



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE UNA CEPA DE
Aspergillus flavus EN MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO UTILIZANDO
COMPLEJAS FUENTES DE CARBONO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

BRENDA GUADALUPE PIÑA SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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	Aurora Irma Ortegón Ávila
Vocal	José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
Secretario	Alejandro Camacho Cruz
1° suplente	Norma Angélica Camacho de la Rosa
2° suplente	Laura Carmona Salazar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos

Departamento de Alimentos y Biotecnología

Conjunto E

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema

Dr. José Guillermo Aguilar Osorio

Sustentante

Brenda Guadalupe Piña Sánchez

El presente trabajo se desarrolló con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México proyecto No. IN225710 y por el Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” en el periodo 2009-2010 de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Al Dr. Guillermo Aguilar por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y permitirme aprender de él, tanto en el aspecto científico como humano. Agradezco de corazón todo su tiempo, disposición, paciencia, generosidad, enseñanzas, consejos, y sobre todo por transmitirme su gran pasión por la ciencia.

A mis Padres, Víctor Manuel y María Elena, a ellos les debo mi vida y lo que soy. Por dedicar cada uno de sus días a la hermosa familia que formaron y por darnos a sus hijos su apoyo incondicional e inmenso amor siempre. Ustedes son, sin duda alguna, el mejor obsequio que pude haber recibido de Dios y espero que me dé mucho tiempo para disfrutarlos, respetarlos, valorarlos y recompensarlos. Porque sé que éste es solo uno de los éxitos que se merecen de mi parte y que sin ustedes nunca hubiese podido lograr. Gracias por creer en mí. Los Amo.

A mis amados hermanos, Manuel Adolfo y Andrea Victoria, porque los mejores momentos de mi vida no hubieran significado nada sin ustedes a mi lado. Por ayudarme a ser cada día mejor, por su compañía, cariño, calidez, afecto y buenos deseos. Hermanito, este ejemplar no hubiese sido posible sin ti, gracias por financiar mis gastos, pronto te lo recompensare. Azucena, aunque es poco el tiempo que hemos compartido, me alegra que seas parte de esta familia, ojalá siempre sea así.

† A mis abuelos, María E. Arciniega, Adolfo Sánchez y Eva Alfaro, porque desde pequeña compartieron conmigo todo su cariño, alegrías, satisfacciones, risas, entusiasmo, optimismo, consejos, anécdotas, lecciones de vida, valores, júbilos, sabiduría, relatos, etc. Estoy consciente que siempre me harán muchísima falta, pero sé que de alguna u otra manera, siempre estarán conmigo en mi mente y en mi corazón, por todo lo que representaron para mí y por lo mucho que los estimé, les estaré eternamente agradecida.

A ti Ulises por estar estos últimos años a mi lado en las buenas y en las malas, por amarme, protegerme, respetarme, comprenderme, fortalecerme, escucharme, cuidarme, defenderme, ayudarme, apoyarme y acompañarme hacia donde sea que vaya. Gracias por todo eso, por el gran corazón que tienes, por aceptar ser mi mejor amigo y confidente. Deseo con todo mi ser seas dichoso y feliz por siempre independientemente de que sea a mi lado o no. Te amo y siempre estaré para ti.

A cada uno de mis tíos y primos, especialmente a mis tías Lupita, Rosa y Laura, y a mis tíos Fay, Fernando y Juan, por estar al tanto de mi bienestar y procurarme hasta el día de hoy. Así mismo a mi prima Evita, gracias por sacarme siempre de apuros y dudas, y por compartir conmigo tus conocimientos.

A mis amigos, sin ustedes mi vida escolar no hubiera sido tan satisfactoria, gracias por los momentos tan amenos que pasamos juntos, por todas las risas, travesías, bromas, chistes y aventuras realizadas a lo largo de todos estos ciclos escolares que tuvimos que atravesar para llegar hasta este punto de nuestras vidas. Ana Laura, Cecilia, Sandra, Jacqueline, Monse, Blanca, Áziliz, Giovanna, Alma, Lizeth, Marcelo, Bengi, César, Winnie, Ariel, Rodrigo, Polo, Pablo, Ángel, Chino, Juárez, Chema y Ernesto. Suerte, ánimo y mucho éxito para cada uno de ustedes.

A mis compañeros de laboratorio, Isabel y Kiev, chicos gracias por compartir conmigo el espacio de trabajo y sobre todo por brindarme su amistad, Isa gracias por guiarme en el camino de la realización de este trabajo así como en la consumación del mismo y con tantos trámites. Ruth, gracias por tus enseñanzas, buenos consejos y esas platicas tan divertidas en la hora de la comida. Paulina, gracias por contagiarnos en el laboratorio de toda tu vitalidad y energía.

Brenda Guadalupe Piña Sánchez

CONTENIDO

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN	8
-----------------------	---

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo general	10
2.2 Objetivos particulares	10
2.3 Justificación	10

CAPÍTULO III

3. ANTECEDENTES	12
3.1 Generalidades de la nutrición de los hongos.....	12
3.2 Generalidades de <i>Aspergillus flavus</i>	13
3.3 Composición de la pared celular de las plantas	17
3.4 Características estructurales de los polisacáridos de la pared celular	18
3.5 Composición de los sustratos complejos	20
3.6 Enzimas responsables de degradar la pared de células vegetales	24
3.7 Aplicaciones industriales de las enzimas	29

CAPÍTULO IV

4. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Microorganismo	34
4.2 Sustratos complejos	34
4.3 Reactivos utilizados.....	34
4.4 Cultivo del microorganismo	35
4.5 Obtención de la cosecha de esporas	35
4.6 Conteo de esporas	35
4.7 Producción de las enzimas en medio líquido	36
4.8 Obtención del filtrado enzimático crudo de los medios líquidos	36

4.9 Producción de las enzimas en medio sólido.....	36
4.10 Obtención del filtrado enzimático a partir de los medios sólidos	37
4.11 Determinación de la actividad enzimática	37
4.11.1 Medición de la actividad exo-pectinolítica	37
4.11.2 Medición de la actividad xilanolítica.....	38
4.12 Análisis de perfiles electroforéticos	38

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
5.1 Cinética de producción de las actividades enzimáticas en cultivos líquidos utilizando sustratos puros.....	40
5.2 Cinética de producción de las actividades enzimáticas en cultivos líquidos con diversos sustratos complejos	44
5.3 Producción de las actividades enzimáticas en cultivos líquidos con una fuente de carbono compleja añadida de un azúcar simple	47
5.4 Producción de las actividades enzimáticas en cultivos sólidos con diferentes fuentes de carbono.....	55
5.5 Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> CECT-2687 en cultivos sólidos utilizando diferentes fuentes de carbono	63
5.6 Perfil electroforético de los filtrados enzimáticos obtenidos en cultivos sólidos con diferentes fuentes de carbono	68

CAPÍTULO VI

6.0 DISCUSIÓN GENERAL	70
-----------------------------	----

CAPÍTULO VII

7. CONCLUSIONES.....	72
8. REFERENCIAS.....	74

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

Para acceder a una gran variedad de sustratos o penetrar en los tejidos del huésped, los hongos producen numerosas proteínas extracelulares. La principal función de muchas de estas proteínas está relacionada con la degradación de polímeros para la captura de nutrientes asimilables. La regulación de secreción de estas enzimas hidrolíticas es compleja y dependiente del sustrato específico en el que crece el hongo.

La gran capacidad para secretar un amplio espectro de enzimas extracelulares que tienen los hongos, ha sido ampliamente explotada por la Biotecnología para la producción de enzimas de uso industrial y comercial, principalmente amilasas, celulasas, pectinasas y proteasas.

Aspergillus flavus pasa la mayor parte de su vida como saprofito en el suelo, donde desempeña un papel importante en el reciclado de carbono y nutrientes de desechos vegetales y animales (Scheidegger y Payne, 2003). Sin embargo, también posee características de un patógeno oportunista con un amplio rango de hospederos no específicos (plantas, animales e insectos).

A. flavus es un hongo fitopatógeno que debe degradar a los polisacáridos presentes en la pared de células vegetales para poder crecer adecuadamente. La eficacia con la que se lleva a cabo dicha degradación, depende de la producción de pectinasas, xilanasas, celulasas y enzimas accesorias. En algunos casos, estas enzimas han sido consideradas como factores de virulencia, tal es el caso de las enzimas pectinolíticas (Sangeeta *et al.*, 2008).

Aspergillus flavus se encuentra ampliamente distribuido en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, y ha adquirido gran importancia a nivel agrícola ya

que infecta cultivos susceptibles y los contamina con potentes aflatoxinas, reduciendo en gran medida el valor de dichos cultivos. Los principales cultivos que se ven afectados son: algodón, cacahuate, nuez, maíz, arroz, pimientos, especias e higos.

La proteómica de hongos filamentosos se encuentra todavía en una etapa relativamente temprana de desarrollo, en particular en cuanto a proteínas secretadas, debido en parte a la falta de datos de la secuencia del genoma.

Sin embargo, recientemente se han publicado las secuencias de los genomas de varios hongos incluido *A. flavus* (NRRL 3357, Geiser Grupo 1C), los cuales se encuentra en progreso (Payne et al., 2006), y proporcionarán una rica fuente de datos comparativos. Esta información será crítica y trascendental para la formulación de estrategias exitosas para controlar la contaminación por aflatoxinas en los cultivos de importancia económica que se han visto afectados hasta ahora. Ya que dicho genoma pondrá de manifiesto los genes potencialmente involucrados en la formación de aflatoxinas y otros metabolitos secundarios, así como en la producción de enzimas capaces de degradar a los complejos polímeros de carbohidratos.

En el trabajo actual se utilizó la cepa de *Aspergillus flavus* CECT-2687, la cual se creció en medios de cultivo líquidos y sólidos con diferentes fuentes de carbono: sencillas, polisacáridos y sustratos complejos (cáscara de limón, salvado de trigo y olote de maíz), con la finalidad de determinar y comparar las enzimas que se producen y evaluar la utilización de los diferentes tipos de fuentes de carbono y de los sistemas enzimáticos involucrados en su degradación.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Análisis del crecimiento y producción enzimática de una cepa de *Aspergillus flavus* CECT-2687 en medios de cultivo líquidos y sólidos utilizando diferentes fuentes de carbono.

2.2 Objetivos particulares

- Evaluación del crecimiento de *A. flavus* CECT-2687 en medios de cultivo líquidos y sólidos con sustratos simples y complejos.
- Determinación de la actividad enzimática de pectinasas y xilanasas extracelulares producida por dicha cepa.
- Análisis de los perfiles electroforéticos de los filtrados obtenidos en los medios de cultivo sólidos utilizados en dicho estudio.

2.3 Justificación

La importancia de analizar los sistemas enzimáticos producidos por *Aspergillus flavus* CECT-2687, radica en la ventaja que representan para el hongo dichas enzimas, las cuales son responsables de la degradación de los polisacáridos de la pared celular de plantas. La eficacia con la cual se lleva a cabo dicha degradación está directamente relacionada con la posibilidad de que el hongo colonice las células vegetales y se desarrolle exitosamente en ellas. Esto tiene una repercusión económica importante, ya que éste produce aflatoxinas altamente carcinogénicas, las cuales representan un serio problema de salud pública, por lo

que los cultivos infectados con éste hongo constituyen una gran pérdida económica, especialmente, en cultivos de maíz, cacahuate y algodón. El conocimiento del tipo de enzimas que produce el hongo durante la colonización de diversos tejidos vegetales, proporcionará información útil para la formulación de estrategias que permitan controlar la contaminación de los cultivos por parte de *Aspergillus flavus*.

CAPITULO III

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de la nutrición de los hongos

Los requerimientos nutricionales de un microorganismo están determinados por la composición química de la célula, por su constitución genética y por factores del medio ambiente natural donde vive, estos factores determinan el tipo de nutrientes necesarios para su desarrollo. En principio, cualquier sustrato puede constituir una fuente de nutrientes para ciertos microorganismos. Sin embargo, cada uno varía ampliamente en sus características genéticas y por consiguientes también en sus propiedades fisiológicas y en su capacidad para utilizar y transformar a los diferentes compuestos químicos (Olivares y Alarcón, 2004).

Faltos de clorofila, los hongos son incapaces de asimilar el dióxido de Carbono por vía fotosintética; todos son igualmente incapaces de hacerlo por vía quimiosintética. En consecuencia, todos son heterótrofos para el carbono, lo que les impone la necesidad de explotar los medios orgánicos y, en consecuencia, les hace jugar, en la naturaleza, un papel muy importante (H. Des Abbayes *et al.*, 1989).

Obligados por sus diversas heterotrofías a vivir en medios orgánicos, los hongos pueden ser saprófitos o parásitos. Los saprófitos aprovechan sustancias orgánicas muertas, en las que provocan la descomposición; restos vegetales (hojas y frutos caídos, madera muerta, hierba seca, viejas cortezas, etc.); restos animales (cadáveres, excrementos, pelos, plumas, pezuñas, etc.); y humus del suelo (en los bosques, los prados y los campos), entre otros. Los parásitos en cambio utilizan sustancias orgánicas de seres vivos, a los que enferman e incluso matan. Los hongos parásitos son los causantes de las micosis de los animales y

de las enfermedades criptogámicas de las plantas, tan perjudiciales a la agricultura (Lastra. 2001).

Para su nutrición, los hongos poseen la capacidad de utilizar una gran variedad de materiales orgánicos tanto sencillos como complejos. Los carbohidratos simples, como la glucosa, son fuentes de carbono apropiadas para la mayoría de los hongos, así como la sacarosa y maltosa. Otros compuestos de carbono más complejos, como el almidón, pectina y celulosa pueden ser utilizados por muchos de ellos (García, 2004). Algunos hongos pueden utilizar inclusive la lignina o la queratina. Algunos hongos tienen la capacidad de crecer en sustratos mucho más complejos (olote de maíz, salvado de trigo, cáscara de limón, etc.), los cuales principalmente contienen una mezcla de diferentes polisacáridos formando múltiples fibras entre sí.

Dichos compuestos para poder ser utilizados por el hongo deben atravesar la membrana celular. En el caso de polisacáridos y sustratos más complejos, para que esto pueda ocurrir, deberán primero ser degradados a moléculas simples, lo cual realizan los hongos mediante la producción de enzimas digestivas (exoenzimas) a través de sus paredes celulares. Las enzimas desintegran externamente a la materia orgánica compleja sobre la que viven (polisacáridos, proteínas y grasas). Después absorben por ósmosis los compuestos orgánicos simplificados o digeridos, por lo que la nutrición extracelular de los hongos se denomina heterótrofa osmotrófica (García, 2005).

3.2 Generalidades de *Aspergillus flavus*

En la naturaleza, *A. flavus* es uno de los hongos más abundantes y ampliamente distribuido en cualquier lugar de la tierra. Es capaz de sobrevivir en muchas fuentes orgánicas de nutrientes, como plantas, hojas de los árboles, forraje, algodón, insectos muertos, cadáveres de animales, granos almacenados e incluso en la alimentación humana y animal (Klich, 1998). Su temperatura óptima

de crecimiento se encuentra en un rango de 28 - 37 °C y puede crecer en un amplio rango de 12 a 48 ° C.

A. flavus pasa la mayor parte de su vida como saprofito en el suelo, donde desempeña un papel importante como reciclador de nutrientes, a partir de los desechos vegetales y animales (Scheidegger y Payne, 2003). La capacidad de *A. flavus* de sobrevivir en condiciones adversas le permite fácilmente competir con otros organismos del suelo (Bhatnagar *et al.*, 2000).

Aspergillus flavus es la principal especie que infecta insectos (Campbell, 1994), y es capaz de causar enfermedades en cultivos de importancia económica, como el maíz y cacahuate, produciendo además potentes micotoxinas. Los insectos están asociados a la presencia de aflatoxinas en granos debido a que pueden actuar como vectores, favoreciendo la diseminación de los conidios de *A. flavus* de un cultivo a otro. La aplicación de insecticidas limita el daño por insectos, pero no suele eliminarlos ni evita la infección fúngica de los granos (Widstrom 1992).



Fotografía 1 – Contaminación masiva de cacahuates con *Aspergillus flavus*
(Copyright © The State of Queensland, 1995-2010)

La epidemiología de *Aspergillus flavus* difiere dependiendo de la especie hospedadora. La figura 1 muestra el ciclo de vida del hongo en el maíz. El hongo inverna como micelio o bien como estructuras resistentes conocidas como esclerocios. Los esclerocios germinan ya sea para producir hifas adicionales o producir conidias (esporas asexuales), que pueden estar dispersas en el suelo y el aire. Estas esporas son llevadas a las mazorcas de maíz por los insectos o el

viento donde germinan e infectan el grano de maíz. A diferencia de la mayoría de los hongos, *A. flavus* se ve favorecida por condiciones cálidas y secas.

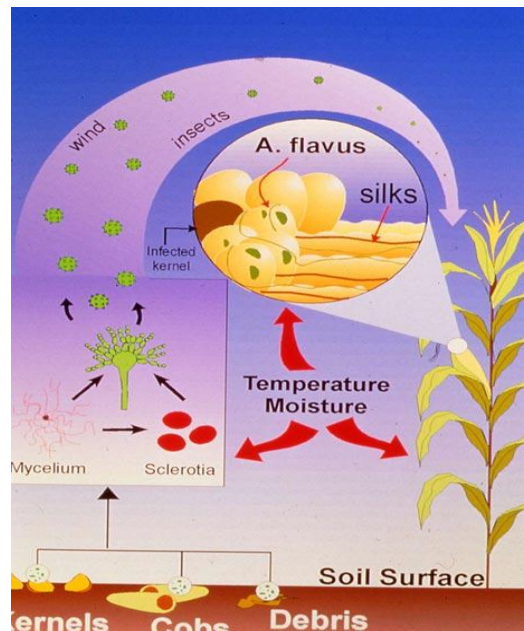
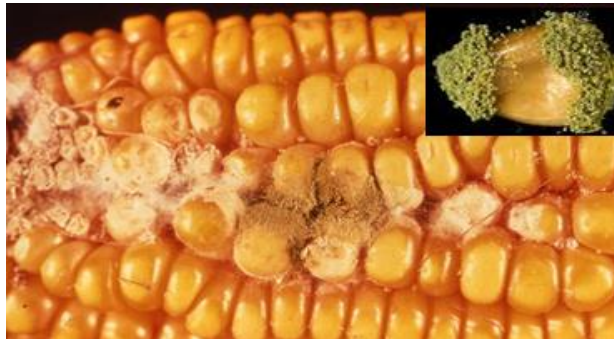


Figura 1 – Representación esquemática del ciclo de vida del hongo en el maíz (Center for Integrated Fungal Research. All rights reserved, 2005).

La asociación entre los hongos del grupo *A. flavus* y la planta de maíz en el campo no termina con la cosecha pues se encontraron aflatoxinas en los rastrojos, además de esclerocios y en el grano durante el almacenamiento (Widstrom 1992). Jalisco destaca por ser la segunda entidad productora de maíz con un volumen de poco más de 3 millones toneladas de maíz para grano en 2006 y de 803 toneladas de cacahuate, lo que indica que existe una gran probabilidad de contaminación.

Los niveles de tolerancia de aflatoxinas son muy estrictos (en USA el nivel es de 20 ppb en cereales y en Europa 10 ppb) debido a que niveles mínimos podrían significar afectaciones en la salud de los consumidores debido a la alta naturaleza carcinogénica y a la afectación de la percepción pública de los alimentos sanos si éstos vienen contaminados con algún tipo de toxinas. En México, según la NOM-188-SSA1-2002 se establece que el límite máximo de tolerancia es de 20 ppb de aflatoxinas totales en el grano de maíz para consumo humano (Bucio-Villalobos *et al.*, 2001).

El maíz se contamina tanto en campo como en almacén y los factores determinantes para la síntesis de aflatoxina B1 en ambas circunstancias son: temperatura 28°C, humedad relativa de 85%, contenido de humedad del grano (18%) y presencia de insectos, como los gusanos barrenadores del maíz que son portadores de las esporas de los hongos. La contaminación del maíz con aflatoxinas es muy importante para México debido a que: 1) es el país donde el maíz es utilizado principalmente para consumo humano, como tortilla: i.e. 325 g de tortilla /día/ per cápita y 2) México importa alrededor de 6 millones de toneladas de maíz al año. Es muy importante mencionar que la técnica más antigua (5,000 años) utilizada en México para transformar el maíz en tortilla es la nixtamalización. Se ha demostrado, por diferentes autores (Guzmán-de-Peña, *et al.*, 1995) que la nixtamalización destruye del 95 al 100% de las aflatoxinas en maíz naturalmente contaminado por estas sustancias.



Fotografía 2 – Contaminación de maíz con *Aspergillus flavus*
(Center for Integrated Fungal Research. All rights reserved, 2005).

Además de ser un saprofito común, *A. flavus* es también un patógeno oportunista y se ha aislado de insectos, aves, mamíferos y plantas. Sin embargo, por lo general no es muy virulenta en los tejidos con una vida saludable. El hongo a menudo obtiene acceso a las semillas a través de aberturas secundarias tales como heridas (maíz) o agujeros de la salida de larvas de insectos (Cotty *et al.*, 1994).

Además, *A. flavus* se ha asociado con infecciones respiratorias secundarias en personas inmunodeprimidas y es considerado el segundo agente causante de

aspergilosis invasiva (Hedayati *et al.*, 2007) y es la causa más común de infecciones superficiales. La patogenicidad de cepas invasoras de *A. flavus* aumenta en climas secos y cálidos. En términos de inóculo necesario, *A. flavus* es 100 veces más virulentas (Sistema modelo animal) que *A. fumigatus* (Hedayati *et al.*, 2007).

El conocimiento de la genómica de *Aspergillus flavus* puede conducir a mejoras en la salud humana, seguridad alimentaria y economía agrícola (Jiujiang Yu *et al.*, 2005). La secuenciación del genoma de *A. flavus* dio como resultado un tamaño de 36.3 Mb organizado en 8 cromosomas. Se estima que contiene unos 13 071 genes con una longitud promedio de 1 384 pb (Yu *et al.*, 2005). Además se reveló que *A. flavus* es genéticamente casi idéntico a *A. oryzae*, lo cual resultó ser algo sorprendente, ya que mientras el primero es un hongo saprófito y fitopatógeno, el cual, hasta la fecha, no ha podido ser controlado, el segundo está perfectamente domesticado (Payne *et al.*, 2006).

3.3 Composición de la pared celular de las plantas

La pared celular de las plantas está constituida principalmente por polisacáridos y proteínas. Los polisacáridos constituyen el 90% de la pared celular y se dividen en tres tipos de acuerdo a su composición (McNeill *et al.*, 1984), los cuales son la celulosa, la hemicelulosa y la pectina.

