



Producción de pectinasas por *Bacillus* spp. a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono

Pectinase production by *Bacillus* spp. from orange and grapefruit peels as a carbon source

Julio Arellano¹, Steban Ilich¹, Marco Salazar¹, Icela Rodríguez², Patricia Torres¹ y Willman Alarcón³

¹Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT. ³Departamento de Zootecnia. UNT

RESUMEN

Se aislaron y seleccionaron cultivos puros de *Bacillus* spp. productores de pectinasas. Para ello se enriquecieron las muestras de suelo con pectina procedente de los albedos de naranja y de toronja, se humedecieron y se dejaron en reposo durante dos semanas; de ésta, se preparó una suspensión al 1/10 en agua destilada y se sometió a un tratamiento térmico de 80°C por 10 min., se enfrió y se sembró en superficie del medio agar nutritivo con sales y pectina como sustrato, se incubó y se realizó la lectura agregando alícuotas de una solución de lugol y aquellos cultivos que presentaban mayor halo de hidrólisis de pectina fueron seleccionados (desde 8 a 32 mm). Estos cultivos (15) fueron sembrados en medio líquido nutritivo más sales y pectina, incubándose por 24-72 horas; luego se centrifugaron y se obtuvo el sobrenadante denominado extracto crudo de pectina (ECP), del cual se realizó los ensayos de actividad. Se encontró que no existe relación entre el tamaño del halo de hidrólisis y la actividad de pectinasa en medio líquido, encontrándose la mayor actividad fue de 3,17 U y que no existe diferencia entre las fuentes de carbono para *Bacillus* spp en la producción de pectinasas

Palabras clave: *Bacillus*, pectinasas, actividad, naranja, toronja.

ABSTRACT

Cultures of *Bacillus* spp. producers of pectinases were isolated and selected. For accomplishing that goal, soil samples were enriched with pectin from orange and grapefruit peels, they were moistened and let stand; from these a suspension at 1/10 in tap water was prepared and it underwent a thermal treatment of 80°C for 10 min., it cooled down and was sowed in surface of the agar nutritious medium with salts and pectin as substratum, it was incubated and the reading was done adding aliquot of a lugol solution and those cultivations that presented bigger halo of hydrolysis of pectin were selected (from 8 to 32 mm). These cultivations (15) were sowed between liquid nutritious more salts and pectin and they were incubated by 24 - 72 hours; then they were centrifuged and the supernatant denominated raw extract of pectin was obtained (ECP), from which the essays of activity were carried out. It was found that there is no relationship between the size of the hydrolysis halo and the pectinase activity in medium liquid, being the biggest activity 3,17 U and there are no difference among the sources of carbon for *Bacillus* spp in the pectinases production.

Keywords: *Bacillus*, pectinases, activity, orange and grapefruit peels

INTRODUCCIÓN

La pectina es una mezcla amplia de sustancias pécticas de diferente composición que contiene como componente principal ácido pectínico; en forma natural se localiza en la pared celular y puede estar entrecruzada con otros polisacáridos estructurales y proteínas para formar protopectina insoluble¹. Sin embargo, su presencia en el zumo de frutas, origina importantes problemas en su procesamiento industrial: ello se debe a que, por su escasa solubilidad, retienen el jugo espesándolo y disminuyendo el rendimiento de la extracción^{2,3}. En la degradación de pectinas, las industrias dedicadas al procesamiento de jugos de frutas utilizan un sistema pectinolítico compuesto por varias enzimas distribuidas en tres grupos principalmente: pectinesterasas las cuales catalizan la desesterificación de los grupos metoxilo, pectina despolimerasas que rompen los enlaces α -1-4 glucosídicos por hidrólisis (polimetilgalacturonasas y poligalacturonasas) y transeliminación (pectintranseliminasa y ácido poligalacturónico transeliminasa), reacciones que catalizan el rompimiento de la molécula^{4,5,6}.

Las pectinasas figuran entre las enzimas de aplicación industrial más antiguas y pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: ácidas y alcalinas. Las primeras son utilizadas en la industria de zumos de fruta y en la fabricación de vinos: son mayoritariamente poligalacturonasas de origen fúngico, especialmente de *Aspergillus niger*; las pectinasas alcalinas, por su lado, han sido introducidas en diversos procesos industriales, como el textil, principalmente en el enriado de lino y en el procesado de fibras de plantas: proceden mayoritariamente de bacterias, en particular de *Bacillus*¹.

