



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Aislamiento y selección de cepas *de Aspergillus*
e identificación de las enzimas que producen

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

YANIRA ROSARIO RUEDA CASALES



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



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: Profesor: Aurora Irma Ortegón Ávila

VOCAL: Profesor: Agustín Reyo Herrera

SECRETARIO: Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

1er. SUPLENTE: Profesor: Francisco Ruíz Terán

2º SUPLENTE: Profesor: Sandra Paola Sánchez Rodríguez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos.

Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E.

Facultad de Química, UNAM.

SUSTENTANTE: Yanira Rosario Rueda Casales

ASESOR DEL TEMA: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

La presente investigación fue realizada con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM.
Proyecto: "Secretoma de *Aspergillus flavus*: enzimas que participan en la degradación y utilización de sustratos complejos", clave IN225710. Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) la beca recibida.

*Los objetos naturales deberían ser explorados e investigados por lo que son
y no para ajustarse al observador,
sino que respetuosamente, como si fueran seres divinos*

Johann Wolfgang von Goethe

Agradecimientos

A Dios por ser inmenso y dejarme ser parte de todo.

A la UNAM y a la Facultad de Química por enseñarme a ser libre y mostrarme, de otras maneras, la belleza del Universo.

A mi mamá, Rosario Casales, por enseñarme, cuidarme y guiarme. A mi papá, Gerardo Rueda, por encaminarme.

A Montse por estar siempre conmigo y apoyarme.

A Maxi por compartirme su belleza, sabiduría y cariño.

A Dani por acompañarme, apoyarme y ayudarme a ser una mejor versión de mí.

A mis abuelitos, Guillermina Rueda, por su apoyo y fortaleza, y Jaime Casales, por haberme cuidado y enseñado tantas cosas que hasta ahora comprendo.

A mis tíos. Miriam Casales, por haber sido siempre alegre y haberme enseñado muchas cosas, Juan Pedro Casales, por apoyarnos y acompañarnos, a Jaime Casales, por ser un ejemplo a seguir y a Pilar Espinoza, por ser respetuosa y alegre.

A mis primos, Santi y Mariana, por ser tan alegres y divertidos.

Al Señor Fabi Paredes, por acompañarme, soportarme y reírse conmigo tantos años.

A mis amigos, compañeros y todas las personas que estuvieron conmigo en este período y en períodos pasados, con quienes compartí momentos muy divertidos y de los cuales aprendí muchas cosas.

A mis profesores por compartir su experiencia en muchos aspectos de la vida.

Al Dr. Guillermo Aguilar por darme la oportunidad de convivir y aprender de su cepario.

A los aspergilos, de los que aquí se hablan, por mostrarme su belleza y ayudarme a comprender mejor los ciclos naturales.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio 312, por dejarme aprender de ellos.

A mis compañeros de trabajo, por ser personas muy alegres, de las cuáles aprendí mucho e influyeron en mi motivación a terminar esta tesis.

A todos muchas gracias.

Contenido

Capítulo 1. Introducción.....	9
Capítulo 2. Objetivos.....	11
2.1 Objetivos generales.....	11
2.2 Objetivos particulares.....	11
Capítulo 3. Antecedentes.....	12
3.1 El género <i>Aspergillus</i>	12
3.1.1 <i>Aspergillus flavus</i>	13
3.1.2 <i>Aspergillus niger</i>	15
3.2 Pared celular.....	15
3.2.1 Composición de la pared celular de plantas.....	16
3.3 Enzimas degradadoras de los polisacáridos de la pared celular de plantas.	21
3.3.1 Xilanasas.....	21
3.3.2 Pectinasas.....	22
3.3.3 Celulasas.....	23
3.3.4 Enzimas accesorias.....	25
3.4 Enzimas degradadoras de pared celular de plantas identificadas en <i>Aspergillus</i>	26
3.5 Importancia del uso de fermentación sólida.....	27
3.6 Sustratos complejos.....	28
3.6.1 Cáscara de limón.....	28
3.6.2 Olote de maíz.....	28
3.6.3 Salvado de trigo.....	29
3.7 Métodos de conservación.....	29
Capítulo 4. Materiales y métodos.....	32
4.1 Diagrama general.....	32
4.2 Recuperación de microorganismos.....	33
4.3 Cultivo de microorganismos.....	33
4.4 Cosecha y cuenta de esporas.....	33
4.5 Resguardos de microorganismos.....	34
4.5 Microorganismos utilizados para estudio en fermentación sólida y sumergida.....	35

4.6 Composición de los medios sólidos y líquidos.....	35
4.6.1 Fuentes de carbono empleadas	36
4.7 Fermentación sólida	36
4.7.1 Fermentación sólida con membrana	36
4.7.2 Fermentación sumergida.....	36
4.8 Condiciones de crecimiento	36
4.9 Extracción enzimática y determinación de peso seco	37
4.10 Determinación de actividades enzimáticas	37
4.10.1 Determinación de la actividad xilanólica	38
4.10.2 Determinación de la actividad exopectinolítica	38
4.10.3 Determinación de la actividad celulolítica	39
Capítulo 5. Resultados y discusión.....	40
5.1 Resultados del cepario.....	40
5.2 Crecimiento en fermentación sólida.....	42
5.2.1 Cáscara de limón.....	44
5.2.2 Salvado de trigo	45
5.2.3 Pectina	45
5.2.4 Xilano.....	45
5.2.5 Glucosa + 0.1% de ácido ferúlico	45
5.2.6 Olote de maíz	46
5.2.7 α -Celulosa	46
5.3 Crecimiento en cajas con etilferulato como fuente de carbono.....	47
5.4 Resultados de actividad en fermentación sólida.....	51
5.4.1 Actividad xilanólica en fermentación sólida.....	53
5.4.2 Actividad pectinolítica en fermentación sólida	58
5.4.3 Actividad celulolítica en fermentación sólida.....	63
5.5 Resultados de fermentación sumergida.....	66
5.5.1 Actividad xilanólica.....	66
5.5.2 Actividad pectinolítica	70
5.5.3 Actividad celulolítica.....	73
5.6 Resultados de pH final de la fermentación sumergida	76
5.6.1 Efecto en la actividad xilanólica	76

5.6.2 Efecto en la actividad exopectinolítica	76
5.6.3 Efecto en la actividad celulolítica	77
5.6.4 Efecto del pH en las cepas estudiadas.....	77
5.7 Discusión de la actividad producida en fermentación sólida y sumergida.....	78
5.7.1 Observaciones generales.....	78
5.7.2 Observaciones del efecto del sustrato y el tipo de fermentación en las cepas estudiadas	79
5.7.3 Observaciones en los sustratos	81
5.7.4 Diferencias encontradas en función del tipo de fermentación.....	83
5.8 Resultados resguardos	84
Capítulo 6. Conclusiones	86
Capítulo 7. Bibliografía	89

Capítulo 1. Introducción

Las enzimas degradadoras de polisacáridos de la pared celular de plantas están implicadas en el ciclo del carbono, la regulación de maduración de frutos, y son importantes en los procesos involucrados en el procesamiento y producción de diversos productos para la alimentación humana y animal.

Estas enzimas se encuentran distribuidas tanto en vegetales, como en bacterias y hongos. En los vegetales estas enzimas permiten regular sus ciclos vitales, mientras que las producidas por microorganismos, despolimerizan y degradan constituyentes de la pared celular vegetal obteniendo energía a partir de estos compuestos y haciéndolos disponibles para que sean utilizados por otros organismos con lo que se regula la forma en que se utiliza el carbono del planeta. También se han considerado como factores de virulencia en microorganismos fitopatógenos ya que facilitan la penetración de los microorganismos al tejido vegetal.

El género *Aspergillus* es uno de los géneros más importantes en cuanto a producción de enzimas, por sintetizar una amplia variedad y cantidad de actividad enzimática, además de excretar muchas de las enzimas que produce. Algunas especies son consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe). Este género ha sido de interés para diversos grupos de investigación y para la industria, por lo que ha sido ampliamente utilizado en diversas aplicaciones.

En el grupo de trabajo de fisiología de hongos filamentosos nos ha interesado estudiar las enzimas producidas por cepas autóctonas mexicanas. Para este fin se han aislado cepas de diversas fuentes lo cual contribuye al conocimiento de la biodiversidad, también puede permitir la investigación de nuevas enzimas, así como sus posibles aplicaciones. Para el estudio de estas cepas es necesario mantenerlas en resguardos que aseguren su viabilidad y su estabilidad genética.

En este trabajo se aislaron algunas cepas autóctonas y se conservaron las cepas del laboratorio de fisiología de hongos filamentosos, además se estudiaron las enzimas xilanolíticas, pectinolíticas y celulolíticas producidas por tres cepas autóctonas y por dos cepas de colección en fermentación sólida y sumergida.

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivos generales

Conservar el cepario del grupo de fisiología de hongos filamentosos.

Evaluar la capacidad de desarrollo de cepas del laboratorio, FP-80, FP-250 y FP-500, y cepas de colección, *Aspergillus niger* N 402 y *Aspergillus flavus* CECT 2687 en sustratos complejos.

Determinar la actividad enzimática de cepas del laboratorio y cepas de colección en fermentación sólida y sumergida utilizando sustratos complejos como fuente de carbono.

2.2 Objetivos particulares

Reactivar y resguardar las cepas que conforman el cepario.

Aislar nuevas cepas de sustratos naturales.

Determinar mediante un ensayo cualitativo la capacidad de las cepas para producir la enzima feruloilesterasa.

Clasificar las fuentes de carbono en función del desarrollo de los hongos utilizando la determinación de la relación peso seco/ diámetro de las colonias.

Determinar las actividades xilanolítica, exopectinolítica y celulolítica producidas por las cepas elegidas en diferentes fuentes de carbono en fermentación sólida y sumergida.

Comparar las actividades enzimáticas producidas en función de la cepa, del tipo de fermentación y del tipo de sustrato.

Capítulo 3. Antecedentes

3.1 El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece a la División Eumycota subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes en la que la reproducción se realiza solamente por mecanismos asexuales o parasexuales, *Aspergillus* corresponde a la fase asexual o conidial de algunos ascomicetos de los géneros *Eurotium*, *Emericella* y *Neosartorya*, entre otros, es decir, corresponden a los estadios conidiales de ascomicetos que nunca desarrollan estados sexuales o ascógenos en condiciones naturales, o que raramente lo hacen y es difícil encontrarlos. (Herrera, 2004; Mossel, 2002).

Los Deuteromycotina constituyen un grupo de hongos que no pueden ser clasificados fácilmente en los sistemas de clasificación naturales basados en caracteres del estado sexual e integran una categoría taxonómica artificial. La clasificación y claves para su identificación que aún son utilizadas generalmente se basan en el sistema de Saccardo publicado en su *Sylloge Fungorum* (1886), en una interpretación actual de dicho sistema (Ainsworth, 1963) los Fungi Imperfecti se dividen en cuatro órdenes, *Aspergillus* pertenece al orden Moniliales que se caracterizan por tener conidios que nacen directamente de las hifas (Herrera, 2004; Mossel, 2002).

Saccardo dividió a los Moniliales en cuatro familias, y posteriormente a las familias en secciones basándose principalmente en la morfología de los conidios, en particular en la forma, septación y color de los mismos. Estas secciones no son categorías taxonómicas oficiales, sino grupos que convenientemente incluyen géneros de hongos que comparten las mismas características antes mencionadas (Herrera, 2004).

En el género *Aspergillus* han sido descritas unas 200 especies y una gran cantidad de variedades. Los conidióforos de *Aspergillus* terminan en un hinchamiento llamado vesícula, a partir de la cual nace una hilera de fiálides, en las especies monoseriadas, o una de métulas sobre la cual se encuentra una

hilera de fiálides, en las especies biseriadas, productoras de cadenas de conidios. A la vesícula junto con las cadenas de conidios se le conoce como cabeza conidial. Este género tiene una gran distribución geográfica, encontrándose desde las regiones árticas hasta el Ecuador y son capaces de asimilar una enorme variedad de sustancias, debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas (Herrera, 2004).

Aspergillus no puede importar compuestos poliméricos dentro de la célula, por lo que requiere una degradación enzimática para producir monómeros y fuentes de carbono oligoméricas pequeñas. Debido a las diferencias estructurales de los polisacáridos de las plantas, la eficiente degradación de las mismas depende de la producción de una amplia variedad de enzimas. Además, se requiere de un sistema regulatorio para asegurar la producción de la mezcla correcta de enzimas en la presencia de un polisacárido en específico (De Vries & Visser 2001; de Vries 2003).

Los genes que codifican las enzimas xilanolíticas son expresados en xilano y xilosa y son reprimidos en glucosa. En *Aspergillus niger* el activador transcripcional XlnR dirige la expresión de estos genes y de algunos genes celulolíticos. La represión de los genes xilanolíticos en presencia de glucosa se ha asignado a la proteína de represión catabólica CreA esta proteína es el factor principal responsable de la represión catabólica en *Aspergillus*. Las fuentes de carbono glucosa y fructosa reprimen fuertemente la expresión de varios genes, incluyendo los genes xilanolíticos. También se ha observado esta represión catabólica en otros monosacáridos como xilosa y arabinosa (P. de Vries, 1999)

La proteína CreA inhibe la transcripción de genes xilanolíticos en presencia de glucosa uniéndose a secuencias específicas del promotor de estos genes. (Ruijter & Visser, 1997)

3.1.1 *Aspergillus flavus*

Se estima que la especiación de *A. flavus* tuvo lugar hace aproximadamente 5 a 8 millones de años (Ehrlich, 2008). *Aspergillus flavus* es un hongo toxicogénico que produce aflatoxinas, las cuales han sido reportadas con unas de las micotoxinas

más potentes, carcinogénicas y que causan serios problemas en los productos básicos agrícolas en todo el mundo en maíz, cacahuate, semilla de algodón y nueces (Aquino, 2005). Principalmente debido a esta razón, *A. flavus* no es utilizado en aplicaciones comerciales (Chang, 2010).

Aspergillus subgénero *Circumdati* sección *Flavi*, también referido como grupo *Aspergillus flavus*, es un grupo de hongos toxicogénicos dividido en dos grupos de especies, la primera incluye las especies aflatoxigénicas *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, el otro grupo incluye las especies no aflatoxigénicas, *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. tamarii*, los cuales son utilizados para producción de alimentos fermentados tradicionales en Asia. (Rodrigues, 2007)

Las poblaciones de *Aspergillus flavus* encontradas en el suelo contienen dos variantes que difieren en el tamaño del esclerocio, las cepas L tienen un tamaño de esclerocio mayor a 400 μm mientras que las cepas S tienen uno menor a 400 μm (Chang, 2010; Gao2007).

En crecimiento en medios de laboratorio las cepas S producen niveles más altos de aflatoxinas, tienen esclerocio más abundante y menor cantidad de conidias. Cepas S atoxigénicas son muy extrañamente encontradas en la naturaleza, mientras que casi el 40% de las cepas L pueden ser atoxigénicas. *A. oryzae* es una variante atoxigénica de *A. flavus* con características de cepa S o L. Las poblaciones silvestres de *A. flavus* están generalmente conformadas por cientos de cepas de diferentes grupos de compatibilidad vegetativa. A pesar de que no se ha observado un intercambio genético frecuente entre estos grupos, es probable que una recombinación histórica haya tenido lugar. Existe la hipótesis de que la frecuente pérdida de la habilidad para producir aflatoxinas en cepas aisladas de suelo de *A. flavus* se deba a la adaptación a un ambiente alto en fuentes de carbono, lo cual torna el grupo de genes responsables de la producción de aflatoxinas inestable. (Ehrlich, 2008).

Se cree que *A. flavus* es predominantemente saprófito, de todos los *Aspergillus*, es el que se encuentra más asociado a contaminación antes de la cosecha.

Debido a sus pequeñas esporas y su habilidad para crecer a 37 °C puede ser patógeno de animales y humanos (Chang, 2010).

Se ha observado que las poligalacturonasas son factores de patogenicidad importantes para *Aspergillus flavus* (Di Matteo et al, 2006; Federici L et al, 2006). En un estudio se disminuyó la virulencia de varios hongos patógenos, *Aspergillus flavus* en algodón, *Botrytis cinerea* en tomate, *Alternaria citri* en cítricos, *Colletotrichum gloeosporioides* en aguacate, debido a la disrupción de un solo gen pectolítico (Akimitsu, 2004). Sin embargo, la disrupción de un solo gen no disminuyó la virulencia de otros hongos patógenos, esto demuestra que la patogenicidad está dada por varias enzimas, por actividad residual o por otros factores de patogenicidad que pudieran compensar la falta de una enzima en particular (Akimitsu, 2004).

3.1.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger forma parte de la sección de aspergilos negros, *Aspergillus* sección *Nigri*, ha sido aislado de diferentes lugares alrededor del mundo y es uno de los hongos más comúnmente encontrados en las comunidades fúngicas, lo cual indica que es una especie capaz de propagarse eficientemente en un amplio intervalo de hábitats. *Aspergillus niger* y otros aspergilos negros crecen predominantemente en material vegetal muerto, que consiste principalmente en paredes celulares. (Meijer, 2011)

El género *Aspergillus* en particular el grupo que presenta color negro, *A. niger* y *A. tubingensis*, presentan características que los hace aplicables a la industria como: capacidad de hacer buenas fermentaciones, secreción de altos niveles de proteína, estatus GRAS de muchos de sus productos de fermentación, en particular, producen una gran variedad de enzimas degradadoras de polisacáridos de pared celular de importancia para la industria alimentaria (De Vries, 2001).