La celulosa es el principal de estos tres polisacáridos y su principal función es la de asegurar la rigidez de la pared celular. La hemicelulosa es la segunda estructura orgánica más abundante en la pared, y la función estructural de los polisacáridos que la forman, es interconectar la fibrillas de celulosa con las cadenas de polisacárido de la pectina (de Vries & Visser, 2001). La pectina es el compuesto más abundante en la matriz de la lámina media de la pared primaria de las plantas y está casi ausente en la pared secundaria. Su función es la de regular la porosidad de la pared celular y la adhesión entre las células (Willats *et al.*, 2001).

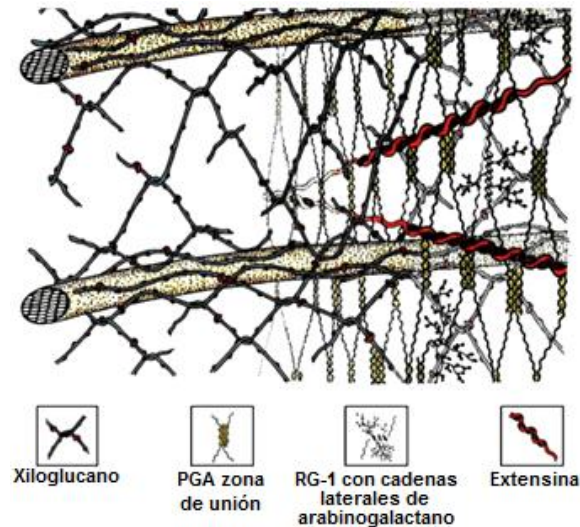


Figura 2 – Pared celular de las plantas
(Consortium of Glycobiology, 2009)

3.4 Características estructurales de los polisacáridos de la pared celular

La celulosa consiste en un polímero lineal de residuos de D-glucosa unidos mediante enlace β -1,4. Los polímeros de celulosa se presentan como estructuras ordenadas (fibras) y por ello su función en la pared celular de plantas asegurar la rigidez de la misma.

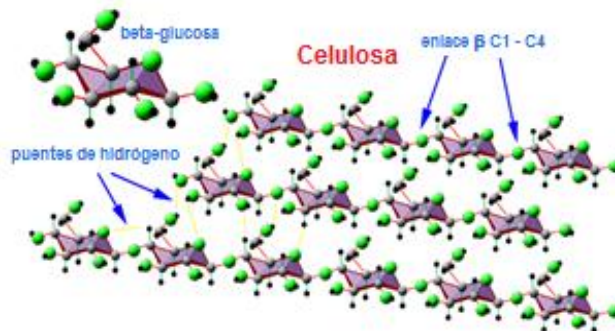


Figura 3 – Representación gráfica del polímero de celulosa
(Copyright © 2009 by General Biomass Company. All Rights Reserved)

La hemicelulosa es un polisacárido muy heterogéneo y es la segunda estructura orgánica más abundante en la pared celular. El xilano encontrado en cereales y maderas duras es el principal polímero que conforma a la hemicelulosa, consiste en un esqueleto de residuos de D-xilosa unidas mediante enlaces α -1,4 que puede ser sustituido por diferentes grupos secundarios como L-arabinosa, D-

galactosa, acetilo, feruloil, p-coumaroil, y residuos de ácido glucurónico (Wilkie & Woo, 1977). El (galacto)glucomanano es la segunda estructura de la hemicelulosa y se encuentra comúnmente en maderas duras y blandas (Timell, 1967), consta de un esqueleto de residuos de D-manosas y D-glucosas unidas mediante enlace β -1,4 con residuos adyacentes de D-galactosa. El xiloglucano es otro tipo de hemicelulosa que está presente en la pared celular de las dicotiledóneas (por ejemplo, la zanahoria) y algunas monocotiledóneas (por ejemplo, la cebolla) y consiste en un esqueleto de residuos de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 sustituido por residuos D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa, los residuos de xilosa pueden estar unidos a su vez con residuos de L-fucosa.

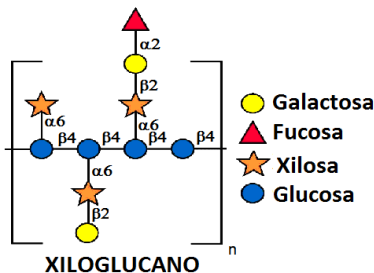


Figura 4 – Representación esquemática de un segmento de la cadena de xiloglucano (Consortium of Glycobiology. 2009)

La pectina es otro grupo de heteropolisacáridos y consiste en un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces α -1,4. En la estructura de la pectina se han identificado dos regiones diferentes. La región lisa está formada por una cadena principal de residuos de ácido D-galacturónico unidos en posición α -1,4 y estos pueden estar sustituidos por grupos de acetilo o metilo. La región ramificada coloquialmente llamada “peluda”, está formada principalmente por el ramnogalacturonano I. Este está constituido de una cadena principal de ácido D-galacturónico y la cadena está interrumpida por residuos de L-ramnosa en posición α -1,2 y los residuos de L-ramnosa están sustituidos por cadenas laterales de arabinanos y galactanos en posición o-4. Otra parte de la región ramificada está conformada por el ramnogalacturonano II (RG-II), un polisacárido de aproximadamente 30 unidades con una cadena principal de residuos de ácido D-galacturónico unidos en posición α -1,4. Esta cadena principal está sustituida con cadenas laterales de hasta 11 azúcares diferentes poco comunes como son la

apiosa, el ácido acerínico, el ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico y el 2-o-metil-L-fucosa. Esta región de la pectina está muy conservada tanto en su composición como en su estructura (de Vries & Visser, 2001).

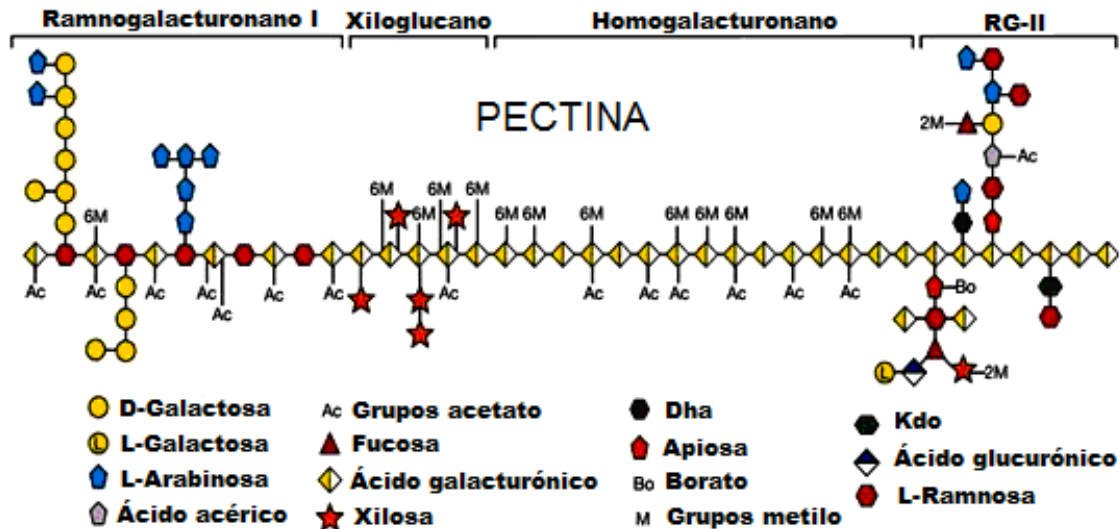


Figura 5 – Representación gráfica de la cadena de pectina (Consortium of Glycobiology, 2009)

3.5 Composición de los sustratos complejos

Se denominan sustratos complejos a residuos orgánicos que no han sufrido modificaciones o alteraciones en su estructura. Tanto los hongos saprófitos como patógenos utilizan como nutrientes compuestos en su estado natural. El uso de sustratos complejos en su forma nativa permite realizar una evaluación más precisa, de la capacidad y potencial que tienen los hongos para degradar diversos tipos sustratos, y al mismo tiempo, tener un mejor conocimiento de las enzimas que éste requiere para llevar a cabo dicha degradación. Los sustratos complejos que se emplearon en éste estudio son: olote de maíz, salvado de trigo y cáscara de limón.

3.3.1 Olote de maíz

El olote (del náhuatl: *olotl* “bizcocho del elote”), chócolo o zuro es el residuo producido luego de desgranar la mazorca de maíz, es decir, su tronco. Un grupo de estudios (Clark & Lathrop, 1953; Foley, 1978) encontró que el olote de maíz contiene 32.3 - 45.6% de celulosa y 39,8% de hemicelulosa, compuesta en su mayoría por pentosanos y lignina en un 6.7 - 13.9 %. Otra composición porcentual promedio de los componentes del olote de maíz más detallada es 34.4 % de celulosa, 31.1 % de xilano, 3.01 % de arabanano, 3.07 % de grupos acetilo, 17.7 % de lignina, 1.3 % de cenizas y 9.52 % otros (Garrote *et al.*, 2002).

El olote de maíz es un desecho del maíz que contiene gran cantidad de azúcares que pueden ser utilizados para producir diversos compuestos como bioetanol y biocombustibles (Cao *et al.*, 1996; Adesanya & Raheem, 2009). La bioconversión de la lignocelulosa en biocombustible, a partir de olote de maíz, una materia prima no comestible y muy económica, para la renovación de energía es imprescindible. Los beneficios de usar olote de maíz como materia prima incluyen un flujo de emisiones potencialmente más limpias y la reducción de las emisiones no deseadas de residuos y cenizas (Gani & Naruse, 2007). Los olotes del maíz secos no contienen almidón y no tienen mayor valor alimenticio, pero contienen celulosa y son, por lo tanto, una fuente potencial para la producción de bioetanol (Elander & Russo, 1993).

3.3.2 Salvado de trigo

El salvado de trigo es uno de los principales subproductos que se obtiene durante la molienda del grano de trigo (13 – 17 %), y corresponde a las capas externas del grano, más concretamente al pericarpio con sus tres subcapas: epicarpio, mesocarpio y endocarpio, las cuales tienen como función dar protección a los granos.

Con el fin de proteger al endospermo, el salvado se compone principalmente de fibra insoluble 44 - 53%. La composición química de la fibra del salvado de trigo es compleja, se sabe que contiene esencialmente celulosa, lignina, pentosanos y polímeros a base de xilosa y arabinosa, los cuales están fuertemente unidos a las proteínas. Las proteínas representan aproximadamente un 16 % del total de la materia seca del salvado, mientras que los hidratos de carbono un 16 – 18 % y la grasa tan solo un 4.0 - 4.5 %. El salvado de trigo es rico en vitaminas del complejo B y su contenido mineral es bastante alto 7.2% (Cornell, 2003).

El sustrato por excelencia para la fermentación sólida es el salvado de trigo por su alto contenido de nutrientes, así como su estructura física, que presenta una área importante para el desarrollo del hongo (López *et al.*, 2004).

El uso más importante del salvado de trigo se da en la alimentación como la principal fuente natural de fibra y también como ingrediente de las formulaciones utilizadas en la alimentación animal. En cosmética, se utiliza para el cuidado del cutis, como ingrediente de cremas y mascarillas exfoliantes. Y en biotecnología como sustrato de fermentaciones que se llevan a cabo para producir una variedad de distintos compuestos, como enzimas.

Se piensa que los componentes de la fibra insoluble del salvado de trigo como la celulosa y la lignina, así como su estructura celular son factores clave que favorecen la fermentación lenta y la capacidad de retención de agua y juegan un papel fundamental en el efecto protector del cáncer de colón. Los componentes no fibrosos del salvado de trigo, incluyendo compuestos fenólicos y el ácido fítico, los cuales también podrían contribuir a su efecto anticancerígeno (Silla, 2004).

3.3.3 Cáscara de limón

Se conoce como cáscara de limón a la corteza que rodea dicha baya cítrica, la cual es muy suave al tacto y otorga al limón su color y aroma tan característico.

Dicha corteza está formada en el exterior por un epicarpio, delgado y de color verde oscuro brillante que está salpicado de numerosas bolsas secretoras de esencia y en el interior por un mesocarpio, compuesto por una capa externa y una capa interna blanca y más delgada. La cáscara deshidratada representa aproximadamente un 14% de rendimiento obtenido en la industria de la citricultura.

La cáscara de limón constituye la materia prima para la fabricación de ácido cítrico, pectinas y aceites esenciales. Los aceites esenciales se obtienen de la parte externa de la cáscara fresca de las frutas cítricas, mientras que la pectina se obtiene a partir de la cáscara de limón deshidratada.

El aceite esencial de limón consiste principalmente de terpenos, en especial limoneno, β -pineno, limoneno, γ -terpineno, felandreno y camfeno, y de aldehídos tales como el linalol, acetato de linalilo, acetato de geranilo, citral y citronelal. Se usa principalmente como aromatizante y saborizante en la industria de bebidas, cosméticos y perfumería.

En México, como en muchos otros países, la cáscara de limón deshidratada es el insumo para la producción de pectina, la cual se usa en la industria de dulces y farmacéutica, además de gelificar líquidos azucarados. De cada tonelada de fruta fresca se obtienen 300 kg de cáscara fresca, la cual, al ser deshidratada, se reduce a 50 kg aproximadamente (Dussel, 2002).

Los componentes principales de la fracción soluble en alcohol de la cáscara de limón son mono- y disacáridos, aceites esenciales y ceras, mientras que la fracción insoluble en alcohol contiene principalmente a los componentes de la pared celular tales como celulosa, lignina, pectina y hemicelulosa (Sinclair & Crandall, 1949). La composición química proximal de la cáscara de limón es 81.6 % de humedad, 1.5% de proteína, 0.3 % de grasas, 16.0% de hidratos de carbono, incluyendo fibra, 0.6% de cenizas (calcio, fósforo, hierro, sodio y potasio)

y en porciones mucho más bajas contiene vitamina A, tiamina, riboflavina y niacina (Morton, 1987).

3.6 Enzimas responsables de degradar la pared de células vegetales

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 para el hongo o intervienen en la regulación de algún proceso fisiológico en particular. La síntesis de enzimas en general está 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 el proceso de represión ocurre en presencia de altas concentraciones de glucosa u otros azúcares simples rápidamente metabolizables, que promueven una alta velocidad de crecimiento de los hongos. La presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables reprime la síntesis de muchas enzimas inducibles como las pectinasas y xilanasas.

La degradación del esqueleto de pectina puede ser hidrolizado por las pectin-liasas (EC 4.2.2.10), las pectato-liasas (EC 4.2.2.2), y las poligalacturonasas (EC 3.2.1.15 y 3.2.1.67). Estas enzimas que degradan a la cadena principal de pectina pueden dividirse en hidrolasas y liasas, de acuerdo con el tipo de mecanismo por el cual hidrolizan al polisacárido. Las pectinasas se dividen en dos grupos: estererasas, las cuales saponifican el sustrato, es decir, catalizan la desesterificación de la pectina para remover los metoxi ésteres; y despolimerasas,

que catalizan el rompimiento de los enlaces α -1,4 glucosídicos del ácido D-galacturónico de la pectina (Jayani *et al.*, 2005).

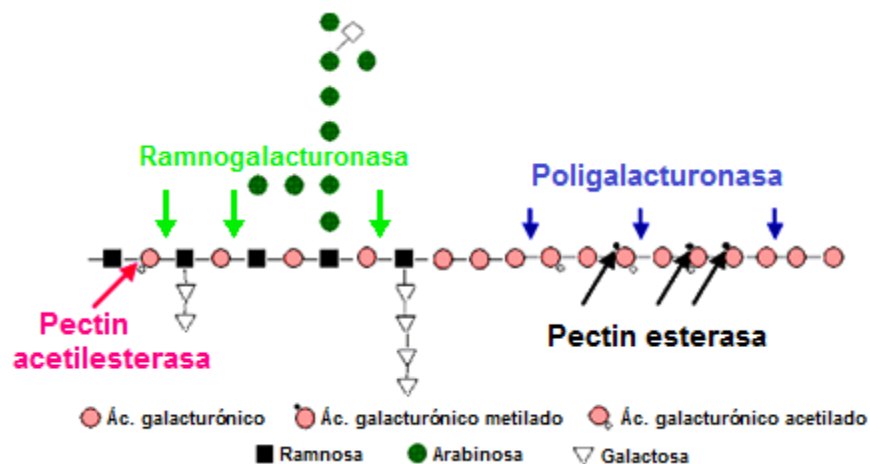


Figura 6 – Representación gráfica de la cadena de pectina, señalando los sitios en que actúan las enzimas que llevan a cabo su degradación (Copyright © 2009 Adisseeo. All rights)

Las enzimas pectinolíticas se han clasificado con base en la forma o frecuencia con la que estas enzimas rompen la molécula de la pectina (frecuencia de corte) y pueden ser de tipo “exo” ó ”endo”. Las enzimas de tipo “exo” rompen el enlace glicosídico en el extremo reductor de la molécula de la pectina formando monómeros, dímeros y trímeros como productos finales. Las de tipo “endo” tienen su sitio de corte en extremos no reductores de la molécula y generan oligómeros de entre 5 y 7 unidades, lo que ocasiona la disminución de la viscosidad de una solución de pectina (Stutzenberger, 1992 y Bennett, 1998). Otra clasificación se dio debido al mecanismo por el cual despolimerizan a la pectina, en hidrolasas y liasas. El mecanismo de acción de las hidrolasas es mediante la adición de una molécula de agua para poder romper el enlace glicosídico. Las liasas rompen el enlace glicosídico por un mecanismo de acción conocido como trans-eliminación o β -eliminación dando lugar a la formación de una doble ligadura entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido galacturónico (Lineweaver & Jasen, 1951).

En la biodegradación de la celulosa participan cuatro clases de enzimas. Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4) hidrolizan la celulosa a glucooligosacáridos. Las

celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) liberan celobiosa de la celulosa cristalina. Las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) degradan los oligosacáridos hasta glucosa. Y por último las exoglucanasas son capaces de liberar glucosa a partir de celulosa y glucooligosacáridos.

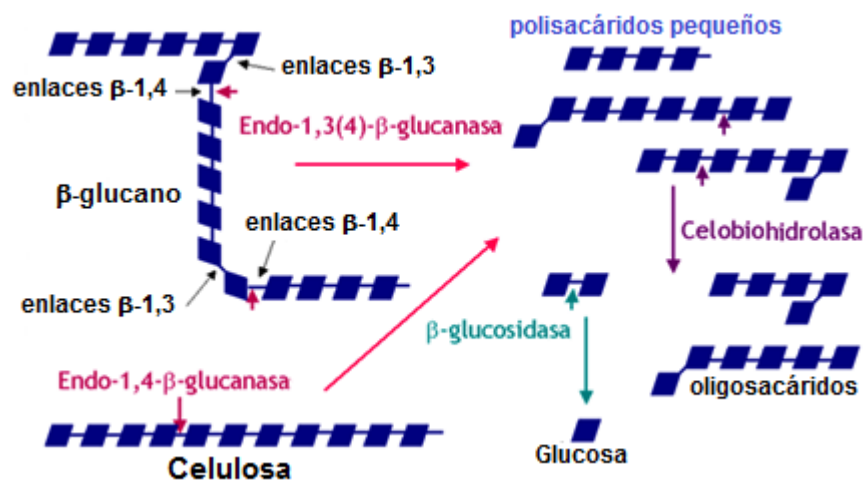


Figura 7 – Representación gráfica de la hidrólisis de celulosa por la acción de diversas enzimas (Copyright © 2009 Adisseo. All rights)

La biodegradación del esqueleto de xilano depende de dos clases de enzimas. Las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) capaces de liberar oligosacáridos más pequeños a partir del xilano, los cuales a su vez son degradados a xilosa por las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37).

La degradación del esqueleto de galacto(gluco)manano depende de la acción de las β -endomananasas (EC 3.2.1.78) y las β -manosidasas (EC 3.2.1.25). Las β -endomananasas, por lo general se denominan β -mananasas e hidrolizan el esqueleto de galacto(gluco)manano liberando manooligosacáridos. La capacidad de degradación de las β -mananasas depende de varios factores, tales como el número y la distribución de los sustituyentes, y la proporción de glucosa a manosa (McCleary, 1991). La β -mananasa es más activa en los galactomananos con menor grado de sustitución (Civas *et al.*, 1984). La presencia de residuos de galactosa en el esqueleto de manano obstaculiza significativamente la actividad de la β -mananasa (McCleary and Mathesen, 1983). La β -mananasa libera predominantemente manobiosa y manotriosa a partir del manano, confirmando

que son verdaderas endohidrolasas (Ademark *et al.*, 1998, McCleary & Mathesen, 1983, Ericsson & Winell, 1968, Ademark *et al.*, 1999 y Reese & Shibata, 1965). Las β -manosidasas (EC 3.2.1.25) son exo-enzimas que liberan residuos de manosa del extremo no reductor de los manooligosacáridos.

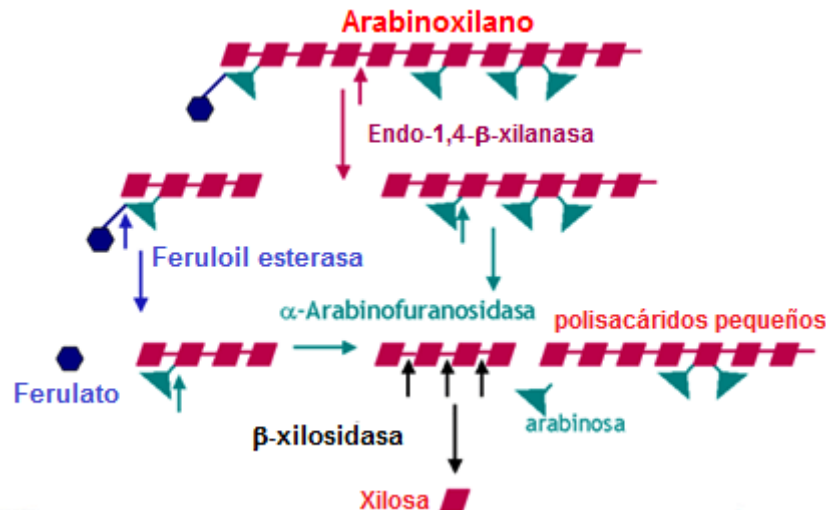


Figura 8 – Representación esquemática de la hidrólisis del polisacárido arabinoxilano por diversas enzimas (Copyright © 2009 Adisseo. All rights)

Las enzimas accesorias que intervienen en la degradación de los polisacáridos de la pared de células vegetales y en contraste con las enzimas descritas anteriormente no actúan sobre las cadenas principales, sino sobre los sustituyentes o cadenas laterales de la pectina y hemicelulosa. Algunas de estas enzimas hidrolizan los enlaces entre un residuo de la cadena principal y el sustituyente, mientras que otras rompen los enlaces internos o terminales de dichas cadenas laterales (de Vries & Visser, 2001).