Las pectinasas, asimismo, se emplean en la extracción, clarificación y reducción de viscosidad en jugos de frutas, extracción de aceites de vegetales y cítricos, fermentación de café y té^{6,7,8,9} y tanto la actividad como los mecanismos que controlan su síntesis y su secreción están bajo la influencia de diversos factores, tales como el pH del medio, la temperatura de incubación y la naturaleza y cantidad de la fuente de carbono⁵.

Se ha registrado la producción de enzimas pécticas producidas por *Bacillus* spp aislado de suelos de arrozales¹⁰, de cáscara de uva¹¹, utilizando la fermentación en medio sólido sobre diferentes substratos, tales como, bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo: ello significa que la composición del medio de cultivo es un factor importante en la inducción de pectinasas ya que influye sobre la diversidad y la cantidad de dichas enzimas pécticas¹². Sin embargo, pocos estudios han sido efectuados sobre la influencia de la composición del medio en cultivo sobre soporte sólido a partir de cáscara de cítricos.

Existe una preocupación creciente por los efectos de la contaminación ambiental, por ello la presión pública ha influido tanto en la industria como en los gobiernos para su disminución. Las enzimas microbianas presentan aplicación industrial debido a su elevada eficiencia catalítica, su uso no daña el ambiente y su alta rentabilidad económica.¹⁰

Por lo tanto, siendo el Perú un país que ha crecido considerablemente en la agroindustria conviene desarrollar un proceso orientado al aprovechamiento integral de recursos provenientes este sector, además evitar la contaminación ambiental, por los residuos provenientes de estas actividades. Uno de estos residuos, por aprovechar, sería el albedo de algunos cítricos ya que por su volumen resulta atractivo para la producción industrial de enzimas pécticas, por lo que, en el presente trabajo de investigación se desarrollará un proceso, a nivel de laboratorio, para la producción de pectinasas por *Bacillus* spp. teniendo como fuente de carbono a las pectinas aisladas de cáscaras de naranja y toronja.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Pectinasas producidas por *Bacillus* spp aisladas de suelo (enriquecido con pectina) del Jardín Botánico de la Ciudad Universitaria de la UNT.

Obtención de pectinas cítricas

• Preparación de la materia prima

Se empleó el albedo (mesocarpio) del fruto de naranja y toronja, residuos sólidos producidos por la venta artesanal del jugo de naranja y toronja; en estado fresco o congelado el mismo día de su colección con el fin de evitar el crecimiento de bacterias u otras formas vivientes que descompongan el producto. Se cortaron en trozos pequeños lo que constituyeron la materia prima para aislar pectinas.¹³

• Inactivación de enzimas pécticas

Se inactivaron las enzimas pécticas, colocando la materia prima en estufa a 98°C por 10 minutos.¹⁴

• Extracción ácida

100g de materia prima inactivada fueron suspendidos en 600mL de agua destilada y a ésta se le agregó HCl 1N hasta obtener un pH entre 1.5 y 3. Luego se calentó a 70°C por 70 minutos.¹⁵

• Filtración de los residuos y precipitación.

Se filtró la suspensión y el filtrado obtenido fue enfriado a temperatura ambiente (25°C) y luego se precipitó con etanol al 60% (v/v), con respecto al volumen de dicho filtrado.^{14,15}

• Secado

El proceso de secado del extracto crudo de pectina se realizó a 70°C en estufa. Luego se pulverizó^{14,15}

Rendimiento de extracción de pectina en cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” y de *Citrus paradisi* “toronja”

Se determinó el rendimiento en peso seco por la relación del peso de pectina obtenida (w2) y el peso inicial de la muestra procesada (w1 = 100 g), mediante la siguiente expresión¹⁶:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{W2}{W1} \times 100$$

Aislamiento y selección de *Bacillus* spp. Productores de pectinasas.

Se colectaron muestras de suelo con un peso aproximado de 100g procedentes del Jardín Botánico de la Ciudad Universitaria de la UNT; estos fueron enriquecidos con pectina y luego se mezcló completamente y se humedeció con agua de caño y de dejó en reposo por espacio de quince días.

Medio para la producción de pectinasas

El medio conteniendo pectina como única fuente de carbono está caracterizado por (g/1000 mL de agua destilada): pectina cítrica (naranja/toronja), 2,0; extracto de levadura, 1,00; agar, 15,00; KH₂PO₄, 0,20; CaCl₂, 0,05; (NH₄)₂SO₄, 1,00; MgSO₄·7H₂O, 0,80; MnSO₄, 0,05; pH = 6,5³. Se autoclavó a 15 lb/ 15 min.; se sirvió en placas estériles y se dejó solidificar. Se realizó control de esterilidad durante 24 horas⁴.

