



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**PRODUCCIÓN SECUENCIAL DE ENZIMAS DEGRADADORAS
DE POLISACÁRIDOS POR CEPAS DE *Aspergillus flavus* y
Aspergillus parasiticus CRECIENDO EN SUSTRATOS
COMPLEJOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

JOSÉ ALBERTO PALOMARES RUIZ

MÉXICO, D. F

2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Raquel Ortega Muñoz
Vocal	Prof. José Guillermo Aguilar Osorio
Secretario	Prof. Rosalba Esquivel Cote
1er. Suplente	Prof. Francisco Ruiz Teran
2º Suplente	Prof. Jorge Arturo Aburto Anell

LUGAR DE TRABAJO: Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos.
Departamento de Alimentos y Biotecnología conjunto E, Facultad de Química.

Vo.Bo.

Asesor

Sustentante

Guillermo Aguilar Osorio

José Alberto Palomares Ruiz

Este trabajo se desarrollo con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México. Proyectos IN219604 y IN207603.

Reconocimientos

A la“**Universidad Nacional Autónoma de México**”, nuestra máxima casa de estudios.

Dr. Guillermo Aguilar

Por su apoyo y tantas enseñanzas que dejo en mi, no encuentro las palabras adecuadas para agradecer su apoyo incondicional, es un gran profesor y un gran ser humano.

Al grupo de Fisiología de hongos Filamentosos:

Carlos, Cristhian, Gina, Pancho, Rodrigo

Les agradezco el apoyo y amistad que me brindaron en el laboratorio. Tantos momentos felices que pasamos juntos hicieron que las cosas fueran más fáciles y nunca se me olvidaran.

Agradecimientos

A Dios, por darme la oportunidad de llegar hasta esta estancia de mi vida, que es el final de un ciclo y el inicio de muchos más.

A mis padres que me han dado todo en esta vida, les dedico esto que es el resultado de su trabajo y esfuerzo, son el mejor regalo que Dios me ha dado. Te amo mamá, te amo papá.

Aline, gracias por todo tu amor, por estar en todos esos momentos que necesito un consejo, una ayuda, un pleito. Eres parte importante de la realización de esto. Gracias hermana!.

A mis abuelos por todo el apoyo que he recibido durante toda mi vida. Gracias por esos consejos que me dieron y me ayudaron a ser una mejor persona.

A mis tíos y primos que de manera directa o indirecta me han apoyado y han confiado en mi. Espero no decepcionarlos y les doy las gracias por la gran familia que somos.

Grissel, te agradezco el tiempo que me has regalado de tu vida y que aún compartes conmigo. Me haz enseñado tantas cosas que creo que aún no he terminado de digerir pero en eso estoy, te quiero confy!.

Alejandra, Paco, Omar, Iroel, Pedro, Cesar, Gerardo, Carlos, Toño, que pasamos tantas cosas en la facultad que siempre que me acuerdo me sacan una sonrisa. Los quiero mucho borrachines!.

A mis amigos y hermanos scouts, Saúl, Lalo, Paco, Arturo, Charly, Edgar, Mari, Diana, que son parte importante de mi vida. Les agradezco todo su tiempo y apoyo.

A mis compañeros y amigos de la carrera de la generación 2001.

A ti, que te tomas el tiempo de leer este trabajo, ojalá que te pueda servir de algo.

CONTENIDO	Pág.
I. RESUMEN	9
II. MARCO TEÓRICO	11
II. I. Pared celular de las plantas	11
II. II Regulación y represión catabólica en hongos filamentosos	14
II. III Patogénesis de hongos filamentosos en plantas	15
II. IV Aflatoxinas	17
II. V. Bio-degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas	18
II. V. 1 Degradación de la cadena principal de celulosa	18
II. V. 2 Degradación de la cadena principal de xilano	20
II. V. 3 Degradación de la pectina	20
II. V. 4 Degradación del xiloglucano	22
II. V. 5 Enzimas accesorias involucradas en la degradación de los polisacáridos de la pared celular de las plantas	24
II: VI El género <i>Aspergillus</i>	26
II. VII Sustratos complejos	28
II. VII. 1 Tamarindo (<i>Tamarindus indica</i> L)	28
II. VII. 2 Manzana (<i>Pyrus malus</i> L)	29
II. VII. 3 Uva (<i>Vitis vinífera</i> L)	30
II.VIII. 4 Limón (<i>Citrus limon</i> L)	31
III. OBJETIVOS	32
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	33
IV. 1 Sustratos Complejos	33
IV.2 Microorganismos	33
IV. 3 Propagación del inóculo	33

IV. 4 Crecimiento en medio líquido	34
IV. 5 Crecimiento en medio sólido	35
IV. 6 Crecimiento de muestras para microscopia electrónica de barrido	35
IV. 7 Determinación de actividades enzimáticas	36
IV. 8 Determinación de azúcares reductores	38
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
V. 1 Crecimiento en diferentes fuentes de carbono	39
V. 2 Cinética de producción en sustratos puros	47
V: 3 Cinética de producción con pectina, xilano, celulosa y mezcla	55
V.3.1 Crecimiento en medio sólido	61
V. 4 Cinética de producción en sustratos complejos	69
V. 5 Microscopía Electrónica de Barrido	75
V. 6 Discusión General	79
VI. CONCLUSIONES	82
VII. REFERENCIAS	84

RESUMEN

La pared celular de las plantas sirve de sustrato para la producción de enzimas de bacterias y hongos fitopatógenos. Estas enzimas degradadoras de pared celular (pectinasas, xilanasas y celulasas) juegan un papel importante en la naturaleza manteniendo el ciclo global de carbono, tienen aplicación a nivel industrial (clarificación de jugos, panificación, blanqueo de pulpas para papel, etc.) y en muchos aspectos sobre la patogenicidad incluyendo penetración, maceración y adquisición de nutrientes (Mayer, A.M., et al. 2002 y Ten Haven., et al. 2002).

Algunas especies de hongos filamentosos como *Aspergillus* son capaces de invadir y contaminar con aflatoxinas (metabolitos secundarios altamente carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. Brown, L., et al. 2001), cultivos de importancia económica como maíz, cacahuate y algodón. Se sabe que el grado de virulencia y agresividad con que estos hongos infectan las plantas depende de la capacidad para producir enzimas que degradan la pared celular y en gran medida de las que degradan pectina, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y la producción de enzimas extracelulares degradadoras de polisacáridos de la pared celular de plantas utilizando sustratos complejos como fuentes de carbono.

Se utilizaron las cepas *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y *Aspergillus parasiticus* NRRL-502, las cuales se crecieron en medio líquido con diferentes fuentes de carbono: sencillas, polisacáridos y sustratos

complejos (cáscara de limón, desechos de manzana, uva y tamarindo), con la finalidad de determinar qué enzimas y en qué tiempo del cultivo se producen para tener una base que nos permita evaluar la utilización de los diferentes tipos de fuentes de carbono y de los sistemas enzimáticos involucrados en esa degradación.

Las tres cepas crecieron en todos los sustratos pero preferentemente en polisacáridos. El crecimiento en mono- y disacáridos en general fue deficiente e inferior al obtenido utilizando pectina o xilano como fuente de carbono.

Las tres cepas produjeron diversas actividades enzimáticas. En las tres cepas se obtuvo actividad exo pectinolítica y actividad pectin liasa. Aunque ninguna produjo actividad endo pectinolítica. Los mejores sustratos para la producción de estas enzimas fueron los sustratos complejos y de estos el mejor fue la cáscara de limón.

En los sustratos complejos se observó cierta tendencia general en la producción de actividades en las tres cepas, a tiempos cortos se presentó actividad pectinolítica (exo pectinolítica y pectin liasa), mientras que a tiempo más largos la actividad que se presentó es xilanolítica y celulolítica.

Debido a que el crecimiento era claramente superior en cáscara de limón, se tomaron micrografías al microscopio electrónico de barrido a diferentes tiempos para observar el proceso de degradación por parte del hongo y su morfología sobre sustratos sólidos como cáscara de limón.

II. MARCO TEÓRICO.

II. I PARED CELULAR DE PLANTAS

La función de la pared celular en la planta es proporcionar rigidez y representa una barrera física para el ataque de agentes externos como microorganismos, insectos, etc (Aro, N., et al.2005).

La pared celular consiste de varios polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina) los cuales junto con lignina forman un complejo estructural rígido. Estas moléculas presentan interacciones a través de la formación de puentes de hidrógeno y enlaces covalentes entre los diferentes polímeros, hemicelulosa – lignina, celulosa – lignina y pectina – hemicelulosa, etc (Aro, N., et al.2005).

Se ha estimado que a nivel mundial anualmente se producen aproximadamente 4×10^9 toneladas de biomasa vegetal. Parte de esta biomasa no se acumula gracias a que es degradada por hongos y ciertas bacterias. Estos microorganismos juegan un papel importante en el ciclo de carbono dentro del ecosistema (Mayer, A.M., et al. 2002 y Ten Haven., et al. 2002).

Los polisacáridos constituyen del 80 al 90% de los polímeros estructurales de la pared celular de plantas (McNeill, M., et al.1984). La celulosa es el más abundante y es el principal constituyente de la pared celular, se trata de un polímero lineal de residuos de glucosa (alrededor de 8,000 a 12,000 unidades), unidos por enlaces β -1,4. Se presenta como estructuras ordenadas (fibras), cuya principal función es asegurar la rigidez de la pared celular de las plantas (De Vries, 1999).

La hemicelulosa es el polisacárido más heterogéneo y la segunda estructura más abundante en la pared celular de plantas. El principal tipo de hemicelulosa en cereales y maderas duras es el xilano (De Vries, 1999). El xilano (Fig. 1) consiste en una cadena principal de residuos de D-xilosil unidos por enlaces β -1,4 (85-93% de la molécula), altamente ramificada. La arabinosa se encuentra unida por enlaces α -(1,2) y α -(1,3) como residuo sencillo o como una pequeña cadena, a la que se encuentra una xilosa con un enlace β -(1,2) o una galactosa en posición β -(1,5); esta última también puede estar unida a la xilosa mediante un enlace β -(1,4). Los grupos acetilos se encuentran unidos a la cadena de xilosa en el carbono 2 o 3 por uniones α . El ácido glucurónico y su éster, el 4-O-metilo están unidos mediante un enlace α -(1,2), mientras que los residuos de los ácidos ferúlico y p-cumárico se encuentran unidos a la arabinosa en el carbono 5 mediante un enlace éster (De Vries, 2001). La frecuencia y composición de las ramificaciones en el xilano dependen de su origen y de su localización citológica.

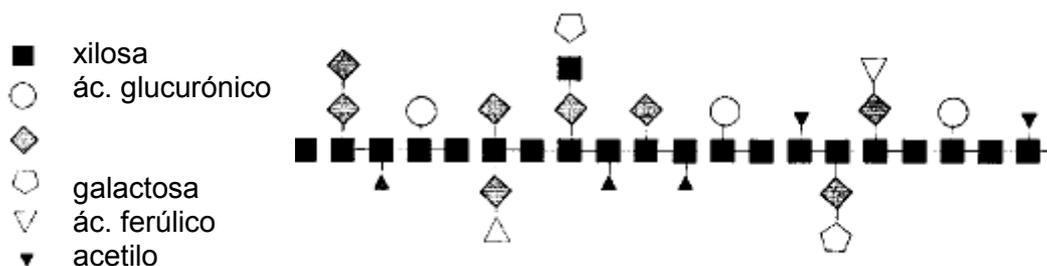


Fig. 1. Representación gráfica de la cadena de xilano (de Vries and Visser, 2001)

El xilano aparece como el mayor constituyente de la interfase entre la lignina y otros carbohidratos en la pared celular secundaria en las plantas, en particular con las microfibrillas de celulosa y pectina vía interacción covalente y/o

puentes de hidrógeno, lo que hace que los tejidos presenten una gran resistencia mecánica y biológica (Fry, S. C. 1986).

La pectina contribuye a la adhesión de las células vegetales y también a la fuerza mecánica de la pared celular (Pérez, S. 2000).

Es un heteropolisacárido compuesto por tres dominios estructurales distribuidos en dos regiones: la región lisa y la región ramificada (De Vries., et al. 1982 y Pérez., et al. 2000). La región lisa consiste en una cadena de residuos de ácido α -D-galacturónico, los cuales pueden estar acetilados en O-2 ó en O-3 ó metilados en O-6. En la región ramificada también llamada “región peluda” (Fig. 2), se han identificado dos regiones unidas por enlaces α -1,4 (homogalacturonano HG) y residuos de ramnosa unidos por enlaces α -1,2 (ramnogalacturonano RGI y RGII); estos tres dominios se encuentran covalentemente unidos formando una especie de red.

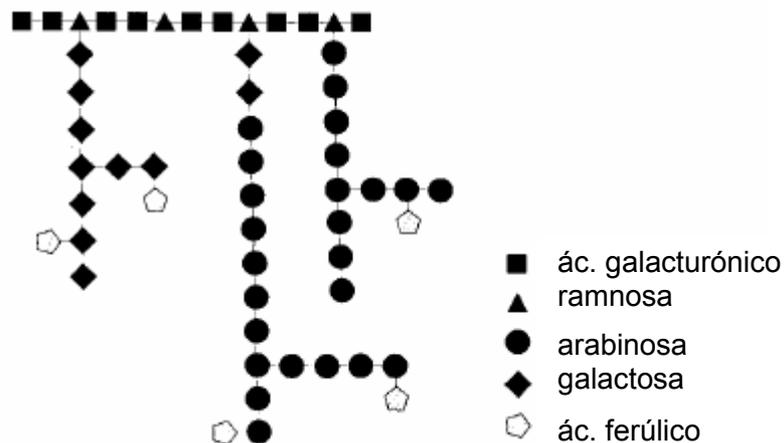


Fig. 2. Representación esquemática de la región altamente ramificada (“región peluda”) de la pectina (De Vries and Visser, 2001)

Las concentraciones más altas de pectina en la pared celular de las plantas son observadas en la lámina media, con una disminución gradual cuando pasa a través de la pared primaria hacia la membrana plasmática.

II. II REGULACIÓN Y REPRESIÓN CATABÓLICA EN HONGOS FILAMENTOSOS

La degradación de la pared celular vegetal es llevada a cabo por una gran variedad de enzimas, cuya acción genera una amplia gama de productos intermedios, oligosacáridos y unidades monoméricas, que sirven de nutrientes o intervienen en la regulación de algún proceso fisiológico en particular.

La síntesis de enzimas en general esta regulada por mecanismos de inducción/represión que actúan a nivel de la transcripción y traducción (Contreras, 2003). La inducción puede definirse como el aumento específico en la concentración de una enzima como respuesta a la presencia de una sustancia química determinada, denominada inductor. Los inductores suelen ser los productos de degradación del polímero (generalmente monómeros o dímeros).

En general este proceso de represión ocurre en presencia de altas concentraciones de glucosa u otros azúcares rápidamente metabolizables, que promueven una alta velocidad de crecimiento microbiano. La presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables reprime la síntesis de muchas enzimas inducibles.

Uno de los sistemas enzimáticos más estudiados en hongos filamentosos (*A. niger*) es el de la degradación de la hemicelulosa principalmente en xilano (De Vries, 2003). El complejo xilanolítico es inducible por xilosa y la expresión de los genes involucrados está mediada por el activador transcripcional XLNR. Este activador regula además la expresión de otros genes para enzimas que degradan la pared celular tales como endoglucanasas, celobiohidrolasa, feruloil-esterasas y otras. Altas concentraciones de xilosa reprimen la inducción

mediada por XLNR, efecto que parece involucrar a proteínas represoras del tipo CreA (proteína de represión catabólica por carbono) (De Vries., et al. 1999). La mayor parte de los estudios de inducción/represión de pectinasas en hongos se refieren a las enzimas que actúan sobre el homogalacturonano y las denominadas enzimas accesorias (Contreras, 2003).

II. III PATOGÉNESIS DE HONGOS FILAMENTOSOS EN PLANTAS



La mayoría de las aproximadamente 100,000 especies de hongos conocidas son saprófitas; sólo 8,000 pueden causar enfermedades en una o más especies vegetales y tan sólo 100 son patógenas de humanos o animales. Los hongos que deterioran los productos vegetales pueden encontrarse en el campo como algunas especies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* y otros.

Las especies difieren según el vegetal, el clima y la región geográfica (Lacey, 1989 y Widstrom, 1992).

El crecimiento fúngico en los productos frescos ocurre durante y después de la cosecha causando lesiones que desfiguran el aspecto de frutas y hortalizas, afectando severamente su calidad. En los granos de cereales los hongos persisten solamente si el grano está suficientemente seco como para evitar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente.

Muchos hongos patógenos muestran una especificidad hacia el órgano al cual se unen, de forma que normalmente no atacan a todas las partes de la planta hospedadora; algunos colonizan partes aéreas mientras que otros infectan zonas situadas por debajo del suelo.



Fotografía 1. Contaminación de *Aspergillus flavus* en maíz (foto. Laura E. Sweet)

Generalmente se acepta que la producción de enfermedades en plantas por hongos fitopatógenos se debe a la acción individual o combinada de cuatro mecanismos de patogénesis.

El primero de ellos es la síntesis y liberación de enzimas degradativas de la pared celular, tales como poligalacturonasas, pectato-liasas, hemicelulasas y celulasas, que en ocasiones son liberadas de forma secuencial. Estas enzimas ocasionan la degradación de sustancias pécticas que unen las paredes celulares en los tejidos parenquimáticos causando ensanchamiento y degradación de la pared celular seguido de la muerte de las células.

Un segundo mecanismo consiste en la producción de toxinas por parte del hongo, productos no enzimáticos de bajo peso molecular que interfieren en el metabolismo de la planta o que afectan a la estructura normal del protoplasma.

El tercer mecanismo de patogénesis consiste en la producción y liberación de compuestos hormonales, antihormonales y de otro tipo que producen una interferencia en el control normal del crecimiento y desarrollo. Así, se ha observado que en muchos de los síntomas que resultan de la patogénesis

provocada por hongos (enanismo, elongación, proliferación celular, etc.) son parecidos a los que se asocian con desarreglos hormonales.

El último de los mecanismos es la interferencia mecánica que provoca el crecimiento del hongo en el movimiento normal del agua, nutrientes y metabolitos.

II. IV AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos que cobraron importancia a partir de la muerte repentina en Escocia (1960), de cien mil pavos alimentados con maní infectado con una especie fúngica: *Aspergillus flavus* proveniente del Brasil.

Son metabolitos secundarios de bajo peso molecular altamente tóxicos y con propiedades carcinogénicas producidas por algunas cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Ordaz et al., 2002). Las toxinas B1, B2, G1 y G2 se encuentran de manera natural en los granos y alimentos. La aflatoxina B1, es la de mayor preocupación ya que es la más tóxica, la FDA (Food and Drug Administration) fija un valor de máximo de aflatoxina B1 en el alimento del orden de 20 ppb.

Un aspecto importante a recalcar es que no todos los hongos de estos géneros producen aflatoxinas (Ordaz et al., 2002).

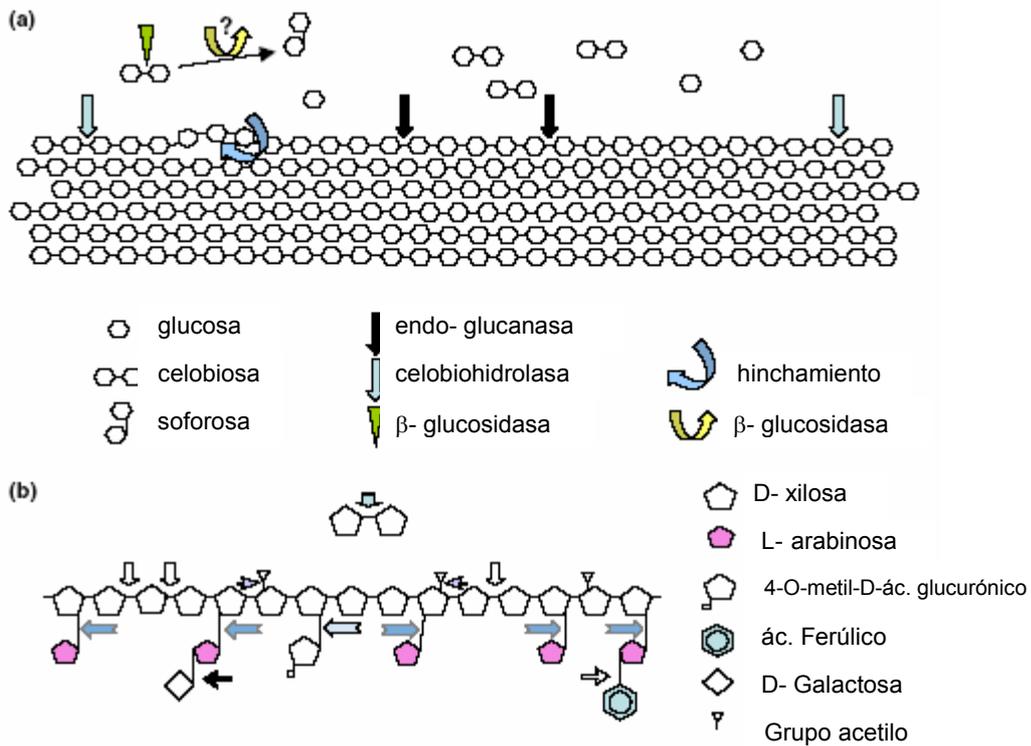
II. V BIO-DEGRADACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR DE LAS PLANTAS.

La degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas es llevada a cabo por microorganismos, que o bien se encuentran libres o como parte de la naturaleza o como parte del tracto intestinal de animales. Debido a la heterogeneidad en la composición y estructura de estos polímeros su degradación es un proceso complejo que requiere de una amplia variedad de enzimas que trabajen sinérgicamente. En hongos filamentosos, estas enzimas degradadoras de pared celular proporcionan al medio tanto energía como nutrientes esenciales para su desarrollo. Estas enzimas han sido purificadas de varios microorganismos, pero especialmente en especies del género *Aspergillus*.

Muchas enzimas degradadoras de pared celular, reciben una considerable atención porque tienen una potencial aplicación en alimentos, textiles, pulpas e industrias del papel (Buchert, J., et al, 1998 y Galante, Y.M., et al, 1998).

II. V. 1 Degradación de la cadena principal de celulosa

Cuatro clases de enzimas están involucradas en la biodegradación de la celulosa: Endoglucanasa (EC 3.2.1.4) hidroliza la celulosa en glucoolisacáridos, corta la cadena interna de celulosa principalmente de la región amorfa proporcionando a la celobiohidrolasa de más cadenas sobre las cuales actuar; Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) libera celobiosa de la celulosa cristalina; β -Glucosidasa (EC 3.2.1.21) degrada los oligosacáridos a glucosa y Exoglucanasas que genera glucosa a partir de celulosa y glucooligosacáridos (De Vries and Visser, 2001).



SIMBOLO	ENZIMA	EC-NÚMERO	ENLACE HIDROLIZADO
↓	Endo- 1,4- β - xilanasa	3.2.1.8	β - 1,4
⇓	β - D- xilosidasa	3.2.1.37	β - 1,4
→	α -L- arabinofuranosidasa Arabinoxilan arabino- Furanohidrolasa	3.2.1.55	α -L1,2; α -L-1, 3 y α -L-1,5
⇒	α -D-glucoronidasa	3.2.1	α -1,2
⇨	Feruloil esterasa	3.2.1	Enlace ester
→	α -D-galactosidasa	3.2.1.22	α -1,6
⇨	Acetilxilan esterasa	3.1.1.6	Enlace ester

Fig. 3. Degradación de celulosa y hemicelulosa. (a) Representación esquemática de un sistema celulolítico. (b) Representación esquemática de un sistema hemicelulolítico. Las enzimas que actúan en el sustrato son listados en la tabla (Aro, 2004)

II. V. 2 Degradación de la cadena principal de xilano

La degradación de la cadena de xilano depende de dos clases de enzimas. Las endoxilanasas y las xilan esterases. Las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) son capaces de romper la cadena de xilano en pequeños oligosacáridos, los cuales después pueden ser degradados a xilosa por las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37). Estas últimas son bastante específicas por oligosacáridos de xilosa (con grado máximo de polimerización de 4) y su acción resulta en la producción de xilosa. Algunas de las endoxilanasas cortan aleatoriamente entre los residuos de xilosa no sustituidos, mientras que la actividad de otras depende de los sustituyentes en los residuos de xilosa vecinos a los residuos atacados. Otra distinción entre las endoxilanasas es que se dividen en dos grupos: aquellas que no liberan L-arabinosa (la enzima no actúa cuando tiene como sustituyente la L- arabinosa) y aquellas que sí la liberan (De Vries and Visser, 2001; Peranicová, L 2000). Otra enzima que actúa en el xilano es el acetil xilan esterasa que libera los grupos acetilo que estén presentes en los residuos de xilosa (Beg., et al, 2001).

II. V. 3 Degradación de la pectina

Los hongos producen una gran variedad de actividades pectinolíticas, que pueden ser clasificadas con base en el tipo de enlace que atacan, las despolimerasas rompen los enlaces glicosídicos α -1,4 del sustrato de preferencia, pueden ser subdivididas de acuerdo al mecanismo de ruptura del enlace, en hidrolasas (ruptura hidrolítica) y liasas (ruptura por β -eliminación) (De Vries and Visser, 2001).

Las pectinasas muestran especificidad dependiendo del sustrato, pero básicamente se clasifican en dos grupos: el grupo del homogalacturonano y el grupo del ramnogalacturonano.

1. Enzimas que degradan el homogalacturonano.

En la parte del homogalacturonano de la pectina participan enzimas como: la pectin metil- y acetil- esterasa (EC3.1.1.11 y EC 3.1.1.6, respectivamente), endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67), pectato liasa (EC 4.2.2.2), y pectin liasa (EC 4.2.2.10). La pectin liasa utiliza como sustrato la pectina metilesterificada, que genera el pectato (pectina de bajo metoxilo) como son sustrato para las poligalacturonasas y la pectato liasa.

a) Poligalacturonasas

Se dividen en tres grupos. Endopoligalacturonasas que atacan enlaces glucosídicos α -1,4 al azar de la cadena del polisacárido generando oligómeros de ácido galacturónico; exopoligalacturonasa tipo I, hidroliza ácido poligalacturónico por el extremo no reductor dando ácido galacturónico (GalA), y exopoligalacturonasa tipo II que libera digalacturonato del extremo no reductor del ácido poligalacturónico.

b) Pectin y pectato liasas

Las liasas catalizan la eliminación del enlace glucosídico α -1,4 entre los residuos de GalA en la pectina o pectato para dar oligosacáridos insaturados entre el C-4 y C-5 del extremo no reductor del producto.

c) Pectin metil- y acetil- esterasas

La pectin metil esterasa remueve el grupo metoxilo del grupo carbonilo de las unidades de galacturonato de la pectina y la acetil esterasa que remueve los grupos acetilos del C-2 o C-3 en el galacturonato produciendo un alcohol y un acetato respectivamente.

2. Enzimas degradadoras del Ramnogalacturonano I

En estas enzimas se encuentran la ramno-galacturonano hidrolasa, ramno-galacturonano liasa, exo-galacturonasas, ramnogalacturonasa ramnohidrolasa, ramno-galacturonano galactohidrolasa y α -ramnosidasa (Parenicová, 2000).

II. V. 4 Degradación del xiloglucano.

Para la completa degradación de la molécula de xiloglucano teóricamente se requiere de la actividad enzimática de cuatro enzimas como mínimo: la cadena principal del xiloglucano se hidroliza con endoglucanasas (endo-(1-4- β -D-glucanasa) para romper los enlaces internos de la cadena de glucano y una β -D-glucosidasa, para completar la hidrólisis de los pequeños fragmentos de oligoglucano. Mientras que para las cadenas laterales se requiere de: una β -D-galactosidasa para remover los residuos terminales de D-galactosa y una α -D-

xilosidasa para remover los residuos terminales y no reductores de la xilosa (Grant and Edwards, 1995).

Adicionalmente se ha identificado una enzima que muestra una absoluta especificidad por el xiloglucano y se nombró específica a este sustrato; xiloglucan-endo-(1-4)- β -D-glucanasa, se ha encontrado que la acción primaria es la transglicosilación, y de acuerdo a estudios de la secuencia de aminoácidos no se encontró ningún parecido con las endo-(1-4)- β -D-glucanasa, por tanto el nombre mas adecuado es el de xiloglucan-endo-transglicosilasa. Esta enzima fue detectada en el cotiledón de *Tropaelum* por su gran habilidad de catalizar una rápida disminución en la viscosidad del xiloglucano de la semilla de tamarindo, debido a la endo- despolimerización de la molécula. Se sabe que también las endo-(1-4)- β -D-glucanasas (incorrectamente llamadas celulasas) de origen fungico, bacterial y de plantas, catalizan la endo despolimerización del xiloglucano. Las celulasas también reconocen y rompen los enlaces β -1-4 de la cadena de glucano, pero su acción en el XG se ve limitada por el alto grado de substitución de la cadena de glucanos (Grant and Edwards, 1995).

II. V. 5 Enzimas accesorias involucradas en la degradación de los polisacáridos de la pared celular de las plantas.

Las enzimas accesorias actúan en los sustituyentes o cadenas laterales de los polisacáridos de la pared celular. Algunas de estas enzimas actúan en los enlaces entre el residuo de la cadena principal y el sustituyente, mientras que otras enzimas rompen los enlaces internos o terminales de las cadenas laterales (De Vries and Visser, 2001).

a) α -L-arabinofuranosidasas y arabinoxilan arabinohidrolasas. Los residuos de arabinosa pueden ser removidos por la α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) y arabinoxilan arabinofuranohidrolasas y la diferencia entre estas radica en la especificidad del sustrato.

b) Endo y exoarabinasas. Las endoarabinasas (EC 3.2.1.99) hidrolizan los enlaces α -1,5 del arabinano, que esta presente en las cadenas laterales de la pectina. Además algunas arabinofuranosidasa son capaces de hidrolizar arabinano polimérico.

c) α -y β -D-galactosidasas. Para remover los residuos de D-galactosa de los polisacáridos de la pared celular de plantas requiere de la acción de α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) y β -galactosidasas (EC 3.2.1.23). Las β -galactosidasas liberan los residuos de galactosa del galactano de las cadenas laterales de la pectina y del XG. Las α -galactosidasas están involucradas en la degradación de galacto(gluco)manano, removiendo la galactosa de los residuos de manosa de la cadena principal.

d) α -glucuronidasas. Los residuos de ácido glucurónico y su 4-O-metil éter pueden ser removido de la cadena de xilano por α -glucuronidasas (EC

3.2.1.131). La enzima es solo activa principalmente sobre pequeños xilooligómeros.

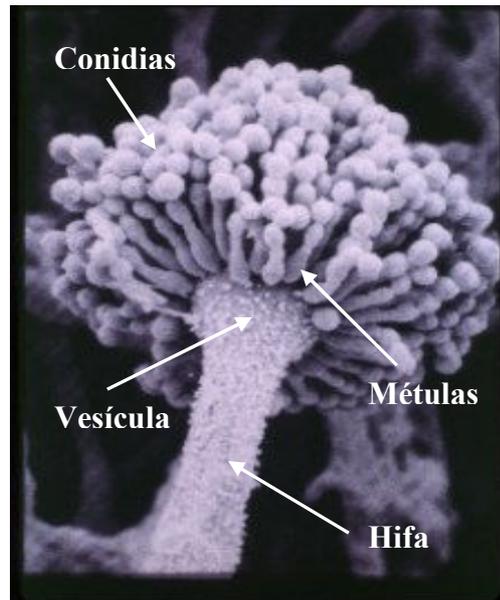
e) Feruloil y p-coumaril esterasas. Liberan los grupos fenólicos presentes en la estructura del xilano (De Vries and Visser, 2001; De Vries, 1999).

Para conseguir una degradación eficiente de los polisacáridos presentes en la pared celular de las plantas requiere de la cooperación o interacciones sinérgicas entre las enzimas responsables de los diferentes enlaces.

f) Ligninasas. En la pared celular de las plantas la lignina forma una matriz que rodea la celulosa y hemicelulosa. La degradación de lignina es un prerrequisito para la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa y por lo tanto para el uso de la principal fuente de carbono y energía por el hongo (Aro, N., et al.2005).

Las enzimas degradadoras de lignina son oxidativas, no específicas y actúan vía mediador no proteico en contraste con celulasas y hemicelulasas hidrolíticas. Las principales enzimas ligninolíticas son manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) lignin peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14) y lacasa (EC 1.10.3.1).

II: VI El género *Aspergillus*.



Fotografía 2. Representación gráfica de *Aspergillus* sp.

<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/image1.html/> 11-Ene 2007.

Pertenece a la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina (hongos imperfectos), cuya reproducción es solamente asexual por medio de conidias.

Dentro de Deuteromycotina, esta especie pertenece a la clase Hyphomycetos, la cual produce conidióforos en algunas partes del micelio (Perenicová, 2000).

Aspergillus se caracteriza por una estructura morfológica típica: un conidióforo, que incluye un tallo y una cabeza conidial, que surge de la especialización de una estructura micelial llamada célula pie.

Los conidióforos no son septados, se ensanchan hacia la punta y terminan en una estructura globosa, de incolora a amarillenta (vesículas). Las vesículas tienen una superficie total de alrededor de 10 a 15 μm de largo. Las conidias son producidas sucesivamente desde las puntas de las métulas, formando así cadenas no ramificadas (Perenicová, 2000).

Algunas especies de *Aspergillus* tienen un estilo de vida saprofito, son capaces de utilizar un rango muy amplio de materiales como fuente de carbono y por este motivo posee la capacidad de producir un sinnúmero de enzimas.

El a_w óptimo para la proliferación de *Aspergillus flavus* es alto (alrededor de 0,99); el valor máximo es al menos 0,998 y el mínimo no se ha determinado aún con precisión, pero según Pitt y Miscamble (1995) es aproximadamente 0,82. En general, parece que una a_w alta favorece la producción de toxinas. Se ha notificado que *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10 a 43°C. La tasa de crecimiento óptima, hasta 25 mm al día, se produce a una temperatura ligeramente superior a 30°C. *A. flavus* produce aflatoxinas en el intervalo de temperaturas de al menos 15 a 37°C. No es posible especificar una temperatura óptima para la producción de toxinas, aunque se ha notificado que entre 20 y 30°C la producción es considerablemente mayor que a temperaturas más altas y más bajas.

Los efectos de la actividad de agua y la temperatura sobre el comportamiento de *Aspergillus parasiticus* son similares a los antes descritos para *Aspergillus flavus*. Pitt y Miscamble (1995) han notificado un valor mínimo de 0,83 aproximadamente para el crecimiento y de 0,87 aproximadamente para la producción de aflatoxinas. Hay pocos datos acerca de los efectos de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus*. Se han notificado valores óptimos para el crecimiento y para la producción de toxinas de aproximadamente 30 y 28°C, respectivamente.

II. VII Sustratos complejos

Se les llamó sustratos complejos a residuos agros industriales obtenidos durante el procesamiento de frutas que no han sufrido modificaciones o alteraciones en su estructura.

Los hongos tanto saprofitos como patógenos utilizan como nutrientes los compuestos en su estado natural. Por lo que el uso de estos sustratos complejos en forma nativa nos permitió una evaluación más precisa de la capacidad y potencial degradativo de estos microorganismos, así como de las enzimas requeridas para tal degradación. Los sustratos complejos que se utilizaron son:

II. VII. 1. Tamarindo (*Tamarindus indica* L.)

El tamarindo pertenece a la familia de las leguminosas. Es probablemente nativa del este de África y fue introducida en la India, donde fue rápidamente adoptada y cultivada. Crece abundantemente en los campos secos en el sur y centro de la India y también en los países del sureste de Asia. En México existen cerca de 4, 400 hectáreas de tamarindo, la mayoría se encuentra en los estados de Chiapas, Jalisco, Oaxaca y Veracruz (Morton, 1987; Salunke and Kadam, 1995).

Los frutos son irregularmente curvados y abultados, crecen en gran abundancia en las ramas y tienen un largo entre 5-17.8 cm y un diámetro de 2-3.2 cm. Las vainas maduras son de color café-canela o café grisáceo externamente y la pulpa de color café o café-rojizo. Las vainas de tamarindo contienen: entre 30-55% de pulpa, 11-30% de cáscara y fibra y entre 33-40% de semillas. La composición química de la fruta es variable y depende de la

localidad. El tamarindo tiene un bajo contenido de agua y un alto nivel de carbohidratos (60%-72%) y minerales. El contenido de sólidos solubles varía de 54-69.9° Brix.

El tamarindo es una fruta versátil que puede ser usada para muchos propósitos. El peculiar sabor dulce/ácido de la pulpa es popular para cocinar y dar sabor.

Manzana (*Pyrus malus L.*)

Se desconoce el origen exacto del manzano, aunque se cree que procede del cruzamiento y selección de varias especies de manzanos silvestres europeos y asiáticos. Pertenece a la familia familia: Rosaceae.

El manzano es una de las especies de fruta dulce de mayor difusión a escala mundial debido fundamentalmente a su facilidad de adaptación a diferentes climas y suelos y a la calidad y diversidad de productos que se obtienen en la industria.

Es más resistente al frío que el peral y no necesita tanta cantidad de calor y luz para la maduración. Sufre menos con el exceso de frío que con el de calor y prefiere los climas húmedos a los secos.

En cuanto a la producción mundial según la FAO, México se encuentra dentro de los primeros 20 países productores de manzana.

Los principales estados productores de manzana en México son: Chihuahua, Durango, Puebla, Coahuila, Nuevo León, Hidalgo, (Ramírez, 2003).

La composición química de la manzana es aproximadamente 0.3% de proteínas, 13% carbohidratos, 0.4% grasa, 85% agua, 1.1% fibra y 0.2% cenizas.

http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/frutas_y_derivados/2004/09/02/108242.php /10 Enero 2007.

Uva (*Vitis vinifera* L.)

La uva o grano de uva es el nombre que recibe el fruto que crece formando racimos de la vid común o vid europea. Pertenece al género *Vitis* de la familia de las Vitáceas, que incluye unas 600 especies de arbustos, por lo general trepadores y que producen frutos en baya, propios de países cálidos y tropicales. Dentro del género *Vitis* se incluyen unas 20 especies cultivadas por sus frutos y algunas por sus hojas que se consumen como cualquier verdura.

Hoy en día, la vid se cultiva en las regiones cálidas de todo el mundo, siendo los mayores productores: Australia, Sudáfrica y los países de Europa (Italia, Francia, España, Portugal, Turquía y Grecia) y en el continente americano, los mejores viñedos se encuentran en California, Chile y Argentina.

Existen innumerables variedades de uvas con grandes diferencias entre sí; en forma, tamaño, tonalidad de los frutos, productividad, calidad, etc. Todas ellas se han clasificado tradicionalmente según su destino final sea, para vinificación o para consumo de mesa. Las variedades europeas se consideran superiores a las norteamericanas para elaborar vinos de mesa, como frutos de postre y de mesa y para elaborar pasas; mientras que estas últimas se prefieren para obtener jugos y jaleas. Su composición general es 80.5% agua, 0.58 % lípidos, 0.66% proteínas, 17.7% carbohidratos y 1% de fibra.

http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/frutas_y_derivados/2004/12/01/112715.php / 10 Enero 2007

Limón (*Citrus limon* L.)

Pertenece a la familia Rutaceae, género: *Citrus* y especie: *limon*. Cultivado por sus frutos y como árbol de jardín en zonas cálidas. Probablemente deriva de la especie "*Citrus medica* L.", natural de la India.

Es la especie de los cítricos más sensible al frío, ya que es la más tropical y presenta floración casi continua. Por lo que requiere para vegetar climas de tipo semitropical. En los climas tropicales, el limonero crece y fructifica con normalidad, sin embargo, los frutos que produce no tienen buena calidad comercial, al ser demasiado gruesos y tener poca acidez, por ello en dichas zonas se prefiere el cultivo de la lima ácida (*C. latifolia*). El clima más adecuado para el cultivo del limonero es de tipo mediterráneo libre de heladas. Los períodos de sequía seguidos de precipitaciones juegan un importante papel en la floración.

Los rendimientos obtenidos son similares entre las especies. El principal uso es el consumo en fresco, tanto para la elaboración casera de jugos y refrescos, como condimento para multitud de platillos. En los últimos años se ha incrementado el uso industrial para la obtención de jugos naturales y concentrados, aceite esencial, pulpas, pectinas, flavonoides, piensos, etc. y últimamente la producción de ácido cítrico natural con destino a la confección de conservas naturales. Según la FAO en el 2002 México fue el principal productor de limones a nivel mundial.

La composición química del limón es por cada 100g: 91g de agua, 0.38g proteínas, 0.5g fibra, 124 mg potasio, 7 mg calcio, 6 mg fósforo, 6mg magnesio, 46 mg vitamina C.

<http://frutas.consumer.es/documentos/frescas/limon/intro.php/> 10 Enero 2007

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Identificar los sistemas enzimáticos producidos por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* creciendo en sustratos complejos y puros y establecer sus preferencias nutricionales.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Establecer la capacidad de crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL-6541, *Aspergillus flavus* CECT-2687 y *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 en diferentes fuentes de carbono y determinar sus preferencias nutricionales.
- ❖ Evaluar la producción de enzimas degradadoras de polisacáridos por *Aspergillus flavus* NRRL-6541, *Aspergillus flavus* CECT-2687 y *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 en medios líquidos con sustratos puros y sustratos complejos.
- ❖ Determinar el crecimiento de cada microorganismo en medio sólido conteniendo azúcares sencillos y polisacáridos puros.
- ❖ Evidenciar la forma de colonización de los sustratos complejos por los hongos por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM).