Las α -D-Xilosidasas pueden liberar residuos de xilosa a partir del xiloglucano. Estas enzimas son altamente específicas en cuanto que solo actúan sobre enlaces de residuos de xilosa (Yoshikawa *et al.*, 1993), pero difieren con respecto al tipo de glucósido que pueden hidrolizar.

Los residuos de arabinosa pueden ser liberados del arabinoxilano por las α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) y por las arabinoxilano arabinofurano-

hidrolasas. La arabinofuranosidasa de *A. niger* purificada por Kaneko *et al.* (Kato *et al.*, 1999) tiene la capacidad de liberar sólo residuos de terminales de arabinosa α -1,3 mientras que la arabinofuranosidasa B de *A. niger* es capaz de liberar residuos de arabinosa terminales α -1,2, α -1,3 y α -1,5 (Beldman *et al.*, 1993). La arabinoxilano arabinofuranohidrolasa (AXH) de *A. awamori* es muy específica para residuos de arabinosa ligados a xilano (Kormelink *et al.*, 1991).

Las endoarabinasas (EC 3.2.1.99) hidrolizan los enlaces α -1,5 del arabinano presente en las cadenas laterales de los polisacáridos de pectina. Aunque algunas arabinofuranosidasas son también capaces de liberar arabinano, las endoarabinasas influyen positivamente en la acción de las arabinofuranosidasas, aumentando su eficiencia en la degradación del arabinano. Hasta la fecha, no se han obtenido referencias de la presencia de más de una endoarabinasa en *Aspergillus sp.* La producción de endoarabinasas por *Aspergillus spp.* se observó en remolacha de azúcar (Van der Veen *et al.*, 1991), L-arabinosa y L-arabitol (Ramon *et al.*, 1993 y Van der Veen *et al.*, 1993). Se demostró mediante un análisis de degradación utilizando α -1,5-L-arabino-oligosacáridos, que la endoarabinasa de *A. niger* es capaz de liberar residuos terminales, pero preferentemente actúa en los enlaces internos (Dunkel & Amado, 1995). Actualmente solo ha sido purificada una exoarabinasa de *Aspergillus*. Esta enzima liberada principalmente arabinobiosa del arabinano de la remolacha de azúcar, aunque también liberó una pequeña cantidad de arabinotriosa.

La eliminación de los residuos de D-galactosa de los polisacáridos de la pared celular de plantas requiere de la acción de las α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) y β -galactosidasas (EC 3.2.1.23). Las β -galactosidasas liberan residuos terminales de galactosa a partir del galactano presente en las cadenas laterales de las pectinas. Las α -galactosidasas participan en la degradación del esqueleto de galacto(gluco)manano, eliminando residuos de galactosa y manosa. La presencia de residuos de galactosa terminales unidos por enlaces β en algunos galactoglucomananos (Sims *et al.*, 1997) sugiere que ambas enzimas, α y β -galactosidasas pueden

desempeñar un papel en la degradación de estos polisacáridos. *Aspergillus spp.* produce β -galactosidasa durante su crecimiento en arabinoxilano (Manzanarez *et al.*, 1998), ácido poligalacturónico (McKay, 1991), salvado de trigo (Gonzales & Monsan, 1991) y lactosa (Reczey *et al.*, 1992). Diferentes galactosidasas se han purificado de *Aspergillus spp.* pero no hay indicios de producción de más de una β -galactosidasa por *Aspergillus sp.*

El galactano de las cadenas laterales de la pectina se hidroliza mediante las endogalactanasas (EC 3.2.1.89), exogalactanasas, y β -galactosidasas. Las endogalactanasas son capaces de hidrolizar los polisacáridos de galactano, resultando la liberación de galactobiosa y galactosa. Existen diferencias entre las enzimas con respecto a su capacidad para hidrolizar los enlaces β -1,3, β -1,4 ó β -1,6 entre los residuos de galactosa. Dos tipos de arabinogalactanos están presentes como parte de las cadenas de pectina. El tipo I consiste en un esqueleto de residuos de galactopiranososa unidos mediante enlaces β -1,4, mientras que el tipo II consiste en un esqueleto de residuos de galactopiranososa con enlaces β -1,3 que puede estar ramificado por residuos de galactopiranososa con enlaces β -1,6.

Los residuos de ácido glucurónico y sus 4-*o*-metil éteres se pueden extraer del esqueleto del xilano por acción de las α -glucuronidasas (EC 3.2.1.131). La enzima actúa principalmente en xilooligómeros pequeños y por tanto depende de la acción de endoxilanasas. Se ha reportado la sinergia que existe entre las α -glucuronidasas y las endoxilanasas, y entre las α -glucuronidasas y las β -xilosidasas (de Vries *et al.*, 2000 y de Vries *et al.*, 1998).

3.7 Aplicaciones industriales de las enzimas

Los hongos han sido importantes tanto en los antiguos como en los modernos procesos biotecnológicos. Procesos y productos que utilizan los hongos incluyen panadería, elaboración de cerveza, y la producción de antibióticos, alcoholes, enzimas, ácidos orgánicos, y muchos productos farmacéuticos. El advenimiento

de la tecnología de ADN recombinante y el análisis de la genómica a gran escala ha puesto levaduras y hongos filamentosos a la vanguardia de las aplicaciones comerciales contemporáneas (Bennett. 1998).

Las celulasas han adquirido gran importancia para la industria y la biotecnología en la bioconversión de la celulosa para la producción de biocombustibles. Para contender con grandes volúmenes de materiales lignocelulósicos, requeridos para la producción de etanol a nivel industrial, se necesitan enzimas con gran actividad a diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH (Sun & Cheng, 2002).

Las preparaciones de celulasas son capaces de modificar la estructura de las fibrillas de celulosa. Son añadidas a detergentes de ropa para mejorar el brillo, color, textura y eliminación de las partículas indeseables de las prendas de vestir de algodón. La mayoría de las prendas de vestir de algodón tienden a opacarse después de repetidos lavados. Esto se debe principalmente a la presencia parcial de microfibrillas de retina en la superficie de las prendas, las cuales pueden ser removidas por celulasas y devolver la suavidad y color original a las prendas.

Las xilanasas se usan en la alimentación animal, para hidrolizar parcialmente al xilano presente, lo cual mejora la accesibilidad de la celulosa, facilita la digestión ruminal y, por tanto, mejora el valor nutricional de los alimentos. Sin embargo, la remoción completa de xilano en dicha alimentación no es deseable, ya que los componentes de la hemicelulosa son parte importante de la "fibra dietética" y su eliminación puede aumentar las enfermedades intestinales de los animales (Dekker, 1979).

En los últimos años, las hemicelulasas, especialmente endoxilanasas se han utilizado para mejorar la calidad de pastas, galletas, pasteles, pan y otros productos de panadería (Poutanen, 1997). Si bien se sabe que estas enzimas aportan beneficios durante el manejo de la masa y horneado, su mecanismo de

acción no es muy claro. Se cree que la capacidad de las endoxilanasas de hidrolizar al arabinoxilano facilita la redistribución del agua presente en la masa tanto en la pasta como en el pan, y es responsable de los efectos favorables observados sobre la manipulación de la masa, volumen del pan, textura y estabilidad (Maat *et al.*, 1992; Poutanen, 1997). Recientemente se ha reportado que arabinasas, L-arabinofuranosidasas y L-arabinofuranohidrolasas estererasas juegan un papel importante mejorando la textura, la calidad y los atributos sensoriales de diversos productos de panadería (Poutanen, 1997). Sin embargo, una adecuada combinación de estas enzimas es esencial para conseguir un máximo beneficio durante los procesos de amasado y horneado.

Durante la fabricación de cerveza se añaden, ya sea durante la maceración o durante la fermentación primaria, β -glucanasas que hidrolizan al β -glucano presente en la malta, con el fin de reducir la viscosidad del mosto y aumentar los rendimientos de producción. Dichas enzimas provienen principalmente de *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma reesei* (Galante *et al.*, 1998).

Tres principales enzimas exógenas utilizadas en la producción de vino son pectinasas, β -glucanasas y hemicelulasas. Los principales beneficios del uso de estas enzimas durante de fabricación del vino son: optimizar la maceración y extracción del color; facilitar las etapas de clarificación y filtración; y mejorar la calidad y estabilidad del vino. (Galante *et al.*, 1998). Recientemente, una cuarta enzima, la β -glucosidasa, ha atraído mucho la atención de la industria del vino debido a su capacidad de mejorar el aroma de los vinos mediante la glicosilación de precursores presentes (Caldini *et al.*, 1994; Gunata *et al.*, 1990). La pectinasa comercial que se utilizó por primera vez en la industria del vino fue producida por *Aspergillus*, y contenía cantidades variables de pectin-esterasa, poligalacturonasa, pectina-liasa y pequeñas cantidades de hemicelulasa. La adición de pectinasas durante el aplastamiento de las uvas, mejora la extracción del jugo, reduce el

tiempo de aclaración y aumenta el contenido de terpenos en el vino (Galante *et al.*, 1998).

Las pectinasas son ampliamente utilizadas en la extracción de aceites, en la industria textil, en la industria alimentaria, en la maceración de tejidos vegetales, en el tratamiento de aguas residuales y en el desgomado de fibras naturales, Además se utilizan para incrementar la producción, en la clarificación de jugos y de vinos, y en la fermentación de café y té. (Kaur *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2007. Jayani *et al.*, 2005).

Se han sugerido las hemicelulasas (xilanasas), junto con celulasas y pectinasas, en aplicaciones como la clarificación de jugos (Biely, 1985 y Dekker, 1979), la preparación de dextranos utilizados como espesantes en alimentos (Thompson, 1983), y la producción de pulpas y jugos (Biely, 1985 y Woodward, 1984).

Las pectinasas ácidas que son utilizadas en la industria para la elaboración de jugos de frutas a menudo provienen de los hongos, especialmente de *Aspergillus niger*. Los jugos producidos comercialmente por estas industrias incluyen: jugos claros y espumosos (manzana, pera y jugos de uva), jugos turbios (jugos de frutas cítricas, jugos ciruela, el jugo de tomate y néctares) y productos unicelulares en los cuales se preserva la integridad de las células vegetales. En el caso de los jugos claros y espumosos las enzimas son añadidas con el fin de aumentar el rendimiento del jugo en la etapa de prensado. En el caso de los jugos turbios, enzimas pectinolíticas que contienen altos niveles de actividad poligalacturonasa son añadidas con el fin de estabilizar la turbidez. En los productos unicelulares, las enzimas utilizadas se conocen como “macerasas” y el proceso se denomina maceración. Es probable que las mejores preparaciones enzimáticas para maceración contengan celulasas y hemicelulasas además de las enzimas pectinolíticas (Kashyap *et al.*, 2000).

Las pectinasas juegan un papel importante en la fermentación del té y café, ya que se utilizan para eliminar las capas carnosas de mucílago que rodean las semillas, tres cuartos de las cuales constan de sustancias pécticas. Celulasas y hemicelulasas presentes los preparados enzimáticos mejoran la digestión de dicho mucílago.

Los aceites de semillas de canola, germen de coco, girasol, palma, almendras y aceitunas son tradicionalmente producidos mediante un proceso de extracción con disolventes orgánicos, el disolvente más utilizado es el hexano, que es un potencial carcinógeno. El uso de enzimas que degradan pared celular, incluyendo pectinasas, sirven para extraer dichos aceites vegetales en un proceso acuoso de licuefacción. Recientemente, preparaciones de enzimas que degradan la pared celular de las plantas, se han comenzado a utilizar en la elaboración del aceite de oliva. Las enzimas se añaden durante la molienda de los olivos y con ayuda de una técnica de separación el aceite es fácilmente liberado (West, 1996). Dicho tratamiento enzimático por lo tanto provoca un importante aumento en el rendimiento en la obtención del aceite de oliva.

La fabricación de papel es esencialmente un proceso de filtración continuo, en el cual interfieren ciertas sustancias, entre las cuales destacan las pectinas, las cuales demandan una gran cantidad de cationes debido en gran medida a su grado de polimerización (Thornton *et al.*, 1994). Las pectinasas se utilizan para hidrolizar los polímeros de ácido galacturónico (Reid, 2000).

CAPITULO IV

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa de *Aspergillus flavus* CECT-2687. La cual está bien identificada y es productora de aflatoxinas. Dicha cepa se encontraba resguardada en agar papa dextrosa (PDA) y se resembró quincenalmente en placas con agar Dextrosa Sabouraud para mantener la cepa viable, se incubó a 37°C por 72 horas y se mantuvo en refrigeración (4 °C).

4.2 Sustratos complejos

Como sustratos complejos se utilizaron cáscara de limón deshidratada, salvado de trigo, y olote de maíz molido.

4.3 Reactivos utilizados

El agar bacteriológico, agar papa dextrosa (PDA) y agar dextrosa Sabouraud (Sab) fueron obtenidos de BD Bioxon. La pectina cítrica, xilano de abedul, xilosa, glucosa, ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), glicina, mercapto-etanol, tris-(hidroximetil) amino-metano (TRIZMA-BASE), persulfato de amonio (PSA) y TEMED de laboratorios SIGMA. Los ácidos galacturónico y poligalacturónico de FLUKA. El Tween 80 de la compañía Aldrich Chemical. El fosfato de potasio mono y di básico, sulfato de amonio, metabisulfito de sodio, cloruro de sodio, tartrato de sodio y potasio, fenol, metanol, hidróxido de sodio, ácido acético y ácido clorhídrico de J. T. Baker, y finalmente la acrilamida, metileno-bis-acrilamida, dodecil sulfato de sodio (SDS) y el marcador de PM (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) de los laboratorios BIO-RAD.

4.4 Cultivo del microorganismo

La cepa de *Aspergillus flavus* se propagó en agar Sabouraud por el método de siembra masiva, para lo cual se tomó una pequeña cantidad del cultivo del hongo seleccionado con un asa micológica estéril y sembró en el centro de la caja presionando ligeramente el asa sobre el agar, y después con un asa de Drigalsky se extendió en todo el medio. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 72 horas.

4.5 Obtención de la cosecha de esporas

Se rasparon las esporas (conidios) de dos cajas y se resuspendieron en 10 mL de solución salina isotónica (0.9% p/v) con Tween 80 (0.005 % v/v) estéril. Dicha suspensión se colocó en tubos para centrifuga, las esporas se lavaron centrifugando la suspensión durante 5 minutos a 5000 rpm, el sobrenadante se desechó y las esporas se resuspendían nuevamente en 10 mL de la misma solución, este lavado se realizó por duplicado. Finalizado este procedimiento se adicionaron 5 mL de solución salina estéril-Tween 80 a las esporas y la suspensión se agitó por 2 minutos en el vortex a máxima velocidad.

4.6 Conteo de esporas

La determinación de la concentración de esporas (conidios) en la suspensión final se realizó mediante el método de conteo directo con la cámara de Neubauer. Para ello se realizó una dilución 1:100 de la suspensión original, a partir de esta se tomaron 10 μ L y colocaron en la cámara, ésta se colocó en el microscopio observándose con el objetivo 40X. Se contaron las esporas contenidas en 16 cuadros que conforman uno de los cuatro cuadrantes. La concentración de esporas de la suspensión se calculó de la siguiente manera:

$$[\text{esporas/mL}] = \# \text{ esporas contadas} \times 4 \times 2500 \times 100$$

4.7 Producción de las enzimas en medio líquido

Para la obtención de las enzimas, matraces de 500 mL, con 100 mL de medio fueron inoculados con una concentración final de 10^6 esporas de *Aspergillus flavus* por mililitro de medio de cultivo. Los medios de cultivo líquido contenían medio basal (KH_2PO_4 2g/L, K_2HPO_4 2g/L Y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L) con la fuente de carbono al 1% p/v y se ajustaron a pH de 6.0, Las fuentes de carbono utilizadas fueron cáscara de limón, salvado de trigo, olote de maíz, berenjena, xilano de abedul, pectina cítrica, xilosa, ácido galacturónico y glucosa. En algunos casos el medio líquido contenía una combinación de fuentes de carbono, en las que se agregó un polisacárido y un azúcar simple, ambos al 1% (p/v) cada uno. Los matraces fueron incubados a 37°C por 72 horas en la incubadora con movimiento recíproco a 200 rpm para favorecer una buena aereación y homogenización del medio.

4.8 Obtención del filtrado enzimático crudo de los medios líquidos

Los matraces con los medios de cultivo líquido se muestrearon a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 horas), tomando 5 mL para cada muestra, los cuales se filtraron primero en algodón, luego en papel filtro Whatman 1, y finalmente se centrifugaron a 500 rpm durante 5 minutos, con el fin de eliminar la biomasa del hongo así como el material sólido residual. A cada muestra se le determinó actividad enzimática de pectinasas y xilanasas.

4.9 Producción de las enzimas en medio sólido

Se inocularon con 10 000 esporas de *Aspergillus flavus* cada una de las cajas petri con medio de cultivo. Los medios de cultivo sólido contenían medio basal (KH_2PO_4 2g/L, K_2HPO_4 2g/L Y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L), la fuente de carbono al 1% p/v y agar bacteriológico al 1.5% p/v, los medios se ajustaron a pH de 6.00. Sobre la caja petri se colocó en condiciones estériles, una membrana Millipore de policarbonato con diámetro de poro de 0.2 μm , posteriormente se inoculó la caja

en la parte central sobre dicha membrana con 2 μL de suspensión de esporas [5000 esporas/ μL]. Se incubaron las cajas 2 horas a 37°C boca arriba para que se absorbiera el inóculo y posteriormente se voltearon e incubaron durante 96 horas a 37°C. Como fuente de carbono se utilizaron cáscara de limón, olote de maíz, salvado de trigo, xilano de abedul y pectina cítrica. Además se elaboraron medios en los que se combinaron por una parte la cáscara de limón y por otra la pectina cítrica con azúcares simples como glucosa, xilosa y ácido galacturónico, adicionados también al 1% p/v.

4.10 Obtención del filtrado enzimático a partir de los medios sólidos

Al finalizar el tiempo de incubación, primeramente se registró el tamaño y apariencia de la colonia, después con ayuda de unas pinzas se retiraron la biomasa y la membrana de la placa. Posteriormente se cortó una circunferencia de agar de un tamaño determinado, abarcando en la mayoría de los casos, el espacio en que creció el hongo, dicho círculo de agar se pesó y maceró en un desmembranador durante 2 minutos a 2000 rpm. La pasta de agar obtenida se transfirió a un tubo de centrifuga al cual se adicionó 5 mL de buffer de acetatos 100 mM (pH 5.0), el tubo se agitó en el vortex a máxima velocidad durante 30 segundos y enseguida se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos. El filtrado enzimático se decantó y el agar se desechó. Se midió el volumen del filtrado enzimático obtenido y se determinó la actividad enzimática del mismo.

Además, en uno de los experimentos, se eligieron dos zonas para la extracción del filtrado enzimático, la primera consistió en una circunferencia de agar de 2 cm de diámetro ubicada en el centro de la placa, y la segunda en un anillo de agar que circundaba a la primer zona, con un diámetro interior de 2 cm y un diámetro exterior de 3.5 cm. En otros de ensayos efectuados, se analizaron dos condiciones de crecimiento, en la primera se colocó una sola membrana de policarbonato en la placa, y sobre ésta el inóculo, con el fin de separar a la biomasa producida del medio de cultivo, y en la segunda se colocó una membrana sobre el medio y una

vez que el inóculo fue absorbido, se colocó sobre la placa una segunda membrana.

4.11 Determinación de la actividad enzimática

4.11.1 Actividad exopectinolítica

Se determinó a partir de la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática empleando una curva de ácido galacturónico como patrón. La mezcla de reacción constó de 0.5 mL de solución de pectina cítrica 1% p/v, 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM (pH 5.0) y 0.1 mL de filtrado enzimático. La mezcla de reacción se inició adicionando 100 μ L de filtrado extracelular, se incubó durante 20 minutos a temperatura de 45 °C, al término de ese tiempo la reacción se detuvo adicionando 2 mL de reactivo DNS. Los tubos se colocaron en baño María a ebullición durante 5 minutos y se añadió después 5 mL de agua destilada. Se centrifugaron las muestras a 500 rpm durante 5 minutos. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm. En el caso de los blancos se incubaron sin muestra y al término de los 20 minutos de incubación se añadieron primero los 2 mL de DNS y después los 100 μ L de filtrado enzimático. La actividad se expresa en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima que produce un micromol de ácido D-galacturónico en dichas condiciones.

4.11.2 Actividad xilanolítica

Se determinó por medio de la cuantificación de azúcares reductores por la técnica de DNS empleando una curva de xilosa como patrón, que se obtienen al realizar la incubación de 0.5 mL de xilano de abedul (1% p/v), 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM (pH 5.0) y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células. Se incubó la mezcla de reacción en un baño a 50 °C durante 20 minutos. Al término se adicionó 1 mL de reactivo DNS y se calentó la mezcla a ebullición durante 5

minutos. Finalmente se añadieron 5 mL de agua destilada, se agitaron las muestras en el vortex a máxima velocidad y se leyó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 575 nm en el espectrofotómetro. Se definió como una unidad de actividad xilanolítica (U) la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un micromol de xilosa en 20 minutos en las condiciones de ensayo dadas.

4.12 Análisis de perfiles electroforéticos

La preparación de los geles de poliacrilamida de 8 x 8 cm con SDS se realizó en condiciones desnaturizantes. La electroforesis se corrió con 5 μ L de muestra a corriente constante (15 mA por gel) por espacio de aproximadamente 1 hora a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mm Mighty Small SE-245 (Hoefer Sci Ins USA). Después de ese tiempo, los geles se sumergieron en una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0.025%, metanol al 40% v/v y ácido acético al 7% v/v durante una hora para teñir la proteína y se destiñeron con una solución de ácido acético al 10% v/v. Las muestras que se cargaron en el gel se obtuvieron a partir de 1 mL de filtrado enzimático, el cual se dializó durante 3 horas y liofilizó a 5×10^{-3} mbar y -50°C , la muestra liofilizada se resuspendió en 50 μ L de buffer de tanque 1X (0.025 M TRIZMA-BASE, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH = 8.3).

CAPITULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

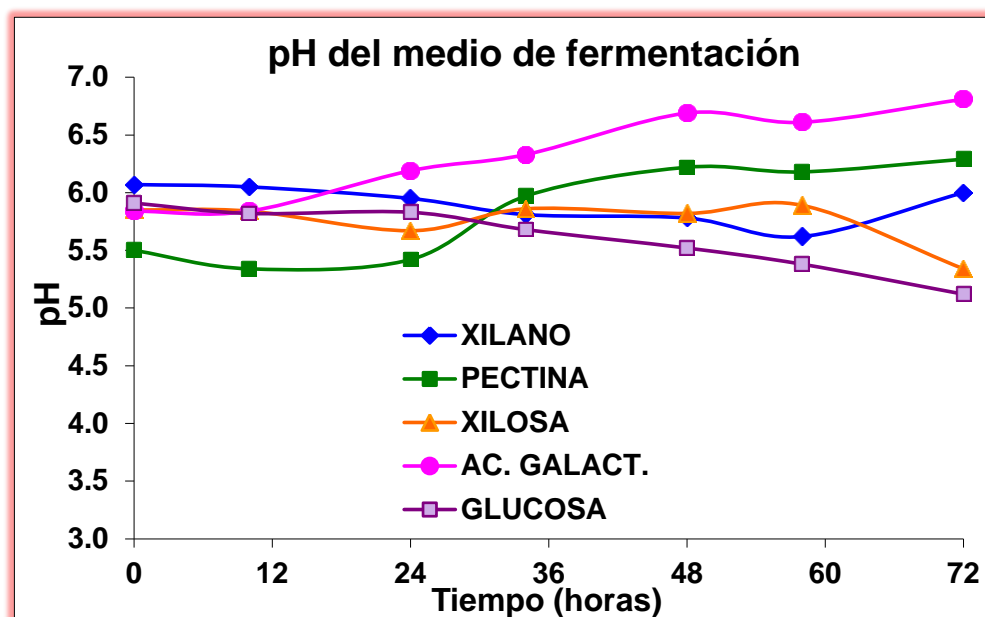
A. flavus es un hongo fitopatógeno que tiene gran facultad para crecer y desarrollarse en plantas, y por ende, la capacidad de producir enzimas que degradan a los polisacáridos presentes en la pared de las células vegetales. Es por ello, que en este trabajo, se consideró utilizar compuestos que componen la pared de células vegetales como sustratos para la producción enzimática. Estos sustratos incluyeron: 1) fuentes complejas como el olote de maíz, el salvado de trigo y la cáscara de limón, 2) polisacáridos contenidos en dichas fuentes complejas como la pectina y el xilano y 3) azúcares simples resultantes de la degradación de dichos polisacáridos, como ácido galacturónico y xilosa, además de estos dos últimos, se incluyó el uso de la glucosa, ya que está comúnmente actúa como un represor en la síntesis enzimática para la mayoría de los microorganismos.

5.1 Cinética de producción de las actividades enzimáticas en cultivos líquidos utilizando sustratos puros

Aspergillus flavus fue crecido en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono, con el fin de conocer las variaciones del perfil enzimático con respecto al tipo de nutrientes contenidos en el medio. Se utilizó como fuente de carbono a los siguientes sustratos puros: tres azúcares simples (xilosa, ácido galacturónico y glucosa) y dos polisacáridos (xilano y pectina), todos al 1% (p/v).

Los cultivos líquidos se muestrearon a diferentes tiempos de fermentación, a las muestras de los filtrados enzimáticos obtenidas, primeramente, se les midió el pH utilizando un potenciómetro, con el fin de observar la variación de éste a lo largo de la fermentación. La gráfica 1 muestra la evolución del pH para los cultivos líquidos.

En un inicio el valor de pH de los cultivos líquidos se ajustó a 6.0. Durante la fermentación se observó una evolución similar de pH para los medios con pectina y ácido galacturónico, teniendo al final un pH de 6.29 y 6.81, respectivamente. Mientras que en los medios con xilano y xilosa, dicho pH se modificó muy poco, encontrándose al final de la fermentación en valores muy cercanos a los iniciales. Por último, en el medio con glucosa se observó el mayor descenso de pH a lo largo de la fermentación, teniendo al final un valor de 5.12.



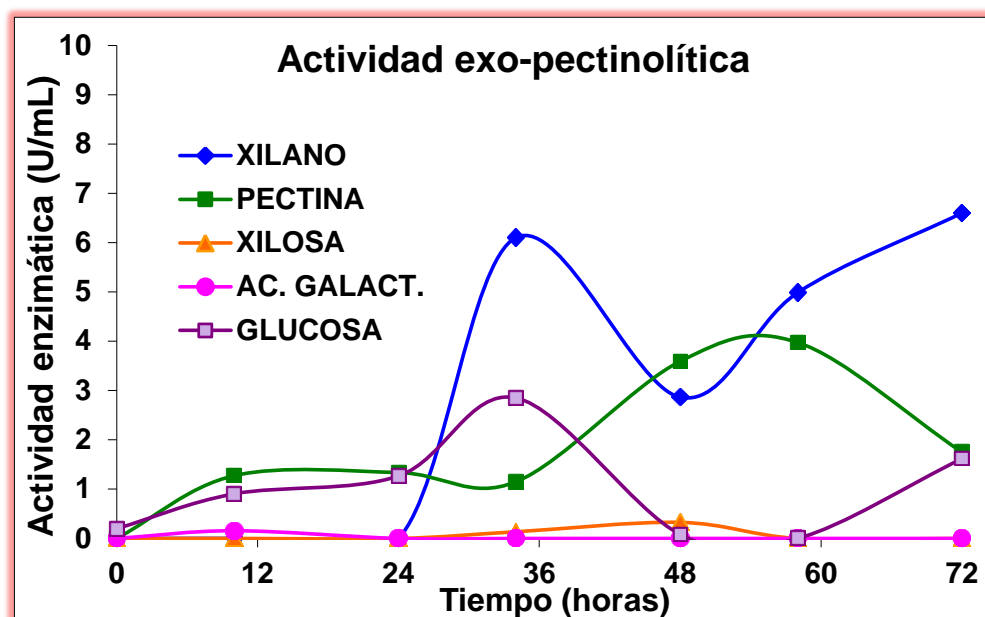
Gráfica 1 - Evolución del pH para los cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: xilano, pectina, xilosa, ácido galacturónico y glucosa, todas al 1% (p/v).

Aspergillus flavus produce títulos más altos a valores de pH de 6.0, a diferencia de otras especies, por ejemplo *A. flavipes* FP-500 produce los niveles más altos de pectinasas a valores de pH entre 3.0 y 3.5 (Aguilar y Huitron 1987, 1990, Martínez Trujillo *et al*, 2007).

El aumento o descenso del pH en los medios de cultivo cuando se lleva a cabo una fermentación, es consecuencia del metabolismo celular de los microorganismos, ya que en éstos, conforme crecen y se desarrollan, originan diversos metabolitos primarios y secundarios, entre estos se tienen principalmente productos ácidos, los cuales tienen a aumentar la concentración de iones H^+ . En algunas ocasiones, el pH del medio no se modifica de manera notable, debido a

un deficiente crecimiento y desarrollo del microorganismo y/o a la presencia de sales amortiguadoras en los medios.

El perfil enzimático de *A. flavus* varió dependiendo de la fuente de carbono en la que creció. Anteriormente se ha observado que la síntesis de enzimas extracelulares de hongos filamentosos como *Aspergillus* se ven fuertemente influenciada por los componentes que contienen los medios de cultivo, particularmente por la fuente de carbono. (Blandino *et al.*, 2001).



Gráfica 2 – Cinética de producción de la actividad exopectinolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: xilano, pectina, xilosa, ácido galacturónico y glucosa, todas al 1% (p/v).

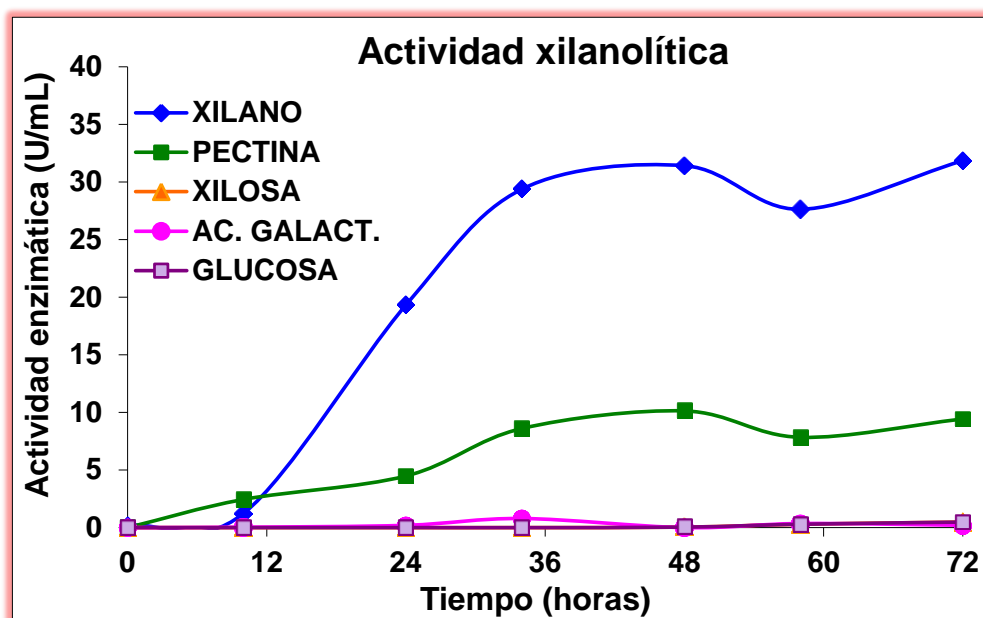
La mayor actividad de pectinasas extracelulares (gráfica 2), se observó en el medio de cultivo que contenía xilano como fuente de carbono, teniendo a las 72 horas de fermentación una actividad de 6.6 U/mL, seguido del medio que contenía pectina, en el cual se esperaba encontrar la mayor actividad exopectinolítica. Sin embargo, en dicho medio hubo un descenso de la actividad en las últimas doce horas de fermentación. Cabe destacar, que en ambos medios, la actividad de pectinasas, coincide cerca de las 4.5 U/mL a las 60 horas de fermentación.

En el medio con glucosa se tuvo un incremento de la actividad a las 36 y 72 horas, sin embargo, la actividad no superó las 3.0 U/mL. En general, para los cultivos líquidos con azúcares simples la producción de enzimas pectinolíticas

resultó ser muy baja a lo largo de toda la fermentación, lo cual era de esperarse, ya que cuando los microorganismos tienen disponibles fuentes de carbono fácilmente asimilables, como es el caso de los monosacáridos, éstos crecen y se desarrollan adecuadamente, sin tener la necesidad de producir enzimas hidrolíticas que degraden a los sustratos poliméricos presentes en el medio.

De lo anterior, destaca la obtención de una producción elevada de actividad exo-pectinolítica en el medio líquido con xilano, se cree que dicho sustrato contiene un constituyente, que actúa como un factor de inducción en la síntesis de enzimas pectinolíticas. En relación a esto no se conoce mucho hasta la fecha.

Dentro de las hemicelulosas el compuesto más abundante es el xilano, por ello, las xilanasas constituyen el grupo enzimático más estudiado entre las enzimas que degradan a las hemicelulosas, por lo que fueron determinadas en éste trabajo.



Gráfica 3 – Cinética de producción de la actividad xilanólica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: xilano, pectina, xilosa, ácido galacturónico y glucosa, todas al 1% (p/v).

Con respecto a las enzimas xilanolíticas, se observó que la mayor actividad se presentó en el medio que contenía xilano, como era de esperarse, seguido del de pectina, obteniendo 31.8 U/mL y 9.4 U/mL, respectivamente, a las 72 horas de fermentación. La producción de xilanasas por parte de *A. flavus* incrementó claramente con respecto al tiempo, cuando se utilizó xilano como fuente de

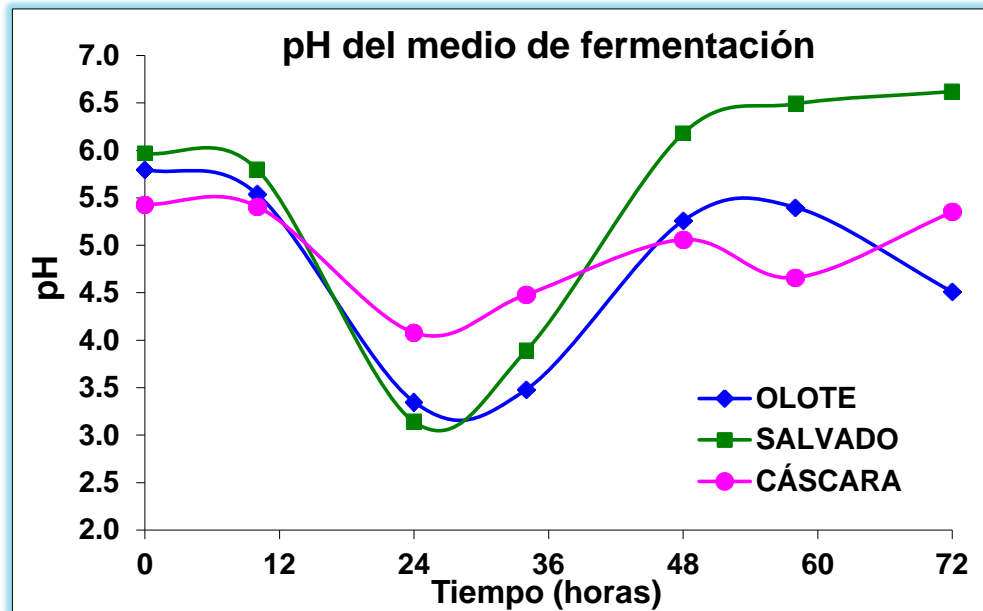
carbono, durante las primeras 48 horas. En los medios que contenían xilosa, ácido galacturónico y glucosa como fuente de carbono no se produjeron enzimas xilanolíticas, como se observa en la gráfica 3. Cabe mencionar que la xilosa, es un azúcar que a bajas concentraciones actúa como un inductor en la síntesis de enzimas xilanolíticas, sin embargo, en cuando está presente en altas concentraciones, actúa como un represor de la síntesis de dichas enzimas. Así mismo, observamos, que cuando la xilosa se añadió como única fuente de carbono, la producción de xilanasas fue prácticamente nula (gráfica 3).

De acuerdo a lo obtenido anteriormente, podemos decir que la mejor producción de las enzimas xilanolíticas se obtuvo cuando se utilizó xilano como fuente de carbono. Cabe mencionar que en esta ocasión, la producción de xilanasas en los medios con pectina como única fuente de carbono, no resultó completamente inesperada, ya que se sabe que una parte de la estructura de la pectina (Pérez *et al.* 2000) está sustituida con unidades de xilosa como sustituyentes y que dicho azúcar está involucrado en el proceso de inducción de dichas enzimas, sobre todo cuando ésta se encuentra presente en bajas concentraciones.

5.2 Cinética de producción de las actividades enzimáticas en cultivos líquidos con diversos sustratos complejos

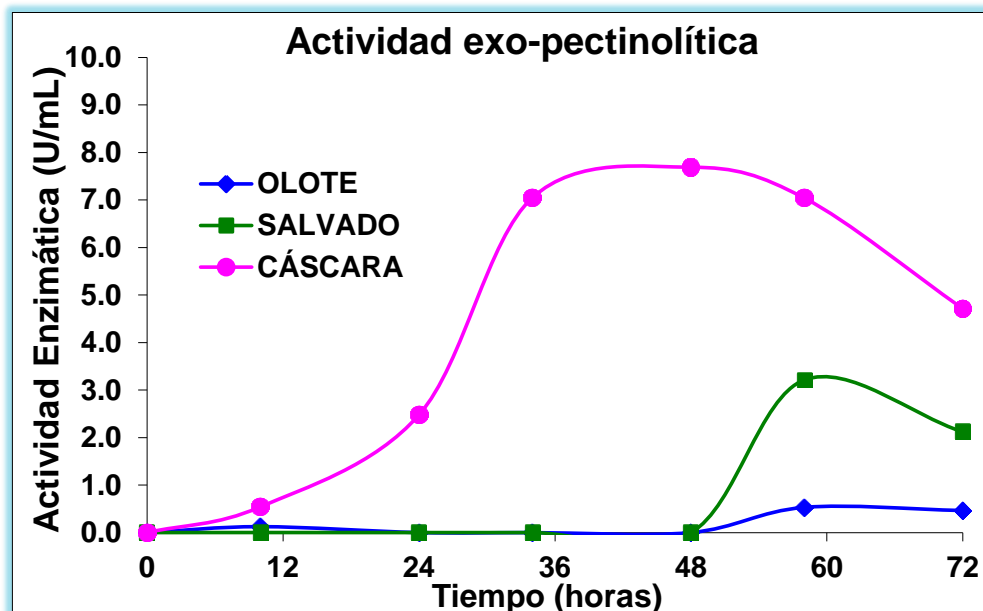
En el caso de los medios de cultivo líquidos, se utilizaron como sustratos complejos: olote de maíz, salvado de trigo y cáscara de limón, todos al 1% (p/v).

En este otro caso, también se ajustó a 6.0 el pH de los medios. Para todos los medios se observó una tendencia similar, en cuanto a los cambios de pH con respecto al tiempo. El mayor descenso de pH se produjo dentro entre las 12 y 24 horas de fermentación, encontrándose el pH en un valor cercano a 3.9 para los medios con salvado y olote, y en un valor de 4.5 para el medio con cáscara de limón, a las 34 horas de fermentación (gráfica 4).



Gráfica 4 – Evolución del pH para los cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: olote de maíz, salvado de trigo y cáscara de limón, todas al 1% (p/v).

Entre las 36 y 48 horas de fermentación el pH ascendió rápidamente en todos los casos, y después de las 48 horas casi no se modificó. Al finalizar la fermentación, los medios de olote de maíz, cáscara de limón y salvado de trigo, tuvieron valores de pH de 4.51, 5.35 y 6.62, respectivamente.

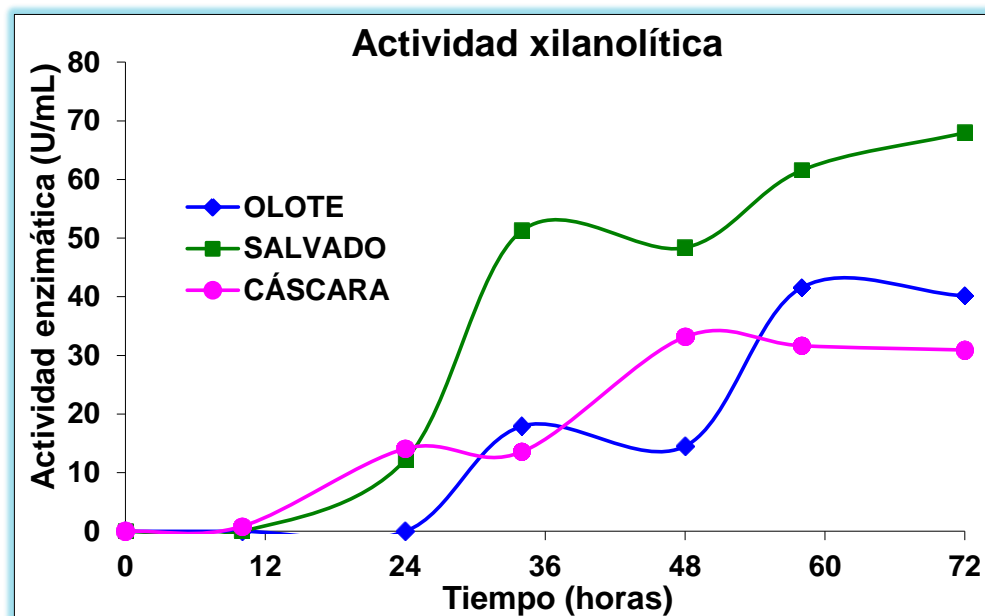


Gráfica 5 - Cinética de producción de la actividad exo-pectinolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: olote de maíz, salvado de trigo y cáscara de limón, todas al 1% (p/v).

La mayor actividad exopectinolítica se produjo a las 48 horas de fermentación, utilizando como fuente de carbono cáscara de limón con 7.7 U/mL, seguida por el salvado con 3.2 U/mL a las 60 horas de fermentación, y por último el olote de maíz con 0.5 U/mL en ese mismo tiempo (gráfica 5). Se observó que para estas dos últimas fuentes de carbono, las pectinasas se produjeron después de las 48 horas, y por ello, se obtuvo una actividad muy baja en dichos ensayos.

De acuerdo a la composición química de dichos sustratos complejos, resultó congruente, que la mayor producción de pectinasas de *A. flavus* se diera usando cáscara de limón como fuente de carbono, ya que ésta contiene una fracción importante de pectina, a diferencia del olote de maíz y el salvado de trigo, los cuales contienen principalmente celulosas y hemicelulosas, y en cantidades muy bajas o nula, pectina (Garrote *et al.*, 2002; Cornell, 2003; Sinclair *et al.*, 1949; Morton, 1987).

En cuanto a la actividad xilanolítica, como se observa en la gráfica 6, la mayor actividad fue de 67.9 U/mL y se obtuvo en el salvado de trigo, seguida por el olote de maíz con 40.1 U/mL, y finalmente la cáscara de limón, en donde se obtuvieron 30.9 U/mL de actividad. Todos estos valores se registraron a las 72 horas de fermentación.



Gráfica 6 - Cinética de producción de la actividad xilanolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: olote de maíz, salvado de trigo y cáscara de limón, todas al 1% (p/v).

En todos los medios de cultivo, se observa claramente que la actividad xilanolítica incrementa con respecto al tiempo. La producción de xilanasas en los medios con cáscara y salvado comienza a las 12 horas, mientras que en el de olote a las 24 horas.

La producción de pectinasas y xilanasas fue mayor en el cultivo con salvado de trigo en comparación con el de olote de maíz. Cabe destacar, que en dichos medios, la síntesis de xilanasas se efectuó a partir de las 12 horas de fermentación para el cultivo de salvado y a partir de las 24 horas para el de olote. Mientras que, la síntesis de pectinasas surgió a partir de las 48 horas de fermentación, para ambos medios, lo cual nuevamente apunta que durante la degradación de las hemicelulosas (xilano), se libera algún tipo de molécula que induce al hongo a producir enzimas pectinolíticas.

5.3 Producción de las actividades enzimáticas en cultivos líquidos con una fuente de carbono compleja añadida de un azúcar simple.