Aislamiento de *Bacillus* spp

El aislamiento *Bacillus* spp productor de pectinasas se llevó a cabo en medio sólido Agar nutritivo enriquecido con sales (ANES). Para ello se realizó una suspensión de 25g del suelo enriquecido anteriormente en 250 mL de agua destilada, se agitó y se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³ y se les sometió a un tratamiento térmico de 85°C durante 10 minutos en baño de agua. Luego, se realizó la siembra en superficie (0,1mL de la dilución tratada), se incubó a 28°C hasta 72 horas^{17,18,19}

Las colonias con características morfológicas de *Bacillus* fueron repicadas en tubos con ANES inclinado¹⁹ y se incubaron durante 24 h a 28°C para efectuar la prueba de la catalasa a fin de ubicarlas en el género *Bacillus*. Los aislamientos que resultaron positivos a la catalasa se conservaron como cultivos puros, en viales conteniendo ANES inclinado a 4°C^{20,21}

Bacillus spp productores de Pectinasas (Selección primaria de pectinasas)

En el medio de cultivo anteriormente mencionado se sembró por puntura los cultivos puros de *Bacillus* spp aislados. Se incubó a 30°C por 24, 48 - 72h. Luego se añadió alícuotas de una solución

Lugol y se observó la presencia de halos de hidrólisis de pectina ². Se seleccionaron aquellos cultivos puros de *Bacillus* spp que presentaron mayor halo de hidrólisis de la pectina es decir los cultivos que presentaron mayor relación diámetro de halo/ diámetro de colonia.⁹

Obtención de los extractos crudos de pectinasa de *Bacillus* spp

Se sembraron los cultivos puros de *Bacillus* spp seleccionados previamente (inóculo al 5%) en caldo YEPD modificado (g/1000 mL de agua destilada): pectina, 5,0; Peptona de soja, 1,0; Peptona de carne, 1,0; Extracto de levadura, 1,0; pH 6,5. Los cultivos se incubaron en agitación intermitente durante 24–96 horas a temperatura ambiente (30°C). Luego, se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 min y el centrifugado obtenido correspondió al **extracto crudo de pectinasa de *Bacillus* spp.**⁹

Determinación de actividad de pectinasa en los extractos crudos.

Se determinó la actividad de pectinasa por la cuantificación de los azúcares reductores liberados desde una solución de pectina (0,5% de pectina en buffer fosfato, pH 6,5) usando el reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) ²¹. Se trabajó con un Factor obtenido con solución de Equivalente reductor (glucosa estándar 1mg/mL). ^{9,11, 22, 23}

La mezcla de reacción contuvo 0,45 mL de sustrato y 0,05 mL de extracto crudo enzimático. Dichas soluciones se incubaron a 30 °C durante 30 min y la reacción se detuvo mediante la adición de 0,5 mL del reactivo DNS²¹ y posterior inmersión en baño de agua hirviente por 15 min. Después del enfriamiento, se adicionó 1,5 mL de ADE a cada muestra y se medirá la absorbancia a 570 nm.¹¹ La determinación se llevó a cabo por triplicado.

Una unidad de pectinasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de Equivalente reductor (glucosa) por minuto bajo las condiciones del ensayo, 30°C, pH 6,5. ^{9,11}

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra el rendimiento de extracción de pectina en las condiciones de pH 2,5; 70°C y por 70 minutos, observándose un mayor rendimiento de extracción en la cáscara de *Citrus paradisi* “toronja” de 2,81%. Se observó claros halos de hidrólisis (círculos claros) de la pectina de cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” y de *Citrus paradisi* “toronja”, por pectinasas producidas por de *Bacillus* spp. aislados de suelo enriquecido con pectina (Fig.1).

La Tabla 2, muestra halos de hidrólisis (mm) y actividad de pectinasa (U/mL/min.) producida por *Bacillus* spp utilizando como fuente de carbono pectina de cáscara de naranja, observándose que no existe relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y la actividad de pectinasa; así *Bacillus* spp M₁₂ presenta un halo de 14 mm y una actividad de 3,17 U/mL/min. En tanto que *Bacillus* spp M₂₇ presenta un halo de 30 mm y una actividad de 2,88 U/mL/min.