IV. MATERIALES Y METODOS.

IV. 1 Sustratos Complejos

Los residuos de tamarindo fueron obtenidos del procesamiento del mismo para la elaboración de dulce de tamarindo de la planta Deritrop S.A de C.V. Los desechos comprendieron: semillas y bagazo (cáscara, fibras membrana que recubre la semilla y parte de la pulpa remanente); fueron recolectados en bolsas de plástico y guardados a temperatura de congelación (-20 °C) hasta su uso. Los residuos se secaron en una estufa a una temperatura de 50 °C durante 24h y una vez seco el producto se molió hasta la obtención de un polvo.

La cáscara de limón es de limón mexicano procesado para la obtención de jugo y aceite esencial en limoneras de Apatzingán en el estado de Michoacán y fue obtenida por medio de la Fundación PRODUCE Michoacán.

Los residuos de manzana fueron obtenidos del proceso de elaboración de sidra por el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología Avanzada (CICATA-IPN) en el estado de Puebla.

El desecho de la uva se obtuvo del procesamiento de uva para la elaboración de vino tinto por la compañía Domeq de sus plantas en el estado de Baja California.

IV. 2 Microorganismos

Se utilizaron las cepas compradas a la Colección Española de Cultivos Tipo *Aspergillus flavus* CECT-2687 y a la Northern Regional Research Laboratories *Aspergillus flavus* NRRL-6541, *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 que fueron mantenidas en cajas petri con agar papa dextrosa (PDA) a 4°C y fueron resembradas cada tres meses.

IV. 3 Propagación del inoculo

En condiciones estériles los microorganismos fueron sembrados en placas de (PDA) e incubado a 37°C durante 72 h. Al término de este periodo de crecimiento y esporulación de la cepa, se procedió a la cosecha de esporas. Las esporas se suspendieron en 10 mL de solución salina-tween 80 y se contaron en una cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas. El inoculo se ajustó a una concentración final en el medio de cultivo de 10^6 esporas/mL.

IV. 4 Crecimiento en medio líquido

a) *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541, *Aspergillus parasiticus* NRRL-502, fue cultivado en frascos de 35 mL con 10 mL o en matraces de 500 mL con 100 mL de medio basal (MB) que contenía en g/L: KH_2PO_4 , 2 g; K_2HPO_4 , 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g; fuente de carbono, 10 g; con un pH ajustado de 6. Los frascos se esterilizaron a 121 °C y 15 psi por 15 min. Se inocularon a una concentración final de 10^6 esporas/mL de medio de cultivo, se incubaron a 37 °C con una agitación de 200 rpm durante 72h, tomándose muestras a las 0, 24, 48 y 72h.

Las fuentes de carbono utilizadas fueron: glucosa, sacarosa y acetato de sodio J. T Baker Chemical Co, ác. galacturónico, ác. glucurónico, ác. poligalacturónico, arabinosa, fructosa, galactosa, glicerol, lactosa, pectina, ramnosa, xilano, xilosa Sigma Chemical Co., celulosa (papel filtro wthaman No.4), mezcla (celulosa, xilano, pectina 50:40:10), cáscara de limón, residuos de uva, tamarindo y manzana.

IV. 5 Crecimiento en medio sólido

Aspergillus flavus CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541, *Aspergillus parasiticus* NRRL-502, fueron cultivados en caja con medio basal que contenía: KH_2PO_4 0.2 %, K_2HPO_4 0.2 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 %, agar bacteriológico 1.5 %. Las cepas fueron crecidas en azúcares sencillos y polisacáridos, en placas conteniendo la mitad de la placa con glucosa, xilosa o ácido galacturónico en la otra un polisacárido como pectina o xilano. Cada mitad y el centro de la placa donde se unen ambas fuentes de carbono se inocularon con 10 μL de una suspensión de esporas de 1000 esp/ μL .

IV. 6 Crecimiento de muestras para microscopía electrónica de barrido

a) Medio líquido. *Aspergillus flavus* CECT-2687, fue cultivado en matraces de 250 mL con 50 mL de medio basal que contenía: KH_2PO_4 0.1g, K_2HPO_4 0.1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25g, 0.5g cáscara de limón, con un pH de 6.0. Los matraces se esterilizaron a 121°C y 15 psi por 15 min antes de ser inoculados. Se incubaron 14 y 24 h, a 37°C con una agitación de 200 rpm.

b) Medio Sólido, *Aspergillus flavus* CECT-2687, fue cultivado en caja con medio basal que contenía: KH_2PO_4 0.2 %, K_2HPO_4 0.2 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 %, agar bacteriológico 1.5 %.

Por separado se esterilizó el sustrato complejo (0.25 g cáscara de limón), 1 mL de H_2O destilada, 1.5 % de agar bacteriológico, se vaciaron en las placas de medio basal, se inocularon 100 μL de una suspensión de esporas y se incubó a 37 °C por 24 h.

IV. 7 Determinación de actividades enzimáticas

a) Actividad Exo pectinolítica

Se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados de pectina por el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959), utilizando una curva estándar de ácido galacturónico. El sistema de reacción consistió en 0.5ml de pectina (de frutas cítricas, con un contenido de 85% de Gal A y 10% de grupos metoxilo, Sigma) al 1% (w/v), con 0.4 ml de buffer de acetatos 100 mM a pH = 5.0 y 0.1 ml de filtrado enzimático libre de células a 45°C durante 20 min. Al término del tiempo se le adicionó 2 ml de DNS y se calentó la mezcla a ebullición por 5 min, se le añadió 5 ml de H_2O destilada y se leyó a una $\lambda=575$ nm en un espectrofotómetro. Una unidad (U) de actividad pectinolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μmol de ácido galacturónico a 45°C en 20 min a un pH de 5.0

b) Actividad Endo pectinolítica

La actividad endo pectinolítica se determinó por el cambio de viscosidad de una solución de pectina al 1% p/v disuelta en una solución amortiguadora de

acetatos a pH de 4.2 y una temperatura de 30 °C, en un viscosímetro de Oswald (Kimax). Se utilizaron 500 mL de filtrado libre de células en 10 mL de solución de pectina durante diferentes tiempos de reacción.

Una unidad (U) de actividad endo pectinolítica se define como la cantidad de enzima que redujo en un 50% la viscosidad de la solución de pectina, en un tiempo de 10 min.

c) Actividad Xilanolítica

La actividad xilanolítica se determinó por la cuantificación de los azúcares reductores liberados del xilano por el método de DNS usando una curva de xilosa como patrón, obtenidos después de la incubación de: 0.5 ml de xilano de abedul (Sigma Chemical Co.) al 1% (w/v) + 0.4 ml de buffer de acetatos 100mM a un pH de 5.0 y 0.1 ml del filtrado enzimático libre de células a 50°C durante 20 min. Al término del tiempo se le adicionó 1ml de DNS y se calentó la mezcla a ebullición por 5 min, se le añadieron 5ml de H₂O destilada y se leyó a una $\lambda=575$ nm en un espectrofotómetro. Una unidad (U) de actividad xilanolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de xilosa en 20 min a las condiciones de ensayo.

d) Actividad Celulolítica

La actividad celulolítica se determinó por liberación de azúcares reductores de la celulosa por el método de DNS usando una curva patrón de glucosa. El sustrato fue 50 mg de papel filtro (Whatman No. 4) en 0.9 ml de buffer de acetatos 100mM a un pH de 5.0 y 0.1 ml de filtrado enzimático libre de células llevándose el ensayo a una temperatura de 40°C y un tiempo de 3 h. Para

detener la reacción se le agregó 2 ml de DNS y se colocó en un baño maría a ebullición por 5 min, se le agregó 5 ml de H₂O destilada y se leyó a una $\lambda=575$ nm en el espectrofotómetro. Una unidad (U) de actividad celulolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de glucosa en 3 h a las condiciones de ensayo.

IV. 8 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron en los filtrados libres de células por el método de DNS (Miller, 1959), la mezcla de reacción constó de 0.1 ml de filtrado enzimático + 0.9 ml de H₂O destilada + 2 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS); la mezcla fue puesta en ebullición por 5 min, se le añadieron 5 ml de H₂O dest. y se leyó a una $\lambda=575$ nm en un espectrofotómetro (Spectronic 20). La concentración de azúcares reductores fue calculada utilizando una curva estándar (entre 0.1 y 1 mg/mL) de glucosa, xilosa y ác. galacturónico dependiendo de la muestra.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Crecimiento en diferentes fuentes de carbono.

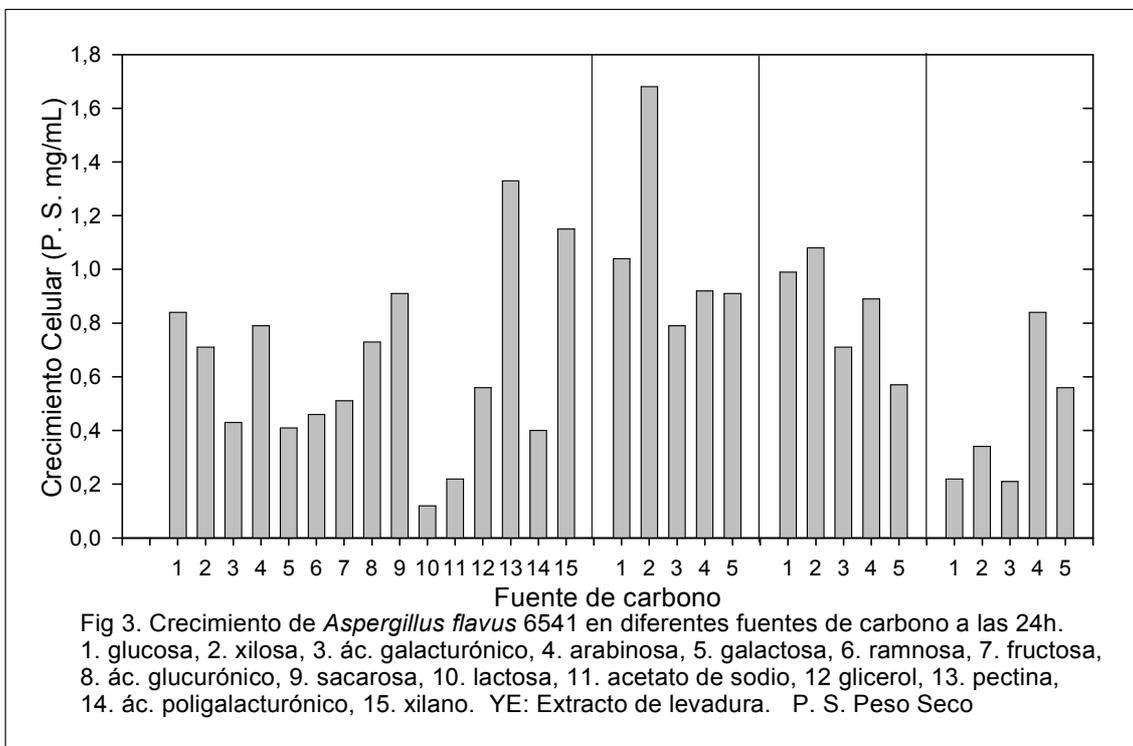
Con el fin de establecer la capacidad de crecimiento de las cepas utilizadas en diferentes fuentes de carbono y determinar sus preferencias nutricionales, se evaluó el crecimiento de las tres cepas de *Aspergillus* en una amplia variedad de fuentes de carbono que incluyen polisacáridos propios de la pared celular de las plantas, además de azúcares simples (monosacáridos) debido a que la mayoría de los microorganismos aprovechan de mejor manera fuentes de carbono fácilmente asimilables, especialmente la glucosa. Además de otras fuentes que no están presentes en la pared celular de las plantas.

La figura 3 representa el crecimiento de *Aspergillus flavus* 6541, en donde el microorganismo tuvo la capacidad de crecer en todas las fuentes de carbono, en cuanto a los polisacáridos se observó el mayor crecimiento en pectina seguido de xilano y un crecimiento deficiente en ác. poligalacturónico.

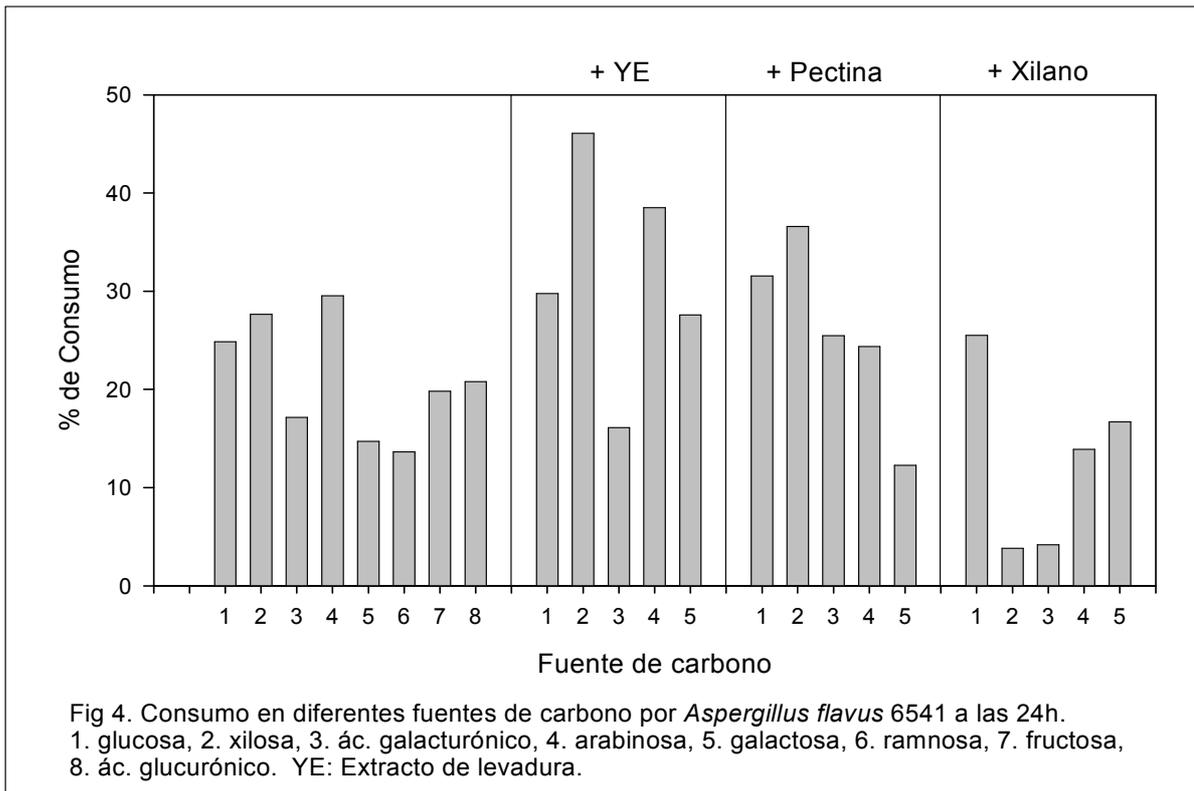
En fuentes de carbono más sencillas (tanto monosacáridos como disacáridos) se presentó un crecimiento menor en todos los casos en relación al obtenido en pectina y xilano. De estos azúcares fue en sacarosa en donde se presentó el mayor crecimiento (0.9 mg/mL) seguido de glucosa (0.84 mg/mL) y de arabinosa (0.8 mg/mL) entre los azúcares simples. Dado el bajo crecimiento el consumo de estas fuentes de carbono, fue en general, inferior al 30% y en algunos casos ni llegó siquiera al 15% (fig. 4).

El hecho de que esta cepa crezca deficientemente en azúcares sencillos no era lo esperado ya que la mayoría de los microorganismos incluyendo hongos filamentosos crecen bien en glucosa, xilosa, etc. El bajo crecimiento obtenido

en estas fuentes de carbono no permite hacer una evaluación confiable de la producción de enzimas por lo que fue necesario evaluar alternativas para mejorar el crecimiento con esa finalidad se probó si la adición de extracto de levadura mejoraba el crecimiento, así mismo y dado que el crecimiento en polisacáridos era favorable, también se analizó si la adición de pequeñas cantidades de pectina y xilano (0.1%) podían estimular el crecimiento en los azúcares sencillos.



En la figura 3 también se observa que para todos los casos hubo un incremento en el crecimiento al adicionar extracto de levadura (YE) debido a que contiene promotores de crecimiento como vitaminas, amino ácidos esenciales etc. Fue en xilosa + YE donde se obtuvo el máximo crecimiento y también fue la condición en donde se obtuvo el máximo consumo (fig. 4).

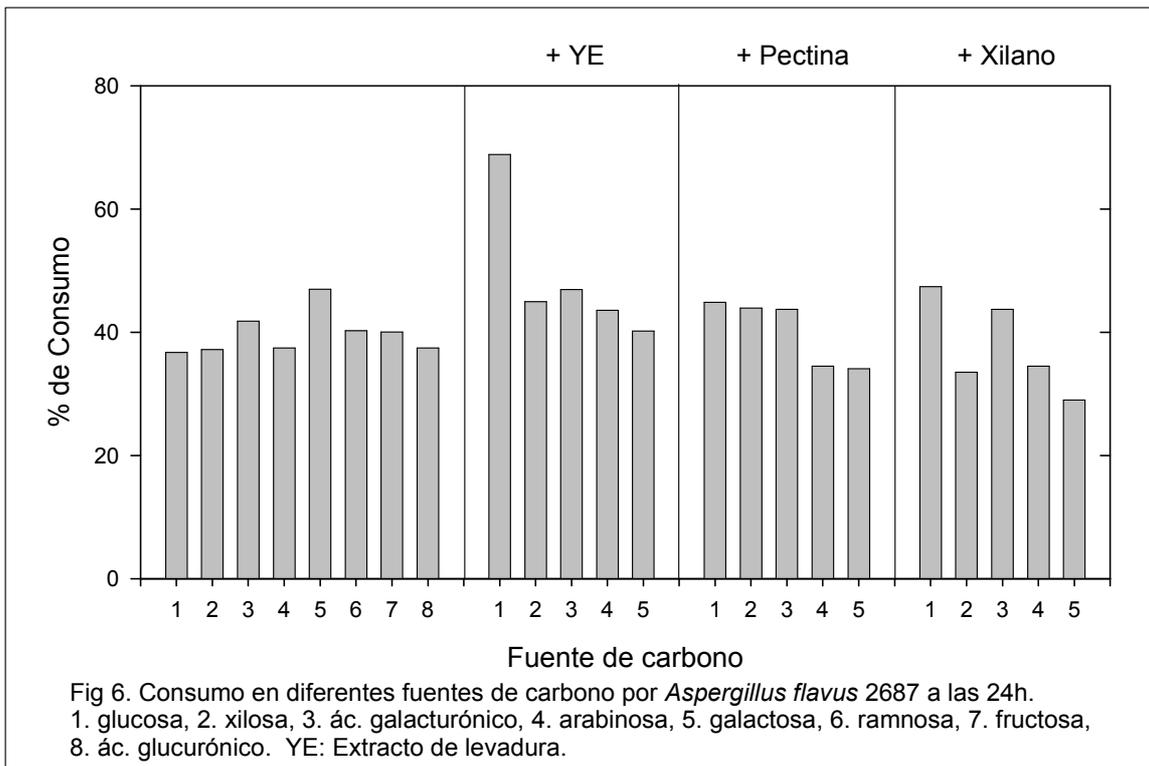
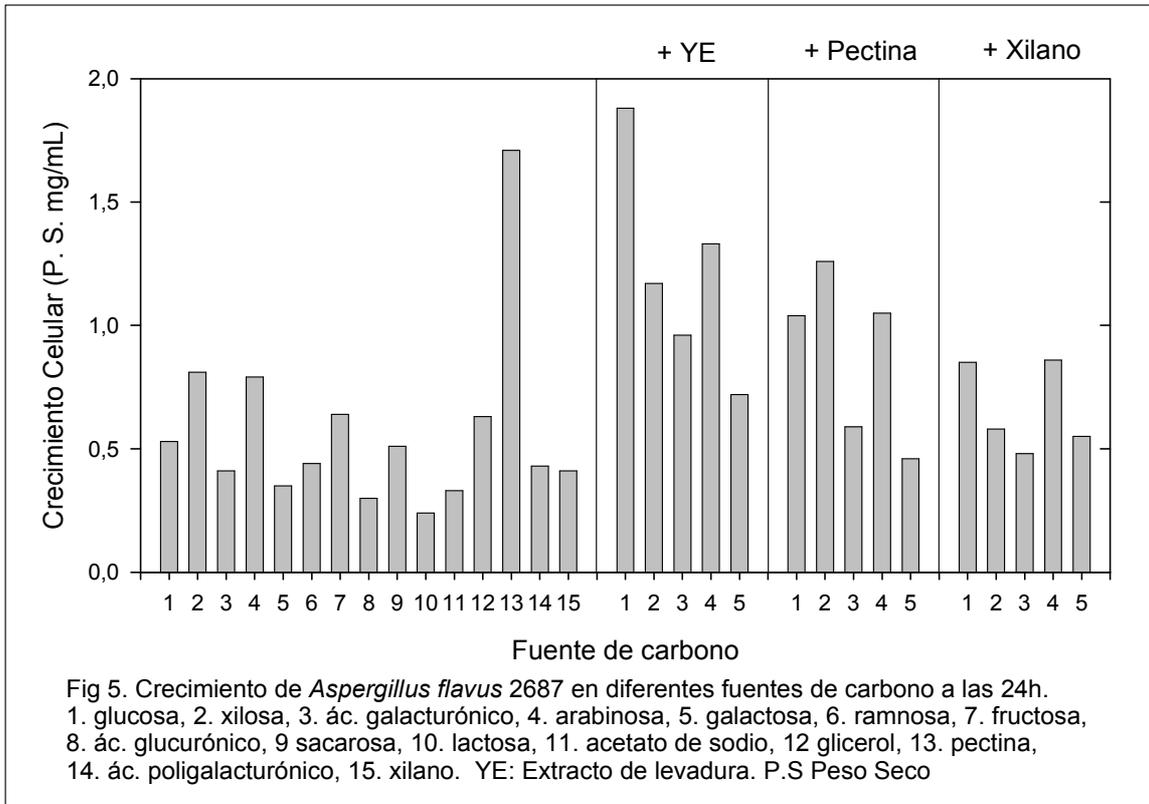


La mayoría de las fuentes adicionadas con YE incrementaron su consumo (fig. 4) con excepción de ác. galacturónico en donde el consumo fue prácticamente el mismo.