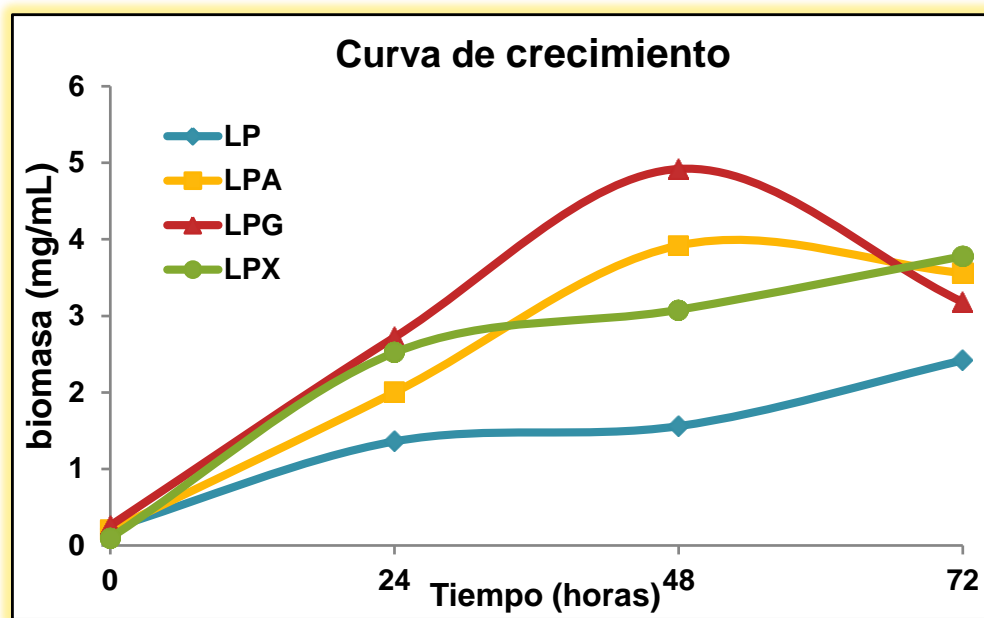
En general la síntesis de las enzimas que degradan a los polisacáridos, está sujeta a mecanismos de regulación (Mellon *et al.*, 2007; de Vries & Visser, 2001; Aguilar y Huitrón, 1987). Dichas enzimas no se producen de modo constante, es decir, constitutivo, sino que su síntesis es inducida por un sustrato adecuado y reprimida, comúnmente, por azúcares fácilmente asimilables, en particular por glucosa. Se sabe que en la mayoría de los casos, el inductor más eficiente es el polímero-sustrato de las enzimas que serán sintetizadas, sin embargo, debido a su alto peso molecular, en general, estos compuestos no pueden penetrar en las células y ejercer su efecto. Se cree entonces, que existen bajos niveles enzimáticos constitutivos que degradan una pequeña proporción del polímero, dando lugar a algún producto soluble de su hidrólisis, que es incorporado por la célula, ejerciendo su efecto inductor en el interior de ésta.

En el presente estudio, con el fin de observar si existe algún proceso de represión/inducción en las actividades enzimáticas pectinolíticas y xilanolíticas producidas por *Aspergillus flavus*, se adicionaron a dos de los medios utilizados

anteriormente (pectina y cáscara de limón) tres azúcares simples (ácido galacturónico, glucosa y xilosa). Todas las fuentes de carbono al 1% (p/v).

Para el caso de los medios que contenían pectina fue posible determinar la producción de biomasa con respecto al tiempo. En la gráfica 7 se observan las curvas de crecimiento que se obtuvieron a lo largo de 72 horas de fermentación.

En el caso de los medios añadidos con azúcares simples se observa un mayor crecimiento con respecto al tiempo, que en el medio que contiene solamente pectina. El mayor crecimiento de la cepa se obtuvo con 4.92 mg/mL de biomasa a las 48 horas en el medio de pectina con glucosa. Este comportamiento era de esperarse, ya que metabólicamente la glucosa, es el azúcar más fácilmente asimilable para la mayoría de los microorganismos. Le siguieron los medios LPA con 3.92 mg/mL a las 48 horas y a las 72 horas LPX con 3.78 mg/mL. Finalmente, en el medio de cultivo con pectina sola (control) se tuvo el menor crecimiento del hongo con 2.42 mg/mL de biomasa a las 72 horas.

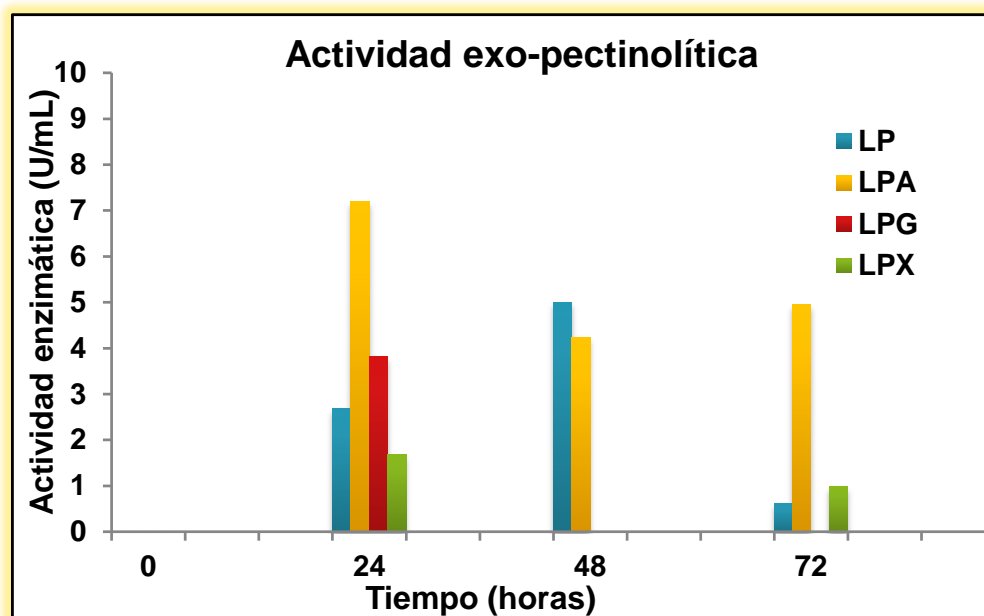


Gráfica 7 - Curva de crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: LP pectina, LPA pectina con ácido galacturónico, LPG pectina con glucosa y LPX pectina con xilosa, todas al 1% p/v.

La producción de actividad exopectinolítica fue mayor para los medios LP y LPA, en los cuales a las 48 horas de fermentación se tuvieron actividades de 5.0 U/mL y 4.2 U/mL, respectivamente (gráfica 8). Sin embargo, a las 24 horas de

fermentación, se observó una mayor actividad pectinolítica en el caso del medio adicionado con ácido galacturónico, indicando el potencial de éste azúcar como inductor de dichas enzimas. Mientras que para los medios LPG y LPX la actividad de pectinasas fue muy escasa, el primero de ellos, solo presentó actividad a las 24 horas con 3.82 U/mL, y el segundo mostró actividad tanto a las 24 como a las 72 horas, obteniendo respectivamente, 1.7 U/mL y 1.0 U/mL.

El ácido galacturónico es el principal producto de la degradación final de pectina y se ha reportado que puede causar represión catabólica de las enzimas pectinolíticas (Aguilar y Huitrón, 1987), pero también se ha demostrado que éste compuesto puede estimular la producción de la actividad de enzimas pectinolíticas en *Aspergillus sp.* cuando es cultivado en pectina. En la gráfica 8 se observa que dicha inducción en la producción de enzimas pectinolíticas se llevó a cabo en el ensayo al añadir ácido galacturónico al medio líquido con pectina, especialmente a las 24 y 72 horas de fermentación.

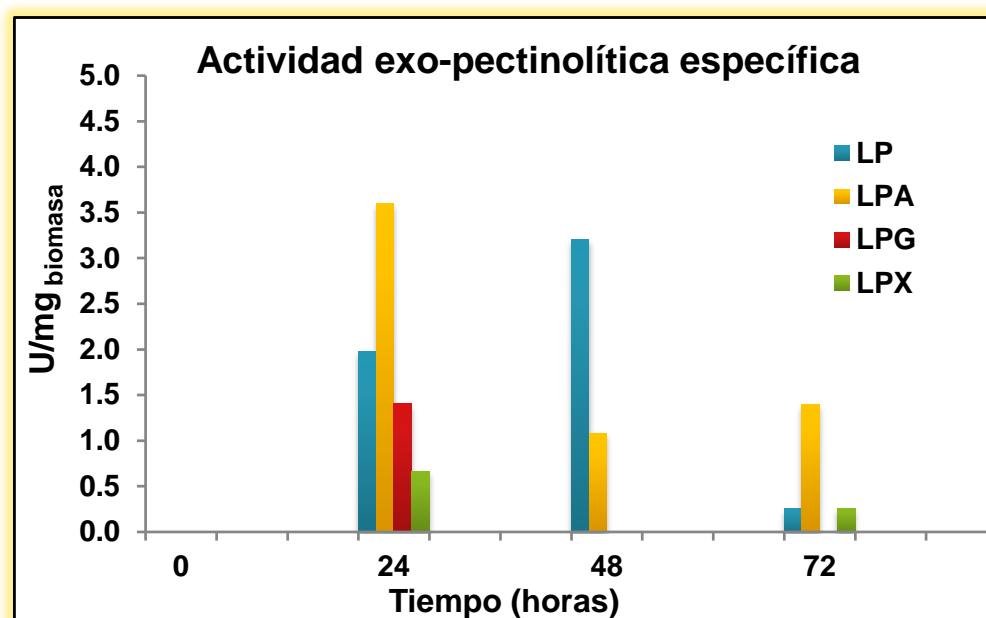


Gráfica 8 - Producción de actividad exo-pectinolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: LP pectina, LPA pectina con ácido galacturónico, LPG pectina con glucosa y LPX pectina con xilosa, todas al 1% p/v.

Cabe destacar, que si observamos únicamente la actividad exo-pectinolítica volumétrica obtenida (gráfica 8), aparentemente la producción enzimática en los medios LP y LPA resulta ser similar a las 24 horas de fermentación, con 5.0 U/mL

y 4.2 U/mL, respectivamente. Sin embargo, si se compara la actividad pectinolítica específica a ese mismo tiempo (gráfica 9), tenemos que existe una diferencia significativa en la producción enzimática con 3.2 U/mg en LP y 1.1 U/mg en LPA.

En el caso de los medios de pectina añadidos con azúcares simples, dado que los sustratos permanecen solubles en el medio, fue posible cuantificar la biomasa del hongo, y con los datos de ésta, a su vez, pudimos determinar la actividad específica de las enzimas exo-pectinolíticas producidas. Para el ensayo se utilizó como sustrato enzimático pectina cítrica al 1% (p/v), pH 5.0.



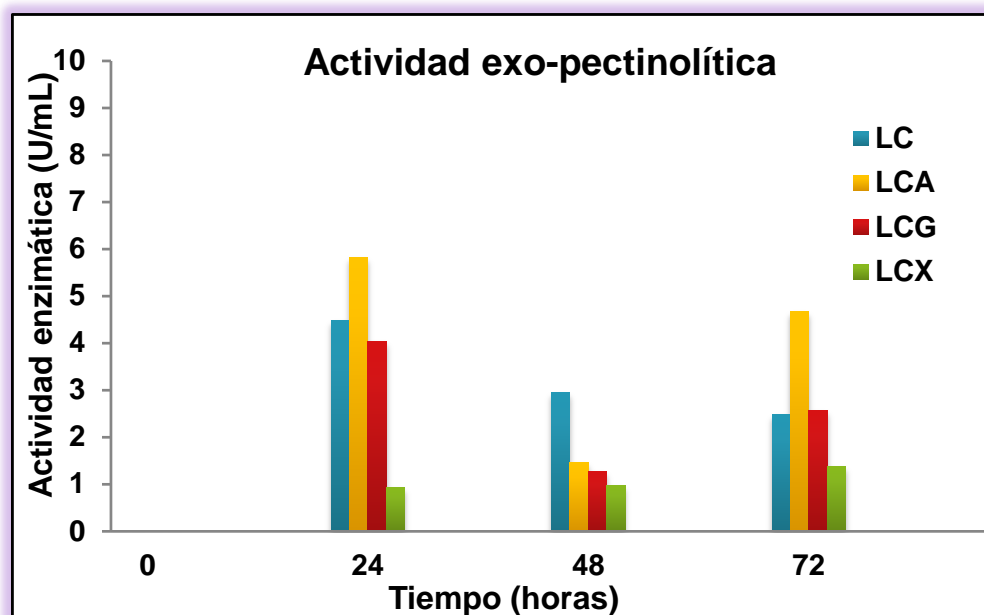
Gráfica 9 – Producción de actividad exo-pectinolítica específica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: LP pectina, LPA pectina con ácido galacturónico, LPG pectina con glucosa y LPX pectina con xilosa, todas al 1% p/v (c/u).

En la gráfica 9 se observa que el único tiempo para el cual se obtuvo actividad pectinolítica en todos los medios de pectina estudiados, fue a las 24 horas de fermentación. La mayor actividad específica de pectinasas en este tiempo se obtuvo en el medio LPA con 3.60 U/mg, seguido de los medios LP con 1.97 U/mg, LPG con 1.41 U/mg y LPX con 0.67 U/mg. En el medio LPA la actividad tuvo una disminución a las 48 horas y luego un incremento a las 72, mientras que en el medio LP la actividad aumentó a 3.2 U/mg a las 48 horas y a las 72 disminuyó siendo casi nula. Para los medios LPG y LPX la producción de pectinasas fue muy baja durante toda la fermentación.

Cabe mencionar que en ninguno de los cultivos líquidos, en los que adicionaron los azúcares fácilmente asimilables se obtuvo actividad xilanolítica (datos no mostrados en dicho trabajo).

En lo que concierne a los medios de cáscara de limón añadidos con diferentes azúcares, en general, las actividades enzimáticas fueron superiores. Cabe destacar que en los medios con cáscara de limón, la actividad enzimática se expresa nuevamente como actividad enzimática volumétrica, ya que en estas condiciones, no fue posible determinar el crecimiento por diferencia de pesos, pues la cáscara de limón es un sustrato sólido no soluble que intervenía con dicha determinación.

En el caso de los medios LC, LCA, LCG y LCX, la actividad de pectinasas se produjo en los cuatro medios para todos los tiempos de fermentación en que se muestreó el cultivo (gráfica 10).



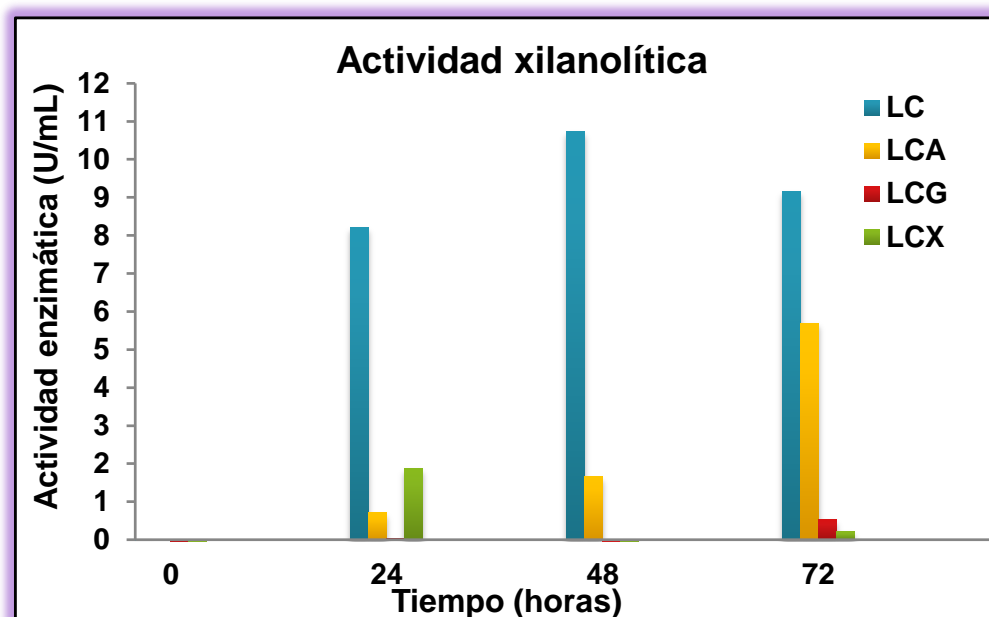
Gráfica 10 – Producción de actividad exo-pectinolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: LC cáscara de limón, LCA cáscara de limón con ácido galacturónico, LCG cáscara de limón con glucosa y LCX cáscara de limón con xilosa, todas al 1% (p/v).

A las 24 horas se produjo la mayor actividad exo-pectinolítica para los medios líquidos, LCA con 5.8 U/mL, LC con 4.5 U/mL y LCG con 4.0 U/mL, con excepción

del medio LCX, que en ese tiempo presentó la menor actividad 0.9 U/mL, la cual incrementó con respecto al tiempo de fermentación.

Por otra parte, tenemos que los medios LCA, LPA y LCG siguieron el mismo patrón de producción enzimática, produciendo la mayor actividad enzimática a las 24 h, la cual disminuyó a las 48 h e incrementó nuevamente a las 72 horas. Y en el medio LC la producción enzimática de pectinasas disminuyó directamente con el tiempo de fermentación.

Además en los medios, tanto de pectina como de cáscara de limón, al adicionar ácido galacturónico, se observó el mismo efecto inductor en la producción de enzimas pectinolíticas del hongo.

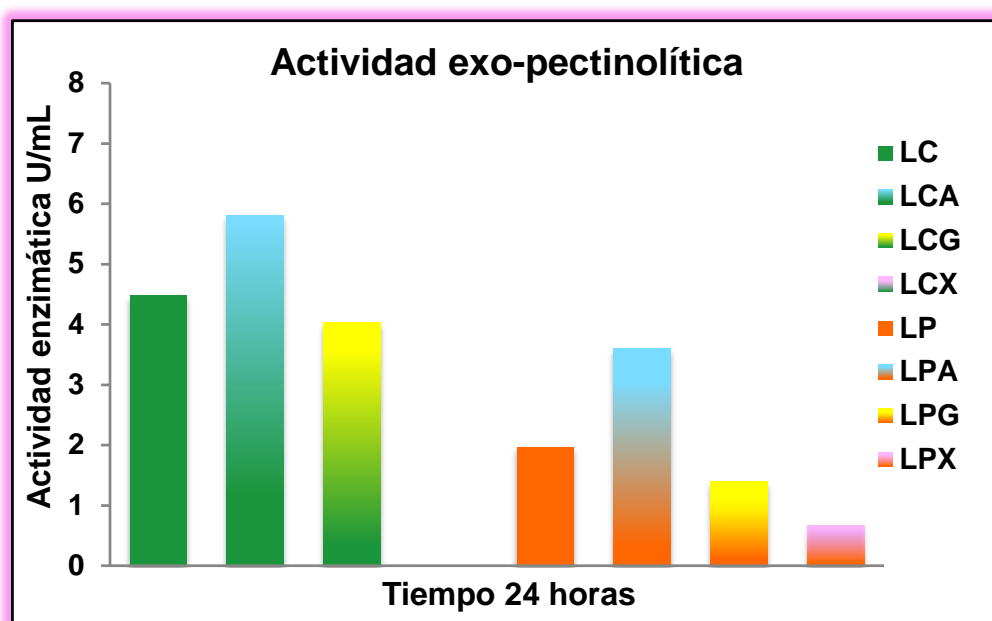


Gráfica 11 – Producción de actividad xilanólica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono: LC cáscara de limón, LCA cáscara de limón con ácido galacturónico, LCG cáscara de limón con glucosa y LCX cáscara de limón con xilosa, todas al 1% (p/v).

En la gráfica 11 se muestra la cinética de la actividad de xilanasas producida en los medios de cultivo de cáscara de limón. Es evidente que para los medios LCG y LCX prácticamente no hubo producción de xilanasas durante la fermentación. Para LCA la producción tendió a ser mayor a tiempos más largo de fermentación, alcanzando 5.69 U/mL a las 72 horas. Y en el caso de LC, la actividad no se modificó mucho con respecto al tiempo y se tuvo una actividad

enzimática máxima de 10.71 U/mL a las 48 horas. En este medio se alcanzaron los niveles máximos para la actividad xilanolítica, lo cual indica que en este caso los azúcares simples que fueron añadidos, inhibieron catabólicamente a las xilanasas producidas por *A. flavus* en los medios de cultivo líquidos.

A continuación en las gráficas 12 y 13, se muestran las actividades enzimáticas producidas en todos los medios, tanto con pectina como con cáscara de limón, sin y con adición de azúcares simples, para un solo tiempo de fermentación (24 horas), con el fin de hacer una comparación de las actividades producidas utilizando diferentes sustratos como fuente de carbono.



Gráfica 12 – Producción de actividad exo-pectinolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono, todas al 1% (p/v), a las 24 horas de fermentación.

Concerniente a la actividad exopectinolítica, se observa que la mayor actividad se debió al crecimiento y producción enzimática del hongo en los medios LPA y LCA, los cuales estaban adicionados con ácido galacturónico, dando actividades de 3.60 U/mg y 5.80 U/mL, respectivamente. En el medio LCX no se tuvo producción en dicho tiempo, mientras que para el LPX la actividad fue muy escasa (0.66 U/mg), lo cual indica, que la adición de xilosa reprimió la producción de enzimas pectinolíticas en los medios de cultivo líquidos. Dicho efecto de represión catabólica, incluso fue mayor al agregar xilosa en comparación a la glucosa, ya

que en los medios LPG y LCG, se presentaron actividades enzimáticas más altas, de 1.40 U/mg y 4.03 U/mL, correspondientemente (gráfica 12).

Tomando la actividad exo-pectinolítica de los medios sin adición de azúcares como el 100%. Los resultados obtenidos a las 24 horas de fermentación, indican que para los medios de cultivo líquidos con cáscara de limón, al añadir ácido galacturónico la actividad incrementó a un 129.46 %, mientras que con glucosa disminuyó a un 89.95 %. En cuanto a los medios de cultivo líquidos con pectina, con adición de ácido galacturónico la actividad resultó del 182.74 %, con adición de glucosa del 71.06 % y finalmente, con adición de xilosa del 33.50 %.



Gráfica 13 – Producción de actividad xilanolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono, todas al 1% (p/v), a las 24 horas de fermentación.

En lo referente a la actividad xilanolítica a las 24 horas de fermentación, en los medios de cultivo líquidos (gráfica 13), tenemos que sólo se produjo actividad en los medios que contenían cáscara de limón, ya que en ninguno de los medios con pectina, hubo producción enzimática en dicho tiempo. La actividad más elevada de xilanasas se obtuvo en el medio LC con 8.16 U/mL, le siguió en actividad el LCX con 1.86 U/mL y por último el LCA con 0.70 U/mL, mientras que en el medio LCG no hubo actividad. Nuevamente, tomando como el 100% la actividad obtenida en

el medio con solamente cáscara de limón, percibimos que, la actividad disminuyó a un 22.79 % al añadir xilosa y a un 8.57 % al añadir ácido galacturónico.

Conforme a los resultados presentados en esta última parte, podemos resumir que: la producción de pectinasas de *A. flavus* CECT-2687 se vio favorecida al añadir a los medios tanto con cáscara de limón como con pectina, ácido galacturónico, mientras que, la adición a éstos tanto de glucosa como de xilosa, ejercen un efecto negativo en dicha producción, todo esto concerniente a las 24 horas de fermentación, tiempo en el que se obtuvo, en general, la mejor producción enzimática. Asimismo, observamos que la obtención de xilanasas, resultó ser mejor en el medio que contenía como única fuente de carbono cáscara de limón, y que la adición de cualquiera de los azúcares simples en este caso afectó negativamente la producción enzimática.