La Tabla 3, muestra halos de hidrólisis (mm) y actividad de pectinasa (U/mL/min.) producida por *Bacillus* spp utilizando como fuente de carbono pectina de cáscara de toronja, observándose que no existe relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y la actividad de pectinasa; así *Bacillus* spp M₆₄ presenta un halo de 32 mm y una actividad de 1,82 U/mL/min., en tanto que *Bacillus* spp M₆₇ presenta un halo de 18 mm y una actividad de 3,53 U/mL/min. También se puede observar en las Tablas 2 y 3 que no existe diferencia en la producción de pectinasa por *Bacillus* spp cuando se siembran en medios conteniendo como fuente de carbono cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” y de *Citrus paradisi* “toronja”.

Tabla 1. Rendimiento de extracción de pectina en cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” y de *Citrus paradisi* “toronja”

Muestra	Parámetros de extracción			N° Repeticiones	Pectina cruda extraída		
	pH	T°C	Tiempo (minutos)		(g)	%	% Promedio
Cáscara de naranja	2,5	70	70	1	1,95	1,95	1,84
				2	1,82	1,82	
				3	1,74	1,74	
Cáscara de toronja	2,5	70	70	1	2,72	2,72	2,81
				2	3,25	3,25	
				3	2,45	2,45	

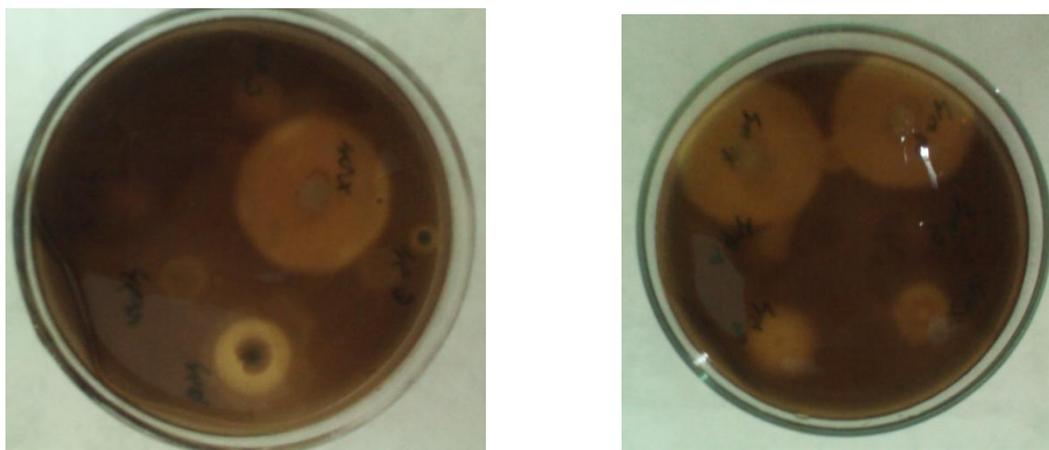


Fig. 1. Selección de *Bacillus* spp. productor de pectinasas según el diámetro de hidrólisis de la pectina como fuente de carbono de (izquierda) cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” y de (derecha) *Citrus paradisi* “toronja”.

Tabla 2. Aislamiento y selección de *Bacillus* spp productor de pectinasas utilizando como fuente de carbono pectina de cáscara de *Citrus sinensis* “naranja”.

Aislamiento y selección de <i>Bacillus</i> spp productor de pectinasas			
Nº	Muestra de suelo	Halos de hidrólisis (mm)	Actividad de Pectinasa* U/mL/min
1	M ₁ 2	14	3,17
2	M ₁ 4	16	2,71
3	M ₂ 1	16	2,82
4	M ₂ 3	14	2,48
5	M ₂ 4	8	1,52
6	M ₂ 7	30	2,88

Una unidad de enzima (pectinasa) = cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de Equivalente reductor (glucosa estandar) por minuto bajo las condiciones del ensayo, 30°C, pH 6,5.

Tabla 3. Aislamiento y selección de *Bacillus* spp productor de pectinasas utilizando como fuente de carbono pectina de cáscara de *Citrus paradisi* “toronja”.

Aislamiento y selección de <i>Bacillus</i> spp productor de pectinasas			
N°	Muestra de suelo	Halos de hidrólisis (mm)	Actividad de Pectinasa* U/mL/min
1	M ₅ 2	9	1,76
2	M ₅ 4	14	2,71
3	M ₅ 8	14	2,13
4	M ₆ 3	32	2,65
5	M ₆ 4	32	1,82
6	M ₆ 7	18	3,53
7	MD	22	2,94
8	ME	28	3,05
9	ML	30	2,94

Una unidad de enzima (pectinasa) = cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de Equivalente reductor (glucosa estandar) por minuto bajo las condiciones del ensayo, 30°C, pH 6,5.