3.2 Pared celular

La pared celular ha sido estudiada por varios años ya que es una fuente importante de textiles, papel, materiales compuestos y tiene un papel central en la nutrición humana y animal (Neutelings, 2011)

Todas las células de las plantas están formadas de una pared celular la cual tiene funciones importantes en la planta, conecta las células para formar tejidos, señala el crecimiento y división celular, permite a la planta permanecer en postura vertical, le da forma a la célula, media las interacciones entre células, provee una barrera contra los ataques de herbívoros y agentes causantes de enfermedades. (Lodish H, 2000)

3.2.1 Composición de la pared celular de plantas

Los polímeros de la pared celular de las plantas son los compuestos orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza, estos compuestos pueden ser divididos en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina. La pared celular consiste en un arreglo de capas de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de pectina y hemicelulosa, recubre totalmente la membrana plasmática y su espesor es de 0.2 μm . . (Lodish H, 2000)

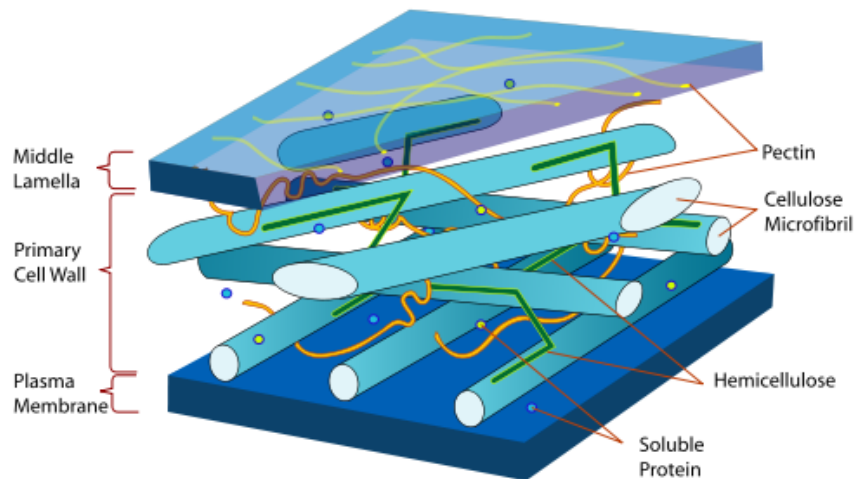


Figura 1. Representación de la composición de la pared celular de vegetales. (Prasanna, *et al.*, 2007)

Los polímeros de la pared celular de vegetales actúan como una barrera frente a la penetración y propagación de fitopatógenos, sin embargo, estos polímeros también pueden servir como sustratos para enzimas extracelulares secretadas por bacterias y hongos patógenos (Akimitsu, 2004).

3.2.1.1 Celulosa

La celulosa es la fuente renovable más abundante en la industria de la agricultura, sin un tratamiento apropiado los residuos celulósicos se han acumulado constituyendo un riesgo para la contaminación ambiental. La biodegradación tiene mayores ventajas frente a la conversión química de celulosa en glucosa debido a que se necesita menor inversión y no produce contaminación en el bioproceso. La degradación de la molécula de celulosa se dificulta debido a los fuertes enlaces de hidrógeno entre cadenas (Liu, 2011)

La celulosa es el constituyente principal de la pared celular, está formada por un polímero lineal de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4, no presenta ramificaciones y los polímeros se presentan como estructuras ordenadas, esto es en fibras. Los múltiples grupos hidroxilo de la glucosa de una cadena forman puentes de hidrógeno con los oxígenos de las cadenas vecinas uniendo las cadenas firmemente y formando una estructura cristalina llamada microfibrillas con una alta resistencia a la tracción, esto le permite otorgar rigidez a la pared celular vegetal, estas microfibrillas están constituidas por cadenas con más de 250 residuos de glucosa unidas por hemicelulosa, (De Vries, 2001). La celulosa cristalina es un sustrato insoluble y su degradación por enzimas bacterianas o fúngicas es en general limitada. Además de las regiones cristalinas, la celulosa contiene regiones amorfas no cristalinas dentro de las microfibrillas (De Vries, 2001).

En el presente trabajo se estudió la degradación enzimática del sustrato α -celulosa por parte de cinco cepas de *Aspergillus*. La separación de la celulosa en fracciones alfa, beta y gama es un procedimiento empírico ideado por Cross y Bevan en 1900, ha sido extensamente utilizado para evaluar pulpas para varios propósitos, este método fue adoptado por TAPPI como un estándar tentativo en 1931. En general, alfa celulosa indica celulosa no degradada y de alto peso molecular y es la fracción insoluble restante de tratar una pulpa deslignificada con 17.5% y 9.45% de hidróxido de sodio.

3.2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polisacárido heterogéneo y el segundo compuesto orgánico más abundante en la pared celular. En cereales y maderas duras, el principal compuesto hemicelulósico es el xilano. El xilano de los cereales contiene grandes cantidades de L-arabinosa, por lo cual es llamado arabinoxilano, este tipo de pared celular corresponde a la pared celular tipo II, mientras que los xilanos de madera dura son llamados glucoronoxilanos, debido a la alta proporción de ácido glucorónico. (De Vries, 1999)

El xilano está formado por una cadena principal de D-xilosa unida por enlaces β -1,4. La cadena principal de xilosa puede estar sustituida con diferentes grupos laterales, como L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido glucorónico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico. La L-arabinosa se encuentra como monómero o como cadenas cortas unidas a la cadena principal de xilosa por enlace α -1,2 ó α -1,3. A estos residuos o cadenas cortas de L-arabinosa puede unirse D-xilosa mediante enlace β -1,2. A su vez, residuos de D-galactosa pueden unirse a los residuos de L-arabinosa por enlace β -1,2 o bien unirse a los residuos laterales de D-xilosa por enlace β -1,4. También se encuentran residuos de acetilo unidos a la cadena principal de xilosa en la posición O2 u O3. El ácido glucorónico es otro residuo que se encuentra unido a la cadena principal de xilosa mediante enlace α -1,2. Los residuos feruloil y p-cumaroil se encuentran en el xilano como residuos terminales de las cadenas secundarias unidos a la posición O5 de L-arabinosa.

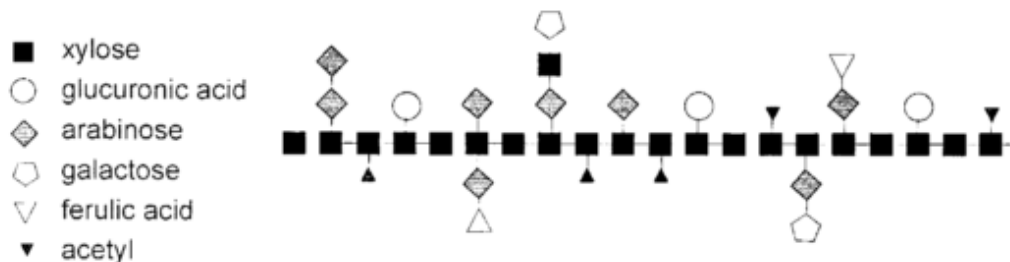


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del xilano (De Vries, 2001)

La composición de hemicelulosa difiere entre monocotiledones y dicotiledones, y también entre las partes vegetativas de la planta y las semillas. En

monocotiledones la clase mayoritaria es arabinoxilano, mientras que en dicotiledones es xiloglucano.

Un segundo compuesto de la hemicelulosa son los galacto- y gluco-mananos que consisten en una cadena principal de manosa y glucosa unidas por enlace β -1,4, las maderas blandas generalmente contienen galactoglucomananos, mientras que la madera dura generalmente contiene glucomananos. (De Vries, 1999)

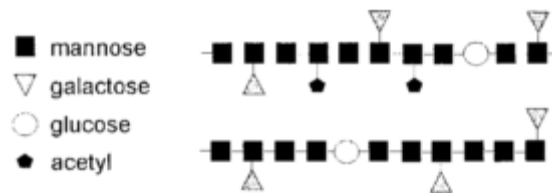


Figura 3. Representación esquemática dos estructuras de galactodlucomananos (De Vries, 2001)

3.2.1.3 Pectina

La pectina es otro grupo de heteropolisacáridos, este grupo está formado por una cadena principal de ácido galacturónico unido por enlaces α -1,4 la cual puede estar metilada o acetilada. Se encuentra en la pared celular primaria y en la lamela media de las células vegetales y tiene funciones en el crecimiento, desarrollo, morfogénesis, defensa, estructura, adhesión, entre otros, en las plantas superiores. Los polisacáridos de pectina tienen una estructura compleja pero pueden ser divididos generalmente en homogalacturonano, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II y xilogalacturonano. Aparentemente estos polisacáridos suelen estar presentes en todas las células pero su abundancia relativa y detalles estructurales difieren entre tipos de células y especies (De Vries, 1999).

puede encontrar entrecruzamiento de estos polisacáridos con lignina. (Mathew, 2004)

Esta estructura entrecruzada incrementa la rigidez de la pared celular. Además el aumento de entrecruzamiento conforme a la edad de la planta sugiere que este limita el crecimiento celular.

También se ha planteado el papel de los entrecruzamientos en la prevención de la biodegradabilidad de la pared celular por microorganismos, debido a que se ha observado que los puentes de ferulato limitan la degradación enzimática del arabinoxilano. Además, el efecto antimicrobiano de los compuestos aromáticos puede aumentar la defensa de la planta frente a microorganismos patógenos. (De Vries, 1999)

3.3 Enzimas degradadoras de los polisacáridos de la pared celular de plantas.

3.3.1 Xilanasas

La degradación de la cadena principal de xilano depende de endoxilanasas (E.C. 3.2.1.8), que cortan el polímero de xilano en oligosacáridos y β -xilosidasas (E.C. 3.2.1.37), que pueden degradar los oligosacáridos en xilosa. (Subramaniyan, 2002)

Las β -xilosidasas permiten la completa degradación del xilano, sin embargo su ausencia no interfiere con la inducción del sistema xilanolítico. Se ha observado que algunas β -xilosidasas transxilosilan oligosacáridos, esto sugiere una posible aplicación de estas enzimas para la síntesis de oligosacáridos específicos.

Las xilanasas son utilizadas en la industria de alimentos en varias aplicaciones como en el horneado, en la preparación de jugos, procesado de almidón, en nutrición animal y en el blanqueo del papel (MacCabe, 2002).

Se ha reportado que las β -xilanasas (1,4 β -D endoxilanasas y β -xilosidasas) junto con las celulasas juegan un papel importante en la invasión primaria del tejido vegetal. La mayoría de los hongos patógenos producen enzimas de degradación de pared celular. Se ha reportado la producción de xilanasas en *Bacillus*, *Streptomyces* y otras bacterias no patógenas. Algunos géneros de hongos productores de xilanasas son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Trichoderma*, entre otros (Subramaniyan, 2002).

3.3.2 Pectinasas

Las pectinasas son un grupo de enzimas que hidrolizan la pectina por diferentes mecanismos que se pueden dividir en dos grandes clases: pectin esterasas y despolimerasas. Las pectinesterasas remueven los grupos metoxilos de los galacturonidos metilados, mientras que las despolimerasas catalizan la ruptura de los enlaces glicosídicos via hidrólisis (hidrolasas) o β -eliminación (liasas). (Hadj-Taieb, 2002)

En la degradación del homogalacturonano también llamada región lisa de la pectina intervienen las poligalacturonasas, pectin y pectato liasas, mientras que en la degradación de la región ramificada de la pectina intervienen ramnogalacturonan-hidrolasas y ramnogalacturonan liasas. (De Vries, 2001)

Pectin liasa. Corta los enlaces glucosídicos adyacentes a un grupo metil ester en zonas altamente metiladas mediante un mecanismo de beta-eliminación.

Pectato liasas. Difieren de las pectin liasas porque cortan los enlaces glicosídicos de las pectinas que están parcial o completamente desesterificadas, actuando en los enlaces que están junto a los grupos carboxílicos libres. Existen endo y exo-liasas. Se han reportado en plantas, hongos y bacterias.

Poligalacturonasas. Endopoligalacturonasas cortan los enlaces internos de pectinas moderadamente esterificadas disminuyendo la viscosidad. Solo corta los enlaces adyacentes a grupos carboxílicos libres.

Pectinesterasas. Cortan los residuos de metil, etil, propil y alil esterificados a la cadena de pectina. La reacción implica la liberación de metanol y la formación de grupos carboxílicos libres que resultan en un cambio de pH. Las pectinesterasas pueden coagular el pectato cálcico y clarificar jugos de cítricos. Son inhibidas por ácido péctico, su producto, y por lo tanto la desesterificación requiere de una acción sinérgica de poligalacturonasas o pectato liasas para remover las regiones libres de poligalacturonato.

Las enzimas pectinolíticas también están involucradas en los cambios de textura de frutas y vegetales durante la maduración y el almacenaje después de la cosecha.

Las pectinasas se usan ampliamente en la industria para procesar frutas y vegetales porque reducen la viscosidad de los jugos y facilitan los procesos de extracción, maceración, licuefacción y clarificación (Naidu y Panda, 1999).

La acción sinérgica de las enzimas pectinolíticas es usada industrialmente para la extracción, clarificación y concentración de jugos de frutas, también es utilizado para la clarificación de vinos, para la extracción de aceites, pigmentos, aromas y sabores de vegetales, también es usado en la preparación de fibras de celulosa para la manufactura de lino, yute y cáñamo (Castilho, 2000).

Las enzimas pectinolíticas también tienen aplicación en la extracción de aceites de la cáscara de vegetales y cítricos, pretratamiento de agua residual con pectina, fermentación de café y té, producción de alimento para aves de corral y purificación de virus de plantas (Saito et al, 2004; Hoondal G. et al, 2002)

Las xilanasas, pectinasas y ligninasas en conjunto, sin celulasas, se utilizan para la predigestión de materiales lignocelulósicos con la finalidad de obtener alimentos con mayor digestibilidad y mayor calidad para nutrición animal (Graminha, 2008).

3.3.3 Celulasas

La degradación de la cadena de celulosa está dada al menos por tres celulasas, endoglucanasas, exocelobiohidrolasas y β -glucosidasas (Lockington, 2002)

Endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4). Hidrolizan los enlaces internos de la celulosa produciendo un rápido decremento de la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores.

Celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91). Remueve unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor, esto resulta en un aumento rápido en grupos reductores y un cambio menor en el tamaño de cadena.

β -glucosidasa. (E.C. 3.2.2.21). Esta enzima tiene como producto la glucosa a partir de los productos de las enzimas anteriores. (De Vries & Visser, 2001).

Generalmente los microorganismos que son capaces de degradar la celulosa tienen múltiples genes que codifican celulasas de diferentes tipos, la máxima velocidad de degradación se alcanza cuando actúan mezclas de diferentes celulasas. Se ha comprobado que existe sinergismo entre diferentes exocelulasas, además diferentes tipos de exocelulasas actúan sobre las terminaciones reductoras o no reductoras de la molécula de celulosa. Se han examinado celulasas fúngicas en varios microorganismos económicamente importantes como *Trichoderma*, *Aspergillus niger* y *Phanerochaete chrysosporium*. En *A. niger* el gen *xlnR* codifica un activador transcripcional proteico necesario para la inducción de los genes codificantes de enzimas xilanolíticas, este activador también regula los genes endocelulolíticos *eglA* y *eglB* y exocelulolíticos *cbhA* y *cbhB* (Lockington, 2002).

Algunas celulasas de *Aspergillus nidulans* están directa o indirectamente reguladas por los reguladores de carbono CreA, CreB y CreC y por el regulador de nitrógeno AreA (Lockington, 2002)

Varios tipos de celulasas son utilizadas en detergentes, estas enzimas pueden incrementar el rendimiento de limpieza, debido a la remoción de fragmentos celulósicos, y proveer beneficios en el cuidado de la tela, por la remoción de fragmentos más grandes de fibras que influyen el opacamiento del color de la tela. (Schäfer, 2007)

3.3.4 Enzimas accesorias

Las enzimas accesorias participan conjuntamente con las celulasas, xilanas y pectinasas para lograr la completa degradación de los polímeros de la pared celular de las plantas. A continuación una breve descripción de este grupo de enzimas:

3.3.4.1 α -L-arabinofuranosidasas y arabinoxilano arabinofuranohidrolasas

Estas enzimas remueven los residuos de arabinosa. Su producción se ha observado en arabinoxilano, pulpa de betabel, L-arabinosa y L-arabitol. Algunas de estas enzimas han sido purificadas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori*, algunas de ellas han resultado ser altamente específicas en la remoción de arabinosa unida a xilano y arabinoxilano de trigo, sin embargo, muchas de estas enzimas remueven los residuos de arabinosa de las cadenas de pectina (De Vries, 2001)

3.3.4.2 Endoarabinasas. Estas enzimas hidrolizan el enlace α -1,5 de las cadenas laterales de arabinosa presentes en la pectina. A pesar de que algunas arabinofuranosidasas también hidrolizan este enlace, las endoarabinasas promueven la eficiencia de la degradación de arabinano e influyen positivamente la acción de arabinofuranosidasas.

3.3.4.3 α y β -galactosidasa. Estas enzimas remueven los residuos de galactosa presentes en las cadenas laterales de pectina.