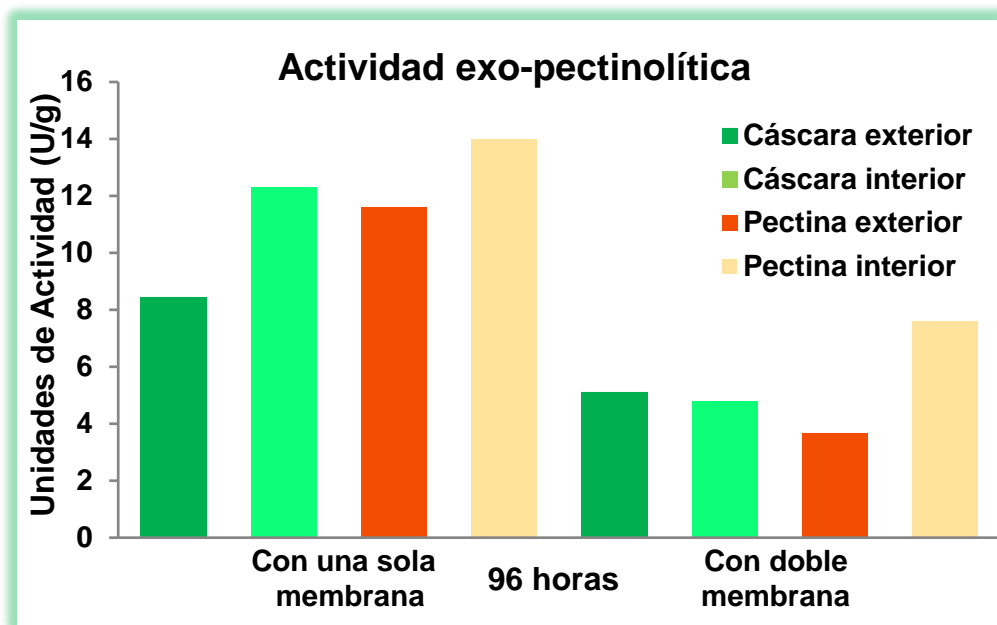
5.4 Producción de las actividades enzimáticas en cultivos sólidos con diferentes fuentes de carbono

Los estudios de producción enzimática, generalmente se llevan a cabo utilizando medios de cultivo líquidos sintéticos con sustratos puros, sin embargo, en la naturaleza los hongos filamentosos crecen comúnmente sobre superficies sólidas, en las cuales encuentran una amplia gama de sustratos heterogéneos. Por esta razón, en el presente estudio, se creció a la cepa de *Aspergillus flavus* CECT-2687 en medios de cultivo sólidos, elaborados en placas Petri con agar. Asimismo, con el fin de conocer si las diferencias de producción enzimática, encontradas en los cultivos líquidos se generan de la misma manera en cultivos sólidos.

Primeramente se creció al hongo utilizando pectina y cáscara de limón como fuentes de carbono al 1% (p/v). Se eligieron dos zonas para la extracción del filtrado enzimático, la primera consistió en una circunferencia de agar de 2 cm de diámetro ubicada en el centro de la placa, y la segunda en un anillo de agar que circundaba a la primer zona, con un diámetro interior de 2 cm y un diámetro exterior de 3.5 cm. Se analizaron dos condiciones de crecimiento, en la primera se

colocó una sola membrana de policarbonato en la placa, y sobre ésta el inóculo, con el fin de separar a la biomasa producida del medio de cultivo, y en la segunda se colocó una membrana sobre el medio y una vez que el inóculo fue absorbido, se colocó sobre la placa una segunda membrana.

Generalmente, el cuerpo de un hongo se diferencia en una parte vegetativa que absorbe nutrientes, y una parte reproductiva. La mayoría de los hongos se reproducen por esporas (conidios), diminutas partículas de protoplasma rodeado de pared celular (Carlile *et al.*, 2001). El verdadero cuerpo del hongo, o cuerpo vegetativo, está escondido, formado por una red de filamentos microscópicos inmersa en el sustrato, denominado micelio vegetativo. En la segunda condición de cultivo realizada, se colocaron dos membranas sobre el medio, con el fin de inhibir el proceso de esporulación del hongo, y a su vez, analizar la producción enzimática cuando únicamente se desarrolla el micelio vegetativo (gráfica 14 y 15).

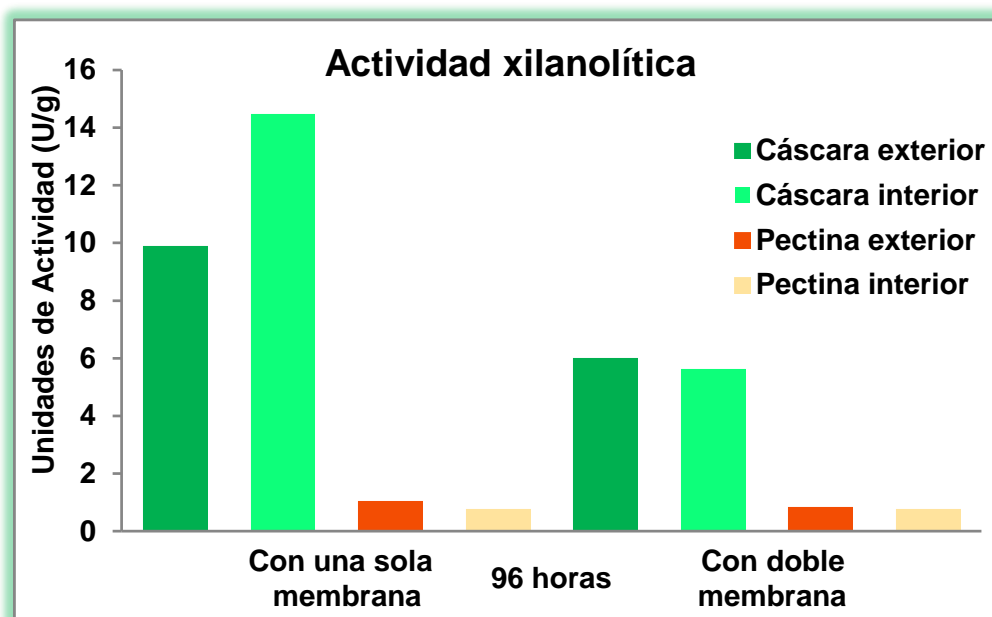


Gráfica 14 – Producción de actividad exo-pectinolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono, en dos zonas de extracción (exterior e interior) y en dos condiciones de cultivo (con una y doble membrana).

Se aprecia que la producción de enzimas pectinolíticas fue considerablemente más alta para la primera condición de cultivo, en la que se desarrollaron ambas partes del hongo, tanto la vegetativa como la reproductiva, a diferencia de la

segunda condición, en la que se inhibió la esporulación y solo se formó la parte vegetativa. En general, se tuvo mayor actividad en los medios de pectina que en los medios de cáscara de limón, aunque la variación entre ambos no fue mucha. La mayor actividad xilanólica fue de 14.0 U/mL y se produjo en la zona interior del medio de pectina con una sola membrana (gráfica 14).

Como se puede ver en la gráfica 15, la actividad xilanólica fue muy superior en los medios de cáscara de limón con respecto a los medios de pectina, los cuales presentaron muy baja actividad xilanólica. La mejor producción de enzimas se presentó con una sola membrana en la zona interior con 14.45 U/mL, seguida de la zona exterior también con una membrana con 9.90 U/mL.



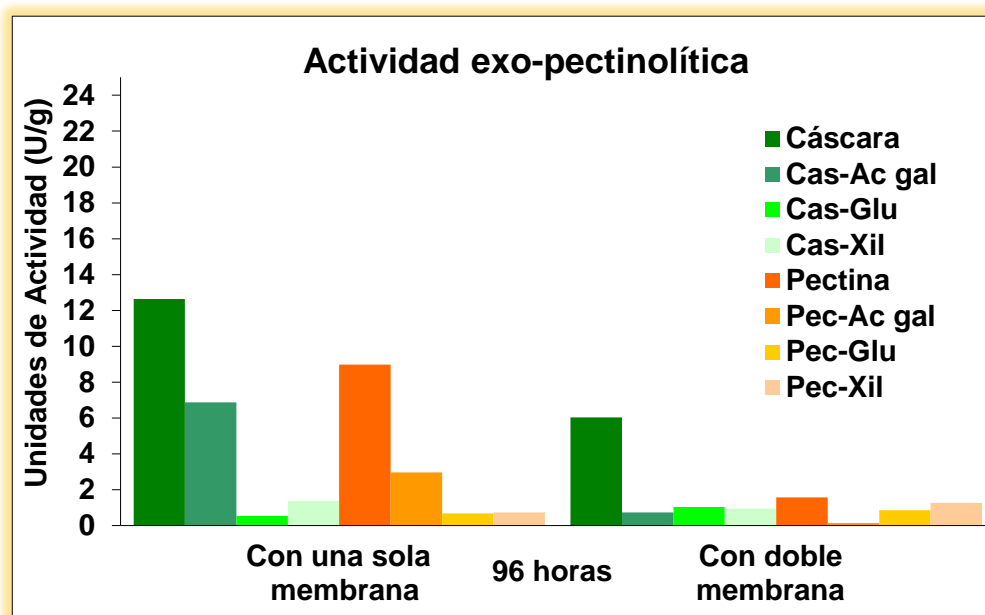
Gráfica 15 – Producción de actividad xilanólica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono, en dos zonas de extracción (exterior e interior) y en dos condiciones de cultivo (con una y doble membrana).

Dado que la actividad enzimática fue en general semejante para ambas zonas de extracción, tanto para la exterior como para la interior. En los siguientes experimentos, el filtrado enzimático se extrajo de una sola zona, que consistió en una circunferencia de agar con un diámetro de 3.5 cm, la cual en la mayoría de los casos, abarcó toda la región en que creció la colonia del hongo.

Posteriormente, se elaboraron medios de cultivo sólidos, a los que se adicionaron azúcares simples, con el fin de comparar si los procesos de

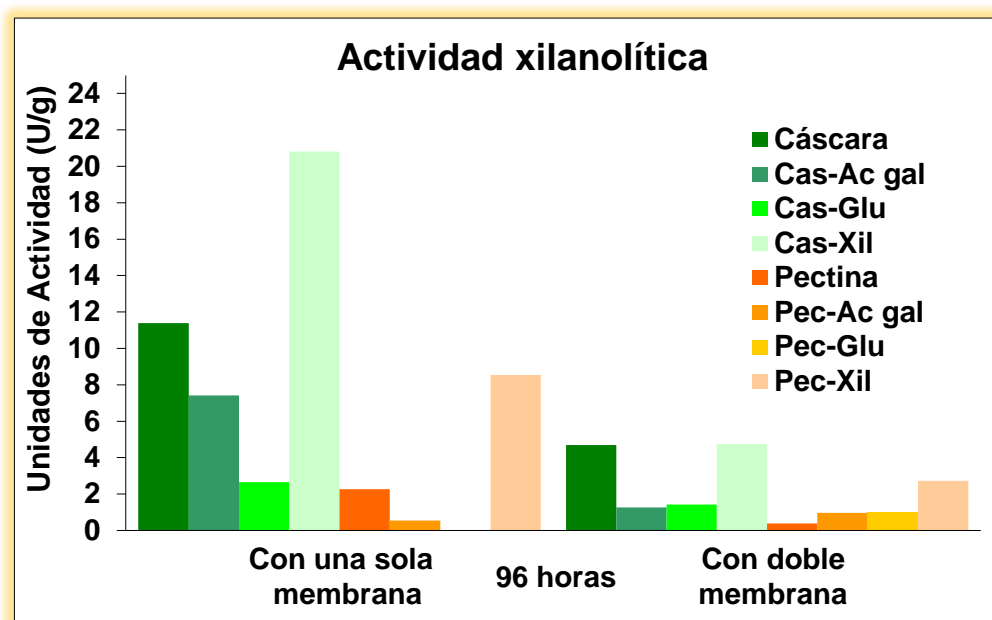
represión/inducción son los mismos que se presentaron en el caso de los medios de cultivo líquidos. Nuevamente se evaluaron las dos condiciones de crecimiento anteriormente descritas, con una y doble membrana. Los azúcares adicionados a los medios de cáscara de limón (Cas) y de pectina (Pec) fueron ácido galacturónico (Ac gal), glucosa (Glu) y xilosa (Xil), gráficas 16-19.

Referente a la actividad exo-pectinolítica, en la gráfica 16 se muestra que la mejor actividad se presentó, para ambas condiciones de crecimiento, en los medios de cultivo con cáscara de limón como única fuente de carbono. Y de nuevo la actividad se vio afectada de manera negativa cuando el hongo no tuvo la capacidad de esporular. En todos los casos, la actividad se vio disminuida en gran medida al agregar una fuente de carbono fácilmente asimilable. Con el ácido galacturónico la disminución de la actividad pectinolítica no resultó ser tan drástica como en el caso en que se adicionó glucosa y xilosa. Sin embargo, en ésta ocasión, el ácido galacturónico reprimió la síntesis de pectinasas, caso contrario al efecto producido en los cultivos líquidos en los cuales indujo dicha actividad (gráfica 8 y 10).



Gráfica 16 – Producción de actividad exo-pectinolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono y en dos condiciones de cultivo (con una y doble membrana).

En lo correspondiente a la actividad de xilanasas (gráfica 17), cuando los medios con una membrana fueron adicionados con xilosa, la producción de enzimas degradadoras del xilano, se incrementó de 11.39 U/g a 20.81 U/g en el medio de cáscara de limón, y de 2.26 U/g a 8.55 U/g en el medio de pectina. Y para los medios con doble membrana, al agregar xilosa, la actividad ascendió de 4.70 U/g a 4.74 U/g en el medio de cáscara de limón y de 0.39 U/g a 2.72 U/g en el medio de pectina. Lo que indica, que la xilosa ejerció un eficaz efecto de inducción en la actividad xilanolítica para los medios de cultivo sólidos, especialmente cuando el hongo crece con una sola membrana, caso contrario a lo que sucedió en los cultivos líquidos en los cuales la xilosa actuó como represor (gráfica 11).

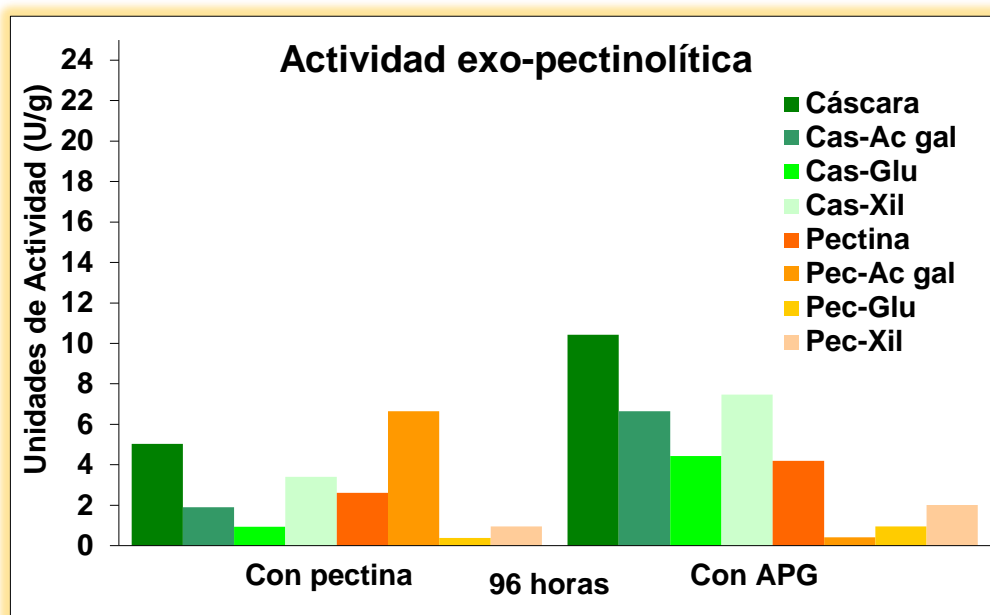


Gráfica 17 – Producción de actividad xilanolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono y en dos condiciones de cultivo (con una y doble membrana).

Los datos obtenidos anteriormente, sugieren que el metabolismo del hongo, en cuanto a la producción de enzimas hidrolíticas, disminuyó considerablemente cuando éste no esporuló. Suponemos que una posible explicación a este fenómeno, se relaciona con la intervención de la parte reproductiva de los hongos en la activación del metabolismo, y por ende, en la producción de muchas enzimas que se requieren para la síntesis y modificación de polisacáridos de la pared

celular, entre esas enzimas están las que son objeto de éste trabajo. Por ello, podría decirse que hay una síntesis aumentada de muchos sistemas enzimáticos. Por otro lado, esto también podría deberse a que la presencia de la segunda membrana, constituyó un impedimento tanto físico como al paso del oxígeno para el hongo, y esto ocasionó a éste cierto estrés o limitación en la síntesis de las xilanasas y pectinasas (Gómez C. Tesis Doctorado, UNAM, 2010). Sin embargo, no sabemos con exactitud cuál de estas dos teorías es la más acertada.

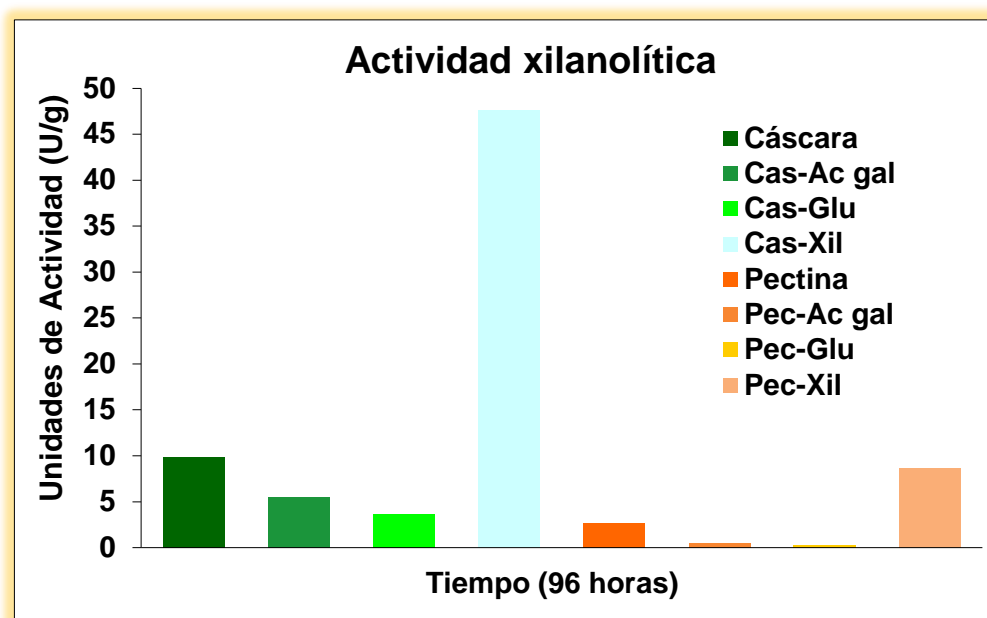
Dado que la mejor producción enzimática se logró cuando el hongo fue capaz de formar esporas, en los siguientes ensayos, se creció al hongo con solamente una membrana. Además, la producción de enzimas exo-pectinolíticas se midió con dos diferentes sustratos enzimáticos, ácido poligalacturónico (APG) y pectina (gráfica 18). Cabe mencionar que hasta antes de este punto solo se había utilizado pectina como sustrato enzimático. Sin embargo, ahora se usaron estos dos sustratos para averiguar si se producen en mayor cantidad las poligalacturonasas (PG) que degradan ácido poligalacturónico o las polimetilgalacturonasas (PMG) que degradan dicho polímero metilado, es decir, la pectina (Jayani, 2005).



Gráfica 18 – Producción de actividad exo-pectinolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono, en una sola condición de cultivo (con una membrana), utilizando como sustratos enzimáticos pectina y ácido poligalacturónico (APG), ambos al 1% (p/v).

En la mayoría de los medios estudiados, resultó ser mayor la producción de PG en comparación de las PMG, con excepción del medio Pec-Ac gal, en el cual hubo más actividad de PMG con 6.65 U/g que de PG con 0.95 U/g, y la fuente de carbono en que se generó la mayor cantidad de PG fue la cáscara de limón sola con 10.42 U/g. En este ensayo solamente se indujo la actividad de PMG al agregar ácido poligalacturónico en el medio con pectina, fuera de ello, en todos los demás casos en que se adicionó un azúcar simple, la actividad enzimática sufrió un efecto represor.

En el caso de la xilanasas, al añadir xilosa a los cultivos sólidos, la actividad se elevó de manera importante, teniendo una actividad en el medio de cáscara de limón con xilosa de 47.65 U/g y en el medio de pectina con xilosa de 8.59 U/g, como se muestra en la gráfica 19. Como se ha observado en experimentos anteriores, en los cultivos de pectina, la actividad xilanolítica fue prácticamente despreciable, sin embargo, en esta ocasión, al adicionar xilosa se tuvo una considerable producción de xilanasas.

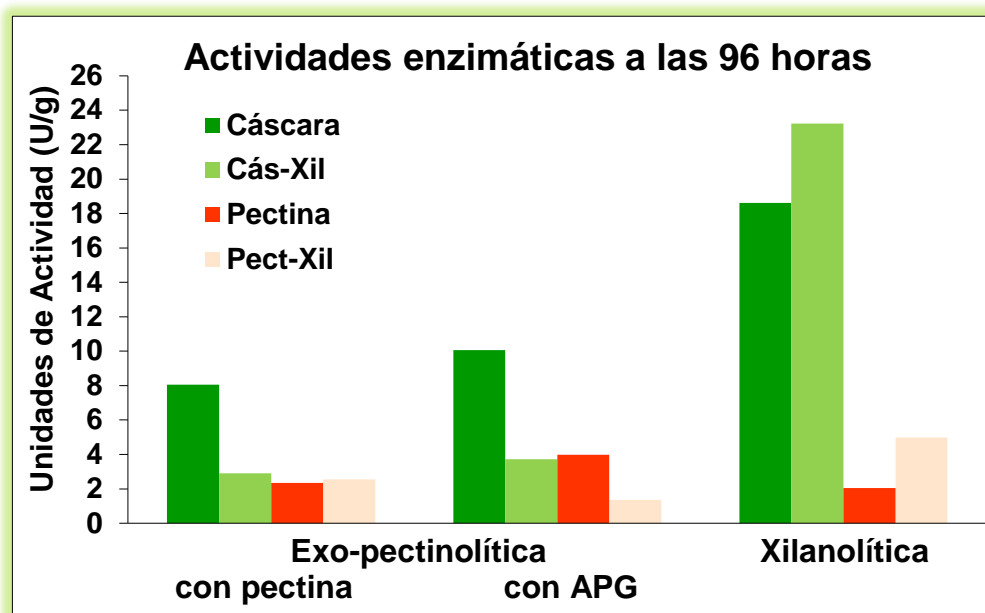


Gráfica 19 – Producción de actividad xilanolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono, en una sola condición de cultivo (con una membrana).

