pegados a la pared interna de la mazorca, haciendo difícil su remoción (Evans *et al.*, 1978).

IV.7. Fase reproductiva sexual y asexual

Según Evans *et al.* (1978), *M. royeri* representó el estado mitótico (anamorfo) de un basidiomiceto desconocido. Posteriormente, Evans (1981) especuló que el teleomorfo (estado reproductivo sexual que típicamente desarrolla un cuerpo fructífero) podría ser una especie del género *Crinepellis*, dado el inusual ciclo vital pleomórfico, hemibiotrófico que presenta *M. royeri*, el cual también es observado en otro de los patógenos importantes del cacao: *Crinipellis perniciosus*.

Evans *et al.* (2002), encontraron evidencias de que la meiosis ocurre dentro de las esporas, un fenómeno que tiene coherencia con el contenido nuclear variable de las mismas; por lo que proponen que la fase reproductiva observada en *M. royeri* es

sexual, y que este patógeno corresponde a un teleomorfo modificado. De acuerdo con estos autores, durante la esporogénesis y germinación ocurre la meiosis, la cual da lugar a la formación de hifas infectivas monocarióticas. La fase parasítica haploide se da sólo en el tejido vivo (biotrófico), en la que el hongo crece y se alimenta intercelularmente sin activar los mecanismos de defensa del hospedero. Una señal no identificada (asociada con la edad del fruto) estimula la transición a la fase diploide necrotrófica, la cual induce los síntomas característicos de la moniliasis (Evans *et al.*, 2002). Lo anterior indica que un antepasado de *M. royeri* perdió la capacidad de formar basidiocarpos pero no la capacidad de experimentar división nuclear meiótica (Griffith *et al.*, 2003).

IV.8. Ciclo de vida de *Moniliophthora royeri*

Galindo y Enríquez (1983) indicaron que la fuente de inóculo conocida capaz de producir infecciones son los conidios.

La espora germina y penetra la mazorca en todos los estados de crecimiento. La penetración ocurre directamente a través de la epidermis y ocasionalmente a través de los estomas, sin que sea necesaria la presencia de heridas. Suárez (1980) describió que la penetración se realiza mediante uno a cinco tubos germinativos que se extienden sobre la epidermis y producen las hifas de infección. Estas hifas pueden observarse, después de 8 h creciendo intercelularmente debajo de la epidermis; desarrollando más tarde los conidióforos y conidios dentro de la corteza de la mazorca (López *et al.*, 2006).

El periodo desde el inicio de la infección hasta la aparición de las manchas color café varía con la edad del fruto atacado, se conoce que el fruto es más susceptible en sus primeras etapas de desarrollo. En frutos de uno a dos meses de edad, la aparición de síntomas ocurre entre 30 a 45 días después de la infección, mientras que en aquellos con edad mayor, los síntomas aparecen entre 60 y 90 días. A los tres ó nueve días siguientes a la aparición de las manchas se forma el estroma y tres ó cuatro días después, aparecen las fructificaciones reproductivas o esporas (López *et al.*, 2006).

La maduración del hongo ocurre bajo condiciones óptimas de calor y humedad, más de 25 °C y 85% de humedad relativa. Las esporas pasan de fruto a fruto tanto dentro del mismo árbol como de árboles vecinos, mayormente con la acción del viento y con menor influencia por el aguade lluvia y algunos insectos (Fig. 3.) (APROCACAHO, 2003).

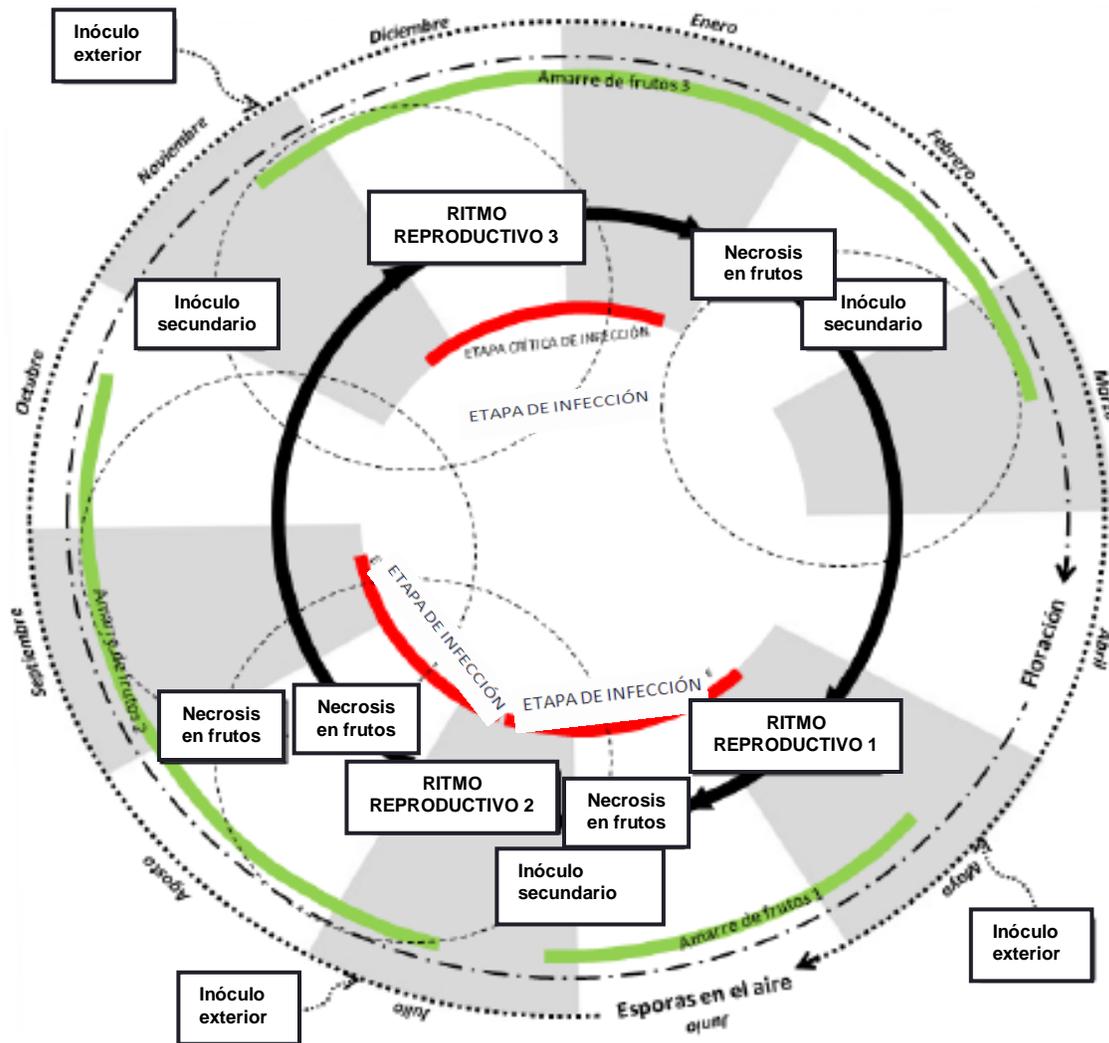


Figura 3. Ciclo de la enfermedad moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*T. cacao* L). En Tabasco, México (Torres et al., 2006)

IV.9. Hospederos

El hongo sólo ha sido encontrado atacando los frutos de los géneros *Theobroma* (*T. bicolor*, *T. grandiflorum*, *T. gileri*, *T. mammosum*, *T. agustifolium*, *T. simearum*, *T.*

silvestre, *T. speciosum*) (Baker *et al.*, 1954; Evans 1981; Enríquez 1981) y *Herrania* (*H. balaensis*, *H. nítida*, *H. albiflora*, *H. purpurea* y *H. pulcherrima*) (Whitlock y Baun 1999).

IV.10. Síntomas de la enfermedad

Los frutos son los únicos órganos que pueden ser infectados naturalmente por *M. roleri* y se caracteriza por su largo período de incubación (tiempo que tarda desde que infecta el fruto hasta que se observa algún síntoma externo en el fruto). Este tiempo puede ser de tres a ocho semanas y varía con la edad del fruto al momento de la infección, la severidad del ataque, la susceptibilidad del árbol y las condiciones de clima, principalmente presencia de lluvias. En frutos tiernos, en días lluviosos y calurosos, el período de incubación se acorta a tres semanas; así los frutos son más susceptibles cuando son jóvenes y se hacen más resistentes a medida que avanza su crecimiento (Ampuero, 1967). Las esporas se depositan sobre el fruto, germinan si hay agua o mueren por la radiación/desecación. El periodo de incubación de la enfermedad es largo, generalmente mayor a un mes. Algunos frutos que están dañados internamente, a veces no muestran evidencias externas de la enfermedad (infecciones ocultas), pero pueden ser reconocidos porque pesan más, debido a que están llenos de agua por la descomposición interna que sufren (Phillips-Mora, 2004).

IV.10.1. Síntomas externos

En sus primeras etapas de desarrollo (menores de 20 días de edad) se produce un marchitamiento similar al ocasionado por otras enfermedades (Fig. 4A) (Phillips-Mora, 2004). En frutos menores de dos meses la infección aparece primero como pequeños abultamientos o gibas en la superficie de la mazorca (Fig. 4B), incluso esa área se decolora (Fig. 4C). Después surge la mancha café que se va extendiendo y sobre ella empieza a aparecer un micelio blanco (filamentos vegetativos). Tres a siete días, sobre el micelio blanquecino empiezan a emerger las esporas de color crema. Algunos frutos presentan madurez prematura, lo que significa que las mazorcas cambian de color, dando la impresión de madurez normal en frutos que todavía no tienen el tamaño ni la edad de cosecha (APROCACAHO, 2003).

En frutos adultos (mayores de 3 meses), aparecen pequeñas áreas aceitosas (Fig. 4D). En muy corto tiempo esos puntos se unen formando una mancha de color café (también llamada “mancha chocolate”), que puede extenderse hasta cubrir todo el fruto. El borde de la mancha es irregular (Fig. 4E) y a veces produce un color amarillento por donde va avanzando la enfermedad y cuatro a cinco días después, sobre la mancha café aparece el micelio blanco con abundante esporulación (Fig. 4F) que se va tornando un poco más oscuro conforme las esporas maduran. Algunos frutos, pueden no mostrar síntomas antes de ser cosechados; sin embargo en su interior muestran necrosis que afecta a algunas o todas las semillas. En otros casos se observan puntos necróticos marrón oscuro y manchas oscuras limitadas, ligeramente hundidas y con frecuencia rodeadas de halos amarillos, dando la apariencia de madurez normal en frutos que todavía no han alcanzado el tamaño ni la edad de cosecha (Phillips-Mora, 2004). Semanas después a la esporulación, el fruto pierde agua y progresivamente se momifica (Suárez, 1971).

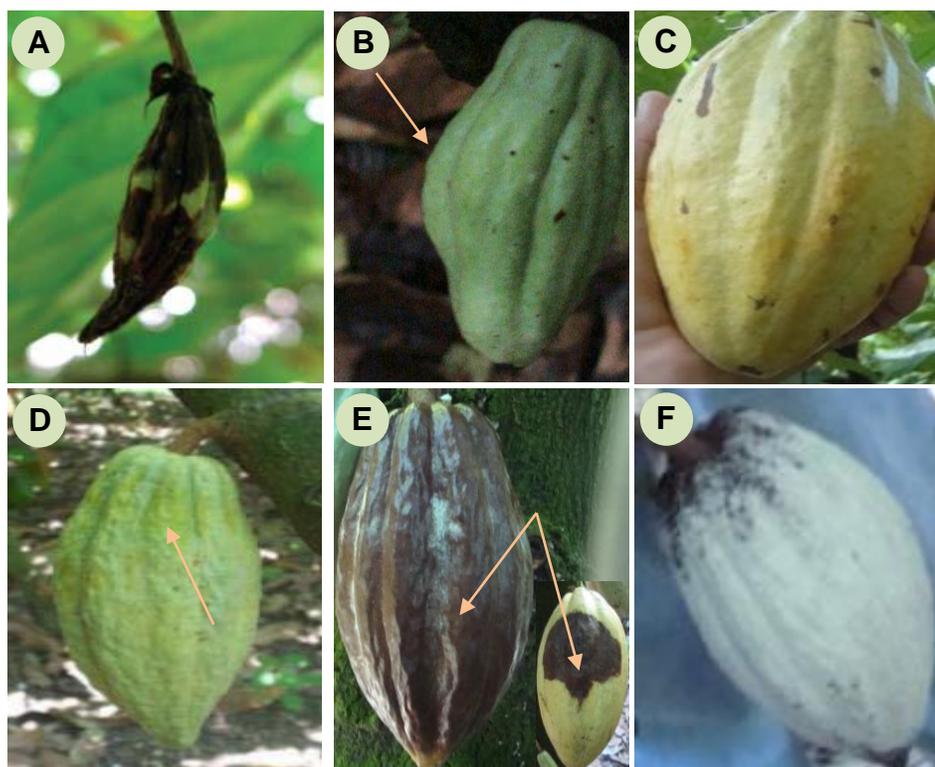


Figura 4. Síntomas externos de frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) infectados con *Moniliophthora roreri*: A. Fruto infectado en sus primeras etapas de desarrollo B. Mazorca con gibas. C. Madurez prematura. D. Puntos aceitosos. E. Mancha chocolate con bordes irregulares que cubren total o parcialmente el fruto. F. Mazorca con micelio.

IV.10.2. Síntomas internos

El hongo produce necrosis progresiva de los tejidos internos. Los frutos jóvenes infectados en etapa de chilillo no completan el número y desarrollo de los granos (Fig. 5A). Los frutos infectados después de los tres meses de edad pueden mostrar necrosis de color marrón rojizo que afecta algunas o todas las semillas (Fig. 5B). En infecciones avanzadas, los carpelos, la pulpa y los granos se vuelven una masa compacta rodeada por una sustancia acuosa como resultado de la maceración (pudrición acuosa) (Rorer, 1918) (Fig. 5C) y, estos frutos pesan más que los frutos sanos, aun teniendo un tamaño similar (Evans, 1981). En frutos infectados de cuatro meses de edad, la infección puede limitarse al mesocarpio sin afectar las semillas, o bien sólo alcanzar el desarrollo de algunos granos (Desrosiers y Suárez 1974; Phillips-Mora 2004).



Figura 5. Síntomas internos de frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) infectados con *Moniliophthora roreri*: A. Frutos jóvenes infectados. B. Necrosis en frutos infectados después de los tres meses de edad. C. Pudrición acuosa.

IV.11. Fuentes de inóculo

Las esporas son el único propágulo infectivo de *M. roreri* y los frutos del cacao los únicos órganos capaces de ser naturalmente infectados por ellas (Phillips-Mora 2004). Campuzano (1980) indicó que 1 cm² de micelio esporulante puede producir 45 millones de esporas y una mazorca completamente infectada puede producir 700 millones de esporas infectivas. Estas esporas, se desprenden con cualquier estímulo físico, se impactan sobre el dosel de los árboles, tronco, cojinetes florales, y se pueden dispersar a grandes distancias, mientras no existan barreras naturales (Phillips-Mora, 2004). Después de un período de aproximadamente tres meses, los frutos enfermos se secan pero permanecen unidos al tronco por largo tiempo. Estos frutos conocidos como

“momias”, son la principal fuente de inóculo y son los responsables de las nuevas infecciones entre los ciclos de producción del cacao (Phillips-Mora, 2004). Además, un fruto infectado puede inducir la esporulación del hongo hasta 20 veces antes de descomponerse totalmente (Parra y Sánchez, 2005).