DISCUSIÓN

Los cultivos puros de *Bacillus* spp fueron aislados previamente por el grupo de investigación en el que se enmarca el presente trabajo a partir de muestras de suelo del Jardín Botánico, en la Ciudad Universitaria de la UNT. El aislamiento se realizó tras un enriquecimiento de dicho suelo con pectina cruda extraída de los cítricos en estudio, aproximadamente durante 2 meses. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron sometidas a un choque térmico de 80°C durante 10 min con el objetivo de seleccionar especies de *Bacillus* spp esporulados. De entre las muchos cultivos aislados, los cultivos de *Bacillus* spp con halos de hidrólisis de pectina mayores e iguales de 8 mm fueron seleccionados para el presente trabajo siendo un total de 15 cultivos que presentaron halos de hidrólisis desde 8 hasta 32 mm, para luego estudiar la producción de pectinasas en medio líquido.

En la Tabla 1, se observan los rendimientos de extracción de pectina “cruda”, siendo mayor en toronja, lo que confirma los datos encontrados por otros investigadores ²⁴. Siendo una técnica estandarizada permite obtener rendimientos que dependen exclusivamente de los parámetros utilizados para extraer la pectina.

Las Tablas 2 y 3, muestran que los cultivos de *Bacillus* spp cultivados en medio agar pectina sales, tras la incubación a 30°C durante 3 días, las placas fueron cubiertas con solución de lugol para revelar la secreción de pectinasas. Se encontró que los cultivos M₆3, M₆4, M₂7y ML mostraron halos notables de degradación de pectina, siendo de mayor tamaño el que presentaron los cultivos de *Bacillus* spp M₆3 y M₆4 de 32 mm (Fig. 1a). En cuanto al cultivo que presentó el menor halo de hidrólisis fue *Bacillus* spp M₂4 de 8 mm. (Fig. 1b).

Todos los cultivos presentaron buen crecimiento en medio líquido y se pudo observar un buen pelet en el centrifugado, sin embargo no se podría concluir cuál de ellos tuvo mejor nivel de crecimiento ya que no se midió la masa celular o la densidad óptica de dicha masa bacteriana.

La Tabla 2 y 3, también muestran los resultados de la actividad pectinolítica del extracto crudo de pectinasa por *Bacillus* spp probablemente extracelular. Dichos valores se encuentran entre 1,52 y 3,53 U de enzima/mL/minuto. Estos resultados son superiores a los encontrados por otros autores ¹⁰ de 0,53 U/mL/min; quienes indican que a ensayos de pH 7 se obtuvieron valores de actividad pectinasa aproximadamente similares a los detectados a pH 10, siendo el perfil de producción muy parecido (1,51 U/mL/min), y por el contrario, cuando los ensayos se realizaron a pH 5 no se detectó actividad. El pH de trabajo fue de 6,5 lo que permitió obtener una pectinasa ácida respecto a ala de estos investigadores.

El crecimiento de *Bacillus* spp en caldo pectina enriquecido con sales evidenció a las 48 horas un mayor desarrollo a pH 6,5 y temperatura de 30°C. Los valores de pH y temperatura utilizados en el presente trabajo, concuerdan con lo reportado por Bergey²⁵, donde menciona un pH 6,5.0 y una temperatura de 30°C, para un buen crecimiento de *Bacillus*.

En el experimento se determinó que el microorganismo necesitó aireación y agitación, para un mayor crecimiento, concordando con Cross²⁶. Valores de 0.5 vvm para la aireación y de 300 rpm para la agitación deben utilizarse para incrementar la producción de pectinasa.