Al haberse obtenido un buen crecimiento en pectina, se esperaba que la adición de pectina a los azúcares sencillos estimularía el crecimiento, lo cual sí ocurrió ya que para el caso de las fuentes adicionadas se observó para todas las condiciones un mayor crecimiento que en las fuentes sencillas (fig. 3). La estimulación del crecimiento en el microorganismo por la adición de pectina fue menor que con la adición de extracto de levadura.

Al observar que el microorganismo fue capaz de crecer bien en xilano, se esperaba que de manera similar al efecto de la pectina, al ser adicionado a las fuentes sencillas se estimulara su crecimiento, pero lo que ocurrió fue que fuentes como glucosa, xilosa y ác. galacturónico el crecimiento no se estimuló

y si se vio fuertemente reprimido. Solo en galactosa fue la única fuente en donde se observó un mayor crecimiento pero este fue incipiente.



Aspergillus flavus 2687 a las 24 h de fermentación creció en todas las fuentes de carbono (fig. 5). En pectina se observó el mayor crecimiento entre las fuentes de carbono no adicionadas. En el caso del crecimiento en xilano y ác. poligalacturónico fue cercano e incluso menor al obtenido en los monosacáridos (fig. 5).

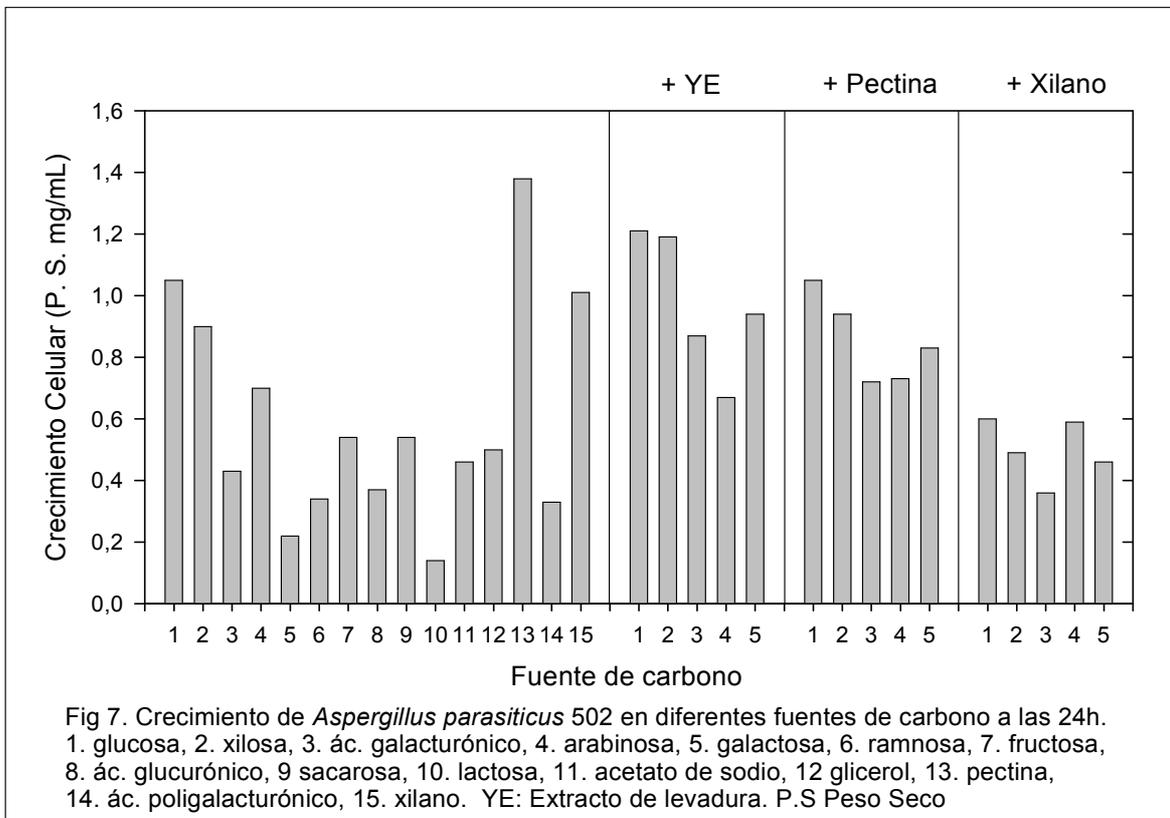
Para las fuentes sencillas el crecimiento es menor a 1 mg/mL, siendo en galactosa la fuente en donde se obtuvo el menor crecimiento pero el mayor consumo de la fuente de carbono, lo cual nos indica que existen ciertas diferencias en cuanto a la forma de metabolizar y aprovechar las fuentes de carbono.

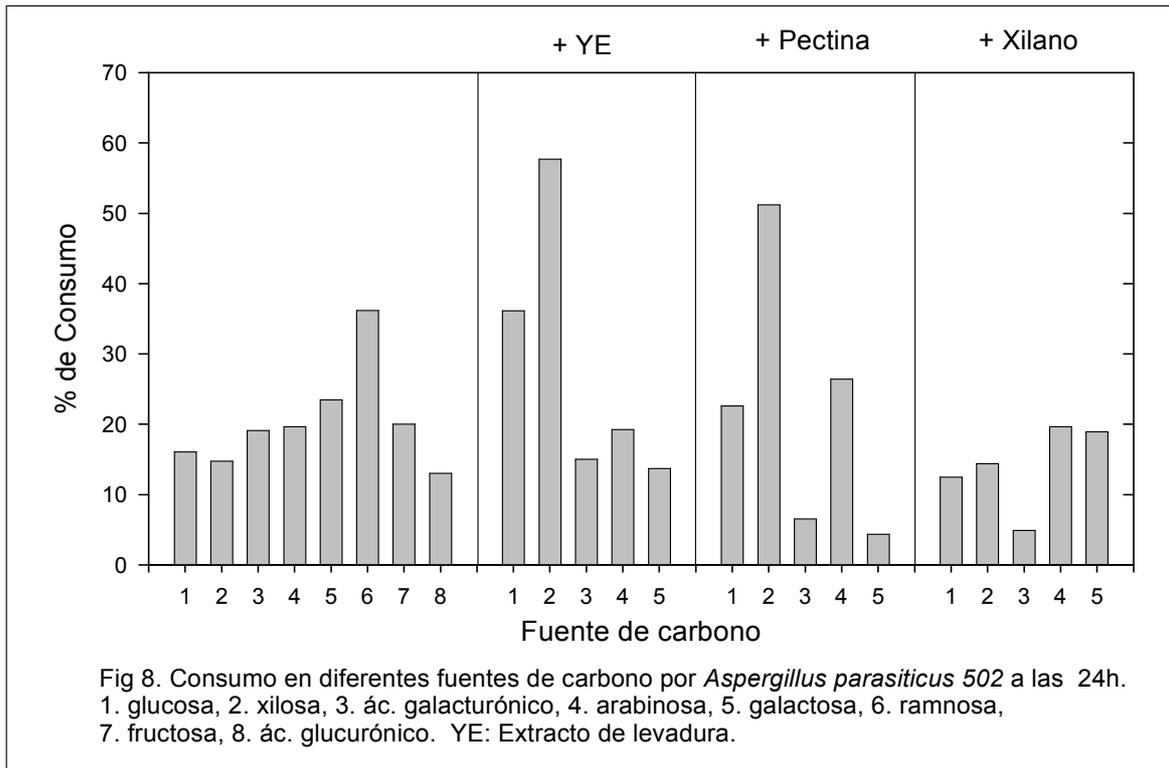
Es importante señalar que *Aspergillus flavus* 2687 siguió una tendencia muy parecida a la observada para *Aspergillus flavus* 6541, tanto para ác. galacturónico, xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa se observó un crecimiento deficiente (crecimiento menor a 1 mg/mL de biomasa), el cual mejoró al adicionar pectina, pero se ven más estimulados al adicionar YE, tal es el caso de glucosa + YE que fue la condición en donde se presentó el mayor crecimiento (1.88 mg/mL de biomasa), mientras que el xilano no estimuló su crecimiento.

En el consumo (fig. 6) se observó poca variación, se mantuvo en niveles del 40% aproximadamente destacando la condición glucosa + YE en el que existió un consumo del 70% que era esperado ya que fue donde se presentó el mayor crecimiento.

En las otras condiciones adicionadas con extracto de levadura se incrementó el crecimiento pero no el consumo, mejoró la eficiencia para metabolizar y

ocupar las fuentes de carbono, esto también se aprecia en el caso de las fuentes adicionadas con pectina y en xilano aunque en un menor grado.





Al igual que las cepas anteriores *Aspergillus parasiticus* 502 (fig. 7) creció en todas las condiciones de fermentación, observándose que en pectina fue donde se obtuvo el mayor crecimiento (1.38 mg/mL).

En el caso de glucosa y xilosa se presentó un estímulo moderado al adicionar YE y se observó prácticamente el mismo crecimiento al adicionar pectina. Como en los casos anteriores se presentó una disminución en el crecimiento en las condiciones adicionadas con xilano.

Se estimuló el crecimiento al añadir pectina, pero en menor grado que en extracto de levadura.

En las fuentes adicionadas con xilano, fue solamente en galactosa donde se observó un estímulo en el crecimiento mientras que en los demás monosacáridos el crecimiento se ve disminuido.

Se aprecia (fig. 8) que hay un mayor consumo en xilosa + YE que en glucosa + YE, aunque el crecimiento fue parecido se podría pensar que *Aspergillus*

parasiticus utiliza de diferente forma estos dos azúcares, siendo más eficiente en cuanto a consumo/crecimiento la glucosa.

Al comparar las tres cepas de *Aspergillus* de manera general se observó que:

1. *Apergillus flavus* 2687 creció mejor en la mayoría de las condiciones adicionadas pero de una manera deficiente en las fuentes sencillas.
2. Las tres cepas crecieron bien en los polisacáridos principalmente en pectina.
3. Las tres cepas presentaron un estímulo moderado al adicionar pectina y un mayor estímulo al adicionar extracto de levadura.
4. *Aspergillus parasiticus* presentó el mayor consumo, prácticamente en todas las fuentes de carbono, pero su crecimiento no fue el mejor.
5. Si bien el consumo de los azúcares sencillos mejora con la adición de extracto de levadura y pectina, en ningún caso es completo lo que puede indicar una aparente limitación en la utilización de estos azúcares por lo microorganismos utilizados.

V. 2 Cinética de producción en sustratos puros

Las tres cepas de *Aspergillus* se crecieron en medios líquidos con la finalidad de conocer el perfil enzimático de cada cepa, creciendo en pectina además de fuentes sencillas (ác. galacturónico y glucosa) y adicionadas con extracto de levadura (YE) debido a que se observó que estimulaba el crecimiento de las tres cepas.

Se adicionaron también ác. galacturónico y glucosa al 0.2% en pectina con la finalidad de observar si la adición de estos azúcares de fácil asimilación intervienen en efectos de regulación metabólica, represión o estimulación de la actividad enzimática.

El perfil enzimático observado en *Aspergillus flavus* 6541 (fig. 9) varió dependiendo de la fuente de carbono en la que se creció. Se ha observado que la síntesis de enzimas extracelulares de hongos como *Aspergillus* se ve fuertemente influenciada por los componentes de los medios de cultivo, particularmente por la fuente de carbono (Blandino et al, 2001).

En pectina (fig. 9a) se produjo actividad tanto exo pectinolítica como pectin liasa y sus máximos de actividad se presentaron a las 48h, el microorganismo tuvo una fase de adaptación prolongada. A las 24h sólo se observó poca actividad celulolítica (1.21 U/mL) que desaparece al final de la fermentación.

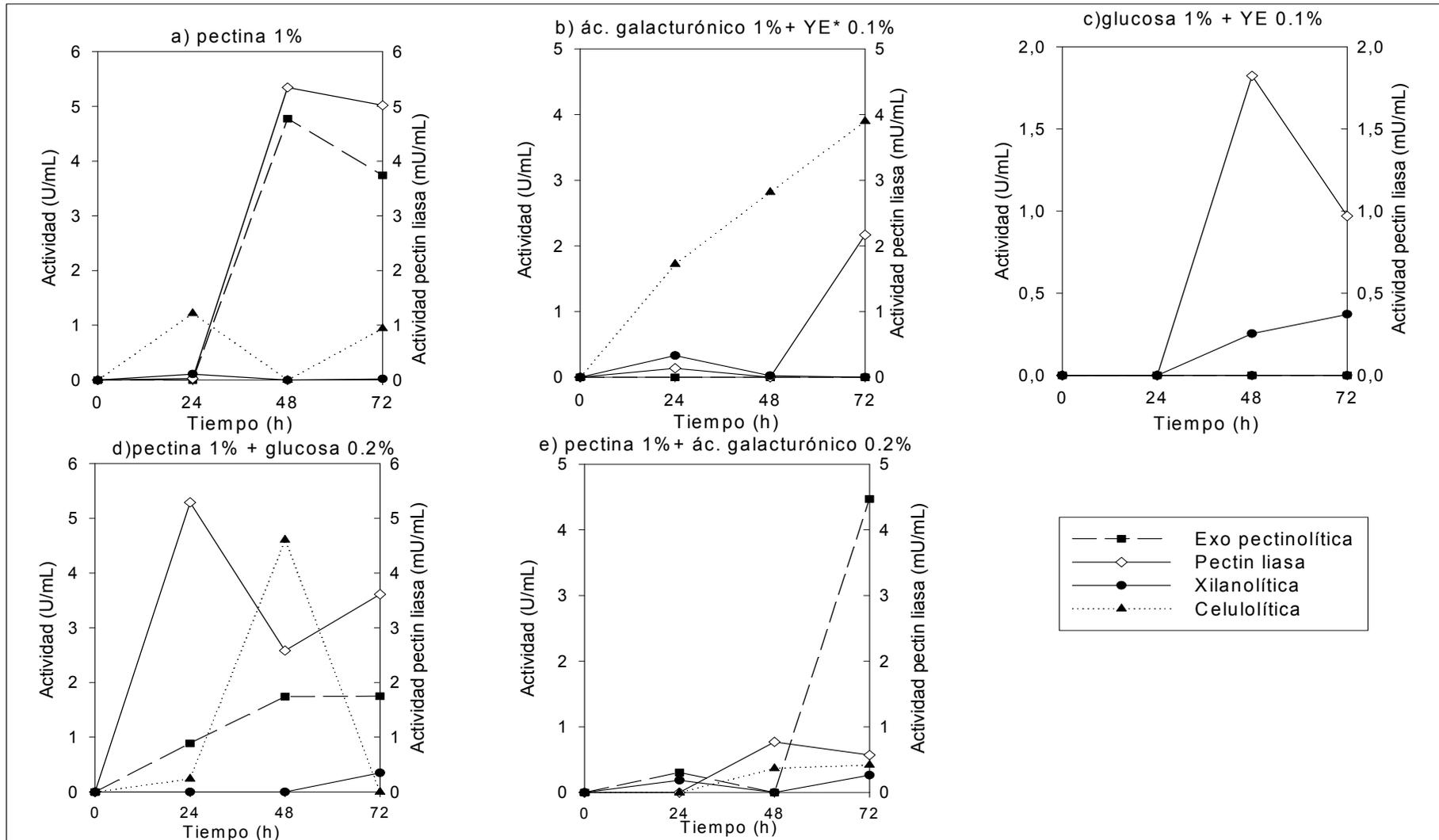


Figura 9. Perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 6541 en diferentes fuentes de carbono, cultivado a 37°C y 200 rpm. YE* Extracto de levadura.

La cepa 6541 de *Aspergillus* no creció en los matraces con azúcares sencillos solos, a esta concentración el hongo no fue capaz de germinar. Este comportamiento fue observado en cultivos de *Aspergillus niger* con concentraciones altas de glucosa, los cuáles mostraban un retraso en los tiempos de germinación (Favela- Torres, 1996).

La adición de YE estimuló su desarrollo, para el caso del ác. galacturónico (fig. 1b) sólo se presentó actividad pectin liasa y actividad celulolítica alcanzando sus máximos hasta tiempos largos de fermentación (72 h). Por otro lado, en la condición de glucosa adicionada (fig. 9c) se produjo actividad pectin liasa a tiempos semejantes a la pectina (48 h) pero en menor magnitud. Se presentó actividad xilanolítica de manera incipiente.

En los casos de pectina adicionados se observó que para pectina + glucosa (fig. 9d) se presentaron las actividades producidas en pectina (fig. 9a), la magnitud de actividad pectin liasa fue la misma que en pectina pero a un tiempo más corto (24h). La actividad exo pectinolítica si se ve afectada (de 9.4 disminuye hasta 2) a las 72 h, el hecho de que hubiera glucosa en el medio provocó una clara disminución en la actividad, la glucosa funcionó de represor catabólico. La adición de glucosa estimuló la producción de actividad celulolítica pero se expresó a tiempos más largos de fermentación.

El efecto más notorio de represión por carbono ocurrió en pectina adicionada con ác galacturónico (fig. 9e) en donde se produjo muy poca actividad, sólo hasta tiempos largos de fermentación se observó actividad pectinolítica siendo la exo pectinolítica la que alcanzó un pico máximo de actividad (4.4 U/mL).

Con respecto a la actividad xilanolítica para los casos de pectina adicionados con los monosacárido la producción fue deficiente, pareciera que la glucosa y el ác. galacturónico no estimulan la síntesis enzimas xilanolíticas.

Es importante mencionar que la actividad pectin liasa se produjo en todas las condiciones que presentaron crecimiento, por lo que con estos resultados podríamos presumir que el complejo pectinolítico con actividad pectin liasa, se produce de manera constitutiva.

El perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 2687 varió dependiendo del tipo de fuente de carbono en el que se creció el microorganismo. Se observó que creciendo en pectina (fig. 10a) se produjeron las actividades exo pectinolítica y pectin liasa así como actividad celulolítica, al parecer los productos de degradación de la pectina inducen la producción de enzimas degradadoras de celulosa. No fue el caso de la actividad xilanolítica debido a que la pectina no estimuló la producción de xilanasas.