Los frutos que permanecen en el suelo pueden producir y dispersar las esporas durante dos semanas (Porrasy Sánchez, 1991). Las esporas también sobreviven en otras partes de la planta como el follaje, tronco, cojinetes florales y musgos (Parra y Sánchez, 2005). Los quebraderos y lugares donde se coloca la cáscara de los frutos cosechados, constituye una importante fuente de inóculo y sirven de sustrato para que *M. roreri* desarrolle, esporule e infecte frutos sanos, ocasionando nuevas infecciones (López *et al.*, 2006).

En el cacao debido a la producción permanente de mazorcas y la presencia de microclimas favorables a la enfermedad, se produce una gran cantidad de inóculo y muchos frutos son infectados. Las mazorcas enfermas, que permanecen en el árbol después de cosechar, son la principal fuente de infección durante los primeros 90 días de vida de los frutos nuevos (López *et al.*, 2006). De igual manera, las plantaciones sin manejo agronómico y donde no se practica ninguna medida de control sanitario, constituyen la principal fuente de la enfermedad de donde se dispersa a otras plantaciones (López *et al.*, 2006).

IV.12. Mecanismos de dispersión de *Moniliophthora roreri*

El viento es el principal modo de dispersión de las esporas, aunque también pueden ser diseminadas por el agua, insectos y otros animales, incluyendo al hombre (Phillips-Mora, 2004). El agua, ya sea como lluvia o como rocío, es efectiva para liberar pequeñas cantidades de esporas (Evans, 1981). Las esporas que están flotando en el aire pueden ser depositadas por la lluvia sobre las copas de los árboles y ser distribuidas a otras partes del árbol, particularmente al tronco en donde pueden infectar los frutos (Ram, 1989).

Diferentes especies de animales como monos, ardillas, ratas murciélagos, venados, pericos y otros tipos de aves podrían tener un papel importante en la diseminación de

la moniliasis. Estos animales, podrían favorecer la dispersión del hongo en dos vías: llevando las esporas sobre sus cuerpos o dentro de sus tractos digestivos o bien, transportando frutos enfermos o parte de ellos de un sitio a otro (Wood y Lass, 1985).

Los seres humanos son los agentes más efectivos de diseminación de la moniliasis a largas distancias, dado que el hongo está muy bien adaptado a este método indirecto de diseminación. La dispersión a largas distancias propiciada por los seres humanos puede ocurrir por dos vías, dentro o sobre frutos enfermos o sobre varetas u otro material vegetativo. Las esporas pueden fácilmente adherirse a estos tejidos y permanecer viables por varios meses (Phillips-Mora, 2004). En otros materiales como costales y herramientas de trabajo, es posible que se transporten esporas, las cuales podrían producir infecciones en caso de llegar a frutos en condiciones ambientales favorables.

Moniliophthora roreri se ha dispersado a diferentes regiones cacaoteras, superando barreras geográficas naturales (López *et al.*, 2006).

IV.13. Proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan reacciones hidrolíticas en las cuales las moléculas de proteínas son degradadas a péptidos y aminoácidos. Estas enzimas constituyen un grupo muy grande y complejo, las cuales difieren en propiedades como: especificidad del sustrato, sitio activo y mecanismo catalítico, pH y temperatura óptima y perfil de estabilidad. Las proteasas se producen de forma natural en todos los organismos vivos, son esenciales para el crecimiento y diferenciación celular (Gupta *et al.*, 2002), constituyen del 1 al 5% del contenido de los genes y son componentes esenciales de todas las formas de vida en la tierra, incluyendo procariotas, hongos, plantas y animales (Krishna, 2005).

Las proteasas catalizan diversas reacciones metabólicas (Sandya *et al.*, 2004) y desempeñan un papel fundamental en muchos procesos fisiológicos y patológicos como el catabolismo de proteínas, coagulación de la sangre, el crecimiento y migración celular, la adaptación de tejidos, morfogénesis en desarrollo, inflamación, liberación de

hormonas y péptidos farmacológicamente activos como precursores de proteínas y en el transporte de proteínas secretoras a través de las membranas (Rao *et al.*, 1998).

IV.13.1. Proteólisis

La proteólisis se define como la hidrólisis de proteínas y polipéptidos, que resulta en la producción de péptidos más pequeños y aminoácidos; en células eucarióticas esta reacción está catalizada por enzimas denominadas proteasas (Fig. 6) (Hirsch *et al.*, 1989).

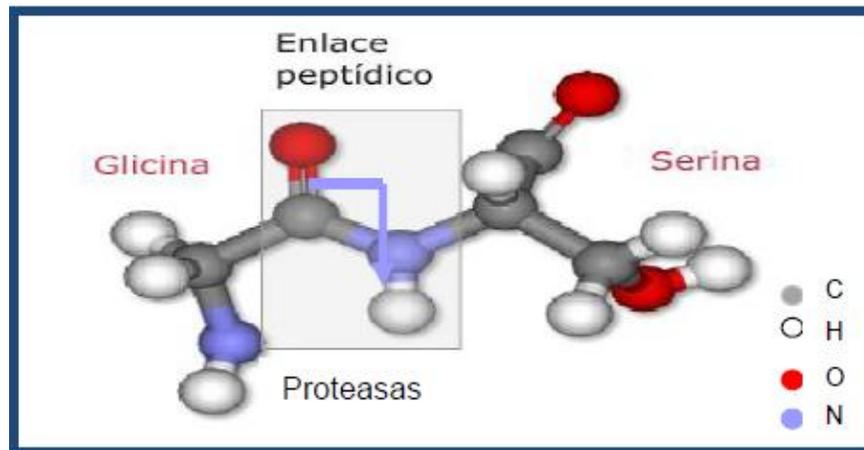


Figura 6. Participación de las proteasas en la hidrólisis de proteínas (Modificado de Mercados, 2004)

La proteólisis juega un papel clave en el recambio de proteínas endógenas, así como en el control de diversas funciones fisiológicas tales como, la digestión de proteínas, maduración de hormonas, respuesta inmune, inflamación, coagulación, fertilización, germinación y otros procesos morfogénicos (Holzer y Heinrich, 1988). Algunas proteasas son importantes en esporulación, germinación, patogenicidad de diversos microorganismos y pueden participar en la regulación post-traducciona (Suárez *et al.*, 1991).

IV.13.2. Clasificación de las proteasas

Debido a la gran diversidad de acción y estructuras, las proteasas no pueden ser clasificadas con el sistema general de nomenclatura enzimática, por ello se clasifican con base en diferentes criterios: tipo de reacción catalizada (exopeptidasas y

endopeptidasas) (Rao *et al.*, 1998) (Tabla 1); de acuerdo con el aminoácido o metal que posean en su sitio activo (serina proteasas, cisteína proteasas, aspartil proteasas y metaloproteasas) (Hartley, 1960) (Fig. 7); por su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico) (Guadix *et al.*, 2000); de acuerdo al pH óptimo al cual se realiza la reacción con el sustrato (proteasa ácidas, neutrales y alcalinas) (Sandhya *et al.*, 2005); especificidad del sustrato (colagenasa, keratinasa, elastasa, etc.) o por su homología con proteínas bien estudiadas como tripsina y pepsina, etc. (proteínas semejantes a tripsina y pepsina).

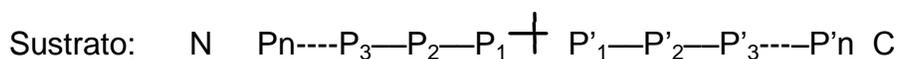
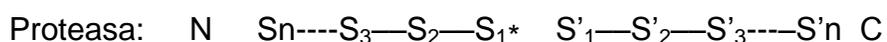


Figura 7. Sitio activo de las proteasas. * Indica el sitio catalítico de las proteasas. † Indica el enlace escindible. S1 a Sn y S1' a Sn' son los subsitios específicos de la enzima. P1 a Pn y P1' a Pn' son los residuos sobre el sustrato ordenados por los subsitios sobre la enzima.

Cuadro 1. Clasificación de proteasas de acuerdo al tipo de reacción que catalizan (Rao *et al.*, 1998)

Proteasas	Modo de acción	No. EC.
Exopeptidasas		
Aminopeptidasas		3.4.11
Dipeptidil peptidasa		3.4.14
Tripeptidil peptidasa		3.4.16 -3.4.18
Carboxipeptidasas		3.4.16
Proteasa tipo serina		3.4.17
Metaloproteasa		3.4.18
Proteasa tipo cisteína		3.4.15
Peptidil dipeptidasas		3.4.13
Dipeptidasas		3.4.19
Omega peptidasas		3.4.19
Endopeptidasas		3.4.21-3.4.34
Serina proteasa		3.4.21
Cisteína proteasa		3.4.22
Proteasas aspárticas		3.4.23
Metaloproteasa		3.4.24
Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido		3.4.99

○ Representan residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. ● Indican aminoácidos terminales.
* Extremo bloqueado. ↓ Representan los sitios de acción de las enzimas.

IV.13.2.1. De acuerdo al tipo de reacción que catalizan

Las proteasas se dividen principalmente en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas dependiendo de su sitio de acción.

Exopeptidasas. Son enzimas que hidrolizan exclusivamente enlaces peptídicos situados en el extremo amino o carboxilo de la cadena polipeptídica, liberando los aminoácidos terminales de la proteína. Según Suárez y Wolf (1988), este grupo comprende:

Aminopeptidasas (L-aminoacil péptido hidrolasas EC 3.4.11). Catalizan la reacción de liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino terminal.

Carboxipeptidasas (Peptidil aminoácido hidrolasas EC. 3.4.12). Catalizan la liberación secuencial del aminoácido del extremo carboxilo terminal.

Dipeptidasas (Dipéptido hidrolasas EC 3.4.13). Hidrolizan dipéptidos con sus grupos aminos y carboxilos libres.

Dipeptidilaminopeptidasas (Dipeptidil péptido hidrolasas EC 3.4.15). Liberan dipéptidos en el extremo amino terminal.

Endopeptidasas. Se caracterizan por su acción preferencial en los enlaces peptídicos localizados en las regiones internas de la cadena polipeptídica, alejados del extremo N y C terminal. La presencia del grupo amino o carboxilo libre tiene una influencia negativa sobre la actividad de la enzima. Las endopeptidasas son divididas dentro de cuatro subgrupos basados en su mecanismo catalítico: serina proteasas, proteasas aspárticas, cisteína proteasas y metaloproteasas (Hartley, 1960).

Serín-proteasas (EC 3.4.21): Poseen un residuo de serina en el sitio activo y frecuentemente son activas en un intervalo de pH de ocho a 12, por lo que se denominan proteasas alcalinas, son inhibidas específicamente por diisopropilfluorofosfato y otros organofosforados.

Cisteín-Proteasas (EC 3.4.22): También llamadas sulfhidril-proteasas, tiol proteasas o cisteína proteasas. Tienen un residuo de cisteína en su sitio activo y son más sensibles a los agentes mercuriales.

Aspartil proteasas (EC 3.4.23): Comúnmente conocidas como proteasas ácidas pertenecen al grupo de las endopeptidasas y la actividad catalítica depende de residuos de ácido aspártico. Estas enzimas se inhiben con pepstatina y poseen uno o más grupos carboxilo en su sitio activo.

Metaloproteasas (EC 3.4.24): Requieren iones metálicos divalentes para su actividad. Estas enzimas son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA (Whitaker, 1994; Rao *et al.*, 1998) y son más activas a pH neutro, por lo que también se denominan proteasas neutras (Reyes *et al.*, 2011)

IV.13.2.2. De acuerdo al pH óptimo

Las proteasas también se distinguen por la ausencia o presencia de grupos cargados en posiciones relacionadas al enlace susceptible y son clasificadas de acuerdo a su pH óptimo en: proteasas alcalinas, proteasas ácidas y proteasas neutras (Cuadro 2) (Sumantha *et al.*, 2006b).

Proteasas alcalinas: Las proteasas activas en un intervalo de pH de 8 a 13, contienen de 420 a 480 residuos de aminoácidos. Seis de ellas pertenecen a la familia subtilasa o S8 de serina proteasas (Rao *et al.*, 1998).

Proteasas ácidas. También llamadas proteasas aspárticas, tienen actividad entre pH 2 y 6. Este grupo incluye principalmente proteasas aspárticas y también a algunas cisteína proteasas y metaloproteasas. Contienen alrededor de 380 a 420 aminoácidos y tienen diferentes residuos de aminoácidos que constituyen el sitio activo.

Proteasas neutras. Las proteasas neutras son activas a valores de pH neutro, levemente alcalino y levemente ácido. Sin embargo, en condiciones ácidas la actividad de estas enzimas disminuye. En este grupo se incluyen las cisteína proteasas, metaloproteasas y algunas serina proteasas (Rao *et al.*, 1998).

Cuadro 2. Proteasas seleccionadas por alineamiento múltiple (Rao *et al.*, 1998)

Acceso SWISS PROT/PIR	Número de residuos de aminoácidos	Tipo de proteasas	Residuo(s) sitio activo
Proteasas ácidas			
CYS2_HORVU	373	C1/papaína (cisteína)	C158 H297, N318
HRTD_CROAT	414	M12B (metaló)	E311
GPR_BACME	371	U3 (aspártico)	D89, D258
ASPP_AEDAE	395	Lisosomal (aspártico)	D96, D258
CARP_CANTR	390	Candidapepsina (aspártica)	D96, D258
CARP_SACFI	390	Saccharopepsina (aspártica)	D96, D258
PEPC_RAT	382	Gastricsina (aspártica)	D96, D258
PEP2_MACFU	378	Pepsina A (aspártica)	D96, D258
Proteasas Neutras			
PRCA_THEAC	233	PS	U
PRC3_YEAST	250	PS	U
PRC6_SCHPO	259	PS	U
PRC2_ORYSA	270	PS	U
PRC6_ARATH	250	PS	U
PRC6_DICDI	250	PS	U
PRC8_CAEEL	259	PS	U
PRC6_DROME	249	PS	U
PRC3_XENLA	233	PS	U
CANS_BOVIN	263	C2/calpaína (cisteína)	U
CANS_PIG	266	C2/calpaína (cisteína)	U
TRYT_CANFA	275	S1/tripsina (serina)	H74, D121, S191
TRYB_HUMANS	275	S1/tripsina (serina)	H74, D121, S191
SNPA_STRLI	237	M7 (metaló)	E64
Proteasas alcalinas		Proteasa semejante a	
JC6052	355	tripsina	H91, D126, S201
EYLA_BACAO	380	S8/subtilasa	D120, H150, S302
SUBT_BACST	381	S8/subtilasa	D120, H150, S302
PRTK_TRIAL	384	S8/subtilasa	D120, H150, S302
ALP_TRIHA 409	409	S8/subtilasa	D120, H150, S302
ALP_CEPAC	402	S8/subtilasa	D120, H150, S302
ORYZ_ASPFL	403	S8/subtilasa	D120, H150, S302
ORYZ_ASPFU	403	S8/subtilasa	D120, H150, S302
I50494	410	Inhibidor serina proteasa	U

Clave de los nombres de entrada de las proteasas ácidas: CYS2_HORVU, *Hordeum vulgare*; HRTD_CROAT, *Crotalus atrox*; GPR_BACME, *Bacillus megaterium*; ASPP_AEDAE, *Aedes aegyptii*; CARP_CANTR, *Candida tropicalis*; CARP_SACFI, *Saccharomycopsis fibuligera*; PEPC_RAT, *Rattus norvegicus*; PEP2_MACFU, *Macaca fuscata*. Las secuencias son numeradas de acuerdo a la cisteína proteasa de *Hordeum vulgare*. Clave de las secuencias de las proteasas neutras: PRCA_THEAC, *Thermoplasma acidophilum*; PRC3_YEAST, *Saccharomycopsis fibuligera*; PRC6_SCHPO, *Schizosaccharomyces pombe*; PRC2_ORYSA, *Oriza sativa*; PRC6_ARATH, *Arabidopsis Thaliana*; PRC6_DICDI, *Dictyostelium discoideum*; PRC8_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*; PRC6_DROME, *Drosophila melanogaster*; PRC3_XENLA, *Xenopus laevis*; CANS_BOVIN, *Bos taurus*; CANS_PIG, *Sus scrofa*; TRYT_CANFA, *Canis familiaris*; TRYT_HUMAN, *Homo sapiens*; SNPA_STRLI, *Streptomyces lividans*. Las secuencias son numeradas de acuerdo a las proteasas *Thermoplasma*: PS, Proteosoma subunido; U, desconocido. Clave de las secuencias de las proteasas alcalinas: JC6052, *Escherichia coli*; EYLA_BACAO, *Bacillus amyloliquefaciens*; SUBT_BACST, *Bacillus subtilis*; PRTK_TRIAL, *Tritirachium album* Limber; ALP_TRIHA, *Tritirachium harzianum*; ALP_CEPAC, *Cephalosporium acremonium*; ORYZ_ASPFL, *Aspergillus flavus*; ORYZ_ASPFU, *Aspergillus fumigatus*; I50494, *Cyprinus carpio*. Los residuos son numerados de acuerdo a la proteasa de *E. coli*.