3.3.4.4 Endo y exogalactanasas. Estas enzimas hidrolizan los enlaces β -1,3, β -1,4 y β -1,6 entre galactosa de las cadenas laterales de pectina, dando la liberación de galactobiosa y galactosa. La exogalactonasa purificada de *Aspergillus*, además de hidrolizar oligosacaridos a galactosa, se ha observado que presenta actividad de galactosa transferasa.

3.3.4.5 α -glucoronidasas. El ácido glucorónico y su 4-O metil éster es removido de la cadena principal de xilano mediante estas enzimas. La actividad de esta enzima se ha detectado en una gran variedad de microorganismos pero se ha

purificado solamente de algunos. Se ha reportado sinergia entre estas enzimas y endoxilanasas y β -xilosidasas.

3.3.4.6 Feruloil y p-cumaroilesterasas. Ambas enzimas remueven los residuos de feruloil y p- cumaroil, respectivamente, que se encuentran unidos a la posición O5 de arabinosa en xilanos, y en la posición O3 de arabinosa y en la posición O6 de galactosa en pectina.

3.3.4.7 Acetil y metilesterasas Las pectinacetilesterasas remueven los residuos de acetilo y metilo de las regiones insustituídas de las pectinas, respectivamente. Las acetilesterasas remueven acetilo de la posición O3 de la cadena principal de xilano. Estas enzimas se han detectado en *A. niger*, *A. japonicus* y *A. nidulans* y se cree que son importantes para la eficiente degradación de xilano por endoxilanasas.

3.4 Enzimas degradadoras de pared celular de plantas identificadas en *Aspergillus*

Se han identificado diferentes endoxilanasas en *Aspergillus* las cuáles difieren en masa molecular, pH óptimo, pI y actividad xilanolítica. Algunas endoxilanasas tienen actividad únicamente si existen sustituyentes de xilosa próximos, mientras que otras endoxilanasas sólo cortan xilosas insustituídas. Otra distinción entre endoxilanasas es su capacidad para liberar L-arabinosa.

También se han identificado en *Aspergillus* familias de genes que codifican para pectin liasas, pectato liasas y poligalacturonasas. Además las enzimas ramnogalacturonan hidrolasas y ramnogalacturonan liasas identificadas en *Aspergillus* han resultado ser altamente específicas para la hidrólisis de la región sustituida de pectina. (De Vries, 2001)

En el presente trabajo se estudio la producción enzimática en fermentación sumergida y fermentación sólida, debido a que la fermentación sólida a nivel industrial se ha utilizado en menor grado comparada con la fermentación sumergida; a continuación se presentan algunas generalidades de las ventajas de este tipo de fermentación.

3.5 Importancia del uso de fermentación sólida

Las condiciones de cultivo en fermentación sólida tienen mayor similitud a las condiciones en las que se desarrollan los hongos en su hábitat natural comparadas con las condiciones de fermentación sumergida, esto facilita su crecimiento y favorece la excreción de grandes cantidades de enzima. Además, este proceso es de interés económico para países que tienen gran cantidad de residuos agroindustriales, los cuales pueden ser utilizados como materias primas de bajo costo (Castilho, 2000).

Algunas ventajas que ofrece la fermentación sólida frente a la sumergida son mayor productividad y concentración de productos, cultivo de microorganismos especializados en sustratos insolubles en agua o cultivo mixto de varios hongos filamentosos, menor demanda en la esterilización debida a la baja actividad del agua usada en este tipo de fermentación (Singhania, et. al., 2009), menores costos de operación (Martins et al, 2011), menor volumen de agua utilizada, lo que afecta en la economía del proceso principalmente por requerir un fermentador de menor tamaño, agitación reducida y menor costo de esterilización (Hölker and Lenz, 2005; Nigam, 2009; Pandey, 2003; Raghavarao et al., 2003) mayor estabilidad a pH y temperaturas extremas (Maldonado & Strasser de Saad, 1998), opción de mayor productividad de endopectinasas, exopectinasas y pectinliasas para *A. niger* (Acuña-Arguelles, et. al, 1995), mayor producción de pectin liasas y pectin esterases en *A. niger* (Taragano & Pilosof, 1999) menor represión catabólica (Solis Pereira et. al., 1993).

Algunas desventajas del uso de este tipo de fermentación es la heterogeneidad del medio, la transferencia de energía y la concentración de CO₂. Estas tres desventajas pueden solucionarse mezclando el medio (Graminha, 2008).

Actualmente los retos que presenta la ampliación del uso de la fermentación sólida son el escalamiento, la purificación de los productos y la estimación de la biomasa. Hoy en día existen algunos bioreactores que permiten escalar este tipo de fermentaciones, otorgan una buena transferencia de calor y masa, y permiten monitorear varios parámetros. La separación de la biomasa es un gran reto, sin

embargo, existen varios métodos indirectos para estimar el crecimiento microbiano, recientemente se considera más exacto el método de la estimación de la razón de consumo de O₂ y aumento de CO₂ (Singhania, 2009).

Para la extracción enzimática de sólidos son importantes los parámetros temperatura, tipo de disolvente, estabilidad térmica de la enzima y el tiempo de exposición. Se ha observado que la extracción con buffer de acetatos pH 4.4 a 35 °C por 30 min, obtuvo la mejor extracción de pectinasas de *Aspergillus niger* en fermentación sólida utilizando salvado de trigo como fuente de carbono (Castilho, 2000)

3.6 Sustratos complejos

En el presente trabajo se utilizaron como sustratos complejos la cáscara de limón, el olote de maíz y el salvado de trigo para determinar la capacidad de crecimiento de las cepas estudiadas y la producción enzimática en estos sustratos. Esto se realizó con la finalidad de estudiar las diferencias entre las cepas al utilizar sustratos complejos, además de ofrecer una opción para la utilización de estos residuos agroindustriales para la producción de enzimas.

3.6.1 Cáscara de limón

Dentro de los vegetales y frutas los cítricos son las frutas con mayor contenido de pectina en todas sus partes. En la cáscara, los cítricos presentan un contenido aproximadamente de 0.20- 0.40 g/ 100 g de peso seco, en el albedo presentan 0.30- 0.80 g/100 g de peso seco y en la pulpa presentan de 0.1- 0.5 g / 100 g de peso seco. El albedo presenta el mayor contenido de pectina. (Ywassaki, 2011)

3.6.2 Olote de maíz

Las actividades agropecuarias y agroindustriales dan origen a una serie muy amplia de esquilmos y subproductos que se pueden emplear de diversas maneras. Los esquilmo y residuos agrícolas se derivan de las partes de las plantas, cereales en su mayoría, que permanecen en el terreno después de cosechar el grano o semilla. La cantidad anual de esquilmos oscila alrededor de 45 millones de toneladas de materia seca para los diez principales cultivos: maíz, sorgo, trigo,

frijol, arroz, cebada, soya, algodón, cártamo y ajonjolí. El rastrojo y olote de maíz representa 25 500 000 toneladas (Muñoz, 2012).

Tabla 1. Contenido de materia seca (MS), proteína, energía metabolizable (EM), fibra y pared celular (fibra detergente neutro; FDN) de diversos esquilmos agrícolas (Muñoz, 2012).

	MS %	Proteína %	EM Mcal/ kg	Fibra %	FDN %
Olote de maíz	90.0	3.2	1.37	36.2	89.1

De la tabla 1 se observa que el olote de maíz contiene una alta cantidad de fibra por lo que constituye una buena fuente de carbono para microorganismos con capacidad degradadora de pared celular de vegetales.

3.6.3 Salvado de trigo

El salvado de trigo es un subproducto abundante generado durante la molienda, esta biomasa tiene diversas aplicaciones. Los principales constituyentes del salvado de trigo son polisacáridos no amiláceos (46%), almidón (10-20%), proteínas (15-22%) y lignina (4-8%). Los arabinoxilanos son los polisacáridos no amiláceos más abundantes (Zhang, 2011)

La cantidad anual en México de esquilmos provenientes del trigo es de alrededor de 4 500 000 toneladas (Muñoz, 2012).

3.7 Métodos de conservación

Para el estudio sistemático y de biodiversidad es esencial mantener y preservar cepas fúngicas mediante diferentes métodos que aseguren la viabilidad y la integridad morfológica, fisiológica y genética de las cepas a través del tiempo. Para la elección de los métodos a emplear se debe considerar el costo beneficio de los métodos disponibles.

Los principales métodos de conservación de cepas se han dividido en métodos de metabolismo activo y de metabolismo suspendido. Los métodos de metabolismo activo son simples y de bajo costo debido a que no se requiere de equipo especializado, un ejemplo de estos es el método del subcultivo. Sin embargo, ofrecen un periodo de conservación corto, menor a 10 años. Los métodos basados en metabolismo suspendido, dentro de los que se incluye la liofilización,

deseccación y la criopreservación son altamente exitosos, proveen un periodo indefinido de conservación, sin embargo requieren de equipo costoso y especializado (Nakasone, 1994).

En este trabajo utilizamos los métodos de desecación con sílica gel, crecimiento recubierto con glicerol y congelación.

La desecación es el método más útil para conservar las esporas de hongos filamentosos, los sustratos más comúnmente utilizados son sílica gel, perlas de vidrio, y arena. (Nakasone, 1994). La utilización de sílica gel es una buena opción cuando no se cuentan con la facilidad de acceso a técnicas de liofilización o crioconservación. Se utiliza leche descremada para proteger a las esporas. Este método tiene como ventaja el limitar el crecimiento celular previniendo la contaminación del resguardo. (Nakasone, 1994; Humber, 1997)

El recubrimiento con glicerol esterilizado puede conservar cepas por un periodo prolongado de tiempo, en este tipo de resguardo se conserva el micelio no esporulado del microorganismo. Debido a que el crecimiento del hongo filamentoso continúa; este método tiene como desventaja la posibilidad de generar mutantes que puedan crecer en condiciones adversas. Además, se debe revisar periódicamente el nivel de glicerol y se debe añadir más glicerol si es necesario.

(Nakasone, 1994; Humber, 1997)

Otro método sencillo, de bajo costo y útil para conservar a la mayoría de los hongos filamentosos que son más frecuentemente empleados es la conservación de esporas en agua destilada estéril. Este método mantiene la viabilidad de la cepa por 10 años, además tiene la ventaja de no inducir formas anormales o pleomorfismos (Harris, 2011).

Sin embargo, es necesario utilizar más de un método de conservación para lograr mayor porcentaje de viabilidad de la totalidad de las cepas que se requieren conservar. (Harny, 2011)

Una vez conservado el cepario, se eligieron aleatoriamente dos cepas nativas, dos de colección y una del cepario y se estudió su capacidad de producir enzimas de degradación de pared celular de plantas en diferentes sustratos.

Capítulo 4. Materiales y métodos

4.1 Diagrama general

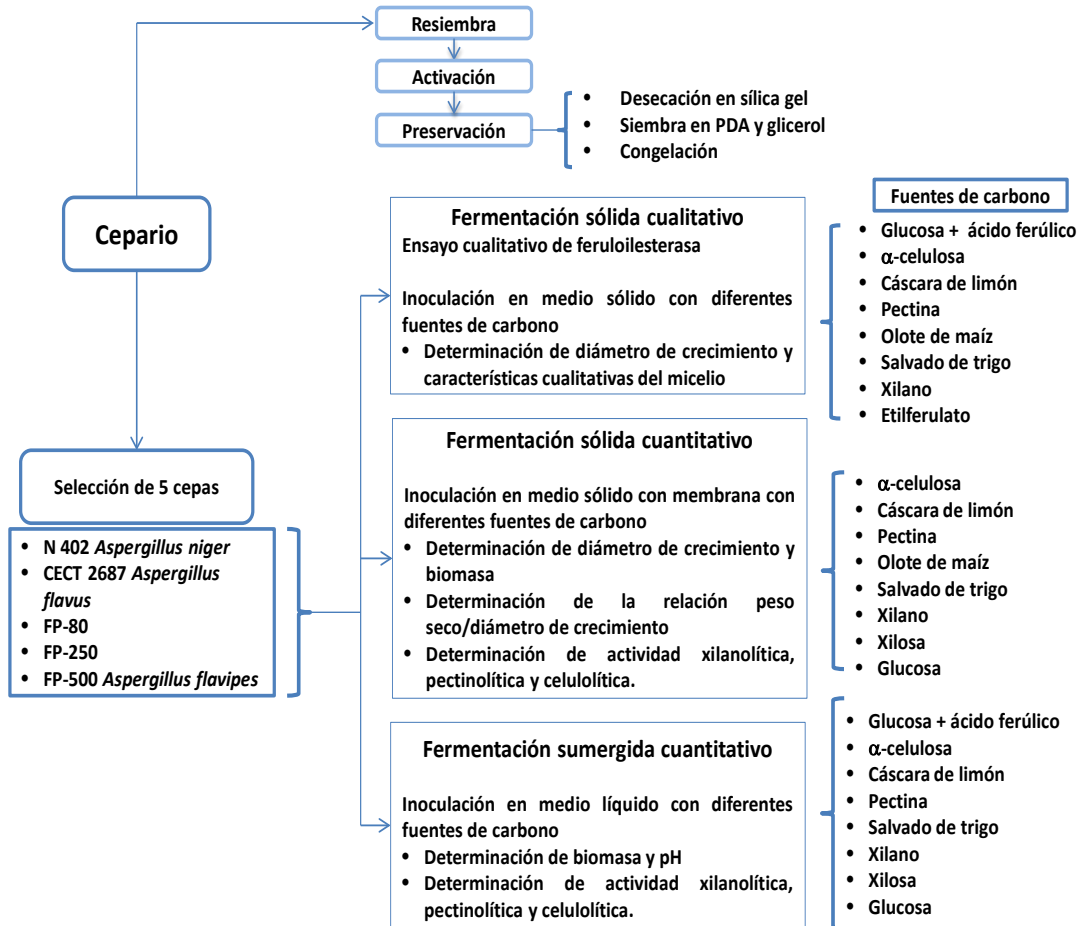


Figura 5. Esquema general de la metodología realizada

4.2 Recuperación de microorganismos

Como primera etapa se recuperaron las cepas del cepario del laboratorio, el cual está constituido por 78 cepas del género *Aspergillus*. Parte del cepario está conformado por cepas autóctonas mexicanas.

Las cepas se encontraban preservadas en dos tipos de resguardo. El primero en refrigeración en medio sólido y glicerol. El segundo conservado por desecación a temperatura ambiente en sílica gel.

Se recuperó el cepario mediante resiembra de los resguardos en medios sólidos tales como PDA, Sabouraud y medio mínimo para *Aspergillus*.

4.3 Cultivo de microorganismos

Se realizó una siembra masiva del microorganismo en medios PDA o Sabouraud con la finalidad de obtener una suspensión con una concentración conocida de esporas para la posterior inoculación de los medios sólidos y líquidos. Con un asa micológica se tomó una asada de las esporas de cada cepa. Esta asada se inoculó por picadura central en los medios de cultivo, las esporas se esparcieron en toda la superficie del medio con un asa Drigalsky. Este cultivo se incubó por 4 días a 37 °C, al final de este periodo se cosecharon las esporas y esta suspensión fue utilizada para la inoculación de resguardos y de medios sólidos y líquidos.

Además, con la finalidad de estudiar las características morfocoloniales de las cepas en medios PDA y en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono, se inoculó por picadura central con un asa micológica, las esporas del microorganismo para que se desarrollara una sola colonia.

4.4 Cosecha y cuenta de esporas

Se propagó cada microorganismo en medio sólido PDA, Sabouraud o medio mínimo para *Aspergillus* por siembra masiva. La caja se incubó por 4 días a 37 °C. La cosecha de esporas se obtuvo deslizando un asa Digralisky sobre las esporas germinadas. Las esporas se suspendieron en 10 mL de solución salina de

NaCl al 0.9% p/v con Tween 80 al 0.005% v/v, después se lavó tres veces por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos, finalmente las esporas se resuspendieron en un volumen igual al original de solución salina.

Se determinó la concentración de esporas mediante el método de cuenta directa en la cámara de Neubauer. Se realizó una dilución 1:100 de la cosecha, se tomaron 20 μ L de la dilución y se colocaron en la cámara. Se contaron 16 cuadros de uno de los cuatro cuadrantes y con este valor se realizó el cálculo de la siguiente manera:

$$[\text{esporas / mL}] = \text{No. de esporas contadas} \times 4 \times 2500 \times 100$$

4.5 Resguardos de microorganismos

A partir del cultivo puro de cada cepa se realizaron tres tipos de resguardos. Uno para mediano plazo, refrigeración de cultivo sólido Sabouraud con glicerol, y dos a largo plazo, congelación y desecación en sílica gel. Se realizaron estos tres tipos de resguardo para reducir la probabilidad de pérdida durante el almacenamiento. Los tres tipos de resguardos se realizaron por duplicado para cada cepa.

4.5.1 Resguardo en agar Sabouraud con glicerol

Para el primer tipo de resguardo, se sembraron por picadura tubos Eppendorf de 1.5 mL con 0.5 mL de agar Sabouraud, se incubaron a temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C, durante 3 días, después de este tiempo se agregó 0.3 mL de glicerol estéril para evitar la desecación del medio. Este resguardo se conserva en refrigeración.