Para la condición en el que se utilizó ác. galacturónico + YE (fig. 10b), en general se observaron actividades bajas y se produjeron a tiempos largos con excepción de la actividad celulolítica la cual se presentó a las 24 h aunque disminuyó conforme transcurrió la fermentación. El perfil enzimático en glucosa + YE (fig. 10c) también presentó muy poca actividad y esta se dio hasta tiempos largos. Quizá lo que ocurrió fue que la presencia de azúcares

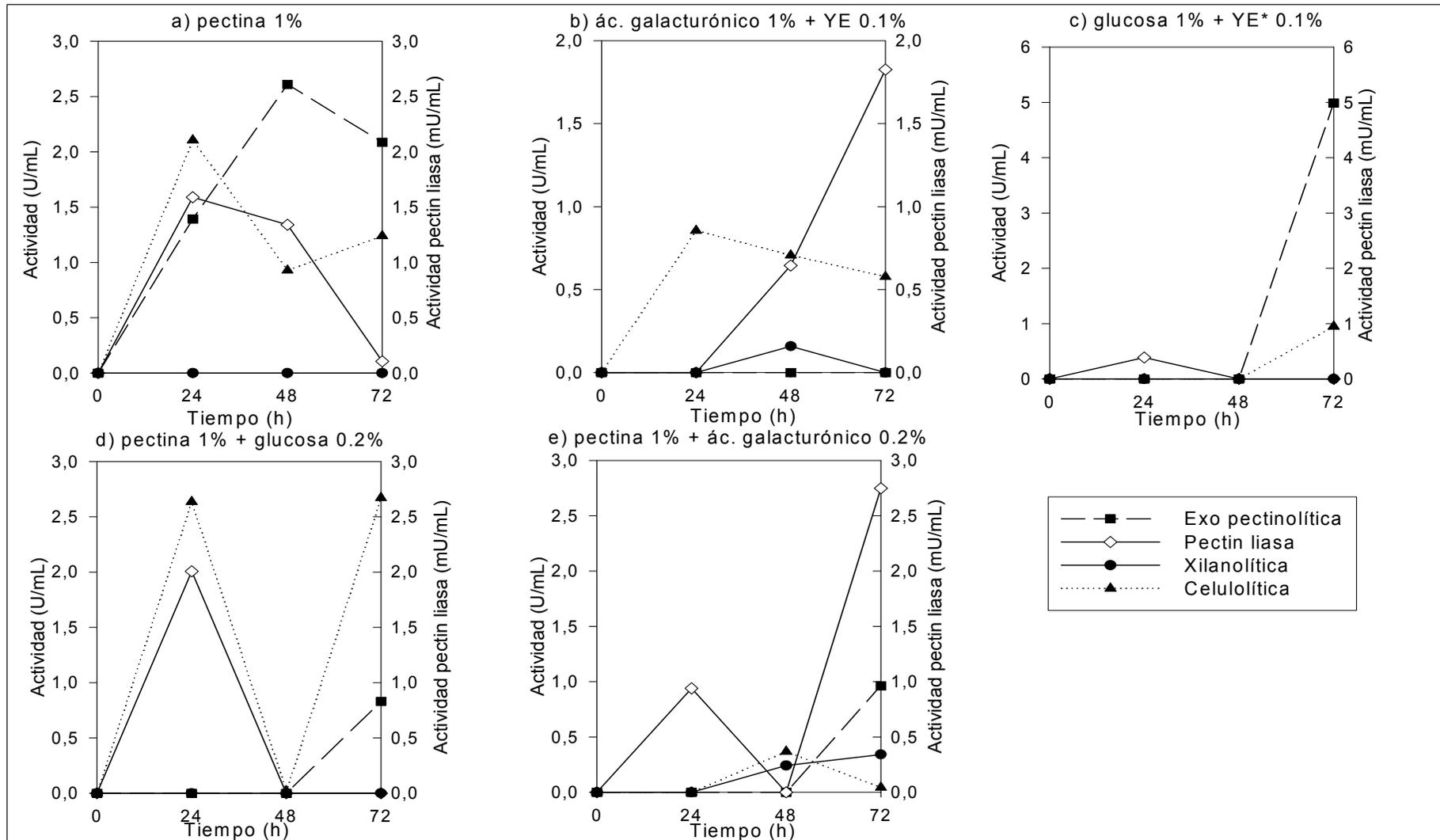


Figura 10. Perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 2687 en diferentes fuentes de carbono, cultivado a 37°C y 200 rpm. YE* Extracto levadura

rápidamente metabolizables como glucosa, reprimió la síntesis de polisacaridasas (Rujiter and Visser, 1997).

La adición de glucosa a cultivos de esta cepa creciendo sobre pectina nos da resultados erráticos. Mientras que para la actividad exo pectinolítica se observó un claro efecto represor para la actividad pectin liasa, para la actividad celulolítica el efecto es incierto.

Por otro lado al incorporar ác. galacturónico a cultivos con pectina provocó una disminución de todas las actividades, con una tendencia a aumentar a tiempos largos de fermentación que la actividad exo pectinolítica disminuyera y se presentara hasta el final de la fermentación (fig. 10e), la adición de este azúcar provocó que se presentara poca actividad xilanolítica a las 48h.

En las todas las condiciones para la cepa 2687 de *Aspergillus* se observó la producción de actividad pectin liasa y actividad celulolítica, lo cuál podría ser indicativo que estas enzimas son producidas de manera constitutiva.

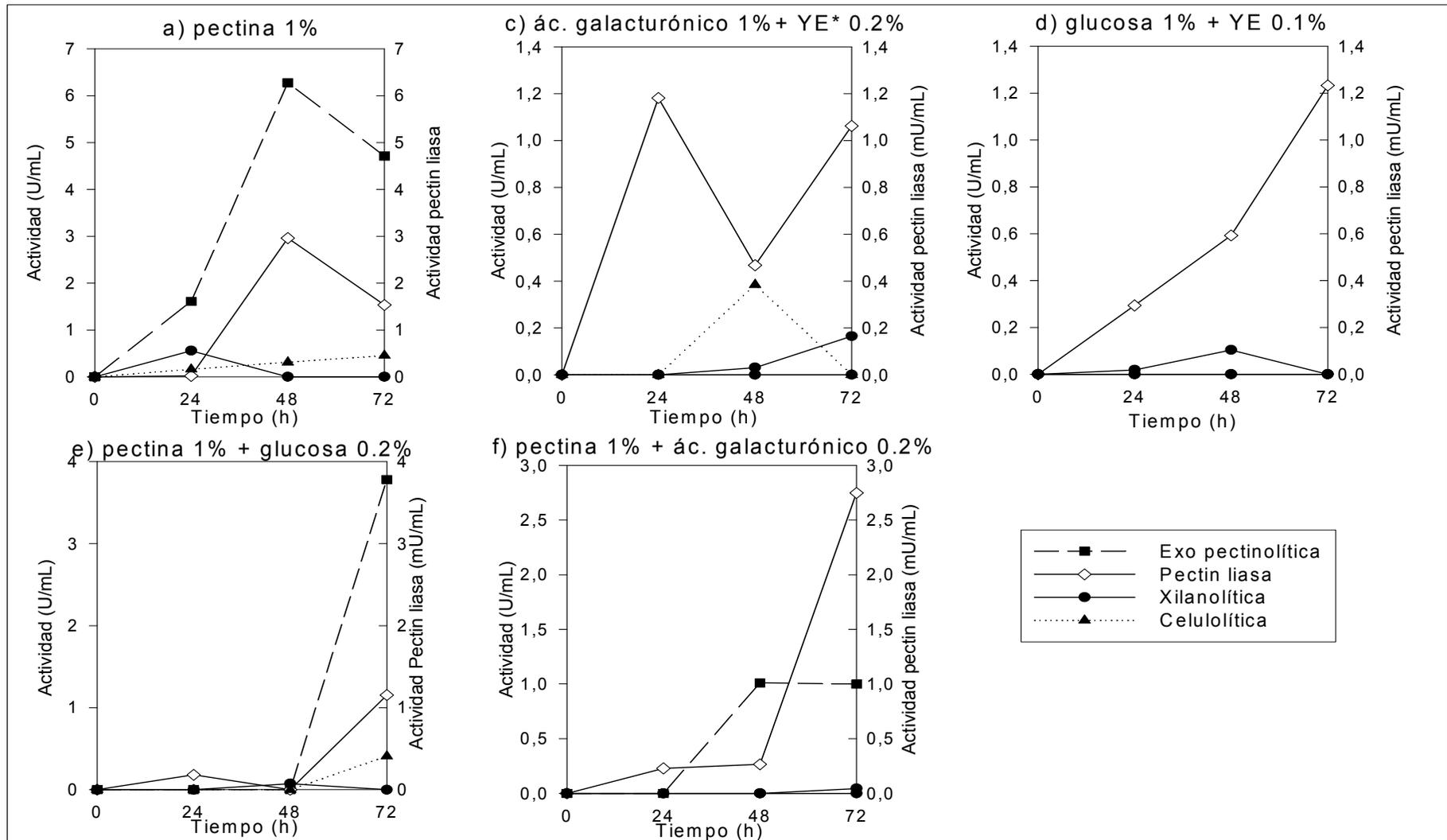


Figura 11. Perfil enzimático de *Aspergillus parasiticus* 502 en diferentes fuentes de carbono, cultivado a 37°C y 200 rpm. YE* Extracto de levadura.

Para la cepa de *Aspergillus parasiticus* 502 al igual que en los casos anteriores, fue en pectina (fig. 11a) donde se presentó la mayor actividad pectinolítica alcanzando sus máximos a las 48h. A diferencia de las otras cepas si se observó actividad xilanolítica, los productos de degradación de la pectina estimulan la producción de xilanasas.

En los matraces adicionados con YE (fig. 11e y 11f) se presentaron actividades menores con respecto a pectina y solo se observó claramente actividad pectin liasa.

Para los casos de pectina adicionados con glucosa y ác. galacturónico como se apreció en las figuras anteriores, la actividad pectinolítica disminuyó además de que se presentó hasta tiempos más largos de fermentación (después de 48 h).

No se presentó actividad xilanolítica en ninguno de los dos casos, la presencia de estos azúcares de fácil asimilación reprimió la producción de enzimas xilanolíticas.

La actividad pectin liasa fue la única actividad enzimática que se presentó en todos los medios probados, quizás debido a que estas enzimas son producidas de manera constitutiva.

En ningún sustrato probado para las cepas *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* se detectó actividad tipo endo pectinolítica, estos resultados concuerdan con resultados previos obtenidos por el grupo de trabajo.

V. 3 Cinética de producción con pectina, xilano, celulosa y mezcla.

Las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* fueron crecidas en polisacáridos que componen la pared celular de plantas: pectina, xilano, celulosa y en una mezcla de los sustratos en proporción (10:40:50) respectivamente como única fuente de carbono, en las mismas condiciones que se utilizaron para los sustratos puros, con el objetivo de evaluar que tipo de enzimas y en qué tiempos eran producidas.

Observamos que la cinética de producción para *Aspergillus flavus* 6541 en pectina (fig. 12a) presentó actividad pectin liasa y exo pectinolítica alcanzando su máximo a las 48h de fermentación, se produjo actividad celulolítica a tiempos cortos de fermentación (24 h). No se observó actividad xilanolítica, los productos de degradación de la pectina no estimulan la producción de enzimas degradadoras de xilano.

Al crecer en xilano (fig. 12b) se presentó una gran actividad xilanolítica en todos los tiempos de fermentación y a las 48h se observó su pico máximo de actividad. Se presentó actividad exo pectinolítica y celulolítica, los productos de degradación del xilano estimulan la producción tanto de pectinasas como celulasa debido a la heterogeneidad del polisacárido,

Fue en celulosa (fig. 12c) en donde se presentó el perfil enzimático más pobre ya que solo se produjo actividad celulolítica y exo pectinolítica, a las 24h se observaron los máximos que disminuyen para prácticamente desaparecer a las 48h.

La mezcla (fig. 12d), presentó un perfil de actividad xilanolítica semejante al de xilano en donde esta actividad se presentó en toda la fermentación con un

máximo de 53.5 U/mL, superando incluso al xilano sólo. A tiempos prolongados de la fermentación se produjo poca actividad pectin liasa.

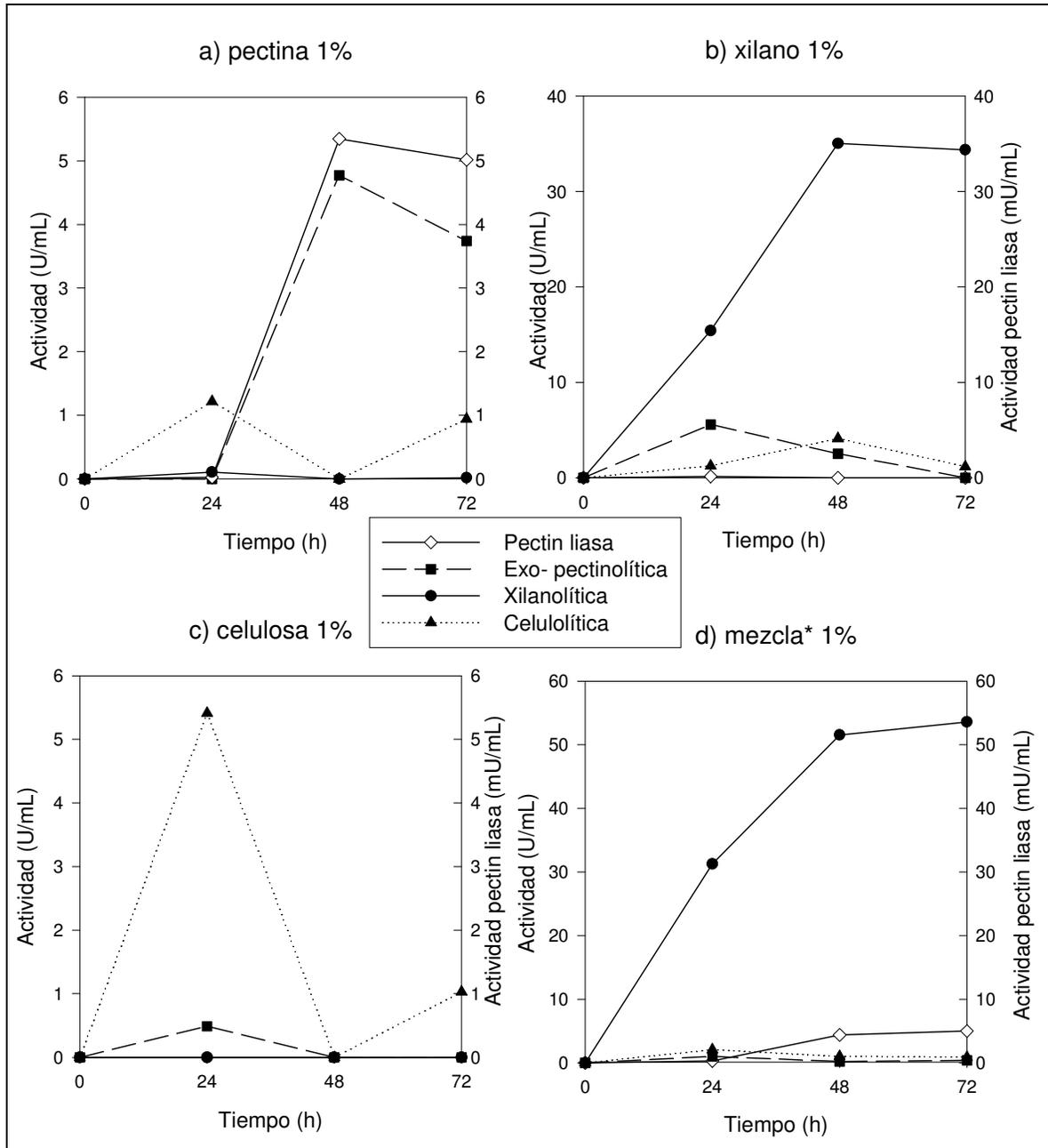


Figura 12. Perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 6541 en diferentes fuentes de carbono, cultivado a 37°C a 200 rpm. Mezcla*: pectina 0.1%, xilano 0.4%, celulosa 0.5%.

En el perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 2687 observamos (fig. 13) que fue en pectina donde se presentaron las menores actividades enzimáticas, a

tiempos cortos solo se produjo poca actividad pectin liasa y celulolítica las cuales se pierden conforme pasa el tiempo de fermentación.

El perfil enzimático de xilano fue muy semejante al perfil de la figura anterior en donde fue la actividad xilanolítica la que más se estimuló, por otro lado se produjo gran cantidad de actividad pectinolítica tipo exo a las 48h de fermentación, superando inclusive a la producida en pectina. No se observó actividad pectin liasa.

En celulosa (fig. 13c) solo se produjeron las actividades celulolítica además de que como se observo en la cepa anterior los productos de degradación de la celulosa estimularon la producción de enzimas exo pectinolíticas. Estas actividades se observaron desde el inicio de la fermentación y disminuyeron a las 48h.

Observamos que se produjeron todas las actividades (fig. 13d), en la mezcla de polisacáridos pareciera tenerse un efecto sinérgico ya que las actividades se incrementan, se presentó una mayor actividad xilanolítica que en xilano (35% más), hubo una mayor actividad pectinolítica en la mezcla que en pectina sola principalmente actividad pectin liasa (83% más) y se presentó también actividad celulolítica pero esta fue menor que en celulosa.

Sólo se observó que la actividad exo pectinolítica fue la única que estuvo presente en todos los sustratos analizados.

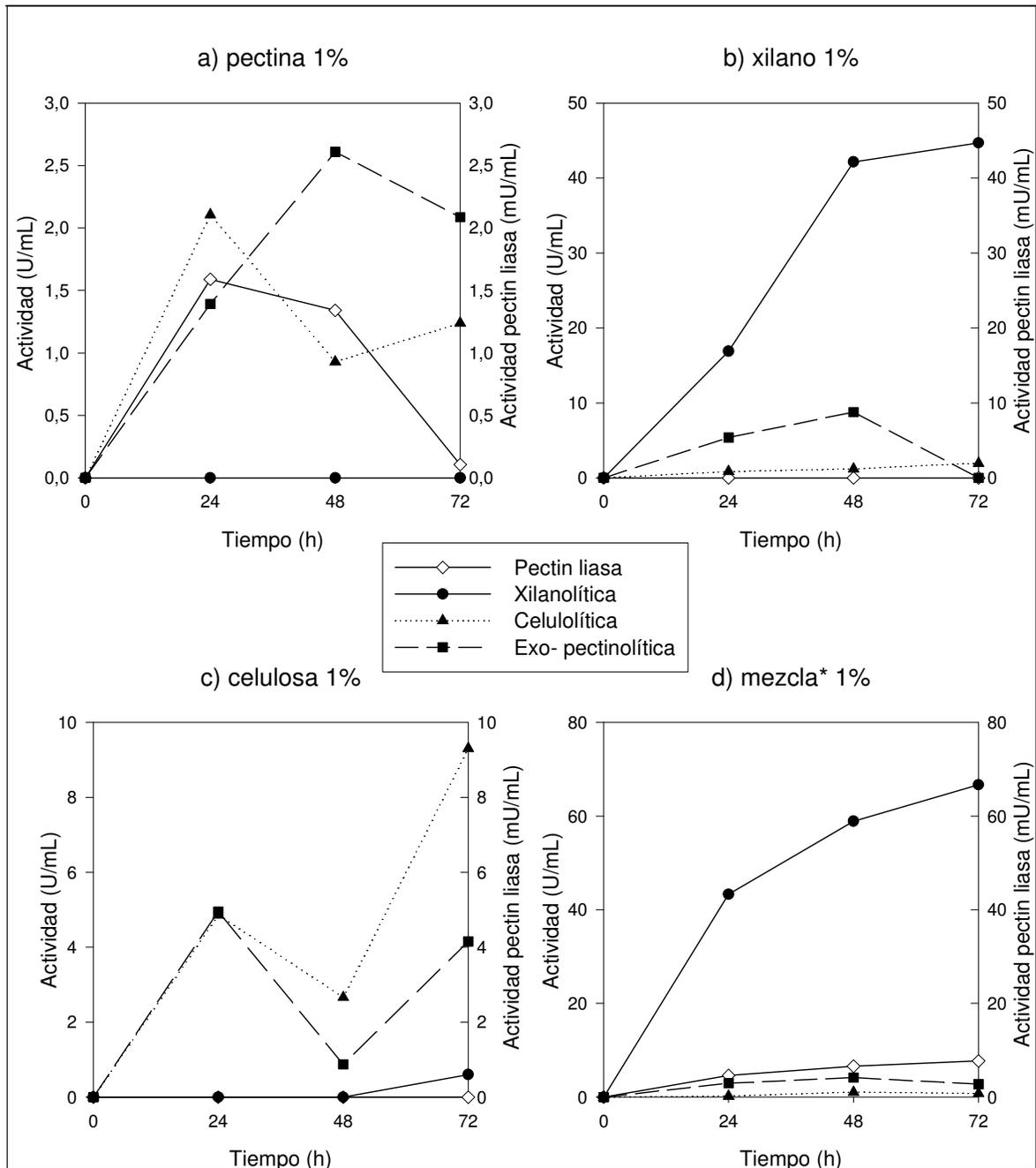


Figura 13. Perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 2687 en diferentes fuentes de carbono, cultivado a 37°C a 200 rpm. Mezcla*: pectina 0.1%, xilano 0.4%, celulosa 0.5%.

El perfil de enzimas producidas por *Aspergillus parasiticus* 502 (figura 14) presentó actividad xilanolítica en los cuatro sustratos estudiados, se produjo en etapas tempranas en pectina y celulosa, solo hasta las 48h se observó en xilano y la mezcla.