IV.13.2.3. Según su origen

Las proteasas son fisiológicamente necesarias para todos los organismos vivos y se encuentran en una amplia diversidad de fuentes tales como plantas, animales y microorganismos (Rao *et al.*, 1998).

Proteasas de plantas

El uso de plantas como una fuente de proteasas, se rige por varios factores como la disponibilidad de tierras para el cultivo y la adecuación de las condiciones climáticas para el crecimiento. Sin embargo, la producción de proteasas de plantas es un proceso que consume tiempo. La papaína, bromelina, keratinasas y ficina representan a algunas de las proteasas bien conocidas de origen vegetal (Rao *et al.*, 1998).

Papaína. La papaína es una proteasa de una planta tradicional y tiene una larga historia de uso. Esta enzima es extraída del látex de los frutos de *Carica papaya*. La preparación cruda de la enzima tiene una especificidad más amplia debido a la presencia de varias proteinasas e isoenzimas de la papaína. El rendimiento de la enzima depende de la fuente de planta, condiciones climáticas de crecimiento y el método usado para su extracción y purificación. La enzima es activa a un valor de pH entre 5 y 9, y es estable a 80 o 90°C en presencia de substratos. Es ampliamente usado en la industria para la preparación de hidrolizados de proteínas saborizantes y altamente solubles.

Bromelina. Es una enzima preparada a partir del tallo y jugo de la piña. La enzima es caracterizada como una cisteína proteasa, es activa a pH entre 5 y 9. La temperatura de inactivación es a 70°C, la cual es más bajo que la de la papaína.

Keratinasas. Algunos de los grupos botánicos de plantas producen proteasas que degradan el cabello. La digestión del cabello y la lana es importante para la producción de aminoácidos esenciales tales como lisina, así como la prevención de la obstrucción de aguas residuales.

Proteasas de origen animal

Las proteasas más conocidas de origen animal incluyen: tripsina pancreática (aparato digestivo intestinal), quimotripsina (páncreas), pepsina (estómago) y renina (estómago de mamíferos lactantes) (Boye *et al.*, 1992; Hoffman, 1974). Dichas enzimas son producidas de forma pura y a gran escala; sin embargo, su producción depende de la disponibilidad del ganado para su sacrificio, lo cual es regido por leyes políticas y agrícolas (Rao *et al.*, 1998).

Tripsina. Tripsina (*Mr* 23,300) es la enzima principal del aparato digestivo intestinal responsable de la hidrólisis de proteínas de los alimentos. Es una serina proteasa, hidroliza enlaces peptídicos cuyos grupos carboxilo pertenecen a residuos de los aminoácidos lisina y arginina. Con base en la habilidad de los inhibidores de proteasas para inhibir la enzima del intestino de los insectos, esta enzima ha recibido atención como blanco en el control biológico de plagas de insectos. La Tripsina tiene aplicaciones limitadas en la industria alimentaria, ya que los hidrolizados de proteínas generadas por su acción resultan ser sumamente amargos. La tripsina se utiliza en la preparación de medios bacterianos y en algunas aplicaciones médicas especializadas (Rao *et al.*, 1998).

Quimotripsina. Quimotripsina (*Mr* 23,800) se encuentra en el extracto pancreático de los animales. La quimotripsina pura, es una enzima costosa y sólo se utiliza para aplicaciones diagnósticas y analíticas. Esta enzima es específica para la hidrólisis de enlaces peptídicos cuyos grupos carboxilos son proporcionados por uno de los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, o triptófano). Se almacena en el páncreas en forma de un precursor conocido como quimotripsinógeno, y es activado por la tripsina en un proceso de múltiples pasos (Rao *et al.*, 1998).

Pepsina. La pepsina (*Mr* 34,500) es una proteasa ácida que se encuentra en el estómago de casi todos los vertebrados. La enzima activa es liberada a partir de su zimógeno, por ejemplo pepsinógeno, por autocatálisis en la presencia de ácido clorhídrico. La pepsina es una aspartil proteasa y se asemeja a la proteasa del virus de

la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), responsable de la maduración del VIH-1. La enzima muestra una actividad óptima entre pH 1 y 2, mientras que el pH óptimo del estómago es de 2 a 4. La pepsina se inactiva a valores de pH superiores a 6.0. La enzima cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos entre dos aminoácidos hidrofóbicos (Rao *et al.*, 1998).

Renina. El cuajo es una proteasa semejante a la pepsina (renina, quimosina; EC 3.4.23.4) que es producida como un precursor inactivo, prorrenina, en el estómago de todos los mamíferos lactantes. Esta enzima es convertida a renina activa (*Mr* 30,700) por la acción de la pepsina o por su autocatálisis. Se utiliza ampliamente en la industria láctea para producir queso firme con buen sabor. La naturaleza especializada de la enzima es debido a su especificidad de escisión de un único enlace peptídico en la k-caseína para generar *para*-k-caseína insoluble y glucopéptido C-terminal (Rao *et al.*, 1998).

Proteasas microbianas

La incapacidad de las proteasas de plantas y animales para satisfacer la demanda mundial actual ha llevado a un creciente interés en las proteasas microbianas. Los microorganismos representan una excelente fuente de enzimas debido a su amplia diversidad bioquímica y su susceptibilidad a la manipulación genética. La tecnología enzimática microbiana ocupa un papel importante dentro de la biotecnología, específicamente en el sector alimentario, farmacéutico y salud (Carrillo *et al.*, 2008) y representan una proporción de dos tercios de la producción comercial de proteasas en el mundo (Kumar y Takagi, 1999), las cuales son intracelulares y/o extracelulares.

Las proteasas intracelulares son importantes para diversos procesos celulares y metabólicos, como la esporulación y la diferenciación, recambio proteico, maduración de enzimas y hormonas, así como el mantenimiento de la concentración proteínica. Las proteasas extracelulares son importante para la hidrólisis de proteínas en ambientes libres de células y permiten a la célula absorber y utilizar los productos de hidrólisis (Kalisz, 1988). Así mismo, estas proteasas extracelulares han sido explotadas comercialmente para ayudar a la degradación de proteínas en varios procesos

industriales (Kumar y Takagi, 1999; Outtrup y Boyce, 1990). Las proteasas microbianas comparadas con las enzimas de origen vegetal y animal, poseen casi todas las características deseables para su aplicación biotecnológica (Rao *et al.*, 1998).

Bacterias. La mayoría de las proteasas comerciales, sobre todo neutrales y alcalina, son producidas por organismos pertenecientes al género *Bacillus*. Las proteasas bacterianas neutras son activas en un intervalo estrecho de pH (pH 5 a 8) y tienen termotolerancia relativamente baja. Debido a su tasa de reacción intermedia, las proteasas neutras generan menos amargor en los hidrolizados de proteínas de los alimentos que las proteasas de origen animal, y por lo tanto son valiosas para su uso en la industria alimentaria.

Virus. Las proteasas virales han cobrado importancia debido a su implicación funcional en el procesamiento de proteínas de virus que causan ciertas enfermedades mortales como el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (SIDA) y el cáncer. Las serina, aspártico y cisteína peptidasas se encuentran en diversos virus (Rawlings y Barret, 1993). Todas las peptidasas codificadas por virus son endopeptidasas no metalopeptidasas. Las aspartil proteasas retrovirales que son requeridas para el ensamble y replicación viral son homodímeros y son expresadas como una parte de la poliproteína precursora. La proteasa madura es liberada por autólisis del precursor.

Hongos. Los hongos elaboran una variedad más amplia de enzimas que las bacterias. Por ejemplo, *Aspergillus oryzae* produce proteasas ácidas, neutras y alcalinas. Las proteasas fúngicas son activas en un intervalo amplio de pH (pH 4 a 11) y muestran una amplia especificidad por el sustrato. Sin embargo, dichas proteasas tienen una velocidad de reacción más baja y peor tolerancia al calor que las enzimas bacterianas. Las enzimas fúngicas se pueden producir convenientemente en un proceso de FES. Las proteasas ácidas de origen fúngico tienen un pH óptimo entre 4 y 4.5 y son estables entre pH 2.5 y 6.0. Son particularmente útiles en la industria quesera, debido a su estrecha especificidad de pH y temperatura. Las proteasas neutras de origen

fúngico son metaloproteasas que son activas a pH 7.0 y son inhibidas por agentes quelantes. Las proteasas alcalinas fúngicas se utilizan también en la modificación de alimentos ricos en proteínas.

Actualmente una gran proporción disponible de las proteasas comerciales son derivadas de cepas de origen fúngico (Kembhavi *et al.*, 1993) y la producción masiva de enzimas ha sido reportada en *Aspergillus niger* (Bosmann, 1973), *A. nidulans*, *A. nidulans* (Stevens y Stevens, 1980), *A. clavatus* ESI (Hajj *et al.*, 2007;2008), *A. flavus* (Hossain *et al.*, 2006), *Penicillium* spp (Sawada, 1963; Tomodo *et al.*, 1964) y especies de *Rhizopus* (Kumar *et al.*,2005), *Mucor pusillus*, *M. miehei* (Osorio *et al.*, 2008), *M. pusillus* Lindt (Somkuti y Babel, 1997), *M. circinelloides f.circinelloides*, *M. circinelloides f. griseocyanus*, *M. circinelloides f. janssenii*, *M. circinelloides f. lusitanicus*, *M. genevensis*, *M. hiemalis f. hiemalis*, *M. hiemalis f. luteus*, *M. piriformis f. piriformis*, *M. piriformis f. nanus*, *M. racemosus f. chibinensis*, *M. subtilissimus*, *M. variosporus*, *M. carbonaceus* (Alves *et al.*, 2005) y en especies de cepas mutantes de *Penicillium* (Chkireb *et al.*, 2009). Los factores nutricionales y los factores físicos, como la concentración de inóculo (Kaur *et al.*, 1998), temperatura y pH (Tobe *et al.*, 2005) pueden afectar la producción de proteasas.

IV.13.3. Proteasas aspárticas

Las proteasas aspárticas (EC.3.4.23) también conocidas como proteinasas, proteinasas aspárticas, endoproteasas, endoproteinazas y proteasas ácidas, son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Estas enzimas han sido aisladas y caracterizadas de animales, plantas, bacterias y hongos (Davies, 1990; Rawlins y Barret, 1995; Wu y Hang, 1998). Todas las proteinasas son activas a pH ácido, contienen dos residuos aspárticos en su sitio activo (Fig. 8), y específicamente son inhibidas por pepstatina A (Rawlins y Barret, 2004). En la mayoría de las proteinasas aspárticas, los residuos catalíticos Asp están contenidos en el motif común Asp-Thr-Gly en ambos lóbulos de la enzima, pero las proteinasas aspárticas de plantas contienen Asp-Ser-Gly en uno de los sitios. Las diversas funciones de algunas proteinasas aspárticas incluye la degradación de proteínas por pepsina y quimosina, procesamiento de proproteína por catepsina D, renina y laproteinasa aspártica A de *Saccharomyces*

cerevisiae (Davies, 1990, Rawlings y Barret, 1995), así como el procesamiento de la poliproteína por la proteinasa aspártica del virus del SIDA.

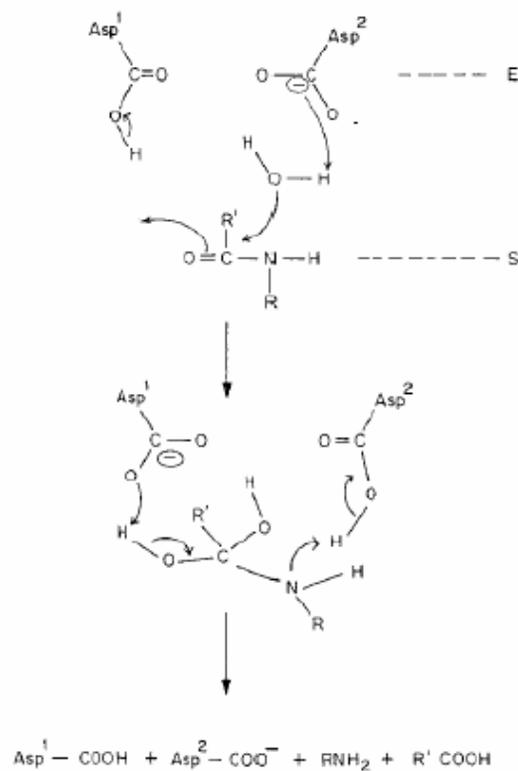


Figura 8. Mecanismo de acción de las proteasas aspárticas (Rao *et al.*, 1998)

Se ha reportado un considerable número de especies de *Aspergillus* productoras de proteasas ácidas, tales como *Aspergillus niger*, *A. orizae* (Tsujiya y Endo, 1978), *A. awamori* (Moralejo *et al.*, 2002), *A. fumigatus* (Reichard *et al.*, 1995) y *A. saitoi* (Tello y Hernández, 1995), entre otros. Estas enzimas son predominantemente extracelulares, aislados en forma activa a partir del medio de cultivo y algunas de ellas están comercialmente disponibles (Rao *et al.*, 1998).

Muchas proteasas ácidas fúngicas llamadas aspergillopepsina han sido purificadas y caracterizadas a partir de cepas de *Aspergillus* (Ishishima, 2004; Percin *et al.*, 2009). Su peso molecular va de 30 a 40 kDa y su máxima actividad a pH de 3.0 a 4.0 (Rao *et al.*, 1998).

Aspergillus niger, produce cinco endopeptidasas diferentes (Van den Hombergh *et al.*, 1997), dos carboxipeptidasas (Dal Degan *et al.*, 1992) y una aminopeptidasa (Basten *et*

al., 2001). Las dos proteasas ácidas extracelulares denominadas proctases A y B. La Proctase A (20 kDa), es una proteasa de tipo no pepsina que no es inhibida por pepstatina (Takahashi *et al.*, 1991). La proctase B o aspergillopepsina I (35 kDa), es inhibida por pepstatina perteneciente a la familia A1 de proteasas (Inoue *et al.*, 1995; 1996).