4.5.2 Resguardo en sílica gel

Para el segundo tipo de resguardo, se resuspendió una cosecha de esporas en leche descremada al 10% y homogeneizó. Fueron agregados 200 μ L de la suspensión de esporas de cada cepa a viales con sílica gel estériles. Este resguardo se conserva a temperatura ambiente.

4.5.3 Resguardo en leche descremada

El tercer tipo de resguardo consta de la congelación de 0.7 mL de suspensión de esporas en leche descremada al 10% colocados en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

4.6 Microorganismos utilizados para estudio en fermentación sólida y sumergida

Se eligieron dos cepas autóctonas mexicanas, FP-250 y FP-80, para compararlas en cuanto a crecimiento y producción de actividad enzimática, con las cepas *Aspergillus niger* N-402 y *Aspergillus flavus* CECT 2687 respectivamente.

Además se trabajó con la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500, la cual es una cepa también mexicana que fue aislada por el grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos de la Facultad de Química, y que ha mostrado resultados sobresalientes para diferentes actividades enzimáticas.

4.7 Composición de los medios sólidos y líquidos

Se inocularon las cepas seleccionadas en medio mínimo para *Aspergillus*, tanto en cultivo sólido como en líquido con diferentes fuentes de carbono al 1%.

Se utilizó el medio mínimo para *Aspergillus* de Pontecorvo (Pontecorvo, 1953) el cual está constituido por NaNO_3 al 0.6 %, KH_2PO_4 al 0.15%, y 0.05% de KCl y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Todos los reactivos empleados fueron de J. T. Baker.

En el caso de medio sólido se agregó agar bacteriológico Bioxon al 1.5 % y el medio se ajustó a pH 6.

Para los medios líquidos el pH se ajustó a 5.

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma Aldrich, FLUKA y J. T. Baker.

Para ambos casos las fuentes de carbono complejas, olote de maíz, salvado de trigo, y cáscara de limón, se dejaron remojar 2 horas; tras lo cual se ajustó el pH, se agregó el agar en caso de medio sólido y esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 psi por 20 minutos.

4.7.1 Fuentes de carbono empleadas

Todas las fuentes de carbono fueron utilizadas a una concentración del 1% a excepción de las cajas en las que se utilizó etilferulato como fuente de carbono, en este caso se utilizó 30 µg de etilferulato.

4.8 Fermentación sólida

Para el estudio de crecimiento en fermentación sólida se utilizaron glucosa (Glc) + 0.1% de ácido ferúlico (AF), α -celulosa (C), cáscara de limón (CL), pectina (P), olote de maíz (OM), salvado de trigo (ST), xilano (X) y etilferulato (EF).

4.8.1 Fermentación sólida con membrana

Para la cuantificación de actividad enzimática en fermentación sólida se utilizó una membrana de policarbonato de diámetro de poro de 0.2 µm para separar la biomasa del agar del cual se obtuvo el filtrado enzimático. Las fuentes que se utilizaron se mencionan a continuación: α -celulosa (C), cáscara de limón (CL), pectina (P), olote de maíz (OM), salvado de trigo (ST), xilano (X), xilosa (Xyl) y glucosa (Glc) como fuentes de carbono.

4.8.2 Fermentación sumergida

Para medio líquido las fuentes de carbono con las que se trabajó fueron glucosa (Glc) + 0.1% de ácido ferúlico (AF), α -celulosa (C), cáscara de limón (CL), pectina (P), salvado de trigo (ST), xilano (X), xilosa (Xyl) y glucosa (Glc).

4.9 Condiciones de crecimiento

Los medios sólidos se incubaron en cajas petri de plástico a 37 °C por 3 días para estudiarlos cualitativamente y por 4 días para estudiar su actividad enzimática, Los medios con α -celulosa como fuente de carbono se incubaron 7 días. En los casos en los que se determinó la actividad enzimática se colocó de manera estéril una membrana de policarbonato sobre la cual se inoculó la suspensión de esporas. En ambos casos se inocularon 40 000 esporas en el centro de la caja.

Los medios líquidos se inocularon con una alícuota de suspensión de esporas tal que la concentración final fuese 4×10^6 esporas/ mL de medio con incubaron 72 h

a 37 °C en una incubadora orbital Innova 4230 New Brunswick Scientific a 300 rpm. Para todos los medios líquidos se utilizaron 100 mL de medio en matraces de 500 mL.

4.10 Extracción enzimática y determinación de peso seco

Para la cuantificación de actividad enzimática se realizó una extracción enzimática y determinación del peso seco de la biomasa en los medios sólidos y se obtuvo el filtrado enzimático en la fermentación sumergida.

En fermentación sólida a las 96 h de incubación se registro el tamaño y características de crecimiento de la colonia. La biomasa fue separada de la caja raspando el micelio esporulado de las membranas de policarbonato. Se determinó el peso seco, para esto se colocó la biomasa en un papel a peso constante mantenido previamente 24 h a 80 °C, la biomasa se mantuvo 12 h a 80 °C. Una vez retirada la biomasa y la membrana, se corto la zona de agar sobre la cual creció el microorganismo. Se determinó el peso del agar correspondiente. El agar fue macerado en un desmembranador a 2000 rpm por 1 minuto. El agar macerado se transfirió a tubos de centrifuga y se les añadió 5 mL de buffer de acetatos 100 mM pH= 5.0. El tubo fue agitado por 30 s a máxima velocidad en un vórtex, después se centrifugó 5 minutos a 500 rpm. El filtrado enzimático se decantó, se midió el volumen extraído y se determinó la actividad enzimática. El agar se desechó.

Para la fermentación sumergida, a las 72 h de incubación se filtró el medio en algodón para separar la biomasa y, en el caso de los sustratos complejos, la fuente de carbono, del filtrado enzimático. A este filtrado se le determinó el pH y la actividad enzimática.

4.11 Determinación de actividades enzimáticas

Se determinaron las actividades enzimáticas xilanolíticas, pectinolíticas y celulolíticas cuantificando los azúcares reductores liberados por la actividad

enzimática por la técnica de DNS. El producto de reacción se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 575 nm.

Todos los blancos se incubaron sin filtrado enzimático, el cual se agregó a la mezcla después de la adición del reactivo DNS.

4.11.1 Determinación de la actividad xilanolítica

Se incubó en un baño a 50 °C por 20 minutos la mezcla de reacción que consistió en 0.5 mL de xilano de abedul al 1% p/v, 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático. Al término de la incubación se agregó 1 mL del reactivo DNS. La mezcla se calentó a ebullición por 5 minutos. Finalmente se añadieron 5 mL de agua destilada y las muestras se agitaron en vórtex a máxima velocidad. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm y la concentración de azúcares reductores se calculó con una curva patrón de xilosa.

Se definió como 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.

4.11.2 Determinación de la actividad exopectinolítica

Para la medición de la actividad exopectinolítica se incubó en un baño a 45 °C por 20 minutos la mezcla de reacción que consistió en 0.5 mL de pectina cítrica al 1% p/v, 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático. Al término de la incubación se agregaron 2 mL del reactivo DNS. La mezcla se calentó a ebullición por 5 minutos. Se añadieron 5 mL de agua destilada y se agitaron los tubos en un vórtex a máxima velocidad. Las muestras fueron centrifugadas 5 minutos a 500 rpm. Finalmente el producto de reacción se separó de la pectina residual y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm. El valor se interpoló en una curva patrón de ácido galacturónico.

Se definió como unidad de actividad pectinolítica (U) la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un micromol de ácido galacturónico en 20 minutos en las condiciones dadas.

4.11.3 Determinación de la actividad celulolítica

Se incubó en un baño a 50 °C por una hora la mezcla de reacción que consistió en 0.5 mL de α -celulosa al 1% p/v, 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático. Al término de la incubación se agregaron 2 mL del reactivo DNS. La mezcla se calentó a ebullición por 5 minutos. Finalmente se añadieron 5 mL de agua destilada y las muestras se agitaron en vórtex a máxima velocidad. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm y el valor se interpoló en una curva patrón de glucosa.

Se definió como unidad de actividad celulolítica (U) la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un micromol de glucosa en una hora en las condiciones dadas.

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1 Resultados del cepario

Todas las cepas fueron resembradas a partir de los resguardos en medio PDA o Sabouraud. Se confirmó que el crecimiento de cada cepa coincidiera con el color reportado en el laboratorio para la cepa proveniente y la morfología del género. Algunas cepas no pudieron recuperarse debido a que el periodo que permanecieron resguardadas fue mayor a diez años. Se realizó una revisión de las cepas que se recuperaron para encontrar organismos contaminantes y en su caso se aislaron las cepas. Las cepas fueron resembradas tres veces para reactivarlas.

Se realizó una clasificación del cepario de acuerdo a las características morfológicas presentadas en agar PDA. Las cepas se agruparon en 5 grupos, en la figura 6 se presentan algunas imágenes de cada grupo. El primero y más numeroso son las cepas con esporas negras y con pigmento amarillo, como se observa en la fila 1 de la figura 6. De este grupo se tienen a la cepa *Aspergillus niger* N 402 y *Aspergillus awamorii* 3112 como cepas de colección. Otro grupo está conformado por cepas con esporas negras y sin pigmento amarillo, presentadas en la fila 2 de la figura 6. En la tercer fila de la figura 6 se presenta el tercer grupo de cepas, este grupo está conformado por cepas de *Aspergillus flavipes*, esta cepa fue aislada de un jitomate en descomposición por el grupo de fisiología de hongos filamentosos, esta especie se caracteriza por tener esporas blancas y de menor diámetro que las demás cepas, también presentan un diámetro menor de crecimiento comparados con los demás grupos. Las cepas de colección *Aspergillus flavus* CECT 2687, *Aspergillus flavus* NRRL 6541 y *Aspergillus parasiticus* NRRL 502 son las cepas de referencia para el grupo que tiene como característica esporas verdes y algunos ejemplos de cepas se presentan en la fila 4. En la quinta fila se presenta el último grupo que corresponde a cepas con esporas café claro y se tiene como referencia a *Aspergillus terreus*.

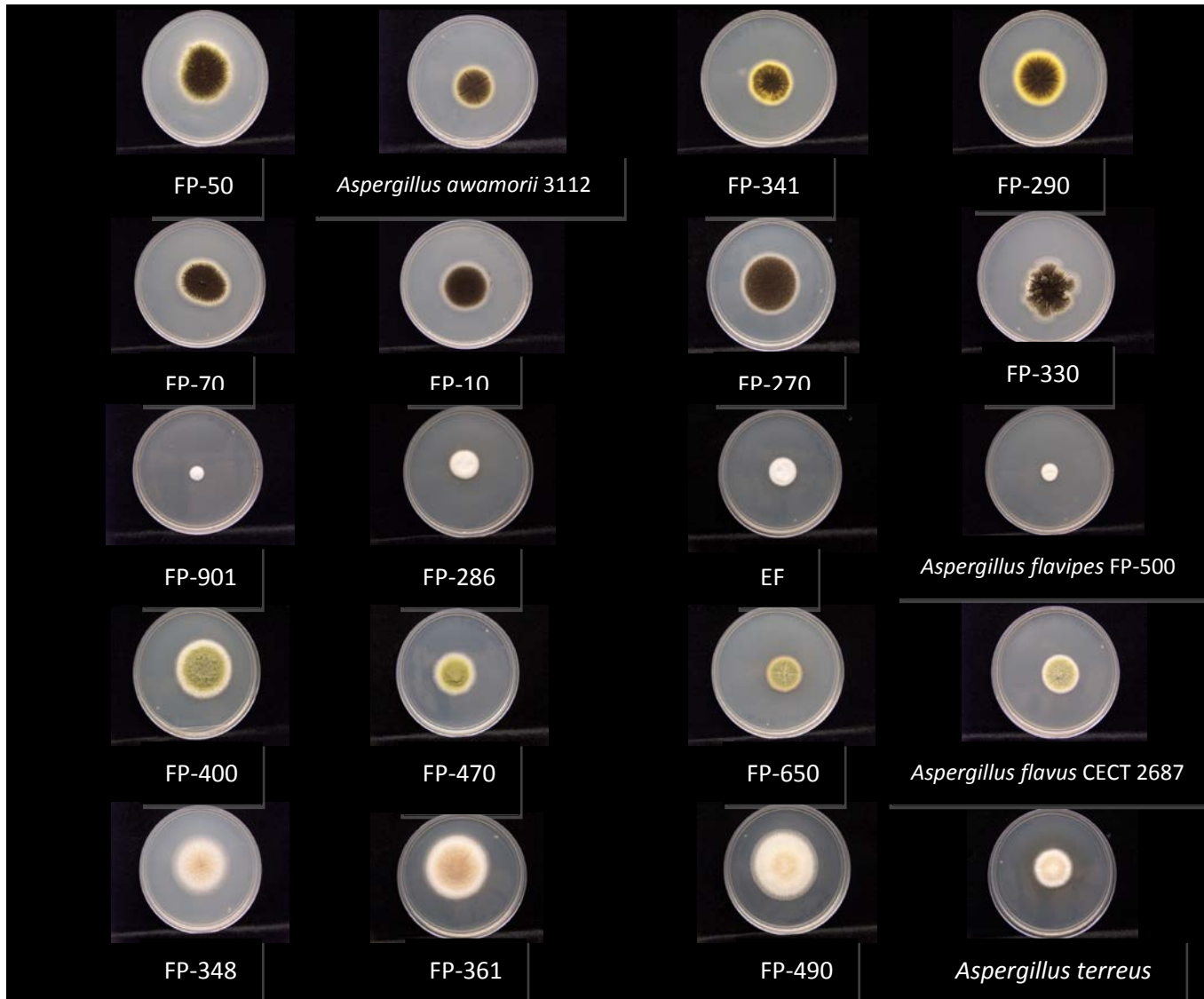


Figura 6. Muestra representativa del cepario del laboratorio.

5.2 Crecimiento en fermentación sólida

Con el objetivo de analizar las características de las cepas en relación con su capacidad para producir enzimas degradadoras de polisacáridos de la pared celular de plantas, se seleccionaron de algunas cepas silvestres de las que fueron recuperadas y algunas de colección para utilizarlas como referencia.

Las cepas seleccionadas FP-80, FP-250, *Aspergillus flavipes* FP-500, *Aspergillus niger* N 402 y *Aspergillus flavus* CECT 2687 fueron inoculadas de acuerdo a las condiciones de crecimiento mostradas anteriormente en medio mínimo con los siguientes sustratos al 1% como fuente de carbono: Glucosa + 0.1% de ácido ferúlico (Glc + AF), xilano (X), pectina (P), cáscara de limón (CL), olote de maíz (OM), salvado de trigo (ST) y α -celulosa (C).

Todas las cajas fueron incubadas a 37 °C por 3 días, a excepción de las cajas que contuvieron medio mínimo con celulosa, en las cuales fue necesario una incubación de 7 días, debido a que no se observó desarrollo a los 3 días (Figura 7)

Se observó el crecimiento de las cinco cepas en función del tiempo y de la fuente de carbono. El desarrollo en las diferentes fuentes de carbono refleja la capacidad de las cepas para degradar el sustrato y este desarrollo se relaciona con la capacidad de las cepas para producir enzimas extracelulares degradadoras de pared celular.

Un micelio denso y mayor esporulación indican mayor disponibilidad de nutrientes en el medio para la célula dada por una buena producción enzimática y/o una fuente de carbono fácilmente asimilable, esto se observa en el crecimiento en los medios con salvado de trigo (ST), cáscara de limón (CL), pectina (P) y xilano (X) como fuente de carbono (fig 7). Por el contrario, un micelio difuso, con largas distancias entre ramificaciones y escasa esporulación indica una baja absorción de nutrientes por parte de la célula, lo que indica una baja capacidad de producción enzimática, como ocurrió en las placas con α -celulosa (C), glucosa +0.1% de ácido ferúlico (Glc + AF) y olote de maíz (OM), esto se observa en la fig

7

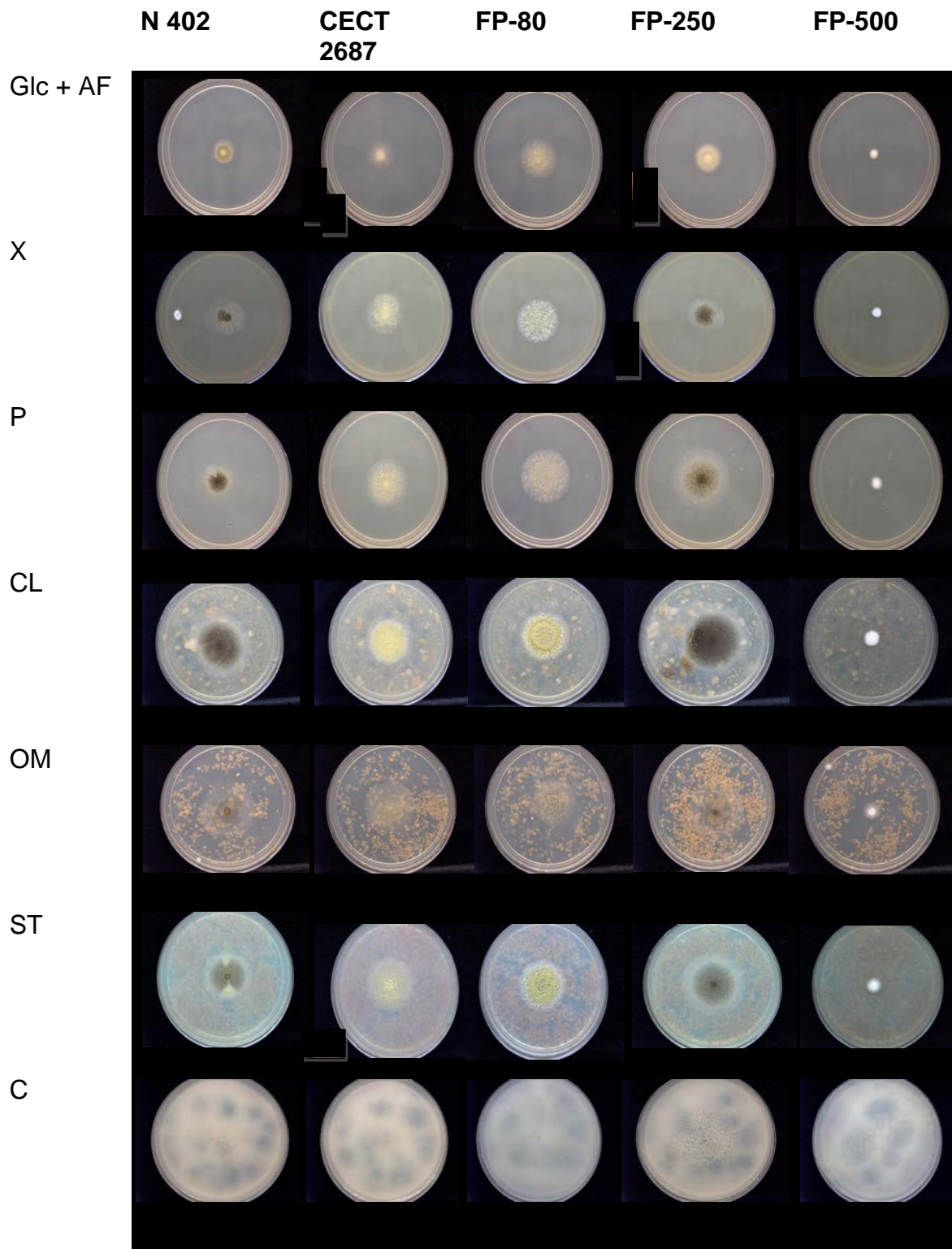


Figura 7. Imágenes del crecimiento de las cepas estudiadas en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono al 1% a 3 días de incubación a 37 ° C, a excepción de las cajas de celulosa, en las que se incubó 7 días.