En pectina se presentó actividad exo pectinolítica desde etapas tempranas de la fermentación alcanzando el máximo a las 48h, en este tiempo la actividad pectin liasa presentó su pico máximo, la actividad celulolítica fue insipiente.

Se observó que en xilano además de la actividad xilanolítica se presentó actividad pectinolítica pero hasta el final de la fermentación.

Al observar el perfil en celulosa (fig. 14c), nos damos cuenta que es la fuente de carbono en donde se presentaron las menores actividades debido a que la celulosa por su conformación estructural hace difícil la acción enzimática. Este comportamiento se apreció en la cepas de *Aspergillus flavus* 2687 y *Aspergillus flavus* 6541.

En el caso de la mezcla, se observó todo el perfil de enzimático, observándose un incremento en la actividad xilanolítica al crecer en la mezcla que en xilano sólo.

Se presentó mayor actividad pectinolítica en la mezcla que en pectina a tiempos muy semejantes (48h), por lo que podríamos presumir que en la mezcla existe un efecto sinérgico, no solo los productos generados de la pectina regulan la síntesis de pectinasas sino que también los productos generados de la hidrólisis del xilano regulan los genes que codifican para la síntesis de pectinasas.

No se registró actividad tipo endo pectinolítica en ningún sustrato analizado para las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.

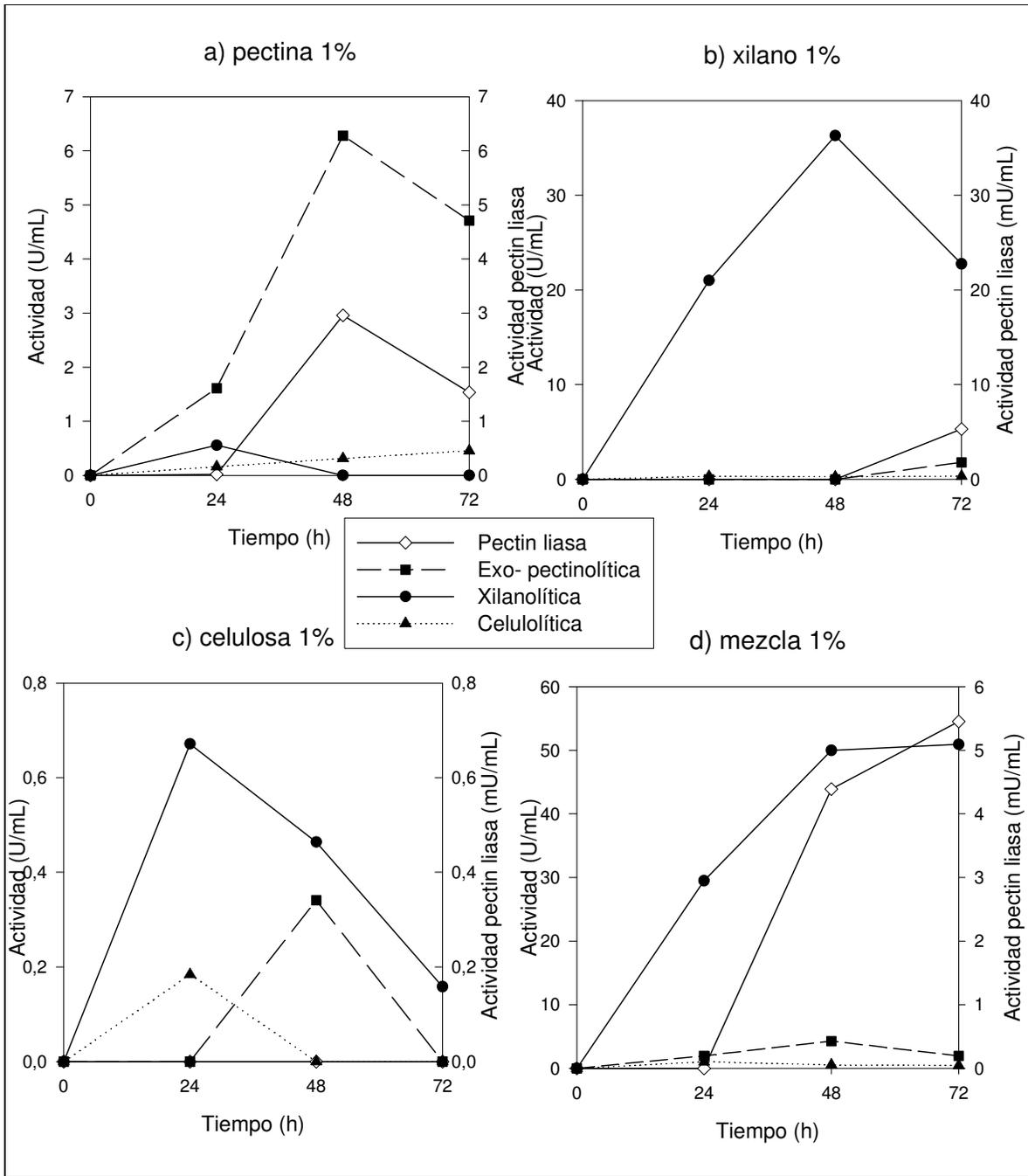


Figura 14. Perfil enzimático de *Aspergillus parasiticus* 502 en diferentes fuentes de carbono, cultivado a 37°C a 200 rpm. Mezcla*: pectina 0.1%, xilano 0.4%, celulosa 0.5%.

V. 3. 1 Crecimiento en medio Sólido

Debido a las diferencias en crecimiento encontradas en medio líquido con diferentes fuentes de carbono y con objeto de identificar si en medio sólido también se presentan estas diferencias en el crecimiento y/o preferencias por alguna fuente de carbono, las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* fueron crecidas en azúcares sencillos y polisacáridos, en placas conteniendo la mitad de la placa con glucosa, xilosa o ácido galacturónico en la otra un polisacárido como pectina o xilano. Cada mitad y el centro de la placa donde se unen ambas fuentes de carbono se inocularon con 10 μL de una suspensión de esporas de 1000 esp/ μL .

Las tres cepas de *Aspergillus* tuvieron la capacidad de crecer en todos los sustratos, se observó que:

***Aspergillus parasiticus* NRRL-502**

- a) Medio basal con ác. galacturónico y pectina.

Se observó un crecimiento semejante aunque ligeramente mayor en ác. galacturónico, el aspecto del micelio es aterciopelado y la colonia es verde mientras que en el azúcar sencillo presentó una colonia no tan compacta, se observan los bordes de la colonia blancos debido a una poca esporulación, no se apreció preferencia por alguno de los sustratos.

- b) Medio basal con xilosa y pectina.

El crecimiento es semejante en ambos medios, la colonia central presentó un crecimiento semejante por lo que con estos resultados no podríamos hablar de

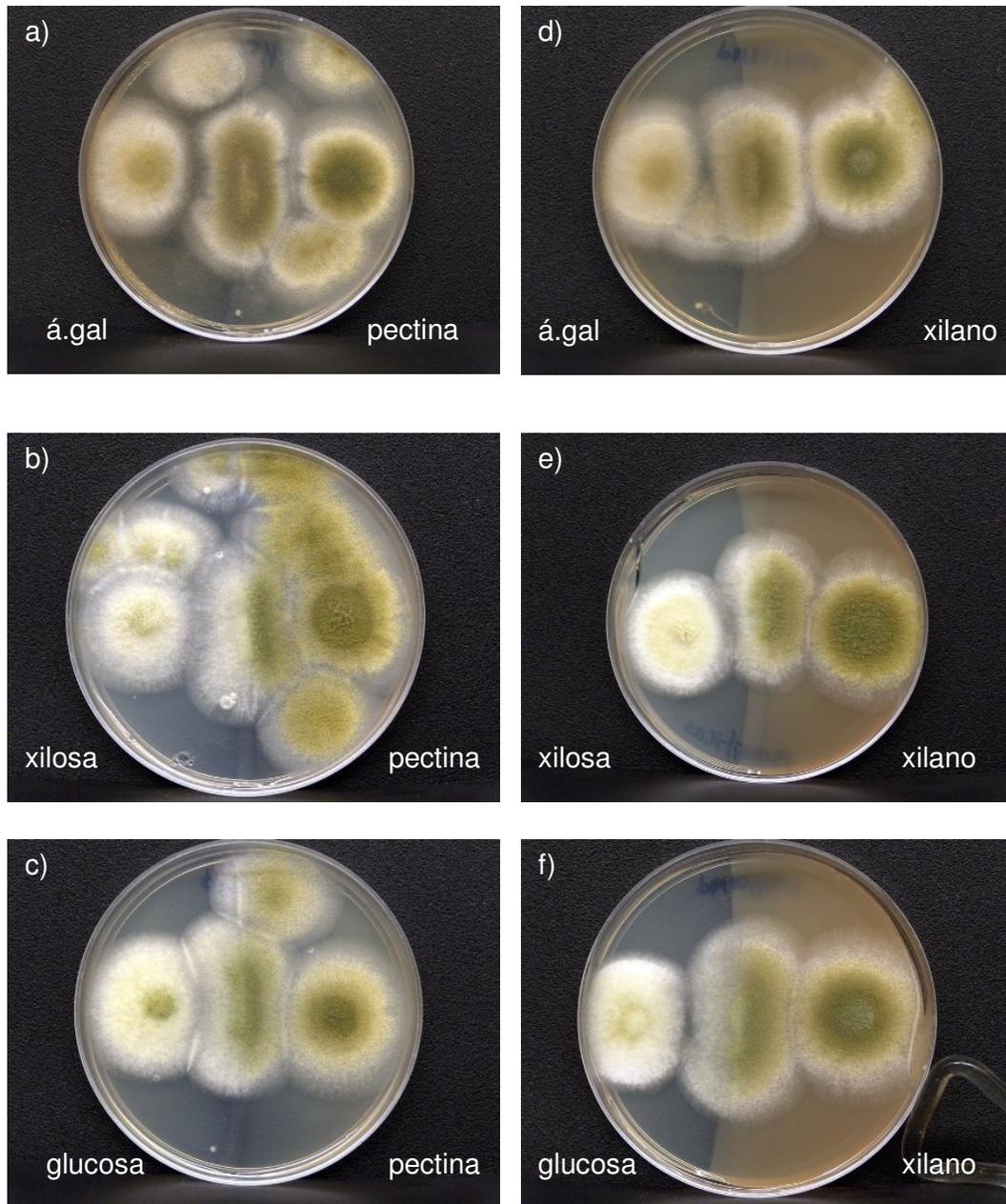


Figura 15. Crecimiento en medio sólido de *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 en a) ác. galacturónico - pectina, b) xilosa – pectina, c) glucosa – pectina, d) ác. galacturónico – xilano, e) xilosa – xilano, f) glucosa – xilano, cultivado a 37 °C por 72h.

preferencia por alguna fuente de carbono, si hubo variación en el color observándose en xilosa una coloración blanca y una menor esporulación que en pectina.

c) Medio basal con glucosa y pectina.

El desarrollo de la colonia fue muy similar aunque un poco menor en glucosa, no se observó que el microorganismo presentara preferencia por algún sustrato. Se observó en glucosa cambios en cuanto al color debido a una menor esporulación.

d) Medio basal con ác. galacturónico y xilano.

El desarrollo es abundante en las tres colonias apreciándose en xilano un mayor crecimiento; se observaron colonias verdes con una tonalidad más tenue en el ác. galacturónico. El aspecto del micelio fue semejante en ambos medios pero hubo una mayor esporulación en xilano, la colonia del centro no presentó preferencia por algún sustrato.

e) Medio basal con xilosa y xilano.

El crecimiento fue abundante en los dos medios siendo en xilano donde fue mejor, en la colonia del centro se observó una colonia más compacta en el polisacárido. Hubo diferencias en el color observándose nuevamente un color blanco en el monosacárido en este caso xilosa debido a una poca esporulación.

f) Medio basal con glucosa y xilano.

Presentó un crecimiento semejante en las dos fuentes de carbono, se observó diferencias en el aspecto del micelio siendo en xilano más compacto que en glucosa, además de que se apreció mayor esporulación en xilano con una tonalidad verde característica de la cepa, mientras que en glucosa se observó la colonia de color blanco debido a una poca esporulación.

***Aspergillus flavus* CECT-2687**

a) Medio basal con ác. galacturónico y pectina.

Se observó un crecimiento semejante, el aspecto del micelio es aterciopelado y las colonias son de color verde, la esporulación es parecida sin embargo en ác. galacturónico se observan los bordes de la colonia mas tenues debido a que no ha esporulado en esa parte, no se apreció alguna preferencia por alguno de los sustratos.

b) Medio basal con xilosa y pectina.

Se apreció un menor crecimiento en xilosa que en pectina, el aspecto de la colonia es semejante en las tres colonias, pero se observa una menor esporulación en los bordes de la fuente sencilla en este caso xilosa.

c) Medio basal con glucosa y pectina.

Se observó un crecimiento abundante en ambos medios, pero fue en el polisacárido en donde el crecimiento fue mayor, aunque no se apreció que la colonia del centro tuviera preferencia por algún sustrato. El color y el aspecto de la colonia fue muy semejante en ambos medios pero en el lado de glucosa se apreció una menor esporulación.

d) medio basal con ac. galacturónico y xilano.

El crecimiento fue abundante en ambos medios, en xilano se aprecia un crecimiento mayor y el aspecto de la colonia no fue tan compacto en ác. galacturónico, se observó también en el monosacárido una zona mas clara en los bordes debido a una menor esporulación.

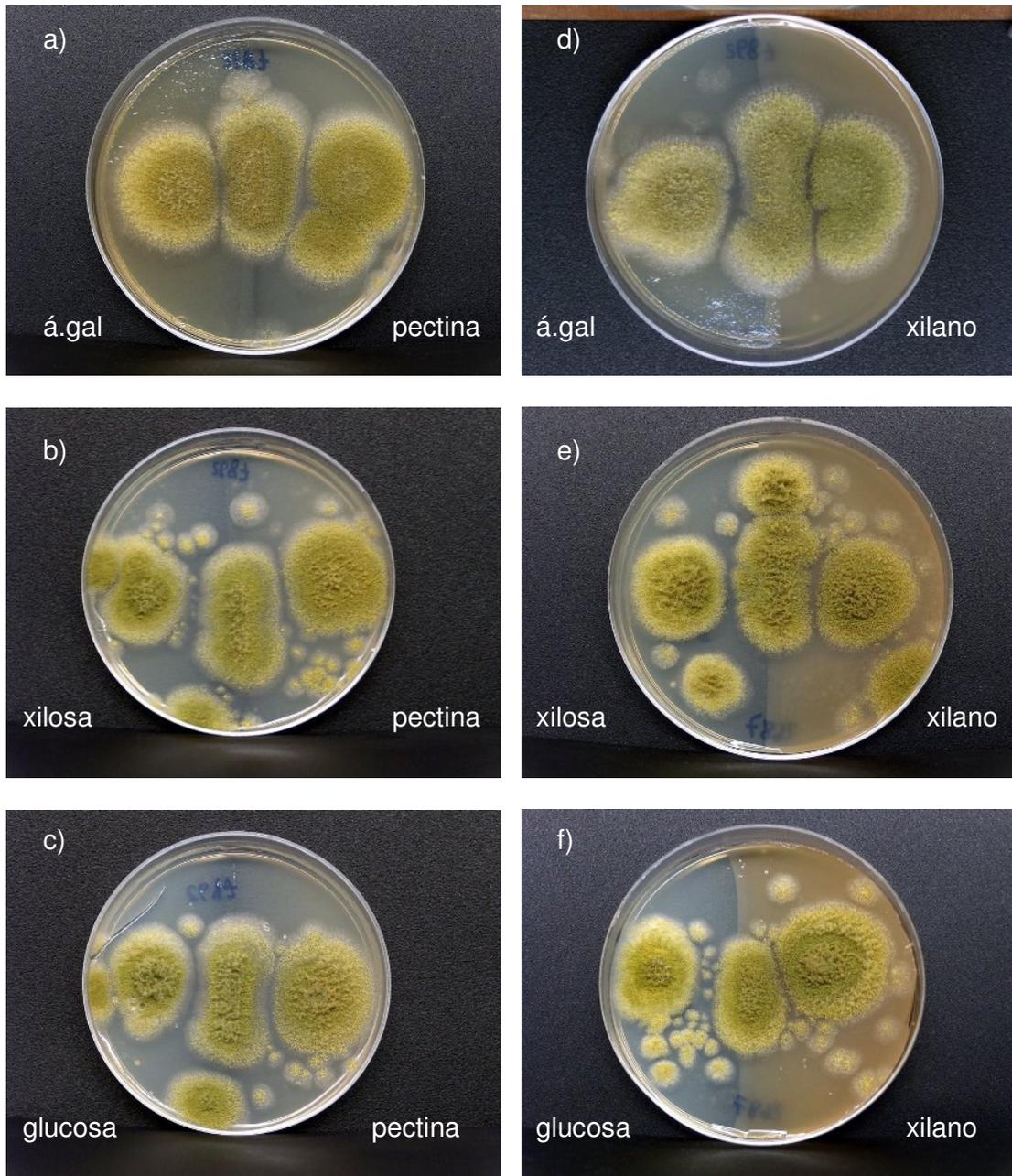


Figura 16. Crecimiento en medio sólido de *Aspergillus flavus* CECT-2687 en a) ác. galacturónico - pectina, b) xilosa – pectina, c) glucosa – pectina, d) ác. galacturónico – xilano, e) xilosa – xilano, f) glucosa – xilano, cultivado a 37 °C por 72h.

e) Medio basal con xilosa y xilano.

No se observaron grandes diferencias en cuanto a crecimiento, el aspecto de la colonia si varia ya que en xilosa se observó una colonia más algodonosa y de una tonalidad verde claro en el centro y una zona más clara en los bordes, mientras que en xilano se observó una colonia mas compacta de un tono más oscuro y mayor esporulación.

f) Medio basal con glucosa y xilano.

El crecimiento es abundante en ambos medios pero se observó un mayor crecimiento en xilano y una mayor esporulación que en glucosa. En la colonia del centro solo se observaron diferencias en el aspecto pero no en cuanto a preferencia por algún sustrato.

***Aspegillus flavus* NRRL-6541**

a) Medio basal con ác. galacturónico y pectina.

Hubo un crecimiento abundante en ambas fuentes de carbono. El aspecto del micelio es aterciopelado y las colonias son de color verde en ambos casos, la mayor diferencia se observa en la zona de esporulación. En pectina toda la colonia esta esporulada, en ác. galacturónico la esporulación en la periferia (aproximadamente 1/3 de la colonia) es insipiente.

b) Medio basal con xilosa y pectina.

El crecimiento fue semejante en ambos medios, no se observa preferencia por algún sustrato, las tres colonias presentaron un aspecto semejante aunque la colonia con xilosa presento una tonalidad más clara.

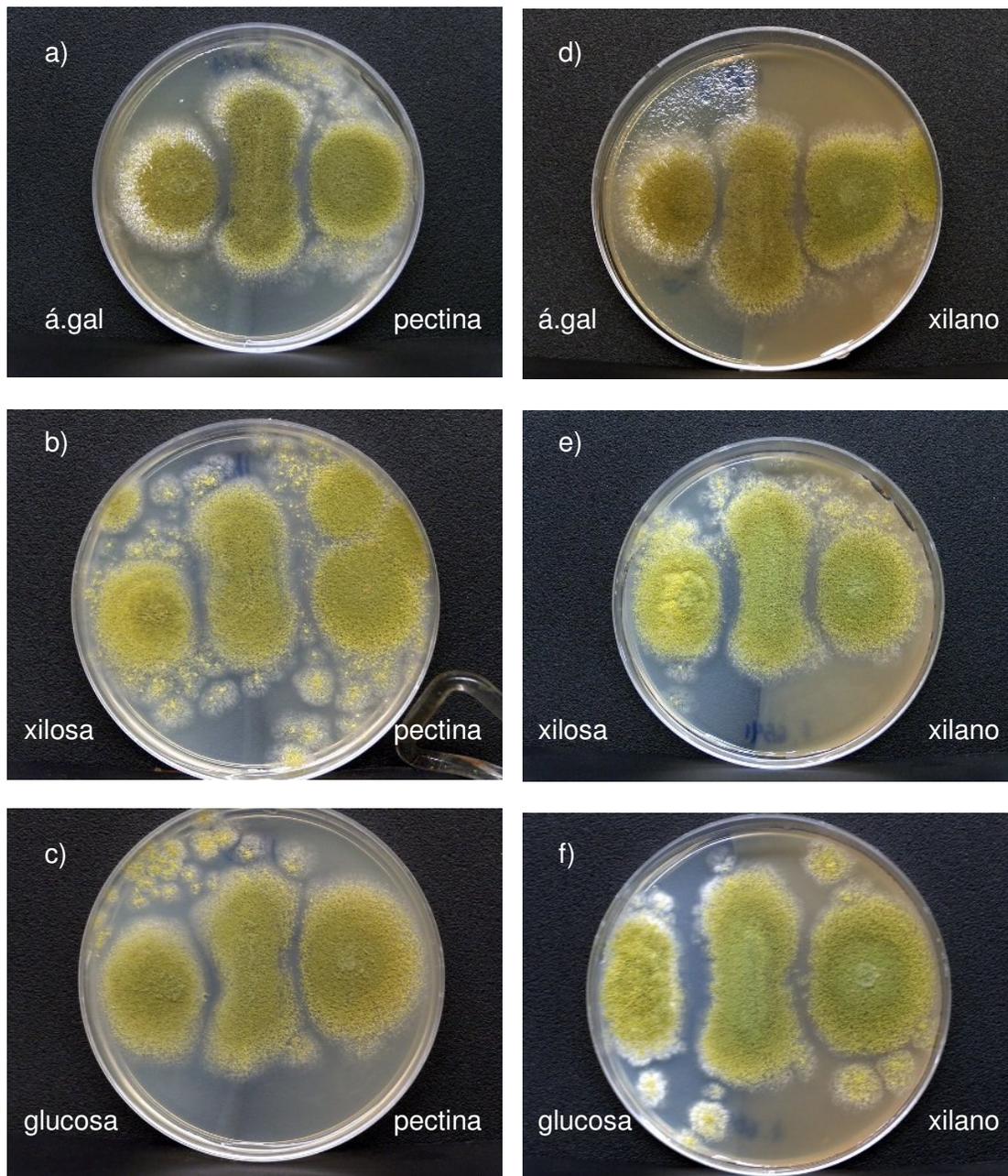


Figura 17. Crecimiento en medio sólido de *Aspergillus flavus* NRRL-6541 en a) ác. galacturónico - pectina, b) xilosa – pectina, c) glucosa – pectina, d) ác. galacturónico – xilano, e) xilosa – xilano, f) glucosa – xilano, cultivado a 37 °C por 72h.

c) Medio basal con glucosa y pectina.