También se ha purificado y caracterizado una proteasa ácida en *Rhodotorula glutinis* K-24 (Kamada *et al.*, 1972). La levadura *Saccharomyces carlsbergensis* ha sido reportada secretar cuatro diferentes proteasas, cada una con doble pH óptimo: un pH ácido entre 2 y 4, y otro pH cercano a la neutralidad entre pH 6 y 8 (Maddox y Hough, 1970). Abdehl *et al.* (1977), reportó que *Yarrowia lipolytica* 37-1 cuando se cultivaba con caseína a pH 3.2, produjo proteasas ácidas extracelulares activas a pH 3.2. *Yarrowia lipolytica* (Tobe *et al.*, 1976) y *Candida olea* (Nelson y Young, 1987) también se han reportado como levaduras productoras de proteasas ácidas secretadas, con un intervalo de masa molecular de 30 a 45 kDa y pH óptimo variable desde 2.5 a 3.9. La levadura psicotrófica, dimórfica *Candida humicola* aislada de suelos antárticos secreta una proteasa ácida con una masa molecular de 36 kDa. Sin embargo, su pH óptimo (pH 1.0) parece ser mucho más bajo que los reportados para otras levaduras (Ray *et al.*, 1992).

IV.13.4. Aplicaciones de las proteasas

Las proteasas tienen diversas aplicaciones en una amplia variedad de industrias tales como, detergente, alimentos, farmacéutica, seda (Siala *et al.*, 2009), procesamiento de pieles, carnes, preparación de fertilizantes y materia orgánica, en la producción de hidrolizado de proteínas (Vairo *et al.*, 2008; Ubalde y Cantera, 2002) y para la recuperación de la plata utilizada en películas de rayos X (Mala *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1999; Chellappan *et al.*, 2006).

Las proteasas con alta actividad y estabilidad en el intervalo de pH ácido tienen importantes aplicaciones industriales, especialmente en la industria de procesamiento de alimentos, principalmente en la industria láctea como agentes coagulantes de la leche en la fabricación de queso (Sumantha *et al.*, 2006a), así como para mejorar el

sabor de los alimentos (Ishibashi *et al.*, 1988).

Además de su aplicación industrial y medicinal, las proteasas son importantes en la investigación básica. Su selectividad en la escisión del enlace peptídico se utiliza en la dilucidación de la relación estructura-función, síntesis de péptidos y secuenciación de proteínas (Rao *et al.*, 1998).

IV.13.5. Fermentación en estado sólido (FES)

El empleo de residuos lignocelulósicos como fuente energética, constituye un reto debido al gran volumen de residuos que se producen anualmente y al alto contenido de fibra que poseen, característica que hace disminuir considerablemente la digestibilidad en los animales. Recurrir a los clásicos métodos físico-químicos para minimizar los niveles de fibra, representa incurrir en gastos de materiales y recursos frente a una nueva y sostenible alternativa, como es el uso de microorganismos para disminuir los niveles de fibra y enriquecer el contenido proteico de los desechos lignocelulósicos (Ravelo *et al.*, 2002).

En la industria azucarera, el principal producto de la fracción insoluble de la caña de azúcar después de extraído el jugo, es el bagazo. Este subproducto representa cerca del 25% de la caña cultivada, destinándose básicamente a sustituir combustible fósil (Ravelo *et al.*, 2002). De esta forma, en la operación industrial se puede disponer entre un 10 y 40% de bagazo sobrante en función de la eficiencia energética y de los esquemas que se apliquen para producir azúcar crudo (Figueroa y Ly, 1990).

Los derivados fibrosos de la caña de azúcar, después de ser sometidos a diversos tratamientos para mejorar su palatabilidad (Martín, 1981; Cabello, 1986) se utiliza en la alimentación de los rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos).

En animales monogástricos (cerdos, aves y conejos) el uso de estos alimentos está limitado por su elevado contenido de fibra bruta y por su escaso valor en proteína. Por este motivo la ración tradicional de los monogástricos, e incluso la de muchos rumiantes, está compuesta mayoritariamente por cereales y granos proteicos, lo que establece una trágica e insostenible competencia con la alimentación del hombre. Todo ello hace que la búsqueda de alternativas que promuevan el uso de materias primas

que no compitan con la alimentación del hombre sea una imperiosa necesidad (Pedraza, 2000).

El bagazo de caña de azúcar (BCA) es uno de los mayores subproductos lignocelulósicos agroindustriales; se compone aproximadamente de celulosa (50%), hemicelulosa (25%) y lignina (25%) (Soccol *et al.*, 2003), los cuales pueden ser utilizados para la producción microbiana de celulasas y xilanasas (Bhat 2000).

Se han realizado varios estudios sobre el uso del bagazo de caña en la producción de celulasa bajo los sistemas de FEL y FES (De Paula *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2000).

El pre tratamiento del BCA es necesario para reducir su recalcitrancia para la hidrólisis enzimática. El pre-tratamiento del BCA puede ser con métodos físicos o químicos como ácido (Martin *et al.*, 2002), vapor de agua (Kaar *et al.*, 1998) o alcalino (Fox *et al.*, 1987; Holtzapple *et al.*, 1991). El ácido sulfúrico diluido ha sido ampliamente utilizado para pre tratar BCA (Van Zyl *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 2002) y resulta en la fracción de hemicelulosa que es liberada como pentosas tales como xilosa y arabinosa. Posteriormente, se requiere neutralizar el sistema, de lo contrario la subsecuente fermentación del hidrolizado puede ser seriamente inhibida.

V. JUSTIFICACIÓN

La moniliasis causada por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, es un problema fitosanitario que enfrentan las regiones cacaoteras de México. Esta enfermedad se localiza principalmente en Tabasco y Chiapas. Los centros de investigación del sureste del país, están estableciendo líneas de estudios enfocadas a este hongo, para entender su metabolismo y desarrollo, patogenicidad y aprovechamiento, así como para controlar este microorganismo. Por otro lado, se ha encontrado que los microorganismos producen una amplia variedad de enzimas extracelulares potencialmente útiles (Eliécer, 2003), los cuales son una fuente preferente de proteasas. Esto por su rápido crecimiento y la facilidad con que pueden ser manipulados genéticamente para generar nuevas enzimas con otras propiedades (Rao *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2008); además por su fácil cultivo en FES utilizando diversos desechos agrícolas.

Hasta el momento, no se ha reportado la producción de proteasas de *M. roreri* cultivado bajo FES empleando desechos agrícolas, sin embargo, la secuenciación del genoma de *Moniliophthora perniciosa*, reporta la presencia de genes que codifican proteasas secretadas (Mondego *et al.*, 2008). Por lo anterior, y dado que las proteasas aspárticas secretadas han sido muy estudiadas en hongos y tienen diversas aplicaciones en una amplia variedad de industrias, en el presente trabajo, se estudió el comportamiento de la biomasa y la cinética de producción de enzimas endoproteasas ácidas (mrAe) del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* cultivado en el sistema FES, con bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado con la cepa MRO1 de *M. roreri* aislada por Sánchez *et al.* (2011).

VI.1. Medios de cultivo

El medio de cultivo empleado para la propagación y conservación de la cepa MRO1 de *M. roreri* fue el medio mineral mínimo en estado sólido, mismo que contenía lo siguiente:

Medio mineral: buffer de fosfatos ($1.54 \text{ gl}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0.26 \text{ gl}^{-1} \text{ HPO}_4$), sales minerales y microelementos ($2.0 \text{ gl}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $0.4 \text{ gl}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, $0.15 \text{ gl}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.02 \text{ gl}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.02 \text{ gl}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.02 \text{ gl}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), solución de hierro ($0.15 \text{ gl}^{-1} \text{ Fe}(\text{NH}_4)_2 \text{ SO}_4$), solución de calcio ($1.10 \text{ gl}^{-1} \text{ CaCl}_2$), 30 gL^{-1} glucosa, 2 gl^{-1} extracto de levadura y 2 gl^{-1} peptona.

El pH del medio de cultivo se ajustó a 6.0 con HCl. El medio sólido, se preparó agregando 2% de agar bacteriológico. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

VI.2. Composición del sistema de fermentación en estado sólido (FES)

La producción de enzima endoproteasa ácida (mrAe), biomasa celular y pH fueron determinados cada 24 horas durante todo el proceso de FES. Los ensayos se realizaron tres veces.

El sistema FES se realizó siguiendo la técnica de Maldonado y Strasser (1998) con modificaciones. La FES se desarrolló en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 g de medio de fermentación. El medio de fermentación contenía en g por 100g lo siguiente: urea 0.3, K_2HPO_4 0.65, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.26, MgSO_4 0.02, FeSO_4 0.029, bagazo de caña de azúcar (BCA) 24.6 y 70 ml de agua destilada, conteniendo 70% de humedad inicial. El pH se ajustó a 4.5. El BCA se tamizó y lavó con agua caliente para eliminar la sacarosa residual. El medio de cultivo y el BCA se esterilizaron por separado a 120°C durante 15 minutos. Una vez enfriadas, ambas fracciones se mezclaron.

VI.3. Preparación del pre-inóculo

La cepa MRO1 de *M. royeri* se cultivó en medio mínimo mineral en cajas de Petri hasta alcanzar 8.5 cm de diámetro (15 a 21 días). Con la finalidad de propiciar la germinación de las esporas y el crecimiento micelial del hongo, se prepararon cultivos pre-inóculos a partir de una suspensión de esporas, agregando 5 ml del medio de fermentación a cada caja Petri, y removiendo cuidadosamente los conidios con un pincel. La suspensión de esporas, se transfirió a un matraz de 500 ml con 100 g de medio de cultivo líquido e incubada a 28°C, en un agitador orbital a 150 rpm durante 24 h (Phillips-Mora, 2003b). Las esporas germinadas se contaron y se prepararon los matraces problema. Estos matraces se inocularon con una concentración de 1×10^6 esporas germinadas por gramo de materia seca. Todos los matraces problema y testigos (sin inocular) se incubaron a 28°C sin agitación y bajo condiciones naturales de luz y oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas cada 24 h, durante 30 días, a continuación el sobrenadante fue separado y usado como extracto enzimático extracelular. A dicho extracto fue se le determinó pH, proteína total y actividad enzimática de endoproteasas ácidas extracelulares (mrAe). Por otro lado, el material sólido fue usado en la determinación de la biomasa celular del hongo.

Las variables evaluadas fueron pH, actividad enzimática y biomasa de *M. royeri*

VI.4. Determinación del pH

La determinación del pH en el medio se realizó con un potenciómetro digital marca Conductronic PC 18.

VI.5. Determinación de la actividad enzimática de endoproteasa ácida

La actividad enzimática de endoproteasa ácida extracelular (mrAe) se determinó con 100 µl de extracto enzimático y 400 µl de albúmina sérica bovina al 1% (preparada en regulador de fosfato-ácido cítrico 0.01M pH 3.2), la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con 500 µl de ácido tricloroacético al 10% frío y posteriormente los tubos fueron centrifugados a 14,000 x g. La liberación de péptidos se determinó en el sobrenadante utilizando el método descrito por Micro-Lowry *et al.* (1951). Las lecturas se interpolaron en una curva de tirosina (Saheki y Holzer, 1975).

Una unidad de mrAe, se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación del equivalente a 1g de tirosina min^{-1} bajo las condiciones de ensayos descritas (Milewski *et al.*, 1994).

VI.6. Determinación de péptidos liberados por la técnica de Micro-Lowry

Para la determinación de péptidos liberados se adicionaron 200 μl de muestra en y 200 μl de una solución de reactivo A ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%, Na_2CO_3 4%, NaOH 1M, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.7%) en tubos de vidrio en agitación constante. Los tubos fueron incubados por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 1000 μl de reactivo Folin-agua en una proporción 1:20. La mezcla se incubó a 37 °C por 45 min y los péptidos liberados se leyeron a 660 nm (Micro-Lowry *et al.* 1951).

VI.7. Determinación de la proteína total

La concentración de proteína total fue determinada por la técnica de Micro Markwell, adicionando 300 μl de la muestra con agua destilada. Posteriormente, se adicionaron en agitación constante 1000 μl del reactivo A (Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4%, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.16%) más reactivo B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en una proporción de 1:100. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 100 μl de reactivo de Folin-agua proporción 1:1. La mezcla se incubó a 37 °C durante 45 min y los péptidos se leyeron a una longitud de onda de 660 nm.

VI.8. Determinación de la biomasa de *M. roreri*

La producción de biomasa de *M. roreri*, se determinó en los matraces problema. El micelio se cosechó cada 24 horas durante 30 días, empleando un sistema de filtración al vacío en un sistema Millipore y papel Whatman número 3. El micelio filtrado se secó en un horno Scorpion Cientific a 65°C durante 72 h. Finalmente, las muestras de los matraces problema y testigo, se pesaron en una balanza analítica Marca AE (Modelo AEP). La biomasa (g) de *M. roreri* fue el resultado del peso de la biomasa de la muestra problema menos el de la muestra testigo.

VI.9. Morfología de las esporas germinadas de *Moniliophthora roreri* cultivado en el sistema FES

La morfología de las esporas germinadas de *M. roreri* fue registrada cada 24 h durante todo el proceso de la FES, mediante observación al microscopio óptico compuesto. Las preparaciones fueron realizadas empleando la metodología de tinción simple con el colorante azul de lactofenol. Brevemente, la muestra del micelio del hongo fue colocada en un portaobjetos, se adicionó el colorante y colocado el cubreobjetos para su observación a 100x en el microscopio óptico (Carl Zeiss), equipado con cámara digital (Canon) y el software AxioVision 4.6.

VI.10. Diseño experimental

Para conocer la actividad enzimática del hongo *M. roreri* en la FES con bagazo de caña de azúcar, se usaron como inóculo esporas germinadas del hongo. El diseño estadístico fue completamente aleatorizado con arreglo factorial de tratamientos 2 x 30. El primer factor fue la inoculación (con o sin) en la FES del bagazo caña de azúcar, el segundo factor fue el tiempo de fermentación. El bagazo de caña inoculado se consideró como un tratamiento (problema) y se comparó contra la FES del bagazo de caña de azúcar sin inóculo (testigo). La comparación (experimento) se hizo durante 30 días con tres repeticiones por día. La unidad experimental fue un matraz Erlenmeyer de 150 ml conteniendo 50 ml del medio de cultivo con bagazo de caña inoculado y sin inocular.

Las variables evaluadas además de la actividad enzimática, fueron el pH y la biomasa. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y comparación múltiple de medias por el método de Tukey ($\alpha=0.05$), mediante el programa estadístico PROC GLM del SAS, versión 9.1 para Windows (SAS, 2009).

VII. RESULTADOS

Los resultados, mostraron el comportamiento del valor de pH, biomasa y actividad enzimática de mrAe de *M. roreri* MRO1 cultivado en el sistema FES usando bagazo de caña de azúcar como sustrato (Fig. 10). Los niveles de actividad enzimática fueron reportados como actividad enzimática específica en Umg^{-1} proteína total.