En la tabla 2 se presentan las características de crecimiento de las cinco cepas en las diferentes fuentes de carbono.

Se asignó una clasificación de (+) a (++++) en función de la densidad del micelio, el grado de esporulación y el radio no esporulado de la colonia. Además, se presenta el diámetro de crecimiento a los 3 días de incubación, y a los 7 días para el caso del medio con α -celulosa (C).

Tabla 2. Características de crecimiento de las cepas en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Cepa				
	N 402	CECT 2687	FP-80	FP-250	FP-500
Glc + AF	d= 1.7 ++	d= 2.3 +	d= 2.9 ++	d= 2.2 ++	d= 0.8 +++
X	d= 2.6 ++	d= 2.5 ++	d= 3 +++	d= 2.3 +++	d= 0.8 +++
P	d= 2.2 +++	d= 3.3 ++	d= 3.6 ++	d= 4 +++	d= 0.8 ++
CL	d= 4.3 +++	d= 4 +++	d= 3.7 ++++	d= 4.4 ++++	d= 1.2 +++
OM	d= 3.8 ++	d= 3.9 ++	d= 3.6 ++	d= 4.4 ++	d= 1.5 ++
ST	d= 3.3 +++	d= 3.7 +++	d= 3.6 ++++	d= 4.4 +++	d= 1.2 ++
C	d= 2 +	d=2 +	d= 7.5 +	d= 5.2 ++	d= 0.4 +

a) d= diámetro (cm).

b) + Micelio difuso no esporulado, ++ Micelio difuso, poco esporulado, +++ Micelio denso, esporulado, ++++ Micelio denso, más esporulado

5.2.1 Cáscara de limón

Como se observa en la figura 7 todas las cepas presentaron buen desarrollo. De acuerdo a las características presentadas en la tabla 2 las cepas autóctonas FP-

80 y FP-250 presentaron la mayor densidad de micelio y esporulación, además la cepa FP-250 presentó el mayor diámetro de crecimiento, mientras que la cepa FP-80 tuvo un diámetro de crecimiento menor que las cepas N 402 y CECT 2687, sin embargo se desarrolló mejor que estas en cuanto a esporulación. Esto refleja la capacidad de las cepas silvestres para asimilar sustratos complejos comparadas con las cepas de colección.

Al igual que en salvado de trigo la cepa FP-80 presentó micelio más denso y mayor esporulación.

5.2.2 Salvado de trigo

En salvado de trigo todas las cepas presentaron buen crecimiento. Como se observa en la tabla 2 la cepa FP-80 fue la que presentó mayor esporulación y densidad de crecimiento en este sustrato. Mientras que la cepa FP-500 fue la que esporuló en menor grado.

5.2.3 Pectina

Como se observa en la figura 7 y en la tabla 2 todas las cepas se desarrollaron bien en este sustrato. Principalmente las cepas FP-250 y N 402 tuvieron mejor desarrollo que las demás cepas como se observa en la tabla 2 ya que en el caso de la cepa FP-250 presentó el mayor diámetro de crecimiento y una buena esporulación, mientras que la cepa N 402 tuvo un diámetro de crecimiento menor que las cepas CECT 2687 y FP-80, sin embargo, esta cepa esporuló mejor que las anteriores.

5.2.4 Xilano

En esta fuente de carbono las cepas en general tuvieron un desarrollo medio. Las cepas que tuvieron mejor desarrollo de acuerdo a la tabla 2 fueron las cepas autóctonas FP-80, FP-250 y FP-500.

5.2.5 Glucosa + 0.1% de ácido ferúlico

Como se observa en la figura 7 todas las cepas estudiadas toleran concentraciones de 0.1% o menores de ácido ferúlico. Sin embargo se observó un

diámetro de crecimiento de dos a tres veces menor a las cajas control con glucosa al 1% (Datos no mostrados).

De acuerdo a los datos de la tabla 2 la cepa FP-500 fue la que mejor desarrollo tuvo en el medio con 1 % de glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico. Esto puede indicar que la cepa FP-500 es productora de feruloilesterasa ya que se ha reportado la inducción de feruloil esterasa en medios complejos conteniendo concentraciones de 0.01 a 0.05 % de ácido ferúlico (Faulds, et. al, 1997). Estos resultados coinciden con los obtenidos en las cajas con etilferulato como fuente de carbono y presentados en la siguiente sección (figura 8 y 9).

5.2.6 Olote de maíz

En este sustrato todas las cepas presentaron micelio difuso y baja esporulación.

5.2.7 α -Celulosa

En el caso de las cajas de celulosa se observó que la esporulación de las cepas a un tiempo de 7 días fue baja. Como se observa en la figura 7 y de acuerdo al diámetro de crecimiento mostrado en la tabla 2 las cepas que se desarrollaron mejor en este sustrato fueron las cepas nativas FP-80 y FP-250. Esto puede indicar una pérdida de en la producción enzimática en las cepas de colección.

Especialmente la cepa FP-250, la cual si bien tuvo una esporulación difusa a comparación de la esporulación producida en otras fuentes de carbono, fue la cepa que esporuló mejor en este sustrato como se observa en la tabla 2. Esto puede indicar que la cepa FP-250 es mejor productora de celulasas.

En la tabla 2 se observa que la cepa FP-80 presentó el mayor diámetro de crecimiento, aunque sin esporulación, comparándola con los demás sustratos en los que se estudió y con las demás cepas en todos los sustratos. El diámetro de crecimiento micelial puede indicar la búsqueda de nuevos nutrientes por parte del microorganismo al tener poca capacidad para degradar α -celulosa. Estos resultados podrían indicar que la cepa nativa FP-80 en hábitats naturales podría sobrevivir mejor que las cepas de colección en sustratos de difícil asimilación al

utilizar sus reservas y nutrientes que puede captar en el medio para extenderse a buscar otros sustratos.

5.3 Crecimiento en cajas con etilferulato como fuente de carbono

Se realizó un ensayo cualitativo para detectar la producción de feruloilesterasa en medio sólido utilizando como única fuente de carbono etilferulato (EF). Estos resultados se muestran en las figuras 8 y 9. La degradación de etilferulato se observó como un halo de degradación alrededor de la colonia y esto se tomó como evidencia de producción de actividad de feruloilesterasa (Donaghy, 1998).

Para este ensayo se trabajó con las siguientes cepas: *Aspergillus flavipes* FP-500, *Aspergillus niger* N 402, *Aspergillus flavus* CECT 2687, FP-80, una cepa verde aislada por el grupo y posiblemente perteneciente a *Aspergillus flavus*, FP-250, FP-290 y FP-690, estas tres últimas son cepas negras y posibles cepas *Aspergillus niger* (figura 8).

Se observó que la cepa FP-500 fue la única que presentó halo de degradación (figura 8) esto se observó a los 9 días de incubación a 37 °C. Las cepas FP-80 y la cepa *Aspergillus flavus* CECT 2687, también presentaron crecimiento en este medio a los 4 días (figura 8). Las cepa *Aspergillus niger* N 402 y las posibles cepas pertenecientes a esta especie FP-250, FP-290 y FP-690 no presentaron crecimiento en esta fuente de carbono (figura 8, inciso e y f).

Se realizaron cajas control en los que se adicionaron al medio extracto de levadura y extracto de levadura con menores cantidades de etilferulato, Como se observa en la figura 7 el disolvente dimetilformamida, y mayores concentraciones de etilferulato producen inhibición del crecimiento.

En la figura se presenta el crecimiento de las cepas en las cajas control de etilferulato. La tabla 3 presenta el diámetro de crecimiento correspondiente a los incisos de la figura 8. Los incisos a), b) y c) muestran el crecimiento de cepas a 2 días de incubación a 37°C, en estas cajas las cepas se inocularon en el orden de las manecillas de reloj de la siguiente forma: FP-250, FP-290, FP-690, N 402, FP-500. Como se observa en el inciso b) de esta figura todas las cepas pudieron

desarrollarse en el medio sin etilferulato, sin embargo se observa una inhibición en el crecimiento debida al disolvente dimetilformamida; en el inciso c) se observa que todas las cepas toleran una concentración de 10 μg de etilferulato, sin embargo, se observa una mayor inhibición en el desarrollo de las cepas en esta condición comparada con el medio que sólo tiene dimetilformamida, esto se observa en el diámetro de crecimiento de las cepas en la tabla 3. Los incisos d) al f) muestran el crecimiento de la cepas en orden de manecillas de reloj FP-500, FP-250, N 402, FP-80 y CECT 2687 a 37°C, en el caso de los incisos d) y e) se muestra el desarrollo a 4 días de incubación y en el inciso f) se muestra el crecimiento a 5 días de incubación. Como se observa en la figura 8 30 μg de etilferulato inhibieron el desarrollo de las cepas, en el caso de las cepas FP-500, CECT 2687 y FP-80 el diámetro de crecimiento fue menor que el mostrado en el medio control en donde se agregó dimetilformamida (tabla 3), mientras que las cepas FP-250 y N 402 no presentaron crecimiento. A los 5 días de incubación se observa un incremento en el diámetro de crecimiento de las cepas FP-500, CECT 2687 y FP-80 (tabla 3), sin embargo, las cepas FP-250 y N 402 no se desarrollaron (figura 8).

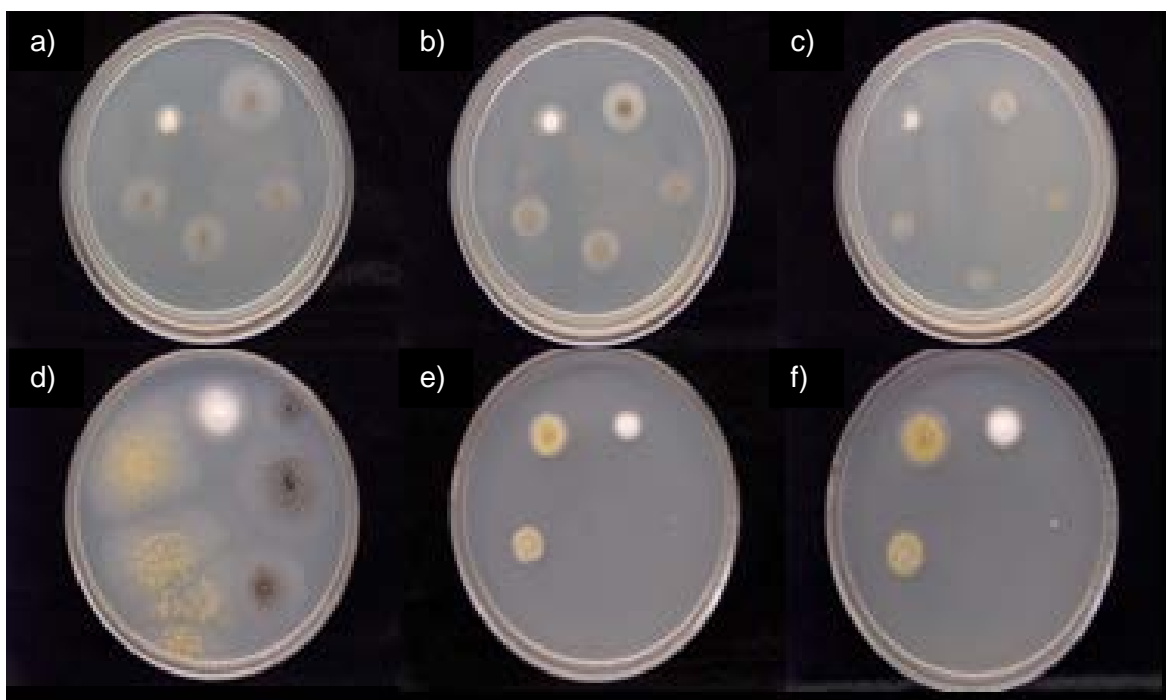


Figura 8. a) medio mínimo + extracto de levadura al 0.1%, b) medio mínimo + extracto de levadura al 0.1% + 300 μ L de dimetilformamida, c) medio mínimo + extracto de levadura al 0.1% + 10 μ g de etilferulato en dimetilformamida, d) medio mínimo + extracto de levadura al 0.1% + dimetilformamida, e) y f) medio mínimo + extracto de levadura al 0.1% + 30 μ g de etilferulato en dimetilformamida.

Tabla 3. Diámetro de crecimiento de las cepas inoculadas en las cajas control de etilferulato. Los datos mostrados corresponden a los incisos de la figura 8. Los incisos a), b) y c) muestran el crecimiento de cepas a 2 días de incubación a 37°C, en estas cajas las cepas se inocularon en el orden de las manecillas de reloj de la siguiente forma: FP-250, FP-290, FP-690, N 402, FP-500, en el caso de los incisos d) y e) se muestra el desarrollo a 4 días de incubación y en el inciso f) se muestra el crecimiento a 5 días de incubación.

Diámetro del crecimiento (cm)					
Caja	Cepa				
	FP-250	FP-290	FP-690	N 402	FP-500
a)	2	1.6	1.6	1.5	1
b)	1.2	1.4	1.4	1.3	1
c)	1	1	0.8	1	0.8
d)	FP-500	FP-250	N 402	FP-80	CECT 2687
	2.2	3.5	2.4	>3.5	>3.5
e)	1.1	0	0	1	1.5
f)	1.2	0	0	1.5	1.8

Los datos corresponden a los incisos de la figura. Las cepas se presentan en el orden correspondiente a la figura, en el orden de las manecillas del reloj.

La figura 9 muestra la inoculación de las cepas FP-250, FP-290, FP-690, N 402 y FP-500 en medio mínimo + extracto de levadura al 0.1% + 30 μg de etilferulato en dimetilformamida a 37 °C, esta caja corresponde al medio completo de las condiciones control mostradas en los incisos a) al c) de la figura 8. Se muestra únicamente la cepa FP-500, porque fue la única que creció a esta concentración de etilferulato y que formó halo de degradación

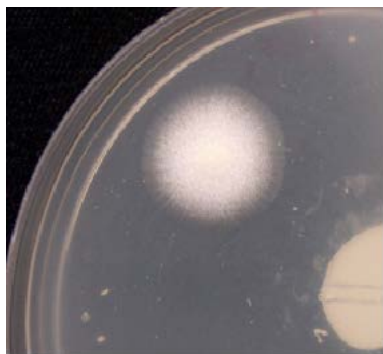


Figura 9. Desarrollo de la cepa FP-500 en medio mínimo + extracto de levadura al 0.1% + 30 μg de etilferulato en dimetilformamida a 9 días de incubación. La cepa presentó un diámetro de crecimiento de 1.8 cm y un halo de degradación de 1.2 cm.

De acuerdo a las figura 8 se observa que el disolvente dimetilformamida inhibió el crecimiento de las cepas. El sustrato etilferulato también inhibe el crecimiento de las cepas, esto puede deberse a que al no tener otra fuente de carbono las cepas no puedan desarrollarse debido a la falta de enzimas capaces de degradar este sustrato como la feruloilesterasa (Donaghy, 1998). Se observó que a mayores concentraciones de etilferulato mayor es la inhibición de algunas cepas, ya que en el inciso c) de la figura, todas las cepas pudieron crecer en presencia de 10 μg de etilferulato, mientras que en el medio con 30 μg de etilferulato (incisos e) y f) de la figura 8), se observa que sólo las cepa CECT 2687, FP-80 y FP-500 se desarrollaron con 30 μg de etilferulato como fuente de carbono, la cepa FP-500 fue la única que mostró halo de degradación (figura 9).