Presentó buen crecimiento en las colonias aisladas observándose en pectina un mayor crecimiento, el color es semejante en ambos medios. A juzgar por el tamaño de la colonia se podría decir que hay preferencia por pectina como fuente de carbono.

d) Medio basal con ác. galacturónico y xilano.

Se observó menor crecimiento en ácido galacturónico que en el polisacárido. También existió una menor esporulación, que se observa claramente en las zonas externas de la colonia donde se aprecia una coloración blanca.

e) Medio basal con xilosa (mitad izquierda) y xilano (mitad derecha). El crecimiento fue bueno, se observó mayor crecimiento en xilano así como también una colonia más esporulada, la colonia del centro no presento grandes diferencias en cuanto a tamaño pero se alcanza a apreciar menor esporulación en la parte donde creció con xilosa.

f) Medio basal con glucosa y xilano.

Creció en ambos medios pero se observó un mayor crecimiento en xilano, el aspecto de la colonia varió observándose una tonalidad más clara así como menor esporulación en glucosa.

V. 4 Cinética de producción enzimática en sustratos complejos.

Se realizó la última cinética de producción en donde se crecieron las cepas de *Aspergillus* en sustratos complejos (sustratos que no han sido modificados físicamente) como un modelo más real al de una pared celular de una planta, por lo que el uso de estos sustratos complejos en forma nativa nos permitió una evaluación más precisa de qué capacidad y potencial degradativo que tienen estos microorganismos, así como de las enzimas requeridas para tal degradación. Esto con la finalidad de acercarnos cada vez más al comportamiento que tendría durante el proceso de crecimiento en estos materiales.

Los sustratos complejos utilizados son desechos agros industriales (cáscara de limón, desechos de manzana, uva y tamarindo) como fuentes de carbono al 1% en el medio basal.

En el caso de los sustratos complejos el perfil enzimático de cada hongo varió de una manera significativa en cuanto a la magnitud y tipo de actividad dependiendo del tipo de residuo agro industrial en el que se realizó la fermentación.

Aspergillus flavus 6541 (fig. 18) tuvo la capacidad de crecer y producir diversas enzimas en los residuos utilizados. En limón (fig. 18a) se observó actividad pectin liasa con un máximo de actividad (21 mU/mL) hasta las 72 h. En este tiempo se obtuvo el máximo de actividad xilanolítica alcanzando 50 U/mL que fue el máximo que se obtuvo en la mezcla (fig. 12d). Se observó muy poca actividad celulolítica (5 U/mL) y exo pectinasa (2 U/mL) hasta el final de la fermentación.

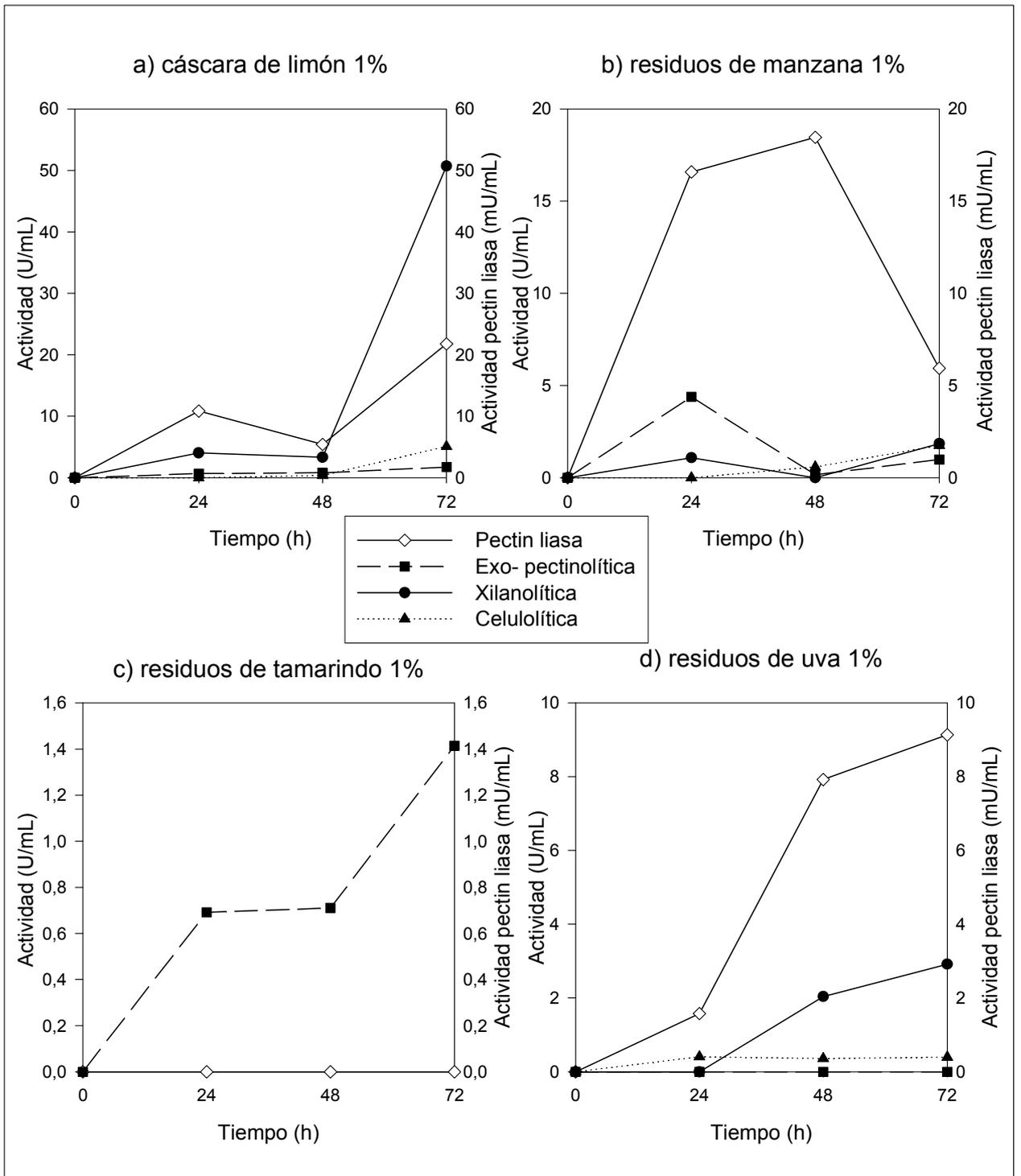


Figura 18. Perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 6541 en diferentes sustratos complejos como únicas fuentes de carbono, cultivado a 37°C a 200 rpm.

En manzana (fig. 18b) se presentó actividad exo pectinolítica a tiempos cortos y conforme transcurrió la fermentación disminuyó la actividad quizá por un incremento en la concentración de monosacáridos, la actividad pectin liasa se presentó desde el principio de la fermentación alcanzándose el máximo hasta las 48h. Se observó actividad xilanolítica hasta el final de la fermentación pero esta fue mucho menor que en limón.

En tamarindo (fig. 18c) sólo se observó actividad exo pectinolítica, tuvo un comportamiento semejante al de pectina (fig. 12a) aunque alcanzó solo la mitad de actividad (1.4 U/mL).

En uva se presentó actividad pectin liasa alcanzando su máximo hasta el final de la fermentación, se observó poca actividad xilanolítica y la actividad celulolítica fue muy baja.

En el perfil enzimático de la cepa 2687 de *Aspergillus flavus* presentado en la figura anterior se produjeron mayores actividades a las observadas en las fuentes sencillas y en los polisacáridos. Para el limón se apreció que (fig. 19a) a las 24h de cultivo alcanzó el máximo de actividad exo pectinolítica (10 U/mL) y el máximo de actividad pectin liasa (29.74 mU/mL) siendo esta la actividad más alta obtenida en todos los sustratos probados, conforme la fermentación continuó la actividad decae y se incrementó la actividad xilanolítica alcanzando un máximo de 70 unidades de actividad a las 72h. Se observó poca actividad celulolítica.

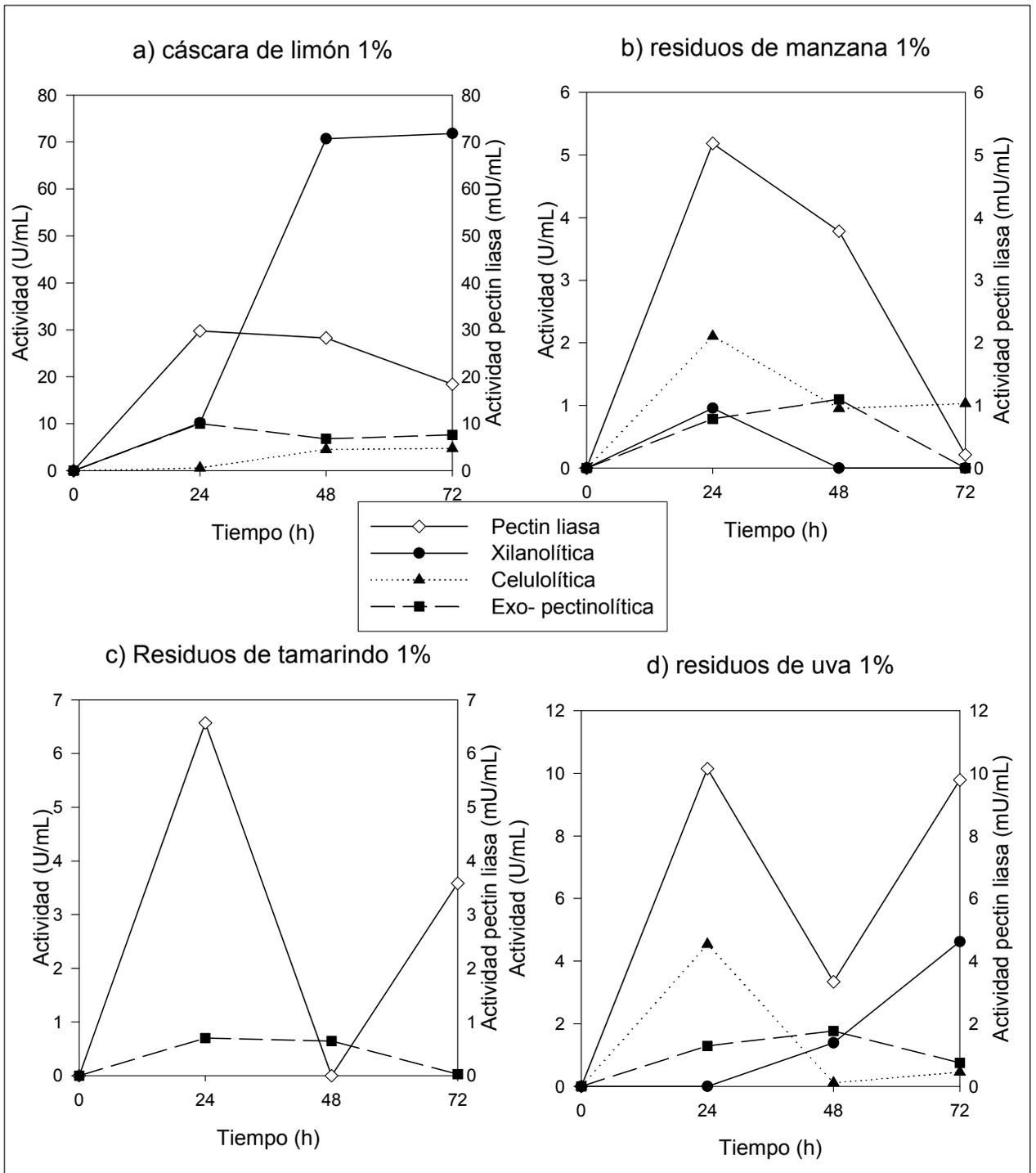


Figura 19. Perfil enzimático de *Aspergillus flavus* 2687 en diferentes sustratos complejos como únicas fuentes de carbono, cultivado a 37°C a 200 rpm.

Para el caso de manzana (fig. 19b) hubo una menor actividad que en el caso de limón, a las 24h la actividad pectin liasa se observó el máximo así como también se observó el máximo de actividad xilanolítica y celulolítica.

En tamarindo (fig. 19c) como en el caso de limón se observó a las 24 de fermentación los máximos de actividad pectinolítica tanto exo pectinolítica y pectin liasa, esta ultima alcanzando niveles mayores que en pectina.

Para el caso de uva (fig. 19d) se presentaron las cuatro actividades desde el principio de la fermentación, a las 24h se alcanzó el máximo de actividad pectin liasa. Se observó el máximo de actividad celulolítica también a tiempo cortos, en este caso la actividad exo pectinolítica si se presentó en tiempos cortos pero el máximo de actividad es hasta las 48 h. En ningún caso hubo actividad endo pectinolítica.

El perfil enzimático de *Aspergillus parasiticus* 502 (fig. 20) se observó al igual que en las otras dos figuras una alta actividad pectin liasa en limón (fig. 20a) teniéndose hasta las 48h su máximo de actividad, también se tuvo el máximo de actividad xilanolítica a este tiempo, se observó poca actividad exo pectinolítica (2.78 U/mL) y esta se mantuvo constante en toda la fermentación. En manzana (fig. 20b) las actividades se presentaron en etapas tempranas y esta se fue perdiendo, mientras que las actividades xilanolítica y celulolítica se incrementaron después de las 48h.

En tamarindo observó poca actividad pectin liasa con respecto a los otros tres sustratos complejos al igual que poca actividad exo- pectinolítica. En uva se observó solo actividad pectin liasa y hasta el final de la fermentación se alcanza su máximo.

En ningún sustrato complejo probado para las cepas *Aspergillus flavus* y *parasiticus* se detecto actividad pectinolítica tipo endo, estos resultados concuerdan con resultados previos obtenidos por el grupo de trabajo.

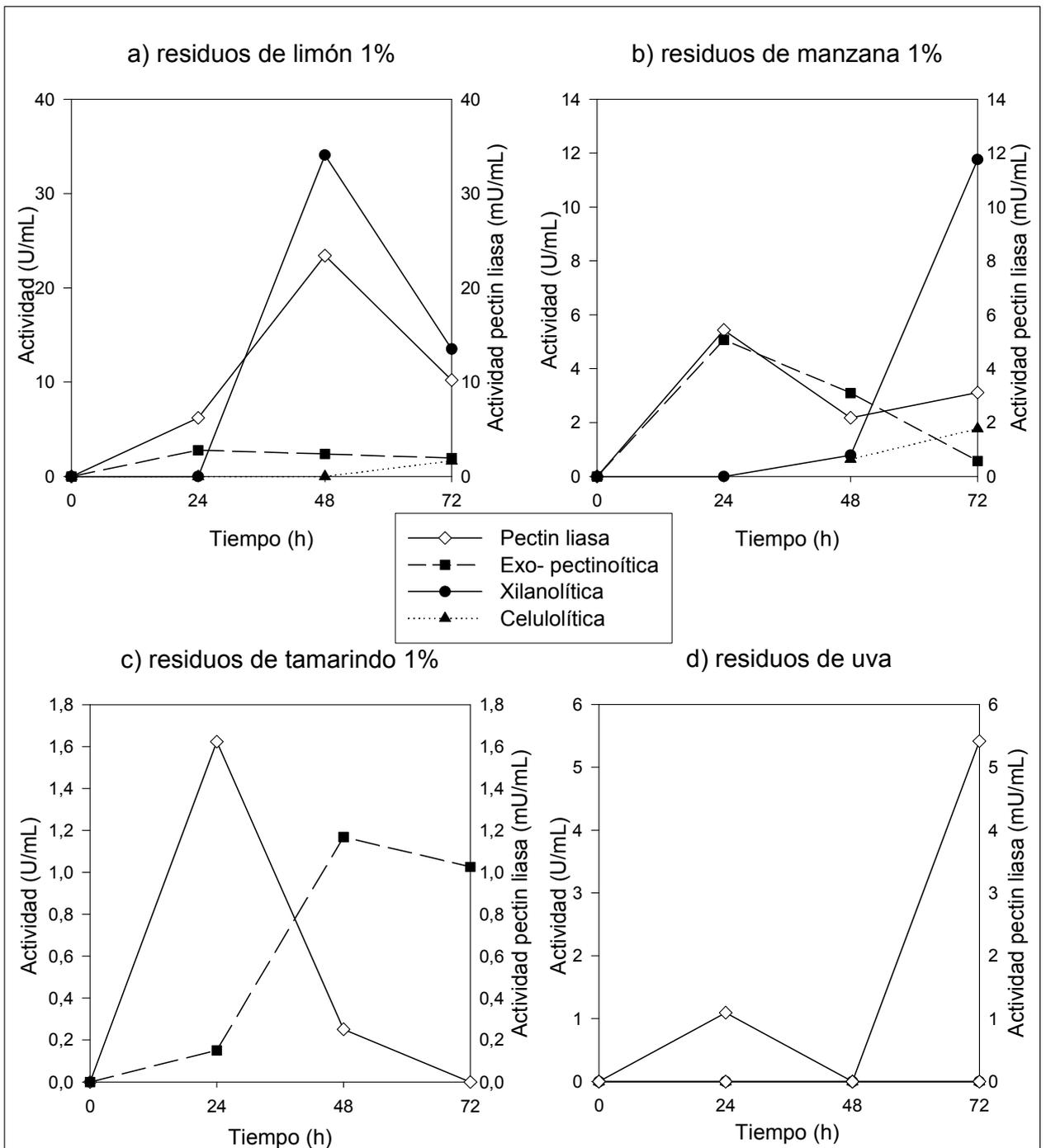


Figura 20. Perfil enzimático de *Aspergillus parasiticus* 502 en diferentes sustratos complejos como únicas fuentes de carbono, cultivado a 37°C a 200 rpm.

V. 5 Microscopía Electrónica de Barrido.

En el capítulo anterior estudiamos el tipo de enzimas producidas por las tres cepas de *Aspergillus* necesarias para degradar los sustratos complejos. De manera simultánea, a las 24h de fermentación se tomó una muestra de medio basal con cáscara de limón de *Aspergillus flavus* 2687, con la finalidad de evidenciar el crecimiento y colonización del sustrato por parte del hongo por medio de microscopía electrónica de barrido.

La muestra analizada a ese tiempo de fermentación presentó gran actividad pectinolítica, alcanzando su pico máximo de actividad exo pectinolítica (10 U/mL) y el máximo de actividad pectin liasa (29.74 mU/mL) siendo esta última la actividad más alta obtenida en todos los sustratos evaluados, a este tiempo también se presentó actividad xilanolítica.

Se tomaron muestras en medio sólido (Sabouraud) donde *Aspergillus* se sabe crece de una manera muy favorable a 37 °C durante 72 h.

Fue crecido también sobre una caja petri que contenía 1g de cáscara de limón estéril hidratada en medio basal dentro de una cámara húmeda a 37 °C durante 24h, se tomaron muestras a dos tiempos (14 y 24 horas) para llevar un seguimiento del proceso de invasión.