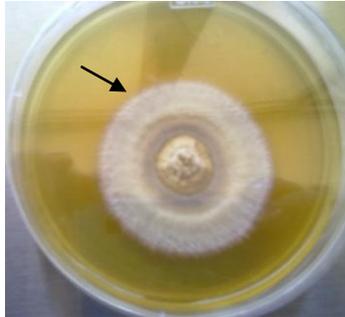


Figura 9. Morfología de *Moniliophthora roreri* MRO1 cultivado en medio mínimo mineral. La colonia de 15 días de aislamiento muestra un crecimiento radial y borde levemente levantado característico del hongo.

VII.1. pH

El valor del pH para el bagazo de caña inoculado con *M. roreri* MRO1 mostró un valor inicial de 6.03, incrementando a 6.11 para el día tres y a 6.28 para el día 15, para finalizar con un valor de pH 6.54. El testigo (Bagazo de caña sin inóculo), mostró un pH inicial de 6.0, subió a 6.11 al día 5 y finalizó con un valor de 6.0 al día 30. En general el pH no presenta cambios contrastantes durante los 30 días de evaluación.

El análisis de varianza no mostró efecto del inóculo en el pH durante la FES del bagazo de caña ($F_{29,59}=0.75$, $P=0.7807$); sin embargo, la comparación de medias de la prueba de Tukey ($P>0.05$) indicó diferencias entre el testigo y el problema (Cuadro 3). Al día 30 se presentó el valor más alto de pH. Sin embargo, la comparación de medias por días no indicó diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 3).

VII.2. Determinación de la actividad enzimática de endoproteasa ácida mrAe

La actividad específica de mrAe medida en Umg^{-1} proteína total fue detectada a partir del día siete de incubación con un valor inicial de 5.51. Valor que se incrementó diario hasta alcanzar 15.42 al día 16. Para el día 17 y 18, disminuyó a 14.75 y 14.93 Umg^{-1}

proteína total, respectivamente y volvió a aumentar a partir del día 19 hasta el día 24, alcanzando su máxima actividad con un valor de 24.69 U mg^{-1} proteína total. Finalmente presentó otra caída en su actividad a partir del día 25, finalizando con un valor de 13.02 U mg^{-1} proteína total el día 30 de incubación (Anexo 2).

Cuadro 3. Efecto de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con y sin inóculo y los días de fermentación en el cambio de pH

Factores	pH
Fermentación del bagazo de caña	
Sin inóculo	6.08a
Con inóculo	6.17b
EE \pm	0.03
Días de fermentación	

El análisis de varianza mostró efecto del tiempo de fermentación en la actividad enzimática de *M. roreri*. La comparación de medias indicó que los niveles más altos de actividad enzimática fueron estadísticamente superiores a partir del día 21 al 24. Al día 24 se alcanza el nivel más alto de actividad con un valor de 24.69 U mg^{-1} proteína total. No obstante este valor fue estadísticamente igual a los obtenidos en los días 19, 25, y 26.

VII.3. Determinación de la biomasa de *M. roreri*

La biomasa celular inició con un valor de 0.200 g y aumentó posteriormente a 24.1, al día 6 y disminuyó el día 7 a 0.202 g, para terminar con un valor de 0.263 g. El análisis de varianza mostró efecto del tiempo de fermentación del bagazo de caña de azúcar en la biomasa celular ($F_{1, 59}=47.52$, $P=0.0001$); sin embargo, la comparación de medias mostró que no hay diferencias en la biomasa durante los 30 días del sistema FES que duró el experimento (Cuadro 4).

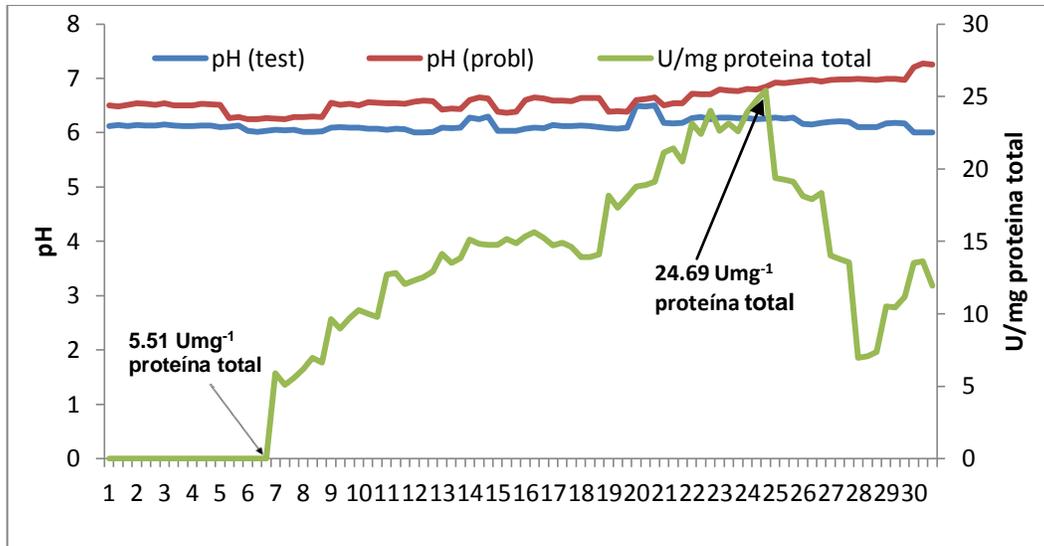


Figura 10. Comportamiento del pH y actividad enzimática específica de mrAe (Umg^{-1} de proteína total) de *M. royeri* MRO1 cultivado bajo FES, utilizando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.

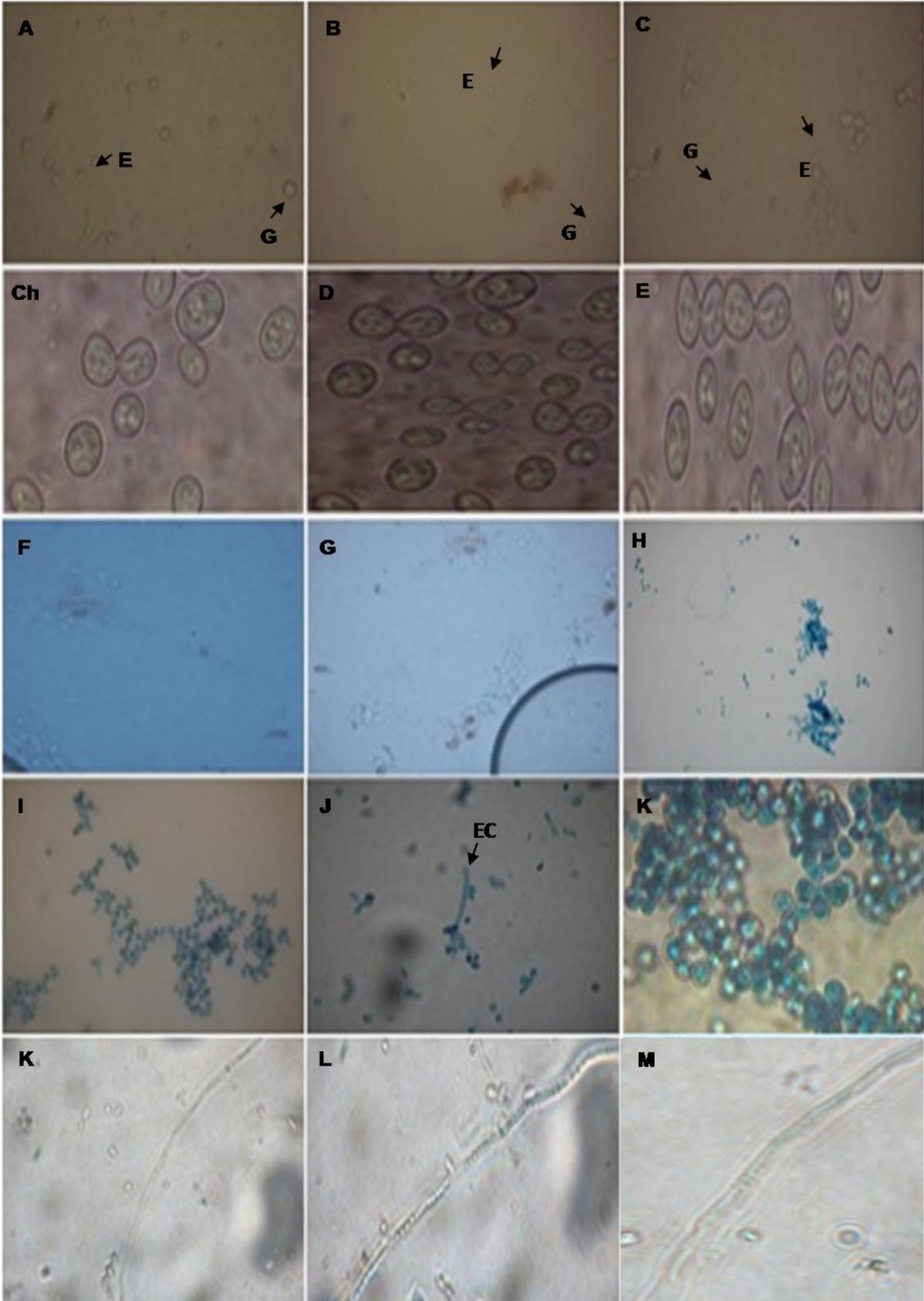
Cuadro 4. Efecto de los días de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con inóculo en la biomasa

Días de fermentación	Biomasa (g)
1	0.200a
2	0.202a
3	0.202a
4	0.206a
5	0.205a
6	0.241a
7	0.202a
8	0.200a
9	0.201a
10	0.201a
11	0.225a
12	0.223a
13	0.223a
14	0.225a
15	0.226a
16	0.233a
17	0.235a
18	0.240a
19	0.236a
20	0.240a
21	0.243a
22	0.246a
23	0.252a
24	0.255a
25	0.260a
26	0.260a
27	0.263a
28	0.265a
29	0.270a
30	0.263a
EE±	0.0006

Medias con diferentes letras difieren a $P > 0.05$ (Tukey, 1953).

VII.4. Morfología celular de las esporas germinadas de *Moniliophthora roreri* cultivado bajo FES

La morfología del hongo *M. roreri* MRO1 fue registrada cada 24 h durante todo el proceso del sistema de FES. Después de 24 h de incubación (día 1), se encontraron esporas germinadas, de formación basal, hialinas, en su mayoría de forma ovoide o elipsoidales (E) y pocas de tipo globosa (G) (Fig. 11A). Las células conservaron su forma hasta alrededor de los 12 días de incubación, cuando se observaron esporas formando cadenas e hifas hialinas en estado joven (Fig. 11A-K), sin septos (Fig. 11L-Rr) y septados (Fig. 11S) o pluriseptados en etapa avanzada (Fig. 11T-X), con conidióforos ramificados (Fig. 11X-Z) más o menos verticales, que dan lugar a cadenas maduras de conidios (Fig. 11Z).



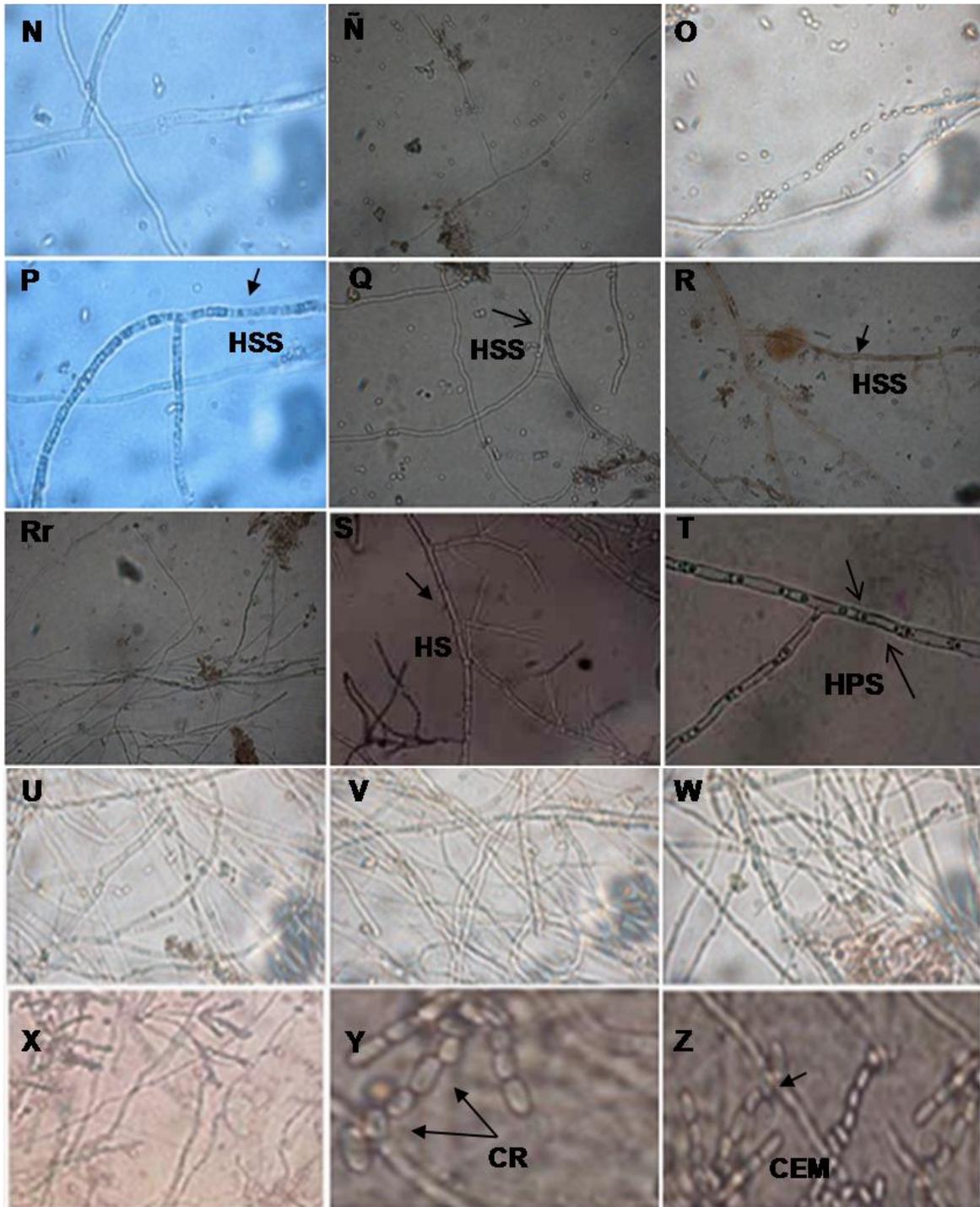


Figura 11. Estructuras conidiales formadas por *M. roleri* MRO1 cultivado en el sistema FES usando BCA como sustrato, durante 30 días de incubación. A-Z, indica los días 1 a 30 del sistema FES. Se observan: A-E) esporas germinadas, de formación basal, hialinas, en su mayoría de forma ovoide o elipsoidales (E) y pocas de tipo globosa (G). E-K) esporas formando cadenas (EC) e hifas hialinas en estado joven. L-M) hifas hialinas sin septos (HSS) y N) hifas hialinas septadas (HS). Ñ-X) hifas hialinas pluriseptadas (HPS) en etapa avanzada. Y-Z) conidióforos ramificados (CR) más o menos verticales. Z) conidióforos ramificados con cadenas de esporas o conidios maduros (CEM).

VIII. DISCUSIÓN

Moniliophthora roreri es el agente causal de la moniliasis del cacao, una enfermedad destructiva presente en nueve países del sur y Centroamérica y en México (Phillips-Mora, 2004). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la fitopatogenicidad del hongo y su planta hospedera, así como las actividades enzimáticas involucradas en la patogénesis. Así mismo, las enzimas proteolíticas en hongos fitopatógenos ha sido poco estudiado, existiendo solo algunos reportes en la literatura (Mercado *et al.*, 2003a; Pousserau *et al.*, 2001a).