Estos resultados sugieren a estas las cepas CECT 2687, FP-80 y FP-500 como cepas productoras de feruloilesterasa. Esto coincide con los resultados obtenidos por parte de la cepa FP-500 en presencia de 0.1% de ácido ferúlico.

5.4 Resultados de actividad en fermentación sólida

Con la finalidad de conocer la actividad que se produjo en los diferentes sustratos y en las diferentes cepas cuando fueron incubadas en fermentación sólida se determinaron las actividades específicas xilanólica, exopectinolítica y celulolítica (U/ mg de peso seco). Además se determinó la relación peso seco/ diámetro (mg /mm) al final de la incubación de las cajas.

En la tabla 4 se presenta la relación peso seco/ diámetro (mg /mm) del desarrollo a 4 días y 7 días para la fuente α -celulosa de las cepas estudiadas en las diferentes fuentes de carbono Glc: glucosa, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, OM: olote de maíz, ST: salvado de trigo y C: α -celulosa.

Los valores resultantes de la relación peso seco/ diámetro dan una medida de la abundancia del crecimiento. Valores iguales a uno resultan de un peso seco y un diámetro del mismo valor, lo que habla de un buen crecimiento. Valores mayores a uno se dan cuando los valores del peso seco rebasan los del diámetro, esto habla de un crecimiento muy denso o esporulación densa, mientras que valores menores a uno implican un diámetro grande pero un micelio difuso, esto se traduce en baja asimilación de nutrientes en el medio.

De acuerdo a lo anterior y a lo que se observa en la tabla 4, los resultados de peso seco/ diámetro en los diferentes sustratos pueden clasificarse en tres tipos de crecimiento; en glucosa y xilosa se observan valores altos e incluso en algunos casos mayores a uno, lo que indica que en general las cepas formaron un micelio denso en estos sustratos de fácil asimilación y promovieron el incremento de biomasa. En xilano, pectina, cáscara de limón y salvado de trigo, se observaron valores entre 0.6 y 0.2 mg/ mm, esto indica que en estos sustratos el micelio fue menos denso y el diámetro de crecimiento fue menor, esto puede observarse en la figura 8, el retraso del crecimiento en función del tiempo en estas fuentes de carbono puede explicarse por el tiempo requerido para la producción de enzimas degradadoras de pared celular en comparación con el crecimiento en azúcares. Por último, en los sustratos olote de maíz y α -celulosa se observaron valores entre 0.3 y 0.1 mg/ mm, en olote de maíz las cepas produjeron diámetros pequeños y poco

esporulados, mientras que en α -celulosa produjeron diámetros grandes y muy difusos (figura 8), estos resultados indican que estas fuentes de carbono son las de más difícil asimilación.

Tabla 4. Relación peso seco/ diámetro de crecimiento de las cepas en las diferentes fuentes de carbono estudiadas.

Peso seco/ diámetro (mg/mm)					
	N 402	CECT 2687	FP-80	FP-250	FP-500
Glc	1.1	0.6	0.7	1.3	0.9
Xyl	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8
X	0.3	0.5	0.6	0.3	0.4
P	0.4	0.2	0.5	0.4	0.2
CL	0.7	0.4	0.6	0.5	0.2
OM	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2
ST	0.6	0.5	0.5	0.3	0.3
C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2

En general se observó que los azúcares glucosa y xilosa no promovieron grandes cantidades de actividad, a excepción de algunas cepas en las que se promovieron las actividades pectinolítica y celulolítica (figuras 10, 11 y 12). En las fuentes de carbono α -celulosa y olote de maíz se presentó el menor crecimiento, en estos sustratos en general se promovieron valores medios de actividad (figuras 10, 11 y 12).

En las figuras 10 a la 12 se muestra la actividad enzimática reportada en U/ mg de peso seco en función de la fuente de carbono al 1% en medio sólido con pH inicial = 5 a los 4 días de crecimiento a 37°C. Las fuentes de carbono se muestran en el siguiente orden Glc: glucosa, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, OM: olote de maíz, ST: salvado de trigo y C: α -celulosa.

Para todas las cepas se encontró que las fuentes de carbono α -celulosa, xilano, olote de maíz y salvado de trigo promovieron la producción de actividad xilanolítica. En el caso de la producción de actividad exopectinolítica se observó que fue promovida en general por pectina y en algunos casos por cáscara de limón, α -celulosa y olote de maíz. En el caso de la producción de actividad celulolítica se observó que se favoreció con la utilización de salvado de trigo en el caso de todas las cepas.

5.4.1 Actividad xilanolítica en fermentación sólida

Como se observa en el inciso A de la figura 10. En xilano y salvado de trigo la cepa N 402 produjo la mejor actividad xilanolítica, 20.1 U/ mg y 12.6 U/ mg, respectivamente. La siguiente mejor producción de actividad xilanolítica se obtuvo en olote de maíz (10.6 U/ mg). La menor producción se observó en las fuentes α -celulosa (6.3 U/ mg), glucosa (1.1 U/ mg), xilosa (1.0 U/ mg), cáscara de limón (1.0 U/ mg), y pectina (0.2 U/ mg).

En el inciso B de la figura 10 se observa que la cepa CECT 2687 produjo la mejor actividad xilanolítica, 40.0 U/ mg, cuando se desarrolló en α -celulosa como fuente de carbono. La segunda mejor producción de actividad xilanolítica ocurrió en salvado de trigo con un valor de 19.1 U/ mg, mientras que en olote de maíz hubo una producción de 11.4 U/ mg. En xilano se obtuvo un valor de actividad promedio menor a 8 U/ mg. La actividad xilanolítica más baja se observó en xilosa, cáscara de limón, glucosa y pectina con valores menores a 4 U/ mg.

La cepa FP-80 tuvo la mejor producción de actividad xilanolítica en el sustrato α -celulosa donde produjo 21.0 U/ mg, en los sustratos xilano y olote de maíz se produjo el segundo mejor nivel de actividad, los valores obtenidos fueron de 16.4 U/

mg y 15.0 U/ mg respectivamente (inciso C de la figura 9). Las fuentes de xilosa, salvado de trigo, cáscara de limón y glucosa produjeron valores menores a 4.0 U/ mg. Hubo una producción de 0.1 U/ mg de actividad xilanolítica cuando se utilizó pectina como fuente de carbono.

Como se observa en la figura 10, inciso D los sustratos que mejor promovieron actividad xilanolítica para la cepa FP-250 fueron olote de maíz (14.1 U/mg), xilano (10.8 U/ mg), α -celulosa (10.3 U/mg) y salvado de trigo (10.3 U/ mg). Menor actividad se obtuvo al utilizar los sustratos xilosa (2.0 U/ mg), cáscara de limón (1.5 U/ mg), glucosa (0.2 U/ mg) y pectina 0.1 U/ mg).

De acuerdo a los resultados que se presentan en el inciso E de la figura 10 la cepa FP-500 presentó mayor actividad xilanolítica en los sustratos salvado de trigo, α -celulosa y xilano, en el primero se obtuvo 27.9 U/ mg, en α -celulosa se obtuvo 25.9 U/ mg y en xilano se obtuvo 25.0 U/ mg. En olote de maíz la actividad xilanolítica fue de 7.9 U/ mg, mientras que en xilosa se obtuvo una actividad de 2.7 U/ mg. Las fuentes de pectina, cáscara de limón produjeron 1.4 U/ mg y 0.8 U/ mg respectivamente, en glucosa se obtuvo la menor actividad xilanolítica, 0.1 U/ mg.

De acuerdo a la figura 10 para todas las cepas los sustratos α -celulosa, xilano, salvado de trigo y olote de maíz produjeron los mayores niveles de actividad xilanolítica específica mientras que los sustratos cáscara de limón, pectina, xilosa y glucosa produjeron los menores niveles de actividad.

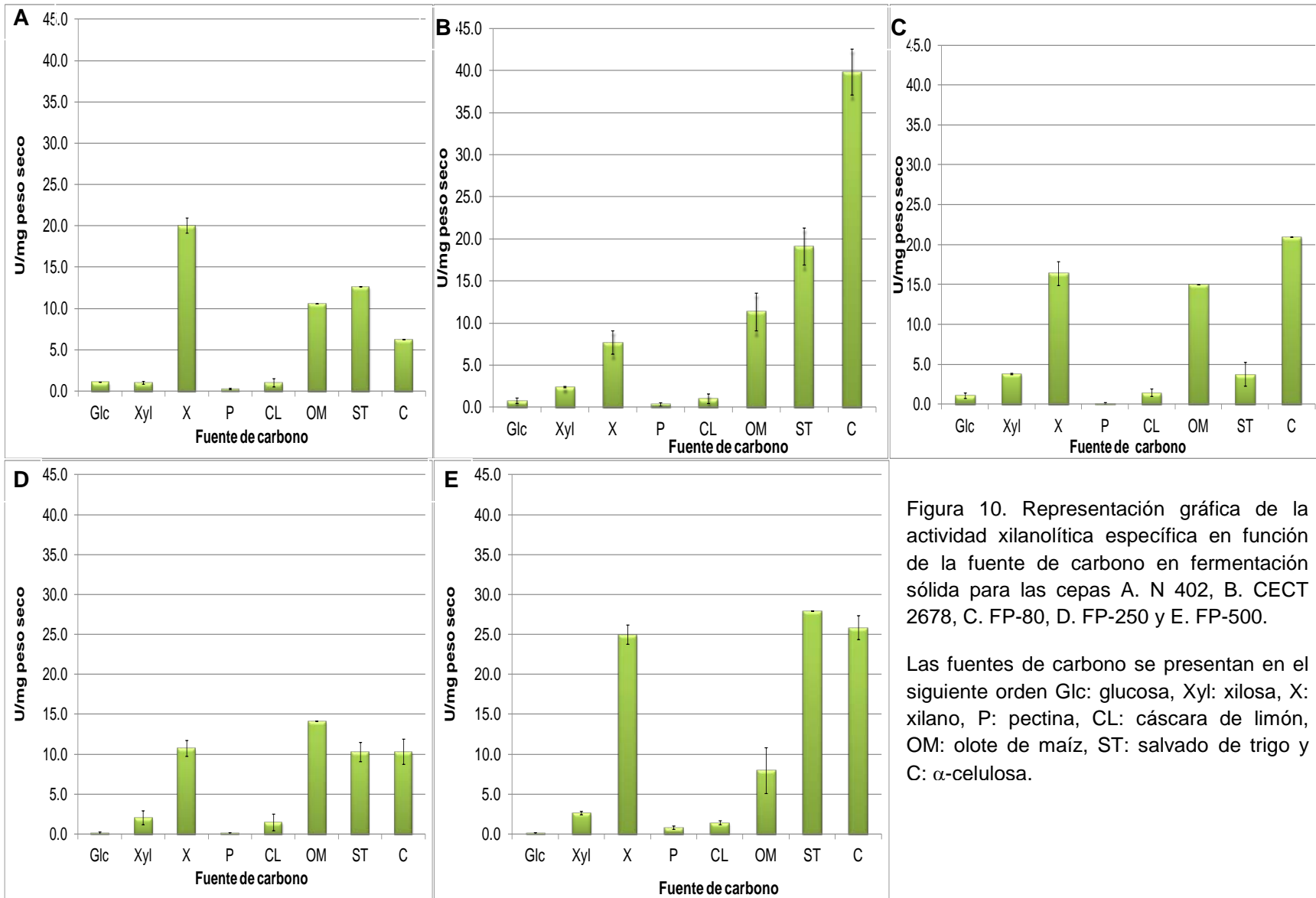


Figura 10. Representación gráfica de la actividad xilanólica específica en función de la fuente de carbono en fermentación sólida para las cepas A. N 402, B. CECT 2678, C. FP-80, D. FP-250 y E. FP-500.

Las fuentes de carbono se presentan en el siguiente orden Glc: glucosa, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, OM: olote de maíz, ST: salvado de trigo y C: α -celulosa.

5.4.1.1 Efecto del sustrato en la actividad xilanolítica específica

No se puede concluir un mejor sustrato para la producción de xilanasas en general, ya que cada sustrato tuvo un efecto distinto en cada cepa, por lo que dependiendo de la cepa, hay sustratos que indujeron mayor actividad xilanolítica.

A continuación se comparan los resultados asociados a las 4 fuentes de carbono que indujeron mayor actividad xilanolítica

En α -celulosa, la cepa CECT 2687 produjo los mayores valores de actividad, el orden decreciente de producción de actividad xilanolítica de las demás cepas fue FP-500, FP-80, FP-250 y por último la cepa N 402.

El orden de los valores de actividad xilanolítica de mayor a menor observado en xilano fue el siguiente; FP-500, N 402, FP-80 y por último las cepas FP-250 y CECT 2687.

La cepa que produjo mayor nivel de actividad xilanolítica en salvado de trigo fue la cepa FP-500, seguida de la cepa CECT 2687, en el tercer mejor nivel de actividad se encontraron las cepas FP-250 y N 402, y por último la cepa FP-80.

En olote de maíz la cepa FP-80 fue la mejor productora de actividad xilanolítica, seguida de la cepa FP-250, las cepas CECT 2687, N 402 y FP-500 produjeron la menor actividad.

5.4.1.2 Efecto de la cepa en la actividad xilanolítica

La cepa N 402 produjo el segundo mejor nivel de actividad en xilano, después del producido por la cepa FP-500, comparado con las demás cepas. Además produjo el tercer mejor nivel de actividad en salvado de trigo.

La cepa CECT 2687 produjo los mejores niveles de actividad xilanolítica en α -celulosa comparada con las demás cepas. También produjo el segundo mayor nivel de actividad en salvado de trigo.

La cepa FP-80 produjo el valor más alto de actividad xilanolítica en olote de maíz y el tercer valor más alto de xilanasas en α -celulosa y xilano.

La cepa FP-250 produjo el segundo mejor nivel de actividad en olote de maíz, además tuvo mayor actividad específica en α -celulosa comparada con la cepa control N 402. En salvado de trigo, al igual que la cepa N 402 produjo el tercer mejor nivel de actividad específica.

De lo anterior se observa que la cepa N 402 produce mayor actividad en sustratos de más fácil asimilación como lo es el xilano que en sustratos de mayor difícil degradación, como el sustrato α -celulosa, en comparación con la cepa FP-250.

La cepa FP-500 produjo los mayores niveles de actividad xilanolítica en xilano y salvado de trigo comparada con las demás cepas, además obtuvo el segundo mejor nivel de actividad en α -celulosa.

Esto podría indicar que el sustrato α -celulosa induce la producción de xilanasas en *Aspergillus flavus* y *Aspergillus flavipes* en mayor proporción que en las otras cepas estudiadas.

De estos resultados se observa que la cepa FP-500 y la cepa CECT 2678 producen niveles altos de actividad enzimática en diferentes sustratos.

5.4.2 Actividad pectinolítica en fermentación sólida

En la figura 11 se presentan los resultados de las determinaciones de actividad pectinolítica, en el inciso A se observa que la mayor actividad pectinolítica para la cepa N 402 se presentó en pectina con un valor de 3.8 U/ mg. Las fuentes α -celulosa (3.6 U/ mg) y cáscara de limón (2.7 U/ mg) produjeron el segundo mejor nivel de actividad. En las fuentes glucosa, olote de maíz, xilano y xilosa se presentaron 2.1 U/ mg, 1.9 U/ mg, 1.6 U/ mg y 1.3 U/ mg respectivamente. En salvado de trigo se presentó la menor actividad pectinolítica, 0.8 U/ mg.

En el inciso B de la figura 11 se observa que para la cepa CECT 2687 la pectina promovió la mejor actividad exopectinolítica en comparación con las demás fuentes de carbono con un valor de 7.2 U/ mg. En α -celulosa se obtuvo el segundo mejor valor de actividad 5.2 U/ mg. En las fuentes olote de maíz y glucosa se obtuvieron valores de 3.2 U/ mg y 3.0 U/ mg. En cáscara de limón, salvado de trigo, xilosa y xilano se obtuvieron valores de 1.6 U/ mg, 1.0 U/ mg, 0.8 U/ mg y 0.5 U/ mg respectivamente.

La producción de actividad exopectinolítica para la cepa FP-80 se encontró dentro del intervalo de 0.7 a 1.3 U/ mg (inciso C de la figura 10). Las mayores actividades se encontraron en los sustratos α -celulosa, cáscara de limón, olote de maíz, todos estos sustratos con 1.3 U/ mg, salvado de trigo (1.0 U/ mg) y xilano (0.9 U/ mg). Las menores actividades se encontraron en glucosa (0.8 U/ mg), pectina (0.7 U/ mg) y xilosa (0.5 U/ mg).

En el inciso D de la figura 11 se presentan los resultados de la cepa FP-250. En pectina esta cepa presentó la mayor actividad pectinolítica con un valor de 5.8 U/ mg. La segunda mejor actividad se obtuvo en α -celulosa con un valor de 3.6 U/ mg. Los sustratos xilano, cáscara de limón y olote de maíz presentaron actividades de 1.6 U/ mg, 1.5 U/ mg y 1.3 U/ mg respectivamente. Los sustratos en los que se obtuvieron los menores valores de actividad específica fueron salvado de trigo (1.0 U/ mg), xilosa (0.6 U/ mg) y glucosa (0.2 U/ mg).