Nuevamente tomando como 100% los cultivos sólidos sin adición de azúcares sencillos, tenemos que la producción de la actividad enzimática de PMG, PG y

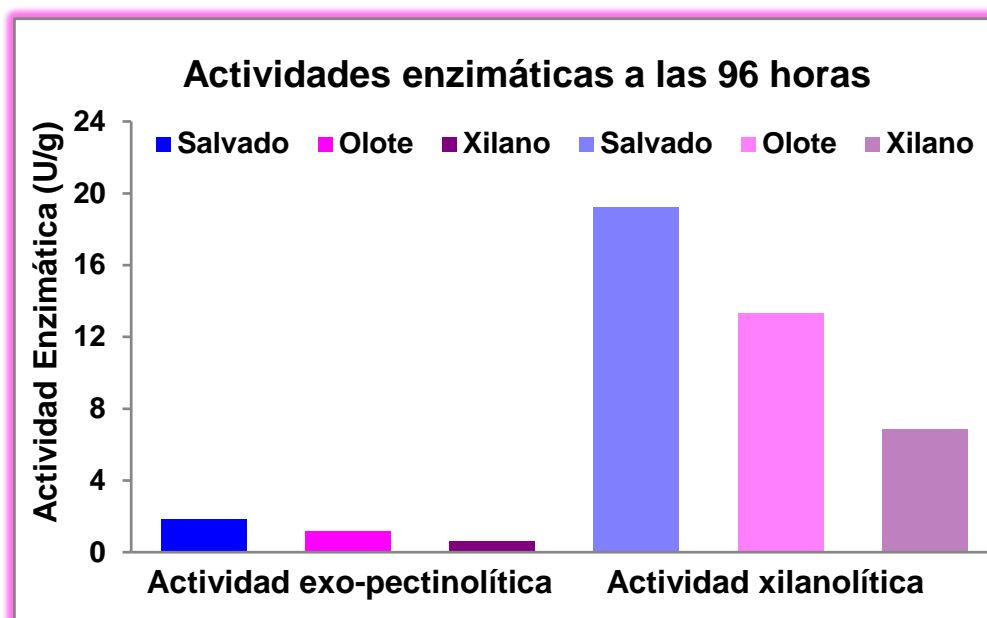
xilanasas, fueron respectivamente: 37.77%, 63.82% y 55.52% en Cas-Ac gal; 18.49%, 71.69% y 37.49% en Cas-Glu; 67.59%, 71.69% y 482.78% en Cas-Xil; 253.82% 9.79% y 19.78% en Pec-Ac gal; 14.50%, 22.67% y 12.31% en Pec-Glu; y finalmente 36.26%, 48.21% y 320.52% en Pec-Xil. De lo anterior destaca, que para los medios con cáscara de limón, la única actividad inducida fue la xilanólítica al adicionar xilosa, mientras que para los medios con pectina, las PMG fueron inducidas al adicionar ácido galacturónico, y las xilanasas al adicionar xilosa.

En la gráfica 20 se muestran valores promedio de las actividades enzimáticas producidas por *Aspergillus flavus* CECT-2687 en medios de cultivo sólidos con distintas fuentes de carbono: cáscara de limón sola y con xilosa, y pectina sola y con xilosa, todas al 1% (p/v). En todos los casos, la mayor cantidad de pectinasas y xilanasas se obtuvo utilizando cáscara de limón como fuente de carbono, en comparación con el uso de la pectina. Las enzimas pectinolíticas sufrieron represión catabólica cuando el hongo creció en presencia de azúcares fácilmente asimilables como la xilosa, tanto para los medios de cáscara como para los de pectina. Sin embargo, las enzimas xilanólíticas fueron inducidas, cuando el hongo creció en presencia de xilosa.



Gráfica 20 - Producción de actividades enzimáticas de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono, en una sola condición de cultivo (con una membrana).

Finalmente se emplearon medios sólidos con salvado de trigo, olote de maíz y xilano de abedul, como fuentes de carbono, todos al 1% (p/v). Al igual que en los cultivos líquidos (gráfica 5), las enzimas pectinolíticas se produjeron escasamente en los cultivos sólidos, debido principalmente a la composición química de dichos sustratos, como ya mencionó anteriormente. Sin embargo, siguiendo la misma tendencia que en los cultivos líquidos (gráfica 6), se obtuvo una gran cantidad de enzimas xilanolíticas, teniendo a las 96 horas de fermentación una actividad de 19.22 U/g en el medio de salvado, de 13.29 U/g en el medio de olote y de 6.84 U/g en el medio de xilano (gráfica 21).



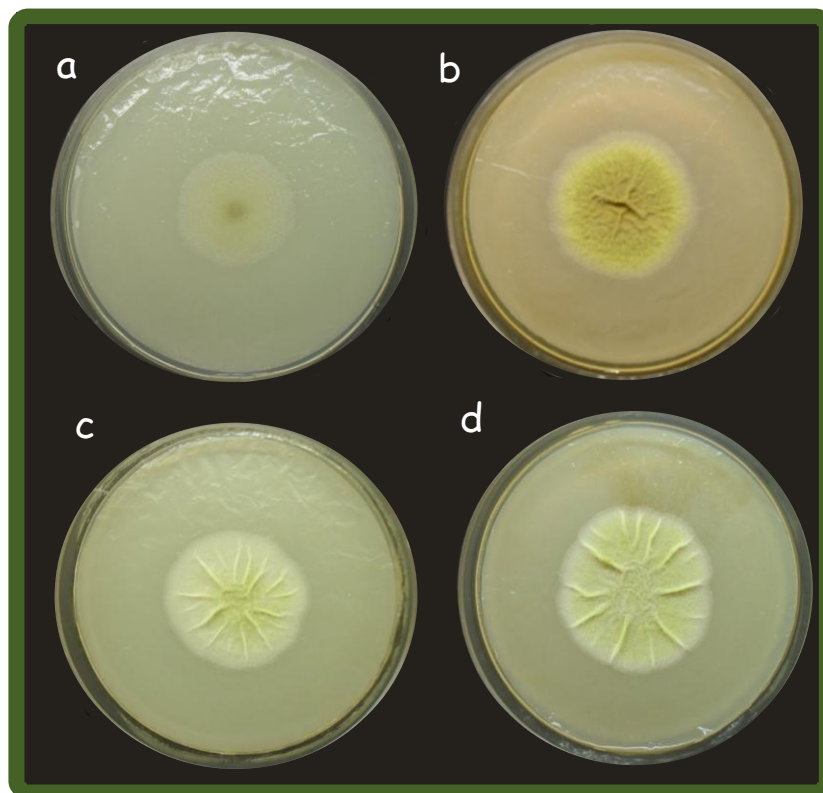
Gráfica 21 – Producción de actividades exo-pectinolítica y xilanolítica de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono, en una sola condición de cultivo (con una membrana).

5.5 Crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos utilizando diferentes fuentes de carbono

Con el fin de establecer la capacidad de crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT-2687 en diferentes fuentes de carbono y determinar indirectamente sus preferencias nutricionales, se evaluó el crecimiento de la cepa en una amplia variedad de fuentes de carbono que incluyeron sustratos complejos (cáscara de limón, olote de maíz y salvado de trigo); polisacáridos propios de la pared celular

de las plantas (pectina y xilano) y medios añadidos con azúcares simples (ácido galacturónico, glucosa y xilosa).

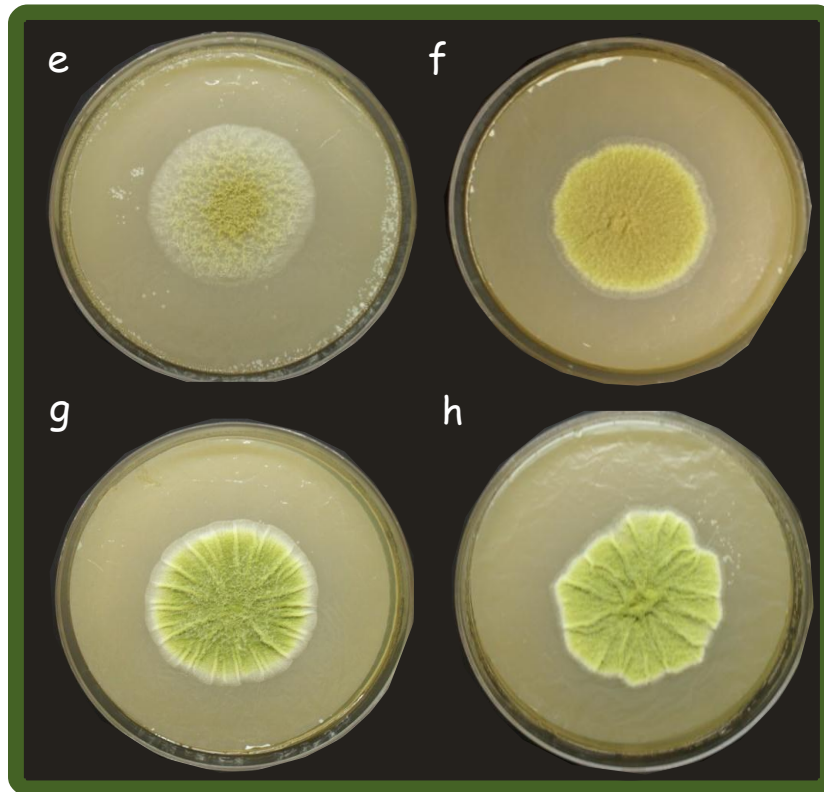
Se observó que el crecimiento y las características morfológicas de la colonia del hongo fueron diferentes para los medios que contenían diferentes tipos de sustratos como fuente de carbono. En relación a las características macroscópicas de *A. flavus*, las colonias son de color verde oliváceo a verde amarillento; micelio blanco; esclerocios, cuando están presentes, de color marrón oscuro a negro, variables en forma y tamaño; reverso incoloro, marrón claro o anaranjado; textura de la colonia variable, generalmente lanosa o aterciopelada (Abarca, 2000).



Fotografía 3 – Crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT-2687 a las 120 horas de incubación a 37 °C en cultivos sólidos con diversas fuentes de carbono: a) pectina; b) pectina con ácido galacturónico; c) pectina con glucosa; d) pectina con xilosa, todas al 1% p/v (c/u).

En la fotografía 3, se observan las diferencias macroscópicas de las colonias de *A. flavus* en cultivos sólidos de pectina sola y con adición de diversos azúcares, durante 120 horas de incubación a 37 °C. En el medio de pectina sola (imagen a), la colonia es en general blanca, aunque posee al centro cierta coloración verdosa,

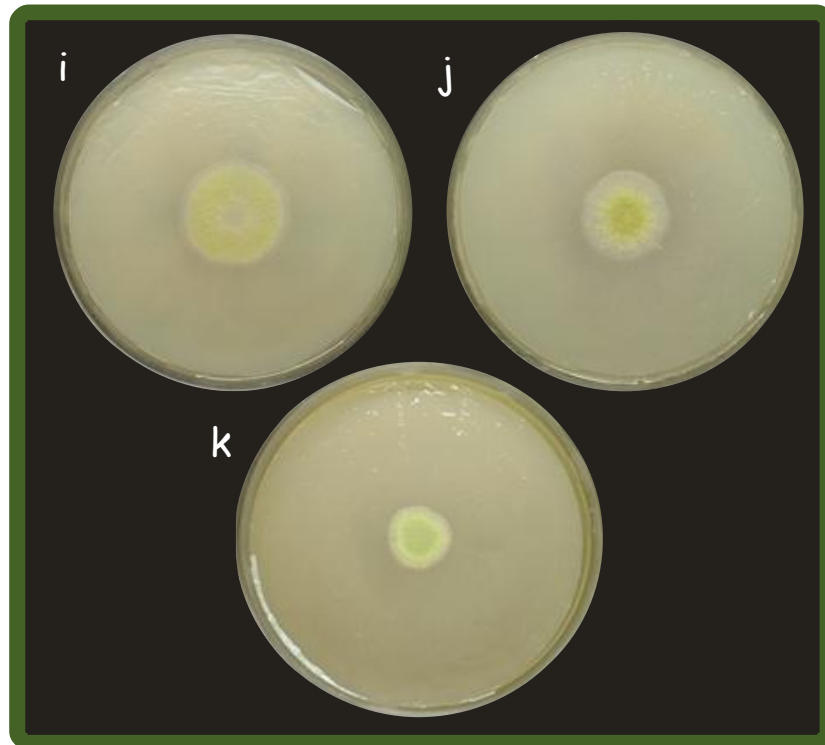
el hongo esporuló escasamente y las esporas no adquirieron el color verde pardo característico. En el medio de pectina con ácido galacturónico (imagen b), la colonia es más compacta y color verde olivo con un pequeño borde blanco, en este caso el hongo generó una cantidad considerable de esporas. En el medio de pectina con glucosa y de pectina con xilosa (imágenes c y d), las características de ambas colonias fueron muy similares, el micelio presentó una coloración blanca-amarillenta y ciertos pliegues que le dieron una apariencia rugosa y estrellada, éste caso la esporulación de las colonias fue muy escasa.



Fotografía 4 – Crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT-2687 a las 120 horas de incubación a 37 °C en cultivos sólidos con diversas fuentes de carbono: e) cáscara de limón; f) cáscara de limón con ácido galacturónico; g) cáscara de limón con glucosa; h) cáscara de limón con xilosa, todas al 1% (p/v).

En la fotografía 4, se pueden ver las diferentes colonias de *A. flavus* en cultivos sólidos de cáscara de limón a las 120 horas de incubación a 37 °C. En el medio de cáscara de limón sola (imagen e), la morfología de la colonia es muy semejante a la que se presentó en el medio con pectina sola, en general, la colonia es blanca con una zona verdosa al centro, y con una gran cantidad de esporas que le dieron

un aspecto voluminoso. En el medio de cáscara de limón con ácido galacturónico (imagen f), la colonia es verde olivo, compacta y aterciopelada, con un pequeño borde blanco y una cantidad excesiva de esporas. En los medios de cáscara de limón con glucosa (imagen g) y con xilosa (imagen h), nuevamente las características macroscópicas del hongo fueron muy similares, ambas colonias presentaron una coloración verde intensa y un borde blanco amplio, además las colonias mostraron ciertos pliegues que les dieron una apariencia estrellada, en éstos medios, el hongo también produjo una cantidad notable de esporas.

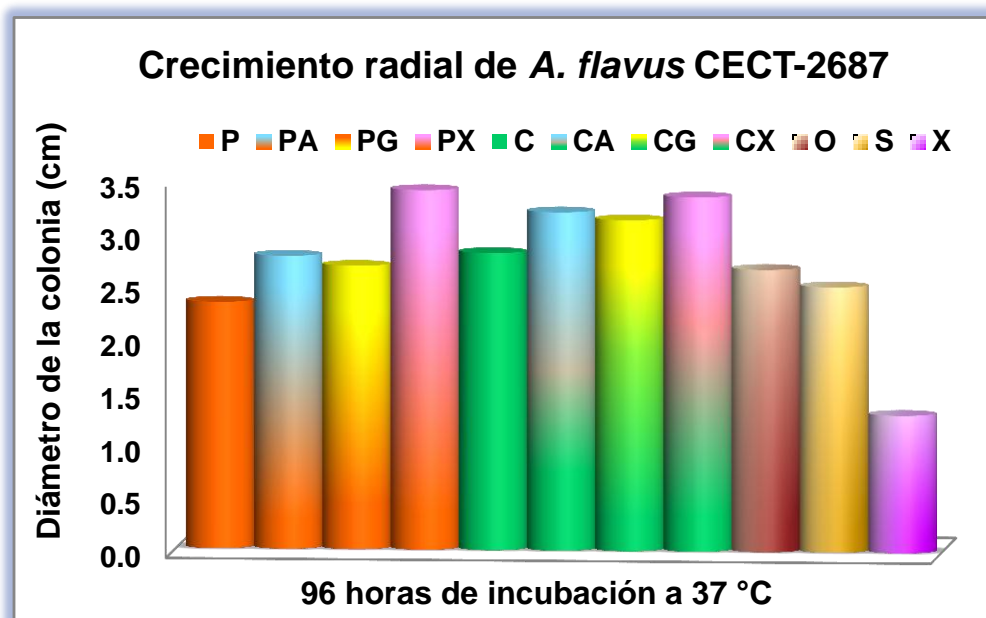


Fotografía 5 – Crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT-2687 a las 96 horas de incubación a 37 °C en cultivos sólidos con diversas fuentes de carbono: i) olote de maíz; j) salvado de trigo; k) xilano de abedul, todas al 1% p/v (c/u).

En la fotografía 5, se muestran las características macroscópicas de las colonias de *A. flavus* en cultivos sólidos con olote de maíz, salvado de trigo y xilano de abedul como fuentes de carbono, a las 96 horas de incubación a 37 °C. En estos tres medios, el hongo desarrolló una morfología semejante, las colonias en su mayoría presentaron una ligera coloración verdosa-amarillenta y un amplio borde blanco, debido a que la esporulación del hongo fue escasa y el crecimiento

deficiente, sin embargo, las actividades xilanolíticas producidas en dichos medios de cultivo resultaron elevadas considerando el limitado desarrollo del hongo.

La capacidad de crecimiento y desarrollo del hongo, así como sus preferencias nutricionales, se relacionaron indirectamente con el crecimiento radial que presentaron las colonias en los diferentes medios de cultivo sólido, para ello, se determinó el tamaño del diámetro de las colonias de *Aspergillus flavus* CECT-2687 en cada uno de los medios a las 96 horas de incubación a 37 °C. Los datos obtenidos con respecto a esto se presentan en la figura 25.



Gráfica 22 – Crecimiento radial de *A. flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos utilizando diversas fuentes de carbono, todas al 1% p/v (c/u). P - Pectina, PA - Pectina con ácido galacturónico, PG - Pectina con glucosa, PX - Pectina con xilosa, C – Cáscara de limón, CA - Cáscara de limón con ácido galacturónico, CG - Cáscara de limón con glucosa, CX - Cáscara de limón con xilosa, O – olote de maíz, S – Salvado de trigo y X – Xilano de abedul.

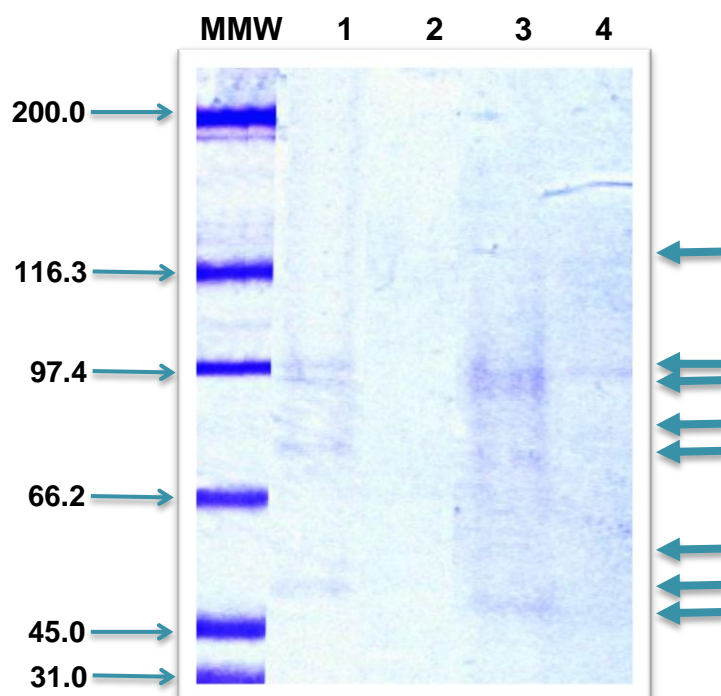
Las colonias del hongo presentaron un mayor crecimiento radial en los medios de cultivo adicionados con azúcares fácilmente asimilables, en comparación a los medios con fuentes de carbono más complejas (gráfica 22). Las colonias de *A. flavus* con mayor diámetro se obtuvieron en los cultivos adicionados con xilosa, le siguieron los de ácido galacturónico y finalmente los de glucosa, lo cual resultó sorprendente, dado que la glucosa es metabólicamente el azúcar más fácilmente

asimilable para la mayoría de los microorganismos, y por ello, generalmente en presencia de este azúcar éstos tienen un rápido y exitoso crecimiento.

Con respecto a los medios con una fuente de carbono más compleja, el crecimiento radial se vio más favorecido con cáscara de limón como sustrato, en donde se obtuvo la colonia con el mayor diámetro (2.81 cm), le siguieron el olote de maíz (2.67 cm), el salvado de trigo (2.51 cm), la pectina (2.33 cm) y finalmente el xilano de abedul (1.3 cm), sustrato en el que se obtuvo la colonia más pequeña.

5.6 Perfil electroforético de los filtrados enzimáticos obtenidos en cultivos sólidos con diferentes fuentes de carbono

En la naturaleza, *Aspergillus flavus* se encuentra con distintos sustratos y diversas condiciones ambientales, por lo que entonces puede producir una gran variedad de formas enzimáticas, con propiedades más adecuadas a las nuevas circunstancias, que le permita degradar los polímeros de la manera más eficiente.



Fotografía 6 – Gel de electroforesis SDS-PAGE. Se corrieron muestras de filtrados enzimáticos de *Aspergillus flavus* CECT-2687 obtenidos a las 96 horas de fermentación con diferentes fuentes de carbono: 1. pectina; 2. pectina con xilosa; 3. cáscara de limón; 4. cáscara de limón con xilosa, todas al 1% (p/v). MMW marcador de peso molecular.

Por lo antes dicho, se deduce que pudieran haber múltiples formas de las enzimas que coexisten en un momento determinado, e incluso que dicha composición de isoenzimas puede variar a lo largo del desarrollo del hongo, dependiendo del sustrato y condiciones en que éste se desarrolle.

En la fotografía 6 se observan los perfiles enzimáticos de los filtrados producidos por *Aspergillus flavus* CECT-2687 en cultivos sólidos utilizando diferentes fuentes de carbono. Con el filtrado libre de células obtenido cuando el hongo fue cultivado en presencia de pectina como única fuente de carbono (carril 1), son distinguidas con claridad al menos 7 bandas en el rango de 45 - 100 KDa, mientras que cuando el hongo fue cultivado en el medio con pectina adicionado de xilosa (carril 2), todas esas bandas prácticamente desaparecieron, lo que nos indica que la síntesis de dichas proteínas fue inhibida en presencia de xilosa, es decir, dicho azúcar denotó un claro efecto represor en el metabolismo del hongo en dichas condiciones de ensayo.

Por otra parte, con la muestra del filtrado que contenía cáscara de limón como única fuente de carbono (carril 3), se observó un perfil proteico similar al mostrado con pectina sola (carril 1), pero en éste caso las bandas fueron más intensas.