En la presente investigación se observó que a medida que transcurre la fermentación, el valor de pH encontrado incrementó de un valor inicial de 6.03 a un valor final 6.54. Este comportamiento de pH, es semejante a lo encontrado en el ICA (s.f.) en Colombia (1979), quienes reportaron que *M. roreri* es capaz de crecer en medios con intervalos de pH de 3.5 a 8.0, siendo el óptimo de 5.0 a 6.5 para que el desarrollo micelial sea abundante, pero es capaz de crecer a pH de 7.0 y a medida que el hongo se desarrolla el pH del medio tiende a alcalinizarse.

La literatura describe la producción de proteasas extracelulares a partir de diversos hongos. Venera *et al.* (1997), reportan la caracterización y determinación de los parámetros cinéticos de una proteasa coagulante de la leche, a partir de *Mucor bacilliformis*. El pH óptimo de actividad de esta proteasa resultó ser de 3.0 y 3.5 para hemoglobina y caseína usados como sustrato proteolítico, respectivamente.

Siala *et al.* (2009) reportaron la producción, purificación y caracterización de una proteasa ácida extracelular a partir del hongo *Aspergillus niger* I1. Esta enzima fue óptimamente activa a pH 3.0 y la actividad enzimática disminuyó significativamente a valores de pH menores. Se han reportado valores óptimos de pH entre 3.0 y 5.5 para proteasas activas de otros hongos tales como *Penicillium camembertii*, pH 3.5 (Chrzanowska *et al.*, 1995) y *Rhizopus oryzae*, pH 5.5.

Kumar *et al.* (2005) también reportaron una actividad enzimática de 3,775.6 U mg^{-1} proteína total, a partir del extracto crudo, usando caseína como sustrato proteolítico, mientras que los resultados obtenidos en la presente investigación indican una actividad enzimática máxima de mrAe de 24.66 U mg^{-1} en el día 24 de la FES.

Mercado *et al.* (2003a), reportaron la actividad de dos proteinasas pumA y pumB en el hongo fitopatógeno y dimórfico *Ustilago maydis*. La proteinasa pumA fue determinada a nivel intracelular (pumAi) y extracelular (pumAe) con hemoglobina ácida desnaturalizada como sustrato. La actividad pumAe (78.53 mU/mg de proteína total), sólo fue detectada en células cultivadas en el medio mínimo YNB con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. La actividad específica empezó a incrementar después de 12 h de cultivo, y los valores máximos alcanzados después de 24 h permanecieron constantes durante la fase estacionaria. Bajo las condiciones antes mencionadas, el medio de cultivo se acidificó en función del tiempo de incubación, en contraste con el medio completo, en el cual el pH permaneció cerca de la neutralidad, dando lugar a la transición dimórfica levadura-micelio (Mercado *et al.*, 2003a). Estos resultados se contraponen a los obtenidos en el presente trabajo, en el cual el pH permaneció cercano a la neutralidad, dando lugar a la formación de micelio, mientras que los máximos niveles de actividad de mrAe alcanzaron un valor máximo de 24,690 mU/mg de Proteína total.

Los autores también reportaron ensayos de inhibición con pepstatina, inhibidor específico de aspartil proteasas. La proteinasa pumAi en su totalidad, mientras que pumAe fue inhibida en casi un 40%, en las dos cepas FB1 y FB2 de *U. maydis* (Mercado *et al.*, 2003a). Posteriormente, la pumAe fue purificada y caracterizada por los mismos autores, reportando que dicha endoproteasa es insensible a la pepstatina A, por lo que describen que el sitio activo de esta proteinasa ácida no aspartil pudiera ser diferente al de la familia de aspartil proteasas (Mercado *et al.*, 2003b).

En general, la determinación de actividad de proteinasas a partir de extractos crudos fresco, en diferentes hongos es difícil, debido a la presencia de inhibidores endógenos

que se unen fuertemente a sus proteinasas durante la desintegración celular (Schuet *et al.*, 1991). Es importante señalar que la metodología empleada fue muy acertada en la determinación de la actividad enzimática de mrAe; sin embargo, no se descarta la posibilidad de la presencia de inhibidores endógenos para esta endoproteasa.

Radha *et al.* (2011), estudiaron la producción y optimización de proteasas ácidas por *Aspergillus* spp cultivado bajo fermentación sumergida. La actividad de proteasa fue gradualmente incrementada de pH 3.0 a pH 5.0 y fue disminuida a pH neutro y alcalino. El pH del cultivo de fermentación después de 120 h de incubación disminuyó hasta 2.25. La proteasa ácida fúngica mostró un intervalo de pH óptimo de 4.0 a 4.5 y estable a valores de pH desde 2.5 a 6.0 (Cristóbal *et al.*, 2008). La producción máxima de enzima y masa seca fúngica fue observada a pH 5.0. De manera similar, Ganesh *et al.* (2008), reportaron que el pH óptimo fue en el intervalo de 5.5 a 6.5 para la producción de proteasa ácida a partir de especies de bacterias anaerobias Gram negativas del grupo Synergistes, cultivados con desechos sólidos de curtidurías.

Durante el transcurso de una fermentación, es imperativo seguir el patrón de crecimiento del organismo sobre su sustrato fermentativo y correlacionar dicho patrón de crecimiento del hongo con la producción del metabolito deseado por el microorganismo. Por lo anterior, la fermentación debe llevarse a cabo sólo hasta el momento en que ocurre la máxima producción de metabolitos (Sumantha *et al.*, 2008). Al respecto, se observó que la máxima producción de la enzima mrAe se encontró cuando *M. roreri* MRO1 presentaba su morfología en forma de hifas hialinas pluriseptadas en etapa avanzada.

Con estos resultados, se acepta la hipótesis planteada. Es decir, el hongo *M. roreri* MRO1 es capaz de producir actividad enzimática de endoproteasas ácidas extracelulares (mrAe) usando bagazo de caña de azúcar como sustrato mediante FES. Hasta el momento, no se han reportado estudios a cerca del comportamiento de *M. roreri* cultivado bajo FES empleando sustratos inductores de endoproteasas ácidas

extracelulares. Este trabajo constituye el primer reporte de la expresión de este tipo de enzimas en el hongo *M. roreri*, una importante línea de investigación sobre este tipo de enzimas.

La morfología de *M. roreri* concuerda con lo reportado por Thorold (1975), Kranz (1978) y Evans *et al.* (1978), Arguello 1990, López *et al.* (2006) y Suárez (2006), los cuales encontraron conidias globosas, hifas y conidias hialinas durante su estado joven; micelio hialino y brillante. Evans (1981) y Suárez (2004) reportan que las esporas son globosas, subglobosas y elípticas.

Con respecto a la biomasa el incremento de biomasa celular fue mínima durante los 30 días del sistema FES.

IX. CONCLUSIONES

1. El hongo *Moniliophthora roreri* MRO1 produce endoproteasa ácida extracelular (mrAe), con una actividad enzimática de 24.69 U mg^{-1} proteína total, pH de 6.09 y una biomasa de 0.255 g correspondiente al día 24 de incubación, cuando es cultivado en el sistema FES usando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor.
2. El valor de pH del medio de cultivo del sistema FES permaneció cercano a la neutralidad.
3. La morfología de *Moniliophthora roreri*, presentó esporas germinadas, de formación basal, hialinas, en su mayoría de forma ovoide o elipsoidales y globosas. Esporas formando cadenas e hifas hialinas en estado joven, sin septos, septados y pluriseptados y conidióforos ramificados.

X. PERSPECTIVAS

1. Ensayar la producción de enzimas mrAe por el hongo *M. roreri* MRO1, cultivado en el sistema FES con BCA como sustrato y diferentes valores de pH.
2. Determinar la actividad de mrAe de *M. roreri* cultivado en el sistema FES ensayando otros desechos agrícolas como sustrato inductor.
3. Purificar y caracterizar enzimas con actividad de endoproteasa ácida extracelular (mrAe).
4. Determinar el efecto del pH del medio sobre la morfología celular del hongo.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdehl, A. T. H., Kennedy, E. H. y Ahearn, D. G. 1977. *Journal of Bacteriology*. 130: 1125-1129.
- Acosta, L., Bustos, G. y Portugal, D. 1988. Aislamiento y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* y su cultivo en residuos agroindustriales en el Estado de Morelos, en *Revista Mexicana Micología*. 4: 13-20.
- Akcan, N. y Uyar, F. 2011. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. 5: 64-72.
- Alves, M. H., Campos, G., Okada, K., Ferreira, I. y Milanez, A. 2005. Detection of a extracelular protease in *Mucor* sp. *Iberoamericana de micología*. 22:114-117.
- Ampuero, C. E. 1967. Monilia pod rot of cocoa. *Cocoa Growers. Bulletin* 9:15-18.
- APROCACAHO (Asociación de productores de cacao en Honduras). 2003. Identificación y control de la moniliasis del cacao. *Fundación Hondureña de investigación agrícola*. 2-11 p.
- Aranzazu, F. 2000. Escoba de bruja en Colombia, su Impacto Económico y Manejo. In: Mejía F.L.A. y Arguello, C.O. (Compiladores). *Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción del Cacao*. Bucaramanga, Colombia: CORPOICA. 144 p.
- Arguello, O. 1990. Seminario Nacional de Actualización en Cacao con énfasis en la rehabilitación de plantaciones. Ministerio de Agricultura, Instituto Colombiano agropecuario. Subgerencias de Transferencia de Tecnología y de Investigación, ICA. Manizales. 27-29 p.
- Baker, R. E., Cope, F. W., Holliday, P. C., Bartley, B. G. y Taylor, D. J. 1954. The anglocolombian cacao collecting expedition. A report on cacao research. St. Augustine, Trinidad: Imperial Collage. 8-29 p.
- Barros, N. O. 1975. Influencia del pH en el crecimiento del hongo *Monilia rozeri* Cif. y Par. *Noticias Fitopatológicas*. 4:78-88.

- Barros, N. O. 1980. Historia de la moniliasis y sus repercusiones en los países productores de cacao en Sudamérica. In. Enríquez, G. A. (edit.) 1982. La moniliasis del cacao. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Serie técnica: Informe Técnico. 28: 14-17.
- Basten, D. E., Visser, J. y Schaap, P. J. 2001. Lysine aminopeptidase of *Aspergillus niger*. *Microbiology*. 147: 2045-50.
- Bermúdez, R. C., Traba, J., Verdecia, M. y Gross, P. 1994. Producción de *Pleurotus* sp. cfr. Florida sobre residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba, en *Micología Neotropical Aplicada*. 7: 47-50.
- Bermúdez, R. C., García, N., Gross, P., Serrano, M. 2001. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micología Aplicada International*. 8 (1): 25-29.
- Bhat, M. K. 2000. Celulasas and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol*. 18: 355-383.
- Bosmann, H. B. 1973. Protein catabolism. 11. Identification of natural and acidic proteolytic enzymes in *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Acta*. 293:476-89.
- Boye, K., Stummann, B. M. y Henningsen, K. W. 1992. cDNA cloning and sequencing of the bean yellow mosaic virus nuclear inclusion protein genes. *Plant Mol. Biol*. 18:1203-1205.
- Bowers, J. H., Bailey, B. A., Hebbbar, P. K., Sanogo, S. y Lumsden, R. D. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. Online. *Plant Health Prog*. doi:10.1094/PHP-0709-01-RV.
- Cabello, A. 1986. Caña de azúcar y alimentación animal. La industria de los derivados de la caña de azúcar. ICIDCA. Ed. Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 383-395 p.
- Calvo, L. y Sánchez, J. 1993. Producción de hongos comestibles en condiciones rústicas bajo un cacaotal y utilizando cáscara de coco como sustrato, *Proceed. 11 th. Int. Cocoa Res. Conf. Cocoa Producers Alliance, Yamoussoukro, Ivory Coast*. 18-24
- Campuzano, H. 1980. La moniliasis del cacao. *Cacatoterio Colombiano* 13:21-24.

- Capriles, R.L., s.f. 1977. Enfermedades del cacao en Venezuela. Fondo Nacional de Investigación Agropecuaria, Venezuela. 79 p.
- Carrillo, J., Salazar, M., Hernández, R., Huerta, S. y Prados, A. 2008. Caracterización de la cinética de producción proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido a partir de una cepa aislada de queso Philadelphia. Páginas sin números.
- Chekireb, D., Tahar, A. y Cochet, N. 2009. Acid protease production by isolated species of *Penicillium*. European journal of scientific research. 25(3):469-477.
- Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S.M., Elyas, K.K., Bhat, S.G., Chandrasekaran, M. 2006. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. Process Biochemistry. 41:956-961.
- Chou, C. C. y Rwan, J. H. 1995. Mycelial propagation and enzyme production in koji prepared with *Aspergillus oryzae* on various rice extrudates and steamed rice. J. Ferment. Bioengg. 79:509-512.
- Chrzanowska, J., Klaczkowska, M., Dryjanski, M., Stachowiak, D., Polanowski, A. 1995. Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: purification, properties and substrate specificity. Enzyme. Microb. Technol. 17:719-724.
- Couri, S., Terzi, S. C., Pinto, G. A., Freitas, S. P. y Costa, A. C. 2000. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. Process Biochem. 36:255-261.
- Cristobal, N. A., Gerardo, G. S., PLilia, A. B., Herrera, R. R., José, L., Hernandez, M. y Juan, C. 2008. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 4(4):354-366.
- Davies, D. R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. Ann Rev Biophys Biophys Chem. 19:189-215.
- Dal Degan, F., Ribadeau, B. y Breddam, K. 1992. Purification and characterization of two serine carboxypeptidases from *Aspergillus niger* and their use in C-

- terminal sequencing of proteins and peptide synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2144-52.
- De-Paula, E. H., Ramos, L. P. y Azevedo, M. O. 1999. The potential of *Humicola grisea* var *thermoida* for bioconversion of sugar cane bagasse. *Bioresource Technology.* 68:35-41.
- Desrosiers, R. y Díaz, J. 1957. The World Distribution of Diseases of Cacao. In: *Proceedings of the Sixth Meeting of the Inter-american Technical Committee of Cacao*, Salvador, Brazil. 331-344 p.
- Desrosiers, R. y Suarez, C. 1974. Monilia Pod Rot of cacao. In: Gregory P.H. (ed.) *Phytophthora Diseases of Cocoa*. Logman Group, London. 273-277 p.
- Eliécer, C. J. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca, Popayán Grupo de investigación Asubagroin.10-15p.
- Enríquez, G. y Suárez, C. 1978. Monilia disease of cocoa in Costa Rica. *Turrialba* 28:339-340.
- Enríquez, G. A. 1981. La moniliasis irrumpe en las zonas cacaoteras en Costa Rica. *Actividades en Turrialba.* 9:8-9.
- Enríquez, G. A. Brenes, O. y Delgado J. C. 1982. Desarrollo e impacto de la moniliasis del cacao en Costa Rica. *Proceedings of the Eighth International Cocoa research Conference*. Cocoa Producer's Alliance, Cartagena, Colombia. 375-380 p.
- Evans, H. C., Stalpers, J. A., Samson, R. A. y Benny, G. L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can. J. Bot.* 56:2528-2532.
- Evans, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora roreri* (Monilia) London, UK: Commonwealth Micological Institute. *Phytopatological.* 24:44p.
- Evans, H. C. 2002. Invasive neotropical pathogens of tree crops. micromycetes. In: Watling R, Frankland J, Ainsworth M, Isaac S, Robinson C (eds) *Tropical mycology*. CABI Publishing, Wallingford. 2:83-112 p.