La cepa FP-500 produjo la mejor actividad en cáscara de limón, seguida de la actividad producida en pectina, 9.7 U/ mg y 9.0 U/ mg respectivamente, en olote de maíz se produjo una actividad de 6.5 U/ mg (inciso E de la figura 11). Los menores valores de actividad se obtuvieron en glucosa (4.0 U/ mg), salvado de trigo (2.7 U/ mg), α -celulosa (2.7 U/ mg), xilano (2.6 U/ mg) y xilosa (2.5 U/ mg).

Se observó que los sustratos que mejor indujeron la actividad exopectinolítica en general fueron pectina, cáscara de limón, olote de maíz y α -celulosa, en las cepas FP-80 y FP-250 el sustrato xilano produjo valores altos de actividad. Se observó que en la cepa CECT 2687 cuando se inoculó en glucosa se indujeron niveles medios de actividad exopectinolítica comparado con los demás sustratos utilizados. Para las demás cepas las menores actividades pectinolíticas se obtuvieron en xilano, glucosa, xilosa y salvado de trigo. Debido a la cantidad inicial de azúcares reductores del sustrato cáscara de limón no se observó mayor inducción de actividad exopectinolítica comparada con la fuente de carbono pectina.

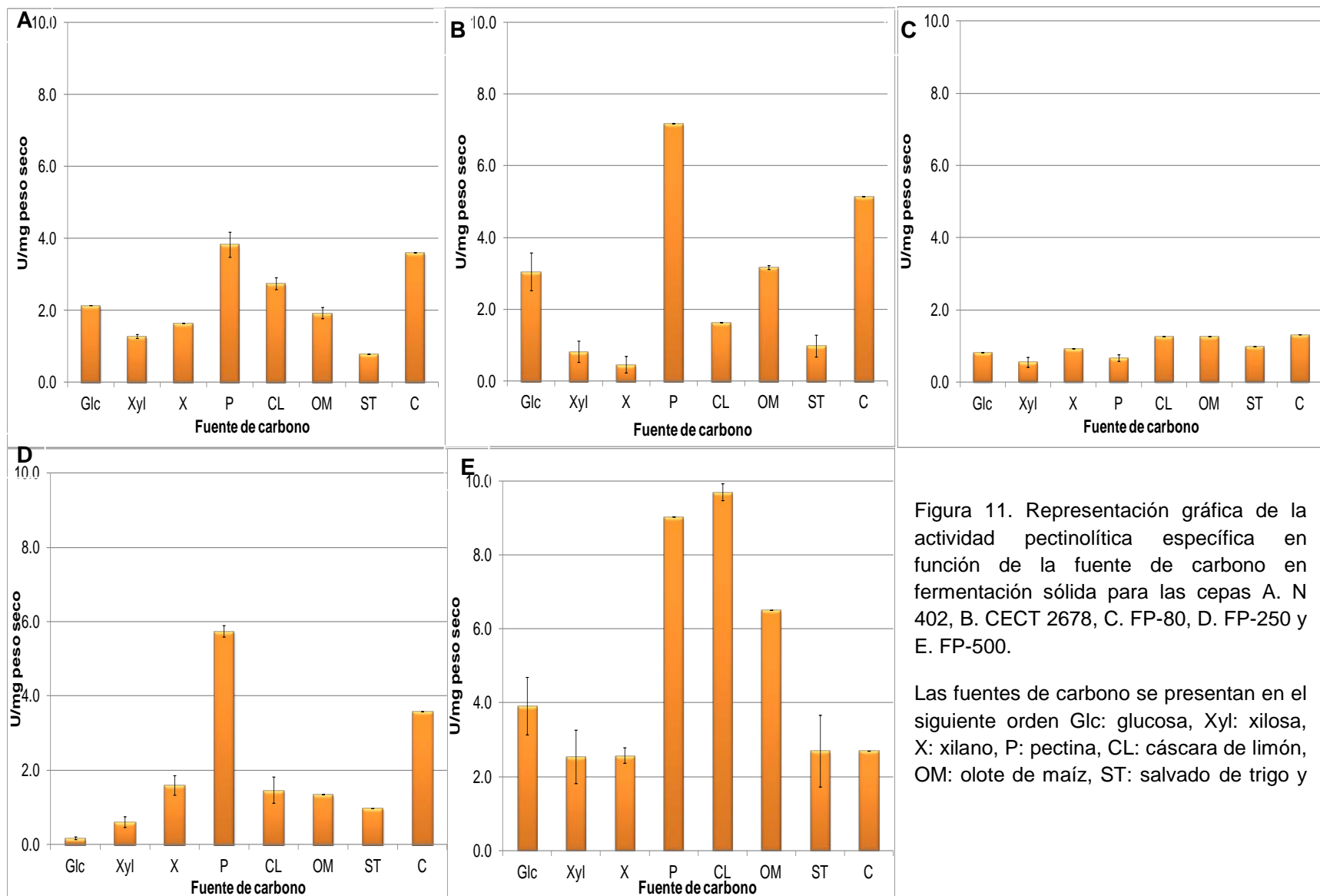


Figura 11. Representación gráfica de la actividad pectinolítica específica en función de la fuente de carbono en fermentación sólida para las cepas A. N 402, B. CECT 2678, C. FP-80, D. FP-250 y E. FP-500.

Las fuentes de carbono se presentan en el siguiente orden Glc: glucosa, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, OM: olote de maíz, ST: salvado de trigo y

5.4.2.1 Efecto del sustrato en la actividad exopectinolítica

A continuación se comparan los resultados asociados a las fuentes de carbono que indujeron mayor actividad exopectinolítica.

En pectina las cepas CECT 2687, FP-500 y FP-250 obtuvieron los mejores niveles de actividad exopectinolítica, las cepas FP-250 y FP-80 obtuvieron los menores valores de actividad.

En cáscara de limón la cepa FP-500 produjo la mayor actividad exopectinolítica comparadas con las demás cepas.

Las cepas FP-500 y CECT 2687 produjeron los mayores valores de actividad pectinolítica en olote de maíz. Las cepas N 402, FP-80 y FP-250 obtuvieron la menor actividad en este sustrato comparadas con las demás cepas.

La cepa CECT 2687, N 402 y FP-250 fueron las cepas que produjeron mayor actividad exopectinolítica en α -celulosa.

La fuente de carbono glucosa indujo mayor actividad pectinolítica en las cepas de colección CECT 2687 y N 402 y en la cepa FP-500 comparadas con las demás cepas. Esto puede deberse al efecto de pectinasas constitutivas como lo han sugerido resultados anteriores para la cepa FP-500 (Martínez, 2009).

5.4.2.2 Efecto de la cepa en la actividad exopectinolítica

La cepa N 402 obtuvo el segundo mejor valor de actividad pectinolítica en los sustratos cáscara de limón y α -celulosa comparada con las demás cepas. Se observó, al igual que en la cepa CECT 2687 y FP-500, una mayor inducción de actividad pectinolítica en el sustrato glucosa, en comparación con las cepas nativas.

La cepa CECT 2687 produjo el valor más alto de actividad exopectinolítica en α -celulosa comparada con las demás cepas. Además produjo después de la cepa FP-500 valores altos de actividad en las fuentes pectina, cáscara de limón y olote de maíz.

La cepa FP-80 tuvo la menor actividad pectinolítica comparada con las demás cepas.

La cepa FP-250 obtuvo la mejor actividad pectinolítica al igual que las cepas CECT 2687 en pectina.

La cepa FP-500 tuvo mayor actividad en los sustratos cáscara de limón, pectina y olote de maíz comparada con las demás cepas.

De estos resultados se puede decir que las cepas CECT 2687 y FP-500 produjeron mayores niveles de actividad pectinolítica que las demás cepas en pectina, olote de maíz, cáscara de limón y α -celulosa.

5.4.3 Actividad celulolítica en fermentación sólida

En el inciso A de la figura 12 se observa que la cepa N 402 produjo los valores más altos de actividad celulolítica específica en olote de maíz (0.8 U/ mg), pectina (0.8 U/ mg), xilano (0.7 U/ mg) y salvado de trigo (0.6 U/ mg). En las fuentes xilosa, α -celulosa y cáscara de limón produjo 0.3 U/ mg, 0.2 U/ mg y 0.2 U/ mg respectivamente, en glucosa se produjo la menor actividad.

En xilosa (0.9 U/ mg) se observó el valor más alto de actividad celulolítica para la cepa CECT 2687 (figura 12 inciso B). Los siguientes mejores valores se observaron en salvado de trigo (0.5 U/ mg), glucosa (0.5 U/ mg) y pectina (0.4 U/ mg). En olote de maíz se produjo una actividad de 0.3 U/ mg, en α -celulosa y cáscara de limón se produjo 0.2 U/ mg, mientras que en xilano se obtuvo la menor producción (0.1 U/ mg).

En el inciso C de la figura 12 se presentan los resultados de actividad celulolítica para la cepa FP-80. En α -celulosa (1.9 U/ mg), xilosa (0.9 U/ mg) y salvado de trigo (0.7 U/ mg) la cepa FP-80 produjo la mayor actividad celulolítica. En glucosa y en cáscara de limón se produjo una actividad de 0.5 U/ mg. Se produjo una actividad específica de 0.4 U/ mg, 0.3 U/ mg y 0.2 U/ mg en las fuentes olote de maíz, xilano y pectina respectivamente.

En el inciso D se observa que la cepa FP-250 produjo los mejores niveles de actividad en las fuentes olote de maíz (1.4 U/ mg), salvado de trigo (1.2 U/ mg), xilano (1.2 U/ mg), pectina (1.0 U/ mg). En α -celulosa se observó una actividad de 0.5 U/ mg. En las fuentes glucosa y cáscara de limón la cepa FP-250 produjo una actividad de 0.3 U/ mg, mientras que en xilosa se presentó una actividad específica de 0.1 U/ mg.

Las mejor fuente de carbono para la producción de actividad celulolítica para la cepa FP-500 fue salvado de trigo (1.8 U/ mg). La siguiente mejor actividad fue observada en los sustratos xilosa (1.3 U/ mg), α -celulosa (1.2 U/ mg), xilano (1.1 U/ mg), olote de maíz (0.8 U/ mg) y cáscara de limón (0.7 U/ mg). La menor actividad celulolítica se presentó en pectina y glucosa (figura 12 inciso E).

5.4.3.1 Efecto del sustrato en la actividad celulolítica específica

Se observó que los sustratos salvado de trigo, xilano, xilosa, α -celulosa, olote de maíz y pectina promovieron mayor actividad celulolítica comparada con los demás sustratos.

5.4.3.2 Efecto de la cepa en la actividad celulolítica específica

Los valores más altos de actividad se obtuvieron en las cepas autóctonas. La cepa FP-80 en α -celulosa, la cepa FP-250 en xilano, pectina, olote de maíz y salvado de trigo y la cepa FP-500 en xilosa, xilano, salvado de trigo y α -celulosa.

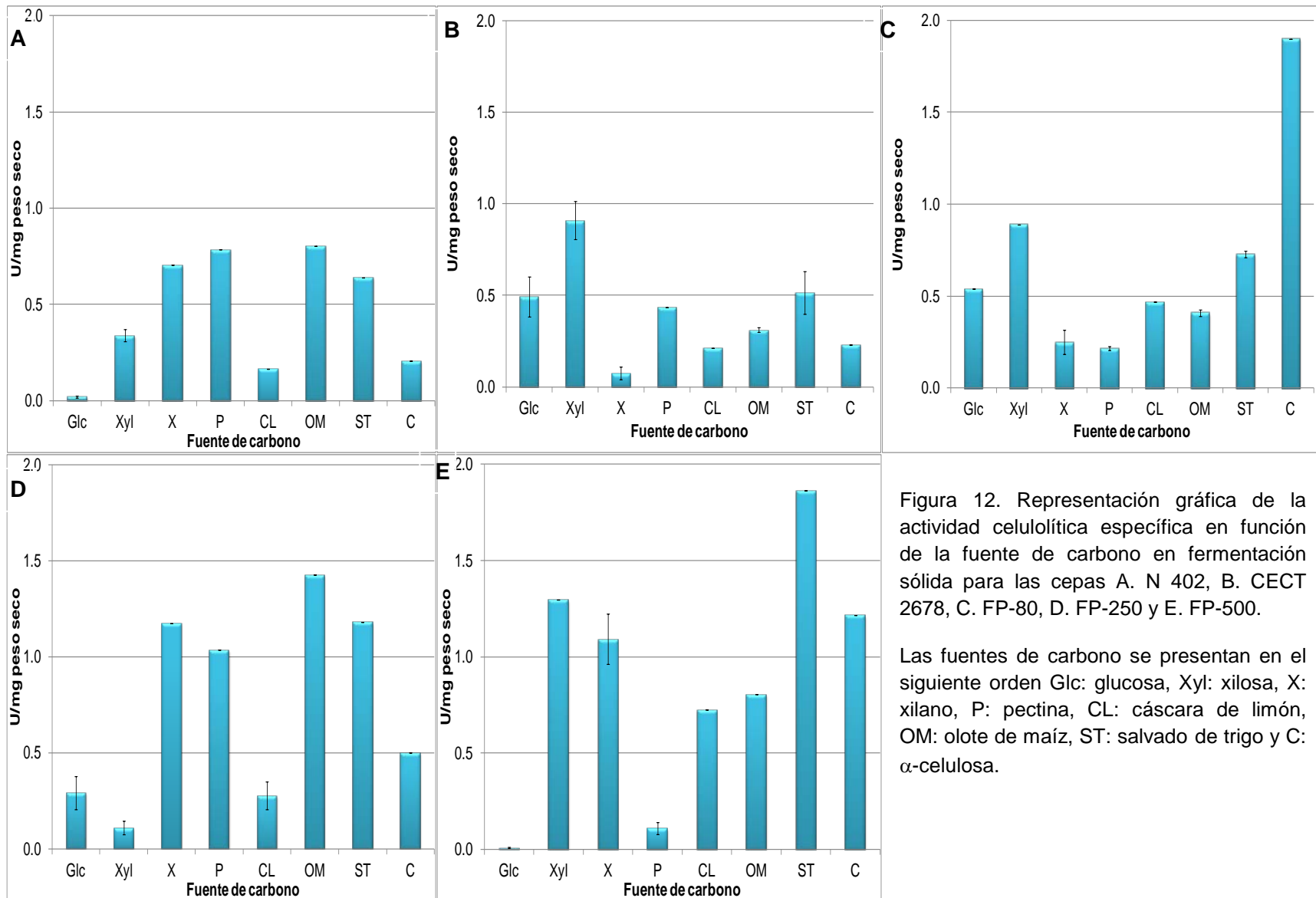


Figura 12. Representación gráfica de la actividad celulolítica específica en función de la fuente de carbono en fermentación sólida para las cepas A. N 402, B. CECT 2678, C. FP-80, D. FP-250 y E. FP-500.

Las fuentes de carbono se presentan en el siguiente orden Glc: glucosa, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, OM: olote de maíz, ST: salvado de trigo y C: α -celulosa.

5.5 Resultados de fermentación sumergida

En las figuras 13 a la 15 se muestra la actividad enzimática reportada en U/ mL en función de la fuente de carbono empleada en medio líquido con pH inicial= 5 a las 72 h de incubación a 300 rpm en una incubadora orbital a 37°C. Las fuentes de carbono se adicionaron al 1% y se muestran en el siguiente orden Glc: glucosa, Glc + AF: glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, ST: salvado de trigo y C: α -celulosa.

5.5.1 Actividad xilanólítica

En la figura 13 se presentan los resultados de actividad xilanólítica de las cepas a las 72 h de incubación a 37°C en una incubadora orbital a 300 rpm en medio mínimo líquido con diferentes fuentes de carbono al 1%.

En el inciso A se presentan los resultados de la cepa N 402, esta cepa obtuvo la mayor actividad en xilano con un valor de 212.2 U/ mL. Las siguientes actividades se obtuvieron en cáscara de limón (69.0 U/ mL), α -celulosa (11.6 U/ mL), glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico (6.5 U/ mL), salvado de trigo (7.5 U/ mL) y xilosa (4.7 U/ mL). En glucosa y pectina se obtuvieron los menores valores de actividad.

En el inciso B se observa que la cepa CECT 2687 tuvo los mayores valores de actividad xilanólítica en los sustratos xilano y salvado de trigo, los valores de actividad fueron 198.0 U/ mL y 155.6 U/ mL, respectivamente. En α -celulosa se obtuvo un valor de 13.6 U/ mL y en cáscara de limón se obtuvo una actividad de 8.1 U/ mL. Los menores valores se produjeron en glucosa + 0.1 ácido ferúlico (4.7 U/ mL), pectina (1.7 U/ mL) y glucosa (0.6 U/ mL). En xilosa no se obtuvo actividad.

Para la cepa FP-80 las fuentes salvado de trigo (156.8 U/ mL) y xilano (145.0 U/ mL) produjeron las actividades más altas como se observa en el inciso C de la figura 13. Las siguientes mejores actividades se presentaron en cáscara de limón, la cual produjo una actividad de 61.8 U/ mL, y α -celulosa, en la cual se presentó una actividad de 52.2 U/ mL. En glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico se presentó una actividad de 17.0 U/ mL. Las menores actividades se presentaron en pectina (3.4 U/ mL), xilosa (3.3 U/mL) y glucosa (0.4 U/ mL).