Todas las muestras se fijaron con glutaraldehído y fueron llevadas al Instituto de Fisiología Celular UNAM para la preparación de las muestras y toma de las micrografías respectivas de cada medio en el microscopio electrónico de barrido.

Debido a que las muestras se tomaron hasta las 72h el crecimiento fue abundante, se observó una colonia madura y completamente esporulada, en las micrografías existió en todos los campos un gran desarrollo.

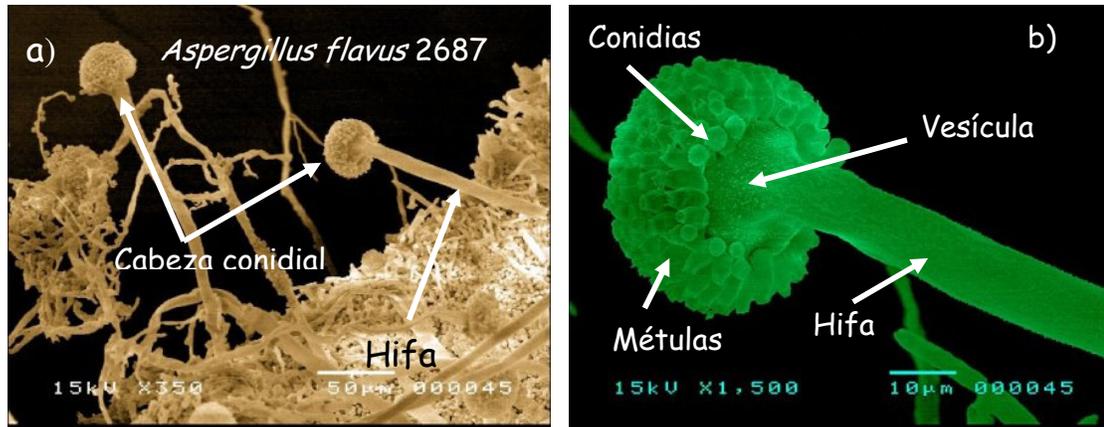


Figura 21. Crecimiento de *Aspergillus flavus* 2687 en medio sólido (agar Sabouraud) a 37 °C durante 72h.

Aspergillus flavus 2687 presentó características de su género (fig. 21a), se observó una estructura morfológica típica: un conidióforo, que incluye un tallo y una cabeza conidial en donde se aprecia la vesícula. Debido a que *Aspergillus flavus* es unisereado solo presenta métulas de las cuales emergen las conidias o esporas (fig. 21b)

Las muestras tomadas a las 24h de la fermentación sumergida presentaron diferencias importantes, se observó un gran crecimiento micelial en donde al parecer existió la formación de una biopelícula (fig. 22a) que le sirvió de anclaje entre las hifas y el sustrato (cáscara de limón). Se observó la formación de estructuras características del género *Aspergillus* (fig. 22b) cabezas conidiales donde se observa la vesícula cercana a las 7 micras de ancho y métulas sin esporular entre 3 y 5 micras de largo.

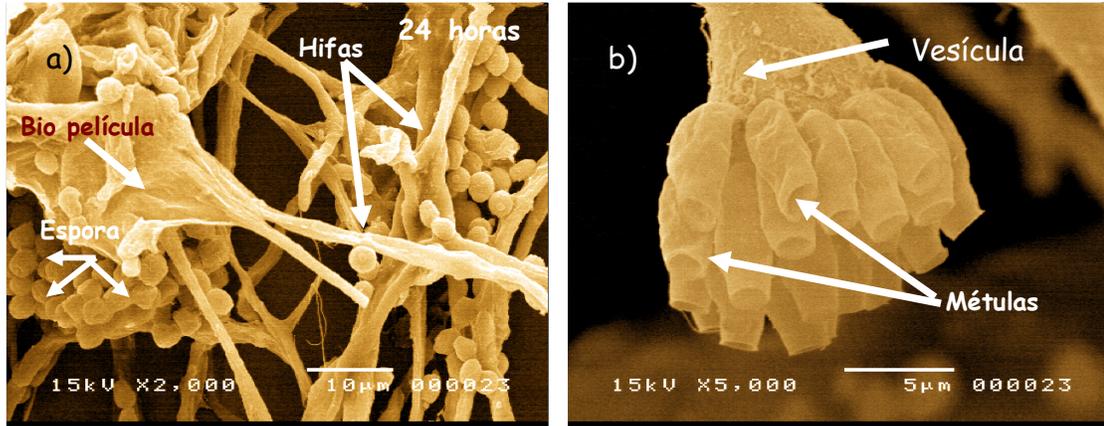


Figura 22. Crecimiento de *Aspergillus flavus* 2687 en medio líquido con cáscara de limón cultivado a 37 °C a 200 rpm durante 24h.

Con respecto a las muestras crecidas sobre el sustrato complejo se observó poco crecimiento a las 14 horas de incubación, se aprecia un sitio de unión entre el hongo y el sustrato (fig. 23) donde comienzan a crecer las primeras hifas.

En varios campos observados de la muestra solo se localizaron pocas hifas (fig. 23b), lo cuál nos indica que su etapa de adaptación se extiende hasta después de las 14 horas pero antes de las 24 h en donde se observó toda la cáscara de limón colonizada.

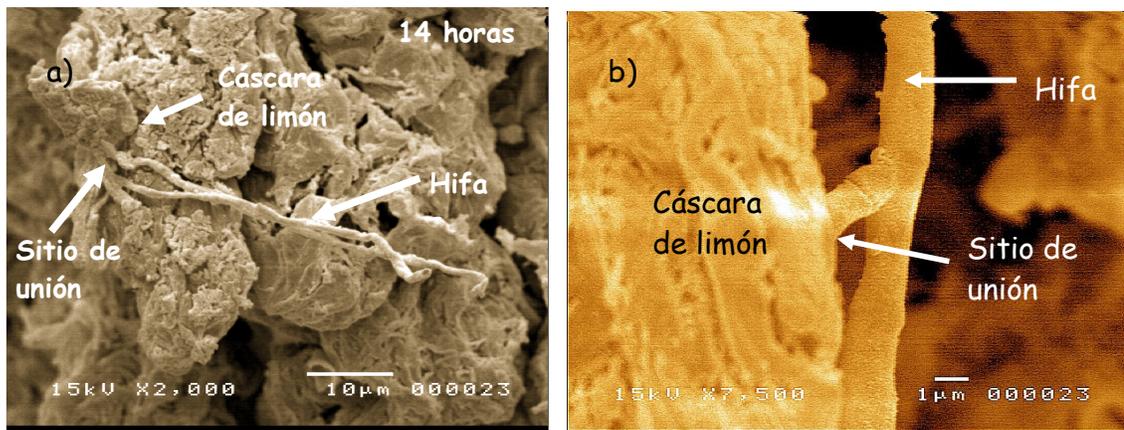


Figura 23. Crecimiento de *Aspergillus flavus* 2687 en cáscara de limón cultivado a 37 °C durante 14h.

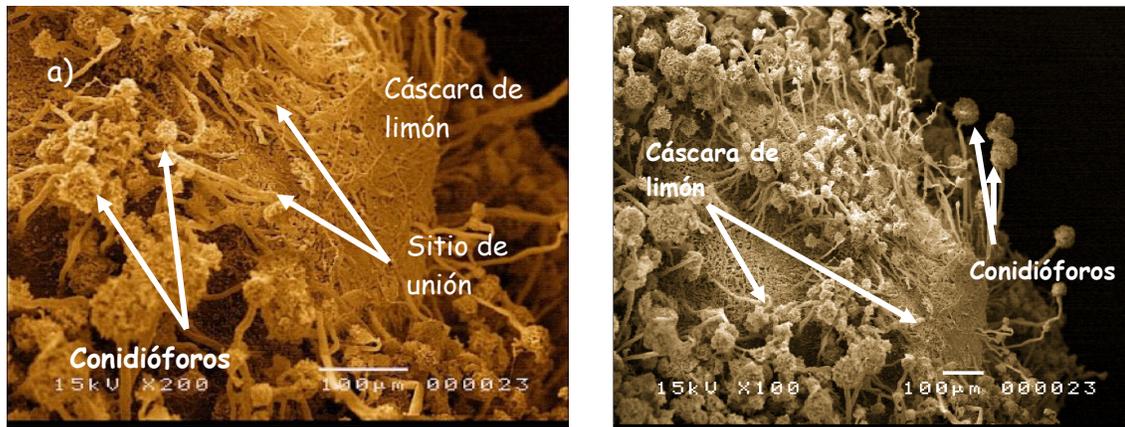


Figura 24. Crecimiento de *Aspergillus flavus* 2687 en cáscara de limón cultivado a 37 °C a durante 24h.

A las 24 horas se observó que el hongo invadió toda la cáscara de limón (fig. 24a) las características morfológicas son muy semejantes a las observadas en el medio Saboraud (fig. 1) en donde se aprecia claramente la formación de hifas y cabezas conidiales, se observa que el micelio formó sitios de unión o de anclaje que penetraron la cáscara de limón.

A este tiempo prácticamente en todos los campos visuales observados el micelio a esporulado, esto debido quizá a que el hongo se encuentra ya en un estado de estrés debido a la falta de nutrientes.

V. 6 Discusión general.

Los hongos filamentosos constituyen un grupo de microorganismos extremadamente versátiles con la capacidad de crecer en una gran variedad de medios, las cepas evaluadas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* crecieron en todos los cultivos probados presentándose un crecimiento deficiente en fuentes de carbono simples como glucosa y ác. galacturónico. En contraste, el crecimiento en pectina fue considerablemente mejor. Este comportamiento no era el esperado ya que la mayoría de los microorganismos crecen de una manera más favorable en monosacáridos que en oligosacáridos o polisacáridos. El crecimiento deficiente no sólo se presentó en glucosa y ácido galacturónico, sino también con otros azúcares como xilosa, fructosa, galactosa, sacarosa, etc. Lo que puede indicar el grado de adaptación de estos microorganismos para utilizar polisacáridos como fuentes de carbono, debido a que en la naturaleza los azúcares sencillos están siempre en concentraciones muy bajas. Por otro lado, la capacidad de estos hongos para crecer y colonizar un gran número de especies vegetales se debe en gran medida a la síntesis de enzimas que degradan sinérgicamente la pared celular de las plantas.

Los perfiles de producción de enzimas por *A. flavus* y *A. parasiticus* en fermentación sumergida variaron dependiendo de la fuente de carbono en la que crecieron, observándose así que al ser crecidas en sustratos puros (ác. galacturónico, glucosa, pectina) presentaron actividades bajas de manera general siendo otra vez en pectina la condición donde se produjeron el mayor número de actividades y de mayor magnitud.

La adición de glucosa ó ac. galacturónico en cultivos de pectina ocasionaron reducción en la producción prácticamente en las tres cepas poniendo en

evidencia el fenómeno de represión por carbono especialmente sobre pectinasas y celulasas por *Aspergillus parasiticus* (fig. 11e y 11f).

De acuerdo a nuestros resultados, para todas las cepas de *Aspergillus* se produce de manera constitutiva la actividad pectin liasa. Estos resultados no concuerdan con los reportados por Famurewa y colaboradores (1993) en donde reportaron un complejo pectinolítico con actividad pectin liasa, que se veía reprimido cuando el hongo fue cultivado sobre azúcares sencillos como glucosa y fructosa.

Como se mencionó anteriormente, para que estos hongos puedan infectar las plantas deben penetrar degradando las barreras constituidas por varios polímeros como son la pectina, el xilano, la celulosa. En las cepas estudiadas fue observada la capacidad de crecer y producir enzimas degradadoras de estos componentes estructurales, es así como en pectina se presentó actividad pectinolítica lo cual era lógico de esperarse, pero se observó inducción de actividad celulolítica, en xilano se produjo una gran actividad xilanolítica y la inducción de otras actividades varió para las cepas de *Aspergillus flavus* en donde los productos de degradación estimularon la síntesis de enzimas exo pectinolíticas además de la síntesis de enzimas celulolíticas. En *Aspergillus parasiticus* sólo se observó actividad pectin liasa al ser crecida en xilano.

Se presentó un efecto sinérgico al crecer en la mezcla de polisacáridos, las actividades producidas fueron mayores a las observadas en los monosacáridos y en los polisacáridos solos. El hecho de que las cepas tuvieran una mejor capacidad de asimilar y degradar los polisacáridos y la mezcla de estos, nos habla nuevamente, de que estos microorganismos están muy bien adaptados al medio ambiente en donde difícilmente se encontrarían condiciones tan

favorables como lo serían los azúcares sencillos libres y que existe una gran complejidad para entender su forma de acción en el proceso degradativo.

Al utilizar sustratos complejos en la fermentación sumergida para evaluar la cinética de producción enzimática observamos que las tres cepas de *Aspergillus* crecieron en todos los residuos agros industriales. Entre las enzimas que se produjeron están las pectinasas, xilanasas y celulasas. Tanto el tipo y el tiempo de expresión de estas enzimas dependió de la fuente de carbono, en el caso de los residuos de manzana se observó gran actividad pectinolítica para la cepa 6541 de *Aspergillus flavus* esto debido a que la manzana es un producto rico en pectina y en esta pectina el Ramnogalacturonano RG I y RG II son muy abundantes, para el caso de las cepa de *Aspergillus flavus* 2687 se apreció que en cáscara de limón se produjo la mayor cantidad de actividad xilanólítica y pectinolítica debido a la composición del desecho que es rica en pectina y hemicelulosa.

Aspergillus parasiticus creció y produjo buena actividad tanto en limón como en manzana.

Las tres cepas produjeron actividad de manera deficiente en tamarindo quizá debido a un efecto de represión catabólica ya que los residuos de tamarindo contienen gran variedad de monosacáridos como: glucosa, manosa, fructosa y disacáridos como xilobiosa, celobiosa provenientes del remanente de la pulpa y la semilla de tamarindo (Gunasena, 2004). Así mismo, el polisacárido más abundante en el residuo de tamarindo es el xiloglucano, lo que eventualmente favorecería la producción de xiloglucanasas que en este trabajo no se determinaron.

VI. CONCLUSIONES:

- Las tres cepas de *Aspergillus* tuvieron la capacidad de crecer en todos los sustratos probados, presentando un crecimiento deficiente en monosacáridos y un mejor crecimiento en polisacáridos.
- Las tres cepas presentaron un estímulo moderado en el crecimiento al agregar pectina y una clara estimulación al agregar extracto de levadura.
- *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 presentó el mayor consumo de todas las fuentes de carbono pero no el mayor crecimiento.
- El tipo de actividades que presentó *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 vario de acuerdo al sustrato complejo en el que se creció.
- El complejo pectinolítico de *Aspergillus flavus* NRRL-6541 se vio moderadamente reprimido por ác. galacturónico.
- No se detectó actividad tipo endo pectinolítica para las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en ningún sustrato probado.
- En los sustratos puros las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, el complejo pectinolítico con actividad liasa se produjo de manera constitutiva.

- Para las tres cepas presentaron un efecto sinérgico al crecer en la mezcla de polisacáridos (celulosa, xilano, pectina), observándose mayores actividades que en los polisacáridos solos.
- No se observaron grandes diferencias en cuanto a la preferencia por algún sustrato en los medios sólidos, pero *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 presentó una menor esporulación en los monosacáridos.
- Existe una cierta tendencia general en la producción de actividades para los sustratos complejos, a tiempos cortos (24 horas) se presenta actividad pectinolítica (exo pectinolítica y pectin liasa), mientras que a tiempos más largos (72 horas) la actividad que se presenta es xilanolítica y celulólitica mientras que la actividad pectinolítica disminuye.
- Fue posible evidenciar la colonización de la cáscara de limón por *Aspergillus flavus* CECT-2687, en medio sólido y líquido por medio de microscopia electrónica de barrido.

VII. REFERENCIAS.

Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Lett 29: 719-739.

Blandino, A., Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S.S., Weeb, C (2001). Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. Process Biochemistry. 37: 497-503.

Brown, L., Chen, Z., Cleveland, T., Cotty, P., Cary J. (2001). Variation in vitro α -amylase and protease activity related to the virulence of *Aspergillus flavus* isolates. Journal of Food Protection 64(3): 401-404.

Buchert, J., Oksanen, J., Pere, J., Sijka-Aho, M., Suurna kki, A y Viikari, L. (1998). Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry (Harman, G.E, and Kubicek, C.P.,Eds), *Trichoderma* and *Gliogladium*, Vol.2 pp 343-364.

Christensen, C. M. (1987). Field and Storage Fungi. En: Beuchat LR, ed. Food and Beverage Mycology. New York, Van Nostrand Reinhold, cap 7, pp. 211-232.

Contreras, E. J. (2003). Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus Kawachii*. Tesis Doctoral. Facultad de ciencias exactas. Universidad de la plata. Argentina.

De Vries, J.A., F. M Rombouts, A. G. J Voragen, y W Pilinik. (1982). Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydr Polym.* 2:25-33.

De Vries, R.P. (1999). Accesory enzymes involved in xylan and pectin degradation. Tesis Doctorado, Wageningen Agricultural University. Holanda pag 2-6.

De Vries, R.P., y Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polisaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 65(4): 497-522.

Favela, S. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry.* 33(2):103-107.

Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **37**:165–186.

Galante, Y. M. (1998). Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry (Harman, G.E, and Kubicek, C.P., Eds), *Trichoderma and Gliogladium*, Vol.2 pp 311-326.

Grant, J.S., y Edwards, M.E. (1995). Galactomananos and Other Cell Wall Storage Polisacarides in seeds. 154-182. En: Alistar M.Stephen. Food Polysaccharides and their applications, Marcer Dekker Inc, New York USA.

Gunasena, H. P.M; y Huges, A (2004). Tamarind (*Tamarindus indica* L.) International Center for Underutilized Crops, Southampton, UK.

http://www.civil.soton.ac.uk/icuc/cd_icuc_ber_tamarind/content/tamarind/tamarind_book_html/index_fulla.htm

Harvey, L.M., y McNeil B. (1994). Liquid Fermentation System and Product Recovery of *Aspergillus*. pp 141-176. En: Smith J.E. Biotechnology Handbooks 7: *Aspergillus*. Plenum Press. New York.

Hernández, A. M. (1995). Evaluación del efecto del pH y la fuente de carbono sobre la producción de xilanasas en cepas de *Aspergillus* creciendo a 45°C. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. 1-18.

Jiménez, A. (1996). *Patología Vegetal* II. Sociedad Española- Fitopatología. Tomo I y II. Ed. Phytoma España pp 86-96; 104-106.

Lacey, J. (1989). Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other storedproducts. Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement, pp. 11S-25S.

McNeill, M., A. G. Darvill, S. C. Fry, and P. Albersheim. (1984). Structure

and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53:625–663.

Mayer, A. M. y Staples, R.C. (2002). Lacacase: new functios for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551- 565.

Miller, G. L. (1959).Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinwation of reducing sugar. *Anal Chem.* 31: 426-428.

Ordaz, J. J. (2002) Development of a method for direct visual determination of afltoxin production by colonies of the *Aspergillus flavus* group. *International Journal of Food Microbiology.*83. 219-225.

Parenicová, L. (2000) Pectinases of *Aspergillus níger*. A molecular and biochemical characterization. Tesis de Doctorado. Wageningen Agricultural University. Holanda. 2-28.

Perez, S., K. Mazean, y C. Herve du Penhoat. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plan Physol. Biochem.* 38:37-55.

Rose, A. H. (1980). *Mycrobial enzymes and bioconversions.* Accademic Press. *Economic Micobiology* vol 5 pag 227.

Ruijter, G. J. G., y Visser J. Carbon repression in *Aspergilli*. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Lett* 151: 103-114.

Sajjaanantakul., y Pitifer. (1991). Pectinesterase the chemistry and technology of pectin pag. 135-157.

Sherrier, D.J., Vanden Bosch, K.A. (1994). Secretion of cell wall polysaccharides in Vicia root hair. Plant J. 5, 185–195.

Swanson, B. G. (1987). Mycotoxins on fruits and vegetables. Acta Horticulturae 207: 49 -61.

Ten, Have A., Tenberge, K. B., Benen, J. A.E Tudzynski, P., Visser, J and Van Kan, J. A. L (2002). The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens (Osiewaez H. D., Ed), The mycota, Vol. 11, pp. 341-358. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Widstrom, N. W. (1992). Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinenteconiche factors. pp. 23-58 en: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar D, editores. Marcel Dekker, New York.

Referencia electrónicas:

<http://www.hort.purdu.edu/newcrop/morton/tamarind.html/> 23 Dic 2007

<http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungi.htm#estructura/> 10 Enero 2007

http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/frutas_y_derivados/2004/09/02/108242.php /10 Enero 2007.

http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/aprender_a_comer_bien/guia_alimentos/frutas_y_derivados/2004/12/01/112715.php / 10 Enero 2007

<http://frutas.consumer.es/documentos/frescas/limon/intro.php/> 10 Enero 2007

<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/image1.html/> 11-Enero 2007.