- Evans, H. C., Holmes, K. A. Phillips, W. y Wikilson, M. J. 2002. What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa?. *Mycologist*. 16:1-4.
- Fang, Y., Liu, S., Wang, S. y Ly M. 2008. Isolation and screening of a novel extracellular organic solvent-stable protease producer. *Biochem Eng J*. 43:212-215.
- Fernandez, H. M., Fraile, E. R. y Cascone, O. 1998. Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. *J. Biotechnol*. 62:83-93.
- Figueroa, V. y Ly, J.1990. Alimentación porcina no convencional, Colección GEPLACEA, Serie Diversificación, México. 215 p.
- Fox, D. J., Gray, P. P., Dunn, N. W. y Marsden, W. L. 1987. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 40:117-132.
- Fulton, R. H. 1989. The cacao disease trilogy. Black pod, Monilia pod rot and Witches' broom. *Plant Disease*. 73:601-603.
- Galindo, J. J. y Enríquez, G. A. 1983. Investigaciones realizadas sobre la moniliasis del cacao en Centro y Sur América. In: Reunión anual de la Sociedad Americana de fitopatología, división Caribe, Panamá. 28 p.
- García, N. 1999. Producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus* sobre subproductos del café y del cacao, Tesis de Máster en Biotecnología, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente. 90 p.
- Ganesh, K. A., Nagesh, N., Prabhakar, T. G., Sekharan, G. 2008. *Bioresource Technol*. 99(7):2364-72.
- Griffith, W. G., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch N. R. y Hedger, J. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*. 41:423-435.
- Guadix, A., Guadix, E., Páez, M., González, P. y Camacho, F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Arspharmaceutica*. 41(1):79-89.
- Guangrong, H., Dehui, D., Weilian, H. y Jiabin, J. 2008. Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus* sp. HS08 with a statistical method. *African of Biotechnology*. 7 (8):1115-1122.

- Gupta, R., Beg, Q. K. y Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 59:15-32.
- Guzmán, G. 1993. El cultivo de los hongos comestibles, México, Instituto Politécnico Nacional, México. 120 p.
- Hajj, M., Kanoun, S., Nafri, M. y Gharsailah, N. 2007. Purification and characterization of a alkaline serine produced by a new isolable *Aspergillus clavatus* ESI process. *Biochem.* 42:491-797.
- Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29:45-72.
- Hernández, T., Aránzazu, F., Arévalo, E. y Ríos, R. 1990. La moniliasis del cacao en el Perú. *Agrotropica.* 2:56-58.
- Hirsch, H. R., Suárez, P., Achstetter, T. y Wolf, D. H. 1989. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) proteinases: Structure, characteristics and functions. En *molecular and Cell Biology of Yeasts*. Walton, E. F. y Yarranton G. T. Blackie and Son Ltd. London. 134-200 p.
- Hoffman, T. 1974. Food related enzymes. *Adv. Chem. Ser.* 136:146-185.
- Holtzapple, M., Cognata, M., Shu, Y. y Hendricson, C. 1990. Inhibition of *T. reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng.* 36: 275-287.
- Holtzapple, M., Jun, J. H., Ashok, G., Patibandla, S. L. y Dale, B. E. 1991. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 29:59-74.
- Holzer, H. y Heinrich, P. C. 1988. Control of proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 49:63-91.
- Hossain, T., Das, F., Marzan. L. W., Rahman, S. y Anwer, M. N. 2006. Some properties of protease of the fungal strain. *Aspergillus flavus*. *I.J. Agri and Biology.* 8:162-164.
- ICA (s.f.), Cif. y Par., Barros, O. 1980. Influencia del pH en el crecimiento del hongo *Monilia roseri*. Medellín, Colombia.
- Ichishima, E. 2004. Aspergillopepsin I. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2a. ed. (Barrett, A. J., Rawlings, N. D. y Woessner, J. F. eds). Elsevier, London. 92-99 p.
- Inoue, H., Lu, J. F., Athauda, S. B., Kong, K. H., Hayashi, T., Kimura, T., Makabe, O. y Takahashi, K. 1995. *Aspergillus niger* var. macrospores proteinase B. cDNA

- cloning, expression and activation of the proenzyme. *Adv. Exp. Med. Biol.* 362:581-587.
- Inoue, H., Hayashi, T., Huang, X. P., Lu, J., Athanda, S. B., Kong, K., Yamagata, H., Ukada, S. y Takahashi, K. 1996. Heterologous expression and site directed mutagenesis studies on the activation mechanism and theroles of the basic residues in the prosegment of aspergillopepsinogenI. *Eur. J. Biochem.* 237:719-25.
- Ishibashi, N., Ono, I., Kato, K., Shigenaga, T., Shinoda, I., Okai, H. y Fukui, S. 1988. Role of the hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptides. *Agr. Biol. Chem.* 52:91-94.
- Kaar, W. E., Gutierrez, C. V. y Kinoshita C. M. 1998. *Biomass and Bioenergy*, 14:277-287.
- Kalisz, M. H. 1988. Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 36:17-55.
- Kamada, M., Oda, K. y Murao, S. 1972. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36:1095-1101.
- Katip, J. Y. 1994. Prospección y estudio de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif. y Par.) Evans *et al*) del cacao en la cuenca del río Marañón. Tesis Ing. Agr. Tingo María Perú: UNAS. 94 p.
- Kaur, M., Dhillon, Chaudhary, K. y Singh. R. 1998. Production, purification and characterization of a thermos table alkaline protease from *Bacillus polymyxa*. *Indian. J. Microbial.* 38:63-67.
- Keane, P. J. 1992. Diseases and pests of cocoa: an overview. Cocoa pest and disease management in Southeast Asia and Australisia. *FAO Plant Prot Prot Pap* 112:1-12.
- Kembhavi, A. A., Kulharni, A., Pant, A. A. 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No.64. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:83-92.
- Klibansky, M., Mansur, M., Gutiérrez, I. y González, L. 1993. Production of *Pleurotus ostreatus* mushrooms on sugar cane agrowastes”, en *Acta Biotechnology.* 3(1):71-78.

- Kranz, J., Schmutterer, H. y Coch. W. Edits. 1978. Diseases, pests and weeds in tropical crops. John Wiley y Sons, New York, USA. 219-220 p.
- Krauss, U. y Soberanis, W. 2001. Rehabilitation of diseased cacao fields in Peru through shade regulation and timing of biocontrol measures. *Agroforestry System* 53:179-184.
- Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation system an over view, *Critical Rev. Biotechnol.* 25(2):1-30.
- Kumar, C. G. y Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 17:561-594.
- Kumar, S., Sharma, N. S., Saharam, M. R. y Cind, R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*. Purification and characterization process. *Biochem.* 40:1701-1705.
- Liu, J. Z., Huang, Y. Y., Weng, L. P. y Ji, L. N. 2001. Effects of metal ions simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus Niger*. *Lett Appl Microbiol.* 32:16-19.
- López, G. M. y Enríquez, V.O. 1980. Presencia de *Monilia roreri* Cif. *Et al.* Par. en el cacao, *Theobroma cacao* L., en la frontera de Costa Rica-Nicaragua. Ministerio de Desarrollo Agropecuario.150 p.
- López, B. O., González, M. O., Lee, R. V., Alvarado, G. A., Ramírez, G. S., González, R. M., Méndez, R. J. y Gehrke, V. M. 2006. Diagnóstico y Técnicas para el Manejo de Tecnológica de Colombia. ISBN: 970-985-07-0, 40 p.
- Lowry, O.H., Rosenbough H.I., Fair, A. Z. y Rondall, R.I. 1951. Protein measurement with the phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193:165-275.
- Maddison, A.C., Macias, G., Moreira, C., Arias, R., y Neira, R. 1995. Cocoa production in Ecuador in relation to dry-season escape from pod rot caused by *Crinipellis pernicioso* and *Moniliophthora roreri*. *Plant pathology* 44:982-998.
- Maddox, I. S. y Hough, J. S. 1970. *The Biochemical Journal*, 117: 843-852.
- Mala, B.R., Aparn, M. T., Mohini, S. G. y Vasanti, V. D. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3):597-635.

- Maldonado, M. C. y Strasser de Saad, A. M. 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Journal of Industrial Microbiology y Biotecnology*. 20:34-38.
- Martín, P. C. 1981. Utilización de subproductos fibrosos de la caña de azúcar por los rumiantes. Efecto de la suplementación en el comportamiento de novillas lecheras alimentadas con bagacillo predigerido. *Rev. cubana Cienc. Agríc.* 15(7):9-13.
- Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C. F., Hahn, B. y Jonsson, L. 2002. Enzyme and Microbial Technology. 31:274-282.
- Martínez, D. 1987. Design of a mushroom farm for growing *Pleurotus* on coffee pulp, en *Mushroom Journal Tropics*. 7:13-23.
- McLaughlin, H. 1950. Observation on cacao in Perú. *Cacao Information Bulletin* 2:3-4.
- Mercado, Y., Hernandez, C. H., Ruíz, H. J., Villa, L. 2003a. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*. 95:327-339.
- Mercado, Y., Guerra, G., Villa, L., Hernández, C. 2003b. Purification and Characterization of an Extracellular Non-Aspartyl Acid Protease (pumAe) from *Ustilago maydis*. *Microbiol.* 47:408-411.
- Mercado, Y., Noriega, Y., Ramírez, B., Hernández, C., Villa, L. 2004. Purification y characterization of Aminopeptidase (PUMAPE) from *Ustilago maydis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 235:369-375.
- Milewski, S. F., Mignini, I., Covelli, y Borowski, E. 1994. Specific inhibition of acid proteinase secretion in *candida albicans* by Lys-Nav-FMDP. *J. Med. Mycol.* 32:1-11.
- Mondego, J., Carazzolle, F. M., Costa, G. L., Formighieri, F. E., Parizzi, P. L., Rincones, J., Cotomacci, C. M., Carraro, D., Cunha, F. A., Carrer, H., Vidal, O, R, Estrela, C. R., García, O., Thomazella, P. T., Oliveira, V. B., Pires, B. L., Rio, S. M., Araújo, R. M., Moraes, M. H., Castro, L. A., Gramacho, P. K., Goncalves, S. M., Moura, N. J., Neto, G. A., Barbosa, V. L., Guiltinan, J. M., Bailey, A. B., Meinhardt, W. L., Cascardo, C. M. y Pereira A. G. 2008. A

- genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. BMC Genomic. 9-548 p.
- Moo-Young, M., Moreira, A. R. y Tengerdy, R. P. 1983. Principles of the Solid Substrate Fermentation, In Filamentous Fungi. 4. Ed. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristianse, Edward Arnold. 117p.
- Moralejo, F. J., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Lombraña, M., Fierro, F. y Martin, J. F. 2002. Silencing of the aspergillopepsin B gene of *Aspergillus awamori* by antisense RNA expression of protease removal by gene disruption results in a large increase in Thaumatin production. Appl Environ Microbiol. 68:3550-3559.
- Mudgett, R. E. 1986. Solid state fermentation. Manual of Industrial and Biotechnology. Demain. Mc Graw Hill, New York, London. París.66-83p.
- Muller, A. 1941. El reconocimiento de las enfermedades de las plantas cultivadas de Venezuela. Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales 8:99-113.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov).
- Nelson, G. y Young, T. W. 1987. Journal of General Microbiology. 133:1461-1469.
- Nigam, P. y Singh, D. 1994. Recent process developments in solid state substrate systems and their applications in biotechnology-solid state fermentation. Journal of Basic Microbiology 34:405-423.
- Orellana, R. G. 1956. La moniliasis y otras enfermedades del cacao en el este de Panamá. Boletín Fitosanitario. FAO 4:168-169.
- Ortiz, G. C. 2005. La moniliasis del cacao: una enfermedad devastadora de América Latina ahora en México, primera parte. Produce Tabasco 2:13-15.
- Osorio, A., Gómez, N. y Sánchez, C. 2008. Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del mohó *Mucor miehei*. Redaclyc. 45:17-26.
- Outtrup, H. y Boyce, COL. 1990. Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty CT, Kelly K (eds) Microbial enzymes and biotechnology. Elsevier, London. 227-254 p.

- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P y Soccol, V. T. 2000. Biotechnological potential of agroindustrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 74:69-80.
- Parra, D. y Sánchez, L. 2005. El control de la moniliasis en el cacao. Aspectos fitosanitarios. 23-26 p.
- Pedraza, O. R. 2000. Bagazo rico en protein (Bagarip). Alimento animal obtenido por fermentación en estado sólido. Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA). Universidad de Camagüey. *Rev. prod. Anim.* 12.
- Pericin, D. M., Madarev, S. Z. y Radulovic, L. M. 2009. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. *Biotechnol. Lett.* 31:43-47.
- Phillips-Mora, W. 2003a. Nuevas expectativas en la lucha contra la moniliasis del cacao: origen, dispersión y diversidad genética del hongo *Moniliophthora roreri* e incorporación de fuentes de resistencia a través de mejoramiento genético. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 3 p.
- Phillips-Mora, W. 2003b. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* As determined using molecular, phytopathological and morphophysiological evidence. Tesis Ph.D. Reading, Inglaterra. University of Reading. 349 p.
- Phillips-Mora, W. 2004. La moniliasis del cacao: una serie amenaza para el cacao en México. In: Simposio Nacional sobre enfermedades tropicales. Resúmenes de ponencias. Tabasco, México.
- Phillips-Mora, W., Coutiño, A., Ortiz, G. C.F., López, A. P., Hernández, J. y Aime, M. C. 2006a. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology* 55:584.
- Phillips-Mora W., Cawich. J., Garnett, W. y Aime M. C. 2006b. First report of frosty pod rot (moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathology*. 55:584.

- Phillips-Mora, W. y Wikilson, M. J. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopatology*. 97:1644-1647.
- Phillips-Mora, Ortiz, G. C. y Aime, M. C. 2007. Fifty years of frosty pod rot in Central America: Chronology of its spread and impact from Panamá to Mexico. *Proceedings of the 15th International Cocoa Research Conference*. 1:1039-1047.
- Ploetz, R. C. 2007. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology*. 97:1634-1639. doi:10.1094/PHYTO-97-12-1634.
- Porras, V. H. y Sánchez, J. A. 1991. Enfermedades del cacao. IICA Procacao. Fascículo W. 5:10-14.
- Porras, V. H. y Enríquez, G. 1998. Spread of monilia pod rot of cocoa through Central América. IICA, San José, Costa Rica. 20p.
- Poussereau, N., Creton, S., Billon-Grand, G., Rasclé, C. y Fevre, M. 2001. Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology* 147:717-726.
- Prados, F., Pino, A. y Fernández, S. J. 2007. Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese, *Int. J. Food Sci. Technol.* 42:556-561.
- Radha, S., Nithya, V. J., Himakiran, R., Sridevi, A., Prasad, N. B. y Narasimha. 2011. Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. *Arch. Appl. Sci. Res.* 3 (2):155-163.
- Ram, A. 1989. Biology, epidemiology and control of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao. PhD. Thesis. London. UK; university of London. 286 p.
- Ramírez, G. S.I. 2007. La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. 21(1):97-110.
- Ramos, I. 1999. Producción de *Pleurotus ostreatus* var florida sobre residuales del cacao. Tesis de Master en Biotecnología, Facultad de Ciencias-ESPOCH, Departamento de Biotecnología, Riobamba, Ecuador. 102p .