Finalmente en el carril 4, que contiene el filtrado enzimático obtenido cuando el hongo fue cultivado en el medio de cáscara de limón adicionado de xilosa, el número de bandas se redujo considerablemente, aunque no en su totalidad, en comparación con las bandas del carril 3. En ésta muestra, dado que se presentó una clara inducción con respecto a la actividad xilanolítica (Gráfica 19), podemos deducir que las enzimas reprimidas están relacionadas más bien con la degradación de pectina, y por ello, probablemente las bandas presentes en el carril 4 corresponden a enzimas xilanolíticas.

En los patrones electroforéticos de los filtrados enzimáticos de *A. flavus* obtenidos en cultivos sólidos con adición de xilosa como una segunda fuente de carbono, el número de bandas detectadas en el gel se redujo considerablemente, en comparación con los perfiles obtenidos cuando el hongo creció con pectina o cáscara de limón como única fuente de carbono.

CAPITULO VI

6. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo se evaluó la influencia que tiene la fuente de carbono sobre la producción enzimática de *Aspergillus flavus* CECT-2687 y se analizó la actividad pectinolítica y xilanolítica de extractos extracelulares obtenidos en medios de cultivo líquidos y sólidos, utilizando una gran variedad de sustratos tanto simples como complejos.

Si bien, *Aspergillus flavus* ha sido estudiado detalladamente, en relación a su capacidad de infectar organismos y producir potentes aflatoxinas (Hedayati *et al.*, 2007). Poco se ha profundizado, con respecto a la capacidad que tiene para producir, en medios de cultivo sólidos con distintas fuentes de carbono, enzimas responsables de degradar la pared de células vegetales, a pesar de saber, que la secreción de éstas se ha visto fuertemente relacionada con su capacidad de invasión y patogenicidad (Mellon *et al.*, 2004). La producción de dichas enzimas normalmente ha sido analizada en medios de cultivo líquidos. Sin embargo, en éste trabajo, se incluye además la producción en medios de cultivo sólidos, con el objetivo principal de adquirir un panorama más amplio de la producción enzimática de una cepa de *A. flavus* en diversos medios de cultivo tanto líquidos como sólidos.

Los resultados obtenidos indican que el crecimiento y la producción enzimática de *A. flavus* CECT-2687 están fuertemente influenciados por la fuente de carbono, además, se observó que algunas de las tendencias de producción enzimática encontradas en los cultivos líquidos no se reprodujeron de la misma forma en los cultivos sólidos. Cabe recordar, que la regulación de la secreción de dichas hidrolasas es compleja y dependiente del sustrato (Mellon *et al.*, 2004).

Se determinó que el sustrato complejo más favorable para la producción de pectinasas fue la cáscara de limón, mientras que para las xilanasas fue el salvado de trigo, tanto en medios de cultivo líquidos como en sólidos.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encontró que el ácido galacturónico indujo la actividad de exopectinasas en los cultivos líquidos pero no en los cultivos sólidos. Y por el contrario, la xilosa indujo la actividad de xilanasas en los cultivos sólidos pero no en los líquidos. La adición de glucosa en todos los casos promovió un efecto de represión catabólica.

En los cultivos sólidos se encontró que la producción enzimática resulta drásticamente afectada cuando el hongo no tiene la capacidad de esporular, es decir, no se producen enzimas con el crecimiento de solamente el micelio vegetativo.

La cepa de *Aspergillus* fue crecida en diferentes cultivos sólidos complejos, se observó que las características macroscópicas de las colonias varió de acuerdo a la fuente de carbono disponible para el crecimiento del hongo.

El perfil proteico que mostró *Aspergillus flavus* cuando creció con una única fuente de carbono, tanto con pectina como con cáscara de limón resultó similar. La gama de bandas de proteínas disminuyó de manera importante, cuando el hongo creció en presencia de un azúcar sencillo, como lo es la xilosa.

CAPITULO VII

7. CONCLUSIONES

1. Se analizó y comparó la producción enzimática de pectinasas y xilanasas de *Aspergillus flavus* CECT-2687 en medios de cultivo líquidos y sólidos con diversas fuentes de carbono.

2. Se desarrolló y efectuó una nueva técnica para la obtención de enzimas degradadoras de la pared celular de plantas a partir de cultivos sólidos utilizando medios de agar en placas Petri.

3. Se observó que la producción enzimática del hongo depende en gran medida de la fuente de carbono contenida en los medios. Se produjeron pectinasas y xilanasas en cultivos líquidos con cada una de las siguientes fuentes de carbono: pectina cítrica, xilano de abedul, olote de maíz, salvado de trigo y cáscara de limón, todas al 1 % (p/v). Por otra parte, en los cultivos líquidos con azúcares sencillos como ácido galacturónico, glucosa y xilosa, como única fuente de carbono, la cepa no produjo ninguna actividad enzimática.

4. En los cultivos líquidos, el mejor sustrato para la producción de pectinasas fue la cáscara de limón, mientras que para las xilanasas fue el salvado de trigo.

5. La producción de enzimas exo-pectinolíticas por *A. flavus* CECT-2687 en cultivos líquidos, tanto de cáscara de limón como de pectina fue estimulada considerablemente cuando estas fuentes de carbono se adicionaron con ácido galacturónico al 1 % (p/v), dichos medios presentaron, respectivamente, a las 24 horas de fermentación una actividad exopectinolítica del 129.46 % y del 182.74 %.

6. En cultivos líquidos, el efecto represor en la producción de pectinasas se demostró cuando se adicionó glucosa o xilosa, ambas al 1% (p/v). Mientras, que la producción de xilanasas fue reprimida al adicionar glucosa o ácido galacturónico o xilosa, todos al 1% (p/v).

7. La mejor producción de poligalacturonasas se obtuvo en con cáscara de limón sola, mientras que la de polimetil-galacturonasas con pectina adicionada con ácido galacturónico, en cultivos sólidos.

8. La producción de enzimas xilanolíticas fue altamente estimulada por la adición de xilosa al 1 % (p/v) en los cultivos sólidos con cáscara de limón o pectina.

9. La producción de pectinasas en cultivos sólidos con salvado de trigo, olote de maíz y xilano de abedul, como fuente de carbono resultó ser muy escasa, a diferencia de la producción de xilanasas, la cual fue considerablemente alta.

10. La producción enzimática del hongo en cultivos sólidos resultó altamente disminuida cuando éste fue crecido en el sistema de doble membrana y no tuvo la capacidad de formar esporas.

11. La cepa de *Aspergillus flavus* CECT-2687 creció bien en los cultivos sólidos con sustratos complejos como fuente de carbono. El mayor crecimiento radial de la colonia se obtuvo en el medio de pectina con xilosa, mientras que el menor en el medio con xilano de abedul. Las características morfológicas del hongo a nivel macroscópico difieren cuando éste es crecido en los cultivos sólidos con distintas fuentes de carbono.

12. El perfil enzimático de *Aspergillus flavus* CECT-2687 obtenido en cultivos sólidos disminuyó drásticamente al adicionar un azúcar fácilmente asimilable a fuentes de carbono más complejas, como la pectina y la cáscara de limón, indicando que la producción de éstas enzimas está sujeta a represión catabólica.

8. REFERENCIAS

1. Abarca, María Lourdes. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*; 17: S79-S84.
2. Ademark, P., J. Lundqvist, P., Hagglund, M., Tenkanen, N., Torto, F., Tjerneld, and Stalbrand, H. (1999). Hydrolytic properties of a β -mannosidase purified from *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol.* 75:281-289.
3. Ademark, P., A. Varga, J., Medve, V., Harjunpaa, T., Drakenberg, F., Tjerneld, and Stalbrand, H. (1998). Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*. Purification and properties of a β -mannanase. *J. Biotechnol.* 63:199-200.
4. Adesanya, D. A. and Raheem, A. A. (2009). Development of corn cob ash blended cement. *Const. Build. Mater*; 23:347-352.
5. Aguilar, Guillermo and Huitron, Carlos. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 9, 690-696.
6. Aguilar, Guillermo and Huitron, Carlos. (1990). Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus sp.* CH-Y1043 on different carbon sources. *Biotechnol. Lett* 12:655-660.
7. Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. (2009). Consortium of Glycobiology. San Diego, La Jolla, California.

8. Beldman, G., M., M.J.F. Searle-van Leeuwen, G.A. de Ruiter, H. A., Siliha, and Voragen, A. G. J. (1993). Degradation of arabinans by arabinases from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Polym.* 20:159-168
9. Bennett, J. W. (1998). *Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology*. *Journal of Biotechnology*; 66:101–107
10. Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. & Payne, G. A. (2000). *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp 72-79. London: Academic Press.
11. Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3:286-290.
12. Blandino, A., Dravillas, K., Cantero D., Pandiella S.S., Weeb C. (2001). Utilization of whole wheat flour for the producción of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochemistry*, 37:497-503.
13. Bucio-Villalobos, C. M., Guzmán-de-Peña, D. and Peña-Cabriales, J. J. (2001). Aflatoxin synthesis in Guanajuato, Mexico. *Rev. Iberoam Micol.* 18: 83-87.
14. Caldini, C. Bonomi, F. Pifferi, PG. Lanzarini, G. Glante, YM. (1994). Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine. *Enzyme Microb Technol*; 16:286-91.
15. Campbell, C. K. (1994). Forms of aspergillosis. In *The Genus Aspergillus*, pp. 313-320, Edited by K. A. Powell, A. Renwick & J. F. Peberdy. New York: Plenum.
16. Cao, N.J., M.S. Krishnan, J.X. Du, C.S. Gong and N.W.Y. Ho *et al.*, (1996). Ethanol production from corn cob pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast. *Biotechnol. Lett.*, 18: 1013-1018.

17. Carlile, M. J. Watkinson, S. C. & Gooday, G. W. (2001). *The fungi* (Second edition ed.). London: Academic Press.
18. Civas, A., R. Eberhard, P., Le Dizet, and F., Petek. (1984). Glycosidases induced in *Aspergillus tamarii*. Secreted α -D-galactosidase and β -D-mannanase. *Biochem. J.* 219.857-863.
19. Clark, T. T. and Lathrop, E. C. (1953). *Corncoobs-Their Composition. Availability. Agricultural and Industrial Uses.* USDA.ARS. North Regional Reserch Lab., Peoria, Il. AIC-177
20. Contreras, E. J. (2003). *Purificación y caracterización de poligalacturonasas de Aspergillus Kawachii.* Tesis Doctoral. Facultad de ciencias exactas. Universidad de la plata. Argentina.
21. Cornell, H. (2003). In: Cauvain SP (ed) *Bread Making: Improving Quality.* Woodhead Publishing, Cambridge.
22. cotty, P. J. Bayman, P. Egel, D. S. Elias, K. S. (1994). Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: Powell K. A. (ed) *The genus Aspergillus.* Plenum, New York, pp 1-27.
23. Dekker, R. F. H. (1979). The hemicellulase group of enzymes, p. 93-108. In J. M. V. Blanshard and J. R. Mitchell (ed.), *Polysaccharides in food.* Butterworths, London.
24. Des Abbayes, H., Chadefaud, M., Feldmann, J., de Ferré, Y., Gaussen, H., Grassé, P.P. y Prévot, A. R. (1989). *Botánica de vegetales inferiores.* Editorial Reverté. Barcelona, España. Págs. 335-336

25. De Vries, R. P. and Visser, J., (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 497-522.
26. De Vries, R. P., C. H. Poulsen, S. Madrid, and J. Visser. (1998). *aguA*, the gene encoding an extracellular α -glucuronidase from *Aspergillus tubingensis*, is specifically induced on xylose and not on glucuronic acid. *J. Bacteriol.* 180:243–249.
27. De Vries, R. P., H. C. M. Kester, C. H. Poulsen, J. A. E. Benen, and J. Visser. (2000). Synergy between accessory enzymes from *Aspergillus* in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 327:401–410.
28. Dunkel, M. P. H., and R. Amado. (1995). Analysis of endo-(1–5)- α -L-arabinanase degradation patterns of linear (1–5)- α -L-arabino-oligosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Carbohydr. Res.* 268:151–158.
29. Dussel Peters Enrique. (2002). Territorio y competitividad en la agroindustria en México. Editores Plaza y Valdes. México. Págs. 144-145
30. Elander, R. T. & Russo, L. J. (1993). Production of ethanol from corn fiber. Paper presented at the 1st Biomass Conf. of the Americas: Energy, Environment, Agriculture and Industry, Burlington, VT, USA.
31. Eriksson, K.-W., and M. Winell. (1968). Purification and characterization of a fungal β -mannanase. *Acta Chem. Scand.* 22:1924-1934.
32. Foley, K. (1978). Physical Properties, Chemical Properties and Uses of the Anderson's Corncob Products. The Andersons, Maumee, OH.

33. Galante, Y.M., De Conti, A., Monteverdi, R. (1998). Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: Harman GF, Kubicek CP, Editors. *Trichoderma & Gliocladium - Enzymes, biological control and commercial applications*. Vol. 2. London: Taylor & Francis pp 327-342.
34. Gani, A., Naruse, I. (2007). Effect of cellulose and lignin content on pyrolysis and combustion characteristics for several types of biomass. *Renewable Energy*. Volume 32, Issue 4, April 2007. pp 649-661.
35. García Barajas, Laura Beatriz. (2005). *Biología - Biodiversidad pluricelular*. Pearson 2° Edición. México. Pág. 154
36. García, Vera. (2004). *Introducción a la microbiología*. 2ª ed., EUNED. Pág. 96
37. Garrote, Gil, Dominguez, Herminia, Parajó, Juan. (2002). Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering* 52, 211–218
38. Gonzalez, R. R., and P. Monsan. (1991). Purification and some characteristics of galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus*. *Enzyme Microb. Technol.* 13:349–352.
39. Gow, N. A. (1995). *The growing Fungus*. (C. & Hall, Ed.) London: N.A.R Gow & G. M. Gadd.
40. Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Cordonnier, R.E., Arnaud, A., Galzy, P. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases. *J Sce. Food Agric.*;50:499-506.

41. Guzmán-de-Peña, D., Trudel, L., Wogan, G.N. (1995). Corn “nixtamalización” and the fate of radiolabelled aflatoxin B1 in the tortilla making process. *Bull. Environ Contam Toxicol* 55:858-864.
42. Hedayati, M. T., Pasqualotto, C., Warn, P. A., Bowyer, P. and Denning, D. W. (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153, 1677–1692
43. Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R., (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40: 2931-2944.
44. Jiujiang, Yu, Thomas, E. Cleveland, William, C. Nierman, and Joan, W. Bennett. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. Review. *Revista Iberoamericana Micología*. 22: 194-202.
45. Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A Review. *Bioresource Technology* 77: 215-227.
46. Kato, M., S. Mimura, U. Rao, A. Tanaka, N. Kitamoto, S. Yoshino, and N. Tsukagoshi. (1999). Regulation of the *xynF1* gene encoding the major family F xylanase of *Aspergillus oryzae*, p. 331–335. *In* K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Koyabashi, S. Karita, and T. Kimura (ed.), *Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation*. Uni Publishers Co., Ltd., Tokyo, Japan.
47. Kaur, G., Sanjeev, K., Satyanarayana, T. (2004) Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a *thermophilic* mould *Sporotrichum thermophile apinis*. *Bioresource Technology*. 94:239-243.
48. Klich, M. (1998) Soil fungi of some low-altitude desert cotton fields and ability of their extracts to inhibit *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*; 142: 97-100.

49. Kormelink, F. J. M., M.J.F. Searle-van Leeuwen, T.m. Wood, and A. G. J. Coragen. (1991). Purification and characterization of a (1,4- β -D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:753-758.
50. Lastra Fernández, Juan José. (2001). Bosques Naturales de Asturias. Universidad de Oviedo. Pág 145
51. Lineweaver, H and Jasen, E., (1951). Pectic enzymes. Advances in Enzymology, 11: 267-295.
52. López Munguía, Agustín, García Garibay, Mariano, Quintero Ramírez, Rodolfo. (2004). Biotecnología Alimentaria. Ediciones Limusa Noriega. México. Pág 585
53. Maat J., Roza M., Verbakel J., Stam H., Santos de Silva MJ., Bosse M., Egmond MR., Hagemans MLD., Van Gorcom RFM., Hessing JGM., van den Hondel CAMJJ., van Rotterdam C. (1992). Xylanases and their application in bakery. In: Visser J. Beldman G. Kusters-Van Someren MA, Voragen AGJ., editors. Xylans and xylanases. Progress in Biotechnology, Vol. 7 Amsterdam: Elsevier, pp 349-60.
54. Manzanares, P., L. H. de Graaff, and J. Visser. (1998). Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel α -galactosidase activity. Enzyme Microb. Technol. 22:383–390.
55. Martínez-Trujillo, A., Aranda, J.S., Gómez-Sánchez, C., Trejo-Aguilar, B. y Aguilar-Osorio, G. (2007). Identification of constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. Archives of Microbiology.

56. McCleary, B.V., and N.K. Mathesen. (1983). Action patterns and substratebinding requirements of β -D-mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 1991:191-219.
57. McCleary, (1991). Comparison of endolytic hydrolases that depolymerize 1,4- β -D-mannan 1.5-cx-L-arabinan, and 1,4- β -D-galactan, p.437-449, In G. F. Leatham and M.E. Himmel (ed). *Enzymes in biomass conversion*. ACS Symposium Series, Vol. 460. American Chemical Society, Washington, D.C.
58. McKay, A. M. (1991). Extracellular α -galactosidase production during growth of filamentous fungi on polygalacturonic acid. *Lett. Appl. Microbiol.* 12: 75–77.
59. 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.
60. Mellon, Jay E., Cotty, Peter J & Dowd, Michael K. (2007). *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization.
61. Morton Frances, Julia. (1987). *Fruits of warm climates*. Editorial Media Incorporated. Miami, USA. Págs. 160–168
62. Olivares, E. Evangelina, Alarcón, Luis Roberto. (2004). *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos*. 1° Edición. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Pág. 23
63. Papinutti, L. (2003). *Enzimas Ligninolíticas en Fomes sclerodermeus*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires Argentina.
64. Payne, G.A., Nierman, W.C., Wortman, J.R., Pritchard, B.L., Brown, D., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Machida, M., and Yu, J. (2006). Whole

genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Med Mycology Suppl.* 44, 9–11.

65. Pérez Serge, Mazeau Karim, Hervé du, Penhoat Catherine. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.*, 2000, 37–55.

66. Poutanen D. (1997). Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereals foods. *Trends food Sci. Technol.*; 8:300-6

67. Ramon, D., P. van der Veen, and J. Visser. (1993). Arabinan degrading enzymes from *Aspergillus nidulans*: induction and purification. *FEMS Microbiol. Lett.* 113:15–22.

68. Reczey, K., H. Stalbrand, B. Hahn-Hagerdal, and F. Tjerneld. (1992). Mycelia-associated α -galactosidase activity in microbial pellets of *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:393–397.

69. Reese, E. T. and Shibata, Y. (1965). β -mannanases of fungi. *Can. J. Microbiol* 11:167-183.

70. Reid I., Richard M. (2000). Pectinase in paper making: Solving retention problems in mechanical pulp, bleached with hydrogen peroxide. *Enz. Microbiology Technol.* 26, 115-123.

71. Sangeeta Yadav, Pramod Kumar Yadav, Dinesh Yadav, Kapil Deo Singh Yadav. (2008). Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry* 43: 547–552

72. Scheidegger, K. A. & Payne, G. A. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *J Toxicol* 22, 423-459.
73. Silla Santos, María Hortensia. (2004). Dieta mediterránea y alimentos funcionales: seguridad alimentaria. Editorial de la UPV. Valencia, España. Pág 51.
74. Silva, M. E., Silva, D., Leite, R. S. R., Gómez, E. (2007). Purification and characterization of polygalacturonase produced by *thermophilic Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 submerged fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91: 291-299.
75. Sinclair, B. Walton and Crandall, R. Paul. (1949). Carbohydrate Fractions of Lemon Peel. *Plant Physiology*. Págs 681 – 705
76. Sims, I., D. J. Craik, and A. Bacic. (1997). Structural characterisation of galactoglucomannan secreted by suspension-cultured cells of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Carbohydr. Res.* 303:79–92.
77. Stutzenberger, F., (1992). Pectinase production. *Enciclopedia of Microbiology*, 3: 327-337.
78. Sun, Y. & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 83, 1-11.
79. Thompson, N. S. (1983). Hemicellulose as a biomass resource, p. 101-119. In E. J. Soltes (ed.), *Wood and agricultural residues. Research on use for feed, fuels, and chemicals*. Academic Press, Inc., New York.

80. Thornton, J., Ekman, R., Holmbom, B., Orsa, F. (1994). Polysaccharides dissolved from Norway Spruce in thermomechanical pulping and peroxide bleaching. *J. Wood. Chem. Techno.* 14 (2), 159-175
81. Timell, T. E. (1967). Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* 1:45-70
82. Van der Veen, P., M. J. A. Flipphi, A.G. J. Voragen, and J. Visser. (1991). Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. *Arch. Microbiol.* 157:23-28.
83. Van der Veen, P., M. J. A. Flipphi, A. G. J. Voragen, and J. Visser. (1993). Induction of extracellular arabinases on monomeric substrates in *Aspergillus niger*. *Arch. Microbiol.* 159:66–71
84. West, S. (1996). Olive and other edible oils. In: Gedfrey, T., West, S. Eds. *Industrial Enzymology*, second Ed. Stockholm Press. New York. Págs. 293-300.
85. Widstrom, N.W. (1992). Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. pp. 23-58 en: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, editores. Marcel Dekker, New York.
86. Wilkie, K. C. B., and Woo S. L. (1977). A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydr. Res.* 57:145-162
87. Willats, William, McCartney, Lesley, Mackie, William and Knox, J. Paul. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis *Plant Molecular Biology* 47: 9–27.

88. Woodward, J. (1984). Xylanases: functions, properties and applications. Topics in Enz. Ferment. Biotechnol. 8: 29-30

89. Yoshikawa, K., K. Yamamoto, and S. Okada. (1993). Isolation of *Aspergillus flavus* MO-5 producing two types of intracellular α -D-xylosidases: purification and characterization of α -D-xylosidase I. Biosci Biotechnol Biochem 57:1275–1280.

90. Yu, J., Cleveland, T. E., Nierman, W. C. & Bennett, J. W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. Rev Iberoam Micol 22,194–202.

Referencias electrónicas

<http://www.adisseo.biz/Productguides/RovabioGuide/versatility.aspx> 01/10/2010
Copyright © 2009 Adisseo. All rights reserved

<http://www.aspergillusflavus.org/aflavus/> 01/10/2010
Center for Integrated Fungal Research. All rights reserved, 2005

http://www.dpi.qld.gov.au/26_11899.htm 01/10/2010
© The State of Queensland (Department of Employment, Economic Development and Innovation) 1995-2010.

<http://www.generalbiomass.com/cellethanol1.htm> 01/10/2010
Copyright © 2009 by General Biomass Company. All Rights Reserved