CONCLUSIONES

- El rendimiento de extracción de pectina es mayor en cáscara *Citrus paradisi* “toronja” respecto a la de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja”.
- Se han aislado y seleccionado 15 cultivos puros de *Bacillus* spp de suelo enriquecido con pectina como fuente de carbono.
- Se ha obtenido una actividad enzimática máxima de 3,53 y 3,17 U/mL/min. de *Bacillus* spp sembrados en medio que contenían pectina de cáscara *Citrus paradisi* “toronja” y de *Citrus sinensis* “naranja”. respectivamente y además no existe diferencia en el uso de dichas fuentes carbonadas para la producción de pectinasas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Devia J. Proceso para producir pectinas cítricas. Rev. Univ. EAFIT. 2003; (129): 21-30.
2. Yegres S, Sánchez J, Belmar M, Riveros W, Belmar D. Producción de enzimas pécticas-ensayos preliminares. Rev. Univ. Or. 2001; 13(1): 55-59.
3. Bayoumi R, Yassin H, Swelim M, Abdell-All E. Production of bacterial pectinase(s) from agro-industrial wastes under solid state fermentation conditions. J App Sci Research. 2008; 4(12): 1708-1721.
4. Feoli M, Gómez Z, Muños A. Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Mangifera indica*. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 1997; (26): 33-37.
5. Beltrán A, Larrondo C, Ramirez M, Ruiza A, Salgado L. Producción de pectinasas por *Aspergillus niger* a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. 2011. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
6. Silva D, Da Silva E, Da Silva R, Gomes E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by products. Brazilian Journal of Microbiology. 2002; (33): 318-324.
7. Nadaroglu H, Taskin E, Adigüzel A, Güllüce M, Demir N. Production of a novel pectin lyase from *Bacillus pumilus* (P9), purification and characterization and fruit juice application. Romanian Biotechnological Letters. 2010; 15(2): 5167-5175.
8. Kashyap D, Vohra P, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology. 2001; 77: 215-227.
9. Arroyo G. Producción de enzimas pectinasas por actinomycetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. [Tesis Msc.]. 2002. UNMSM. Perú.
10. Soriano M. Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Universidad de Barcelona. 2004.
11. Cabeza M, Merín M, Martín M, Sabaté D, Audisio M, Morata V. Effect of a Pectinase-Surfactin Preparation on Extraction of Pigments and Total Polyphenol from Malbec Grape Skins. American Journal of Enology and Viticulture. 2009; 60 (4): 477-483.
12. Trejo M. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. Micol. Neotrop. Apl. 1991; (4): 49-62.
13. Maldonado Y, Salazar S, Millones C, Torres E, Vásquez E. Extracción de pectina mediante el método de hidrólisis ácida en frutos de maushan (*Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo) provenientes del distrito de San Miguel de Soloco, región Amazonas. Rev. Aporte Santiaguino. 2010; 3 (2): 177-184.

14. Chamorro M, Gutiérrez Chaponán. Extracción de pectina a partir de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*), toronja (*Citrus paradisi*) y pomelo (*Citrus grandis*). 2010 Nov 18; Lima, Perú. Centro de investigación de tecnología de alimentos. Universidad Peruana Unión.
15. Guidi A, Arandia M. Obtención de pectina a partir de la cáscara de maracuyá mediante hidrólisis ácida. J Boliviano de Ciencias. 2010; 67-71.
16. Estrada A.; López B. Pectinas cítricas. Efecto del arrastre de vapor en la extracción y de diferentes métodos de secado. Revista del Departamento de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales. 1998. Vol. 7, p. 23 -34
17. Calvo P, Zúñiga D. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*solanum tuberosum*). Ecología aplicada. 2010; 9 (1).
18. Piñero J, Vidal L, Coello N. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus spp* degradadora de plumas de aves de corral. Rev. Científica, FCV-LUZ. 2000; 10(2): 124-129.
19. Ramos E, Zúñiga D. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. Ecol Apl. 2005; 7(1,2): 123-130.
20. Reinoso Y, Casadesús L, García A, Gutiérrez J, Álvarez V. Aislamiento, selección y identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. Fitosanidad. 2006; 10(3): 187-191.
21. Cuervo J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Microbiología agrícola y veterinaria. [Tesis para optar título]. 2010. Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
22. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Biochemistry. 1959; (31): 426-428.
23. Martínez A. DNS: una técnica de cuantificación de azúcares reductores – Utilizada en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE. Rev. Tecnocultura. 2003. 6: 7 – 9
24. Rodríguez KA, Román AM. Extracción y evaluación de pectina a partir de la cáscara de naranja de las variedades *Citrus sinensis* y *Citrus paradisi* y propuesta de diseño de planta piloto para su producción. San Salvador, El Salvador. 2004
25. Acevedo V, Ramírez DM. Análisis técnico y económico de la pectina, a partir de la cáscara de la naranja (*Citrus sinensis*). Santiago de Cali, Colombia. 2011.
26. Cross T. Growth and examination of Actinomycetes-some guidelines, American Society for Microbiology, USA, 1980. 605-609