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. y Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635.
- Ravelo, R. D., Bermúdez, S. R., Valiño, C. E., Pérez, P. J. 2002. Fermentación del bagazo de caña de azúcar en un bioreactor a escala de laboratorio. Centro de Investigaciones en Bioalimentos (CIBA), Centro de Investigaciones Biotecnología Industrial (CEBI), Instituto de Ciencia Animal (ICA). *Tecnología química.* 22: 2.
- Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290:205-218.
- Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. 1995. Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Met Enzymol* 248:105-120.
- Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. 2004. Aspartic peptidases and their clans. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. A. J. Barrett, N. D. Rawlings and J. F. Woessner (eds.), Elsevier Academic Press, London, England. 1:3-12.
- Ray, M. K., Uma, K., Umar, G. S. y Shivaji, S. 1992. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:1918-1923.
- Reichard, U., Monod, M. y Ruechel, R. 1995. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 130:69-74.
- Reid, I. D. 1989. Solid state fermentation for biological delignification. *Enzyme Microb. Techn.* 11:786-803.
- Reyes, A. M, Aguilar, G. C., Prado, B. L. y Martínez, H. J. 2011. Residuos agroindustriales para la producción de proteasas fúngicas. 27.
- Rorer, J. B. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo del cacao. Guayaquil, Ecuador: Asociación de agricultores. 17-40 p.
- Rorer, J. B. 1926. Ecuador cacao (Part 1). *Tropical agricultura (Trinidad)* 3:46-47.
- Saheki, T. y Holzer, H. 1975. Proteolytic activities in yeast. *Biochem. Biophys. Acta* 348:203-214.

- Sánchez, I. F., Gamboa, E. y Rincón, J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* cif & par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado Barinas". Rev. Fac. Agron. 20:188-194.
- Sánchez, S. H., Bautista, M. C., Ramos, J. A y Martínez, C. D. 2011. Determinación de la actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- β -glucanasa y amplificación de genes endo-1,3(4)- β -glucanasa a partir de *Moniliophthora roreri*. Tesis de maestría en ciencias.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Pandey, A. 2004: Proteases. In: Enzyme Technology, A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.), Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India. 312-325 p.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. y Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem. 40:2689-2694.
- Sawada, J. 1963. Studies on the acid protease of *Paecilomyces variotii* Bainier. TPR-220: I Crystallization of the acid-protease of *Paecilomyces variotii* Bainier. TPR. 220. Agr. Biol.Chem. 27:677-683.
- Schu, P., Suarez, R. P., Wolf, D. H. 1991. The proteinase yscB inhibitor (I2B) gene of yeast and studies on the function of its protein product. Eur J Biochem 197:1-7.
- Seglen, R. Bohley, P. 1992. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanism. Experimentia. 48:158-172.
- Siala, R., Sellami, A., Mohamed, H. I., Neji, G. y Moncef, N. 2009. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* I1: purification and characterization African Journal of Biotechnology. 8 (18):4582-4589.
- Singh, J., Voohra, R. M. y Sahoo, D. K. 1999. Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. Biotechnology Letters 21:921-4.
- Soccol, C. R., Luciana, P. S. y Vandenberghe. 2003. Overview of applied Solid-state fermentation in Brazil, Biochem. Engg. 13:205-218.
- Somkuti, G. y Babel, F. 1997. Conditions Influencing the synthesis of acid protease by *Mucor Pusillos* lindt Applied Microbiology. 15(6):1309-1312.

- Stevens, I. y Steven. E. 1980. Neutral proteinase in germinating conidia hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Biochem.Soc.Trans.* 8:542-43.
- Suárez, C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y proceso de infección de *Monilia roreri*. Cif y Par., en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.) Tesis Ing. Agron. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 59 p.
- Suarez, C. C. 1980. El problema de la moniliasis y su combate en el Ecuador. In: Enríquez, G. A. (edit.) 1982. La moniliasis del cacao. Catie, Turrialba, Costa Rica, Serie técnica: Informe técnico. 28:70-87 p.
- Suarez, M. P., Schwencke, J. García, N. y Gascon, S. 1991. A new X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from yeast associated with a particulate fraction. *FEBS let.* 131:296-300.
- Suarez, P. y Wolf, H. 1991. Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of posttranslational control in the eukariotic cell. *FEMS Microbiol. Lett.* 54: 17-46.
- Suárez, L. 2004. Aislamiento e identificación del hongo *Moniliophthora roreri* a partir de Cultivos de cacao ubicados en Norte de Santander Colombia. Sevilla, España. Tesina.
- Suárez, C. L. 2006. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del nororiente colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. *Revista Respuestas*. Universidad Francisco de Paula Santander. 1.
- Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. 2006a. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Technol. Biotechnol.* 44(2):211-220.
- Sumantha, A., Deepa P., Sandya, C., Szakacs, G., Soccol, C.R. y Pandey, A. 2006b. Rice Bran as a Substrate for Proteolytic Enzyme Production. *Brazilian archives of biology and technology.* 49(5):843-851.
- Sumantha, A., Fontanille, P., Larroche, C. y Pandey, A. 2008. Exploration of fungal spores as a possible storehouse of proteolytic biocatalysts. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:2897-2901.

- Takahashi, K., Inoue, H., Sakai, K., Kohama, T., Kitahara, S., Takashima, K., Tanji, M., Athauda, S. B., Takahashi, T., Akanuma, H., Mamiya, G. y Yamasaki, M. 1991. The primary structure of *Aspergillus niger* acid proteinase A. J Biol Chem. 266:19480-19483.
- Tello, S. R., Hernandez, A. 1995. Effect of irreversibility on the thermodynamic characterization of the thermal denaturation of *Aspergillus saitoi* acid proteinase. Biochem. J. 311:969-974.
- Thorold, C. A. 1975. Disease of cocoa Clarendon Press, Oxford, England. 27-31 p.
- Tobe, S., Takami, T., Ikeda, S. y Mitsuzi, K. 1976. Agricultural and Biological Chemistry, 40:1087-1092.
- Tobe, G., Nagob, Y., Watanabe, T. y Mukaiyama, T. 2005. Bacteriolytic activity of detergent protease and its enhancement by detergents materials. J. Oleosci. 54: 89-395.
- Tomodo, K. y Shimazono, H. 1964. Acid protease produced by *Trametes sanguine*, a wood destrayinginy fungus. I. Purification and crystallization of enzyme. Agr. Biol. Chem. 28:770-773.
- Torres, C. M., Teliz, O. D., Ortiz, G. C., Mora, A. J., Nava, D. C. y García, E. R. 2010. Progreso temporal y Manejo Integrado de la Moniliasis [*Moniliophthora roreri* (Cif y Par.) Evans et al.] del cacao (*Theobroma cacao*) en Tabasco, México. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. 71 p.
- Tsujita, Y. y Endo, A. 1978. Purification and characterization of the two molecular forms of membrane acid protease from *Aspergillus oryzae*. Eur. J. Biochem. 15:347-353.
- Ubalde, M. C. y Cantera, A. M. 2002. Utilización de una mezcla de proteasas para la obtención de hidrolizados de lactosueros de bajo grado de hidrólisis, Información Tecnológica: 13(5):77-84
- Vairo, C., S., Silva, S. V., Cimino, C., Malcata, F. X. y Priolo, N. 2008. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. Food Chem. 106(3):997-1003.

- Van den Hombergh, J. P., Van de Vondervoort, P. J., Fraissinet, L. y Visser, J 1997. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. Trends Biotechnol. 15:256-263.
- Van Zyl, C., Prior, B. A. y Dupreez, J. C. 1988. Applied Biochemistry and Biotechnology. 17:357-369.
- Venera, D. G., Machalinski, C., Zumárraga, H., y Biscoglio-De Jiménez, Bonino, M. J. 1997. Further characterization and kinetic parameter determination of a Milk-Clotting Protease from *Mucor bacilliformis*. 69:207-215.
- Whitlock, B.A. y Baum, D.A. 1999. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Bytnerioideae (*Sterculiaceae* or *Malvaceae* s.l.) based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*. Systematic Botany 26:240-437.
- Wood, G. A. y Lass, R. A. 1985. Cocoa. 4a ed. Cornwall, UK: Blackwell Science, 620 p.
- Wu, L. C. y Hang, Y. D. 1998. Purification and characterization of acid proteinase from *Neosartorya fischeri* var. *spinosa* IBT 4872. Lett. Appl. Microbiol. 27:71-75.
- Zhanxi, L. y Zhanhua, L. 1997. Jun-cao technology, Fuzhou, China, Asia-Pacific Edible Fungi Training Center. 75 p.

XII. ANEXOS

Anexo 1: Fórmulas matemáticas

Fórmula para determinar la actividad enzimática de mrAe

Actividad total (Uml^{-1})

$$Uml^{-1} = \frac{(Abs_{660nm}) (\text{Factor de dilución})(\text{Factor de la curva } 23.36)}{\text{Tiempo de incubación}}$$

Actividad específica (Umg^{-1} proteína total)

$$Umg^{-1} \text{ proteína total} = \frac{Uml^{-1}}{mg.ml^{-1} \text{ de proteína total}}$$

Fórmula para determinar la concentración de la proteína total ($mg.ml^{-1}$ de proteína total)

$$mg.ml^{-1} \text{ proteína total} = \frac{(Abs_{660nm})(\text{Factor de dilución})(\text{Factor de la curva de albúmina})}{1000}$$

Anexo 2. Efecto de la fermentación del bagazo de caña de azúcar con y sin inóculo y los días de fermentación en el cambio de pH

Factores	pH
Días de fermentación	
1	6.01a
2	6.02a
3	6.06a
4	6.08a
5	6.13a
6	6.09a
7	6.10a
8	6.09a
9	6.11a
10	6.11a
11	6.09a
12	6.09a
13	6.14a
14	6.22a
15	6.15a
16	6.16a
17	6.15a
18	6.12a
19	6.13a
20	6.31a
21	6.12a
22	6.10a
23	6.17a
24	6.03a
25	6.10a
26	6.14a
27	6.17a
28	6.19a
29	6.22a
30	6.26a
EE±	0.03***

Anexo 3. Determinación de la concentración de la Proteína total en mgml^{-1} de *M. royeri* MR01 cultivado en el sistema de FES usando BCA como sustrato

Tiempo (días)	Extracto enzimático 10,000 rpm	Abs. 660nm	Factor de dilución	Factor de la curva tipo albúmina	mg proteína total ml^{-1}
1	100 μl	0,071	10	150.67	0,1070
2	100 μl	0,082	10	150.67	0,1235
3	100 μl	0,084	10	150.67	0,1266
4	100 μl	0,088	10	150.67	0,1326
5	100 μl	0,090	10	150.67	0,1356
6	100 μl	0,104	10	150.67	0,1567
7	100 μl	0,122	10	150.67	0,1838
8	100 μl	0,117	10	150.67	0,1763
9	100 μl	0,118	10	150.67	0,1778
10	100 μl	0,126	10	150.67	0,1898
11	100 μl	0,129	10	150.67	0,1944
12	100 μl	0,127	10	150.67	0,1914
13	100 μl	0,128	10	150.67	0,1929
14	100 μl	0,128	10	150.67	0,1929
15	100 μl	0,133	10	150.67	0,2004
16	100 μl	0,139	10	150.67	0,2094
17	100 μl	0,153	10	150.67	0,2305
18	100 μl	0,166	10	150.67	0,2501
19	100 μl	0,169	10	150.67	0,2546
20	100 μl	0,167	10	150.67	0,2516
21	100 μl	0,179	10	150.67	0,2697
22	100 μl	0,191	10	150.67	0,2878
23	100 μl	0,200	10	150.67	0,3013
24	100 μl	0,187	10	150.67	0,2818
25	100 μl	0,162	10	150.67	0,2441
26	100 μl	0,154	10	150.67	0,2320
27	100 μl	0,162	10	150.67	0,2441
28	100 μl	0,193	10	150.67	0,2908
29	100 μl	0,113	10	150.67	0,1703
30	100 μl	0,09	10	150.67	0,1356

Anexo 4. Determinación de la actividad enzimática específica mrAe en U/mg⁻¹ Proteína total de *M. royeri* MR01 cultivado en el sistema de FES usando BCA como sustrato

Tiempo (días)	Extracto enzimático 10,000rpm	Abs. 660nm	Factor de dilución	Factor de la curva tipo de Micro Lowry	Actividad total U/ml	mg Proteína total/ml	Actividad específica U/mg Proteína total
1	100µl	0	100	23.36	0	0,107	0
2	100µl	0	100	23.36	0	0,1235	0
3	100µl	0	100	23.36	0	0,1266	0
4	100µl	0	100	23.36	0	0,1326	0
5	100µl	0	100	23.36	0	0,1356	0
6	100µl	0	100	23.36	0	0,1567	0
7	100µl	0,013	100	23.36	1,012	0,1838	5,506
8	100µl	0,015	100	23.36	1,168	0,1763	6,625
9	100µl	0,022	100	23.36	1,713	0,1778	9,634
10	100µl	0,024	100	23.36	1,869	0,1898	9,847
11	100µl	0,028	100	23.36	2,180	0,1944	12,214
12	100µl	0,031	100	23.36	2,414	0,1914	12,612
13	100µl	0,034	100	23.36	2,647	0,1929	13,722
14	100µl	0,037	100	23.36	2,881	0,1929	14,935
15	100µl	0,039	100	23.36	3,037	0,2004	15,155
16	100µl	0,042	100	23.36	3,270	0,2094	15,616
17	100µl	0,044	100	23.36	3,426	0,2305	14,863
18	100µl	0,045	100	23.36	3,504	0,2501	14,910
19	100µl	0,058	100	23.36	4,516	0,2546	17,738
20	100µl	0,061	100	23.36	4,750	0,2516	18,879
21	100µl	0,073	100	23.36	5,684	0,2697	21,075
22	100µl	0,085	100	23.36	6,619	0,2878	22,999
23	100µl	0,088	100	23.36	6,852	0,3013	22,741
24	100µl	0,09	100	23.36	7,008	0,2818	24,869
25	100µl	0,06	100	23.36	4,672	0,2441	19,140
26	100µl	0,054	100	23.36	4,205	0,232	18,125
27	100µl	0,043	100	23.36	3,348	0,2441	13,716
28	100µl	0,026	100	23.36	2,025	0,2908	6,964
29	100µl	0,023	100	23.36	1,791	0,1703	10,517
30	100µl	0,023	100	23.36	1,791	0,1356	13,08

Anexo 5. Valores de pH testigo y pH problema

Días de fermentación	pH (Testigo)	pH (inoculado)
1	6.00	6.03
2	6.02	6.03
3	6.02	6.11
4	6.03	6.13
5	6.11	6.16
6	6.02	6.16
7	6.05	6,17
8	6.01	6.17
9	6.09	6.13
10	6.08	6.15
11	6.06	6.14
12	6.00	6.18
13	6.09	6.20
14	6.20	6.25
15	6.03	6.28
16	6.08	6.25
17	6.13	6.19
18	6.12	6.14
19	6.08	6.18
20	6.49	6.14
21	6.10	6.14
22	6.10	6.11
23	6.18	6.18
24	6.00	6.07
25	6.09	6.12
26	6.13	6.15
27	6.10	6.24
28	6.10	6.28
29	6.17	6.28
30	6.00	6.54