En el inciso D de la figura 13 se puede observar que los mejores valores de actividad xilanolítica para la cepa FP-250 se observaron en los sustratos xilano (431.9 U/ mL) y salvado de trigo (404.0 U/ mL). En xilosa se observó una actividad de 35.2 U/ mL, en α -celulosa se produjo una actividad de 27.2 U/ mL y en cáscara de limón se observó un valor de actividad de 18.0 U/ mL. Las menores actividades corresponden a las fuentes pectina (1.6 U/ mL), glucosa + 0.1 % ácido ferúlico (1.4 U/ mL) y glucosa (0.4 U/ mL).

La cepa FP-500 tuvo el mejor valor de actividad en xilano, 252.2 U/ mL. En salvado de trigo la cepa FP-500 produjo un valor de 79.3 U/ mL, en cáscara de limón se obtuvo una actividad de 35.0 U/ mL, mientras que en α -celulosa se produjo un valor de 21.1 U/ mL. Los menores valores se obtuvieron en xilosa (6.0 U/ mL), pectina (3.3 U/ mL) y glucosa + 0.1 % ácido ferúlico (1.6 U/ mL). En glucosa no se obtuvo actividad (inciso E, figura 13).

5.5.1.1 Efecto de la fuente de carbono en la producción de actividad xilanolítica en fermentación sumergida

Para todas las cepas la fuente de carbono xilano promovió los mayores valores de actividad a las 72 h de incubación en fermentación sumergida. El salvado de trigo produjo de los mayores niveles de actividad comparado con los demás sustratos en las cepas FP-80, CECT 2687 y FP-250. En el caso de las cepas FP-500 y N 402 el salvado de trigo produjo valores medios y bajos respectivamente. Los sustratos cáscara de limón y α -celulosa promovieron para todas las cepas una actividad xilanolítica media comparada con los demás sustratos.

Los sustratos glucosa, glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico, pectina y xilosa produjeron valores bajos.

Se observó que los valores producidos en glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico fueron mayores comparados con los obtenidos en glucosa, esto podría indicar una inducción de enzimas xilanolíticas debidas al ácido ferúlico.

5.5.1.2 Efecto de la cepa en la producción de actividad xilanolítica en fermentación sumergida

La cepa FP-250 obtuvo la mayor actividad xilanolítica en los sustratos xilano (432 U/ mL) y salvado de trigo (404 U/ mL) en comparación con las demás cepas. Los máximos valores de actividad de las demás cepas se encontraron dentro de un intervalo de 145 U/ mL a 252 U/ mL, esto es, aproximadamente la mitad de la actividad producida por la cepa FP-250. Estas actividades se obtuvieron en los sustratos xilano y salvado de trigo.

De estos resultados se puede decir que la cepa FP-250 fue mejor que las demás cepas, incluyendo la cepa control N 402, en la producción de actividad xilanolítica.

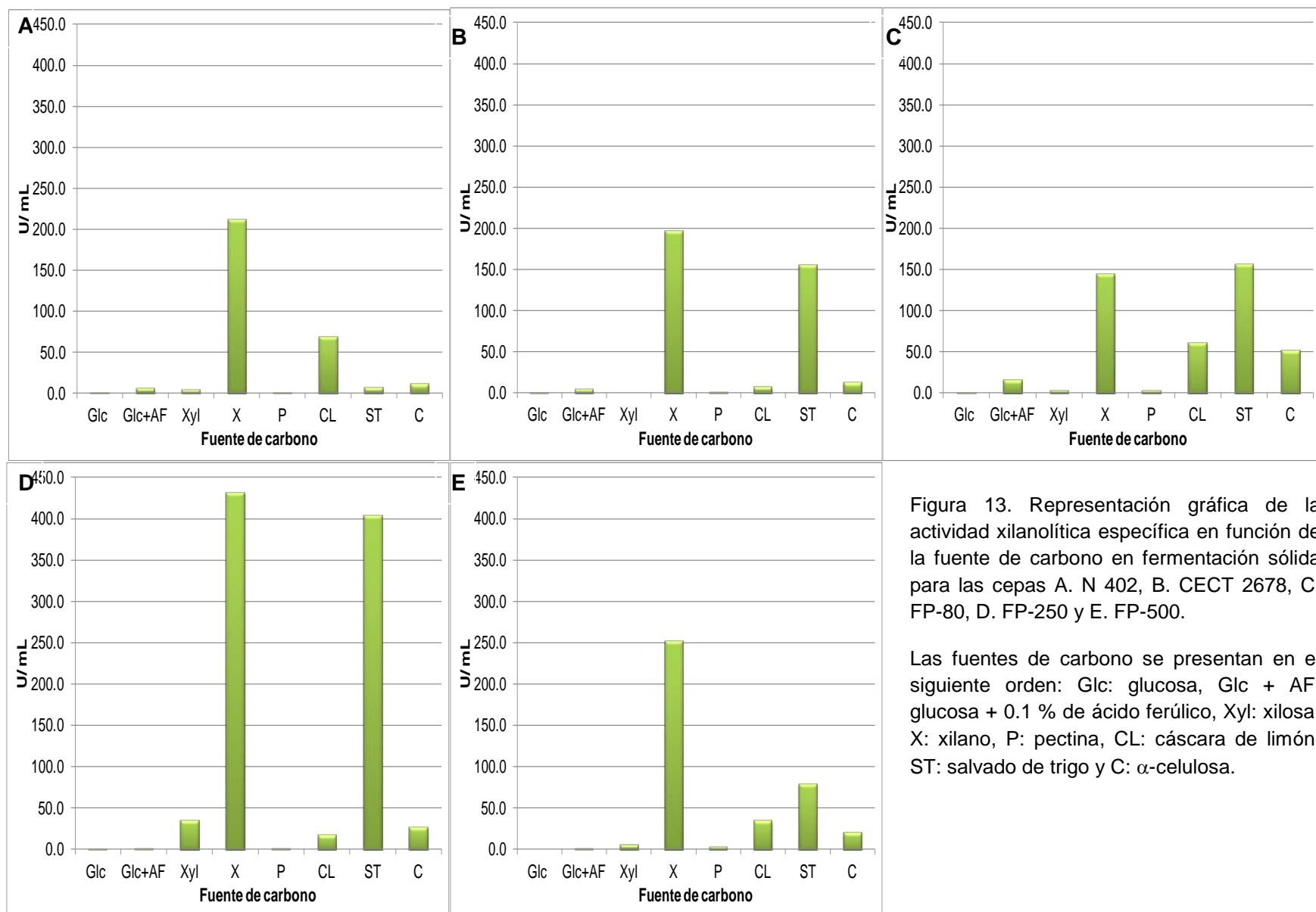


Figura 13. Representación gráfica de la actividad xilanólítica específica en función de la fuente de carbono en fermentación sólida para las cepas A. N 402, B. CECT 2678, C. FP-80, D. FP-250 y E. FP-500.

Las fuentes de carbono se presentan en el siguiente orden: Glc: glucosa, Glc + AF: glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, ST: salvado de trigo y C: α -celulosa.

5.5.2 Actividad pectinolítica

Como se aprecia en la figura 14, inciso A, la cepa N 402 obtuvo los mayores niveles de actividad en los sustratos glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico y xilano, 27.0 U/ mL y 15.0 U/ mL respectivamente. Los sustratos α -celulosa, pectina, cáscara de limón y salvado de trigo produjeron niveles medios de actividad, dentro de un intervalo de 11.0 U/ mL a 8.3 U/ mL. En xilosa se obtuvo el menor valor de actividad, mientras que en glucosa no se obtuvo actividad.

Para la cepa CECT 2687 las fuentes xilano (8.3 U/ mL), glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico (5.3 U/ mL), cáscara de limón (4.7 U/ mL), pectina (3.1 U/ mL) y salvado de trigo (2.7 U/ mL) promovieron en mayor medida la actividad pectinolítica en comparación con las demás fuentes de carbono (figura 14, inciso B). No se obtuvo actividad en las fuentes xilosa y glucosa.

De acuerdo al inciso C de la figura 14 la cepa FP-80 obtuvo un intervalo de actividades comprendido entre 0.3 y 13.4 U/ mL. Se observaron resultados mayores en las fuentes glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico (13.4 U/ mL), pectina (8.8 U/ mL) y α -celulosa (6.2 U/ mL). Los menores valores de actividad exopectinolítica se observaron en las fuentes xilosa y glucosa.

Se observó mayor actividad pectinolítica por parte de la cepa FP-250 en los sustratos glucosa + 0.1% de ácido ferúlico (18.2 U/ mL), pectina (15.0 U/ mL), salvado de trigo (14.4 U/ mL) y xilano (12.0 U/ mL) como se muestra en el inciso D de la figura 14. En los sustratos α -celulosa y cáscara de limón se observaron valores medios. En glucosa se observó el menor valor de actividad, mientras que en xilosa no se obtuvo actividad.

Los resultados de actividad exopectinolítica se presentan en el inciso E de la figura 14. Esta cepa obtuvo los mayores valores de actividad exopectinolítica en las fuentes glucosa + 0.1% de ácido ferúlico (22.2 U/ mL), xilano (18.5 U/ mL), cáscara de limón (9.6 U/ mL) y salvado de trigo (8.9 U/ mL). No se obtuvo actividad en α -celulosa ni en glucosa.

5.5.2.1 Efecto del sustrato en la producción de actividad pectinolítica en fermentación sumergida

Para todas las cepas se observó que el sustrato glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico promovió en mayor medida la actividad pectinolítica. En los azúcares glucosa y xilosa se observó las menores actividades pectinolíticas. Con estos resultados se puede decir que el ácido ferúlico indujo una mayor actividad pectinolítica.

También se observó que el xilano en la mayoría de las cepas, excepto en la cepa FP-80 y FP-250 donde la pectina fue la segunda fuente con mayor producción de actividad pectinolítica, promovió uno de los valores mayores de actividad en comparación con los demás sustratos.

Los demás sustratos cáscara de limón, salvado de trigo y α -celulosa produjeron en algunos casos valores altos y la mayoría de las veces, valores medios de actividad.

5.5.2.2 Efecto de la cepa en la producción de actividad pectinolítica en fermentación sumergida

Los valores de actividad pectinolítica se encontraron cercanos entre las cepas. Se puede observar que los valores más altos fueron encontrados en las cepas FP-80, FP-500, N 402 y FP-250 en el sustrato glucosa + 0.1% de ácido ferúlico, las cepas FP-500, N402 y FP-250 en xilano, y la cepa FP-250 en pectina y salvado de trigo.

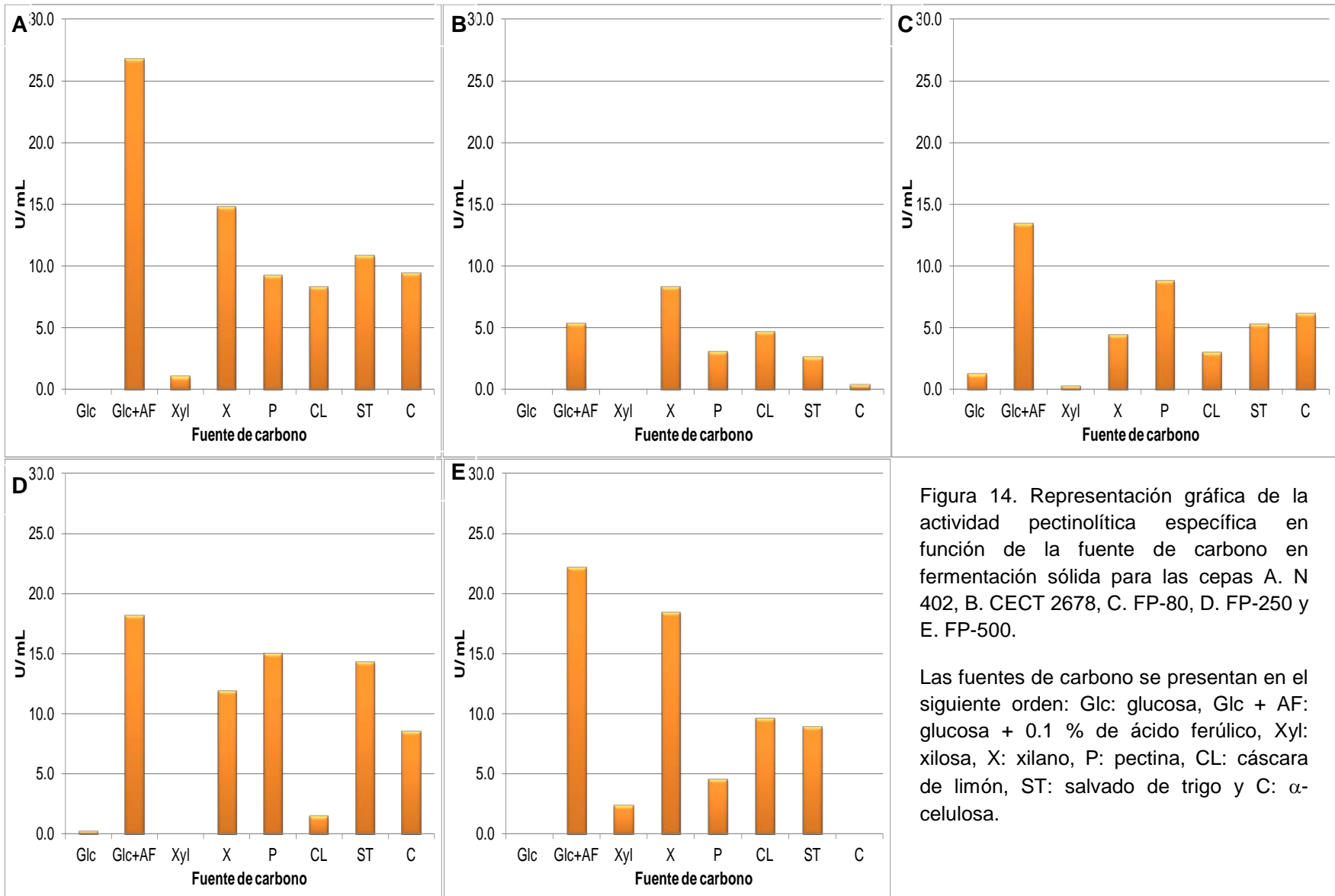


Figura 14. Representación gráfica de la actividad pectinolítica específica en función de la fuente de carbono en fermentación sólida para las cepas A. N 402, B. CECT 2678, C. FP-80, D. FP-250 y E. FP-500.

Las fuentes de carbono se presentan en el siguiente orden: Glc: glucosa, Glc + AF: glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, ST: salvado de trigo y C: α -celulosa.

5.5.3 Actividad celulolítica

Como se muestra en el inciso A de la figura 15 la cepa N 402 produjo la mayor actividad celulolítica, 29.1 U/ mL, en el sustrato glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico. En los sustratos xilano, pectina, salvado de trigo, xilosa y cáscara de limón se presentó una actividad menor a 6.4 U/ mL. En α -celulosa se obtuvo una actividad de 0.1 U/ mL, mientras que en glucosa no se presentó actividad.

En el inciso B de la figura 15 se aprecia que la cepa CECT 2687 presentó la mayor actividad celulolítica, 20.0 U/ mL, en el sustrato glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico. En xilano, salvado de trigo y cáscara de limón se presentó actividad menor a 6.6 U/ mL. En xilosa se observó una actividad de 0.04 U/ mL. No se presentó actividad en los sustratos α -celulosa, pectina y glucosa.

En salvado de trigo se observó la mayor actividad celulolítica de la cepa FP-80, el valor fue de 7.1 U/ mL. Los sustratos α -celulosa, xilosa y pectina presentaron actividades menores a 0.7 U/ mL. No se presentó actividad en los sustratos glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico, cáscara de limón, xilano y glucosa. Estos resultados se muestran en el inciso C de la figura 15.

La cepa FP-250 produjo los mayores niveles de actividad celulolítica en los sustratos xilano y cáscara de limón, 5.2 U/ mL y 3.7 U/ mL respectivamente (inciso D de la figura 15). En los sustratos glucosa + 0.1% de ácido ferúlico, xilosa, salvado de trigo y pectina se presentó una actividad menor a 0.9 U/ mL. No se observó actividad en los sustratos α -celulosa y glucosa.

De acuerdo al inciso E de la figura 15 se observa que la mayor actividad celulolítica, 25.1 U/ mL, para la cepa FP-500 en el sustrato glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico. Los siguientes mejores valores de actividad se presentaron en los sustratos α -celulosa, 8.4 U/ mL y xilano 8.5 U/ mL. Los sustratos pectina, salvado de trigo, cáscara de limón y xilosa presentaron valores de actividad menores a 3.2 U/ mL. No se presentó actividad en glucosa.

5.5.3.1 Efecto del sustrato en la producción de actividad celulolítica en fermentación sumergida

Se observaron los valores más altos de actividad celulolítica en el sustrato glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico, en comparación con los demás sustratos, en las cepas CECT 2687, FP-500 y N 402.

En xilano se observó una producción media en todas las cepas menos en la cepa FP-80 en comparación con los demás sustratos. Los demás sustratos produjeron actividad de media a baja. En ninguna de las cepas se observó actividad celulolítica en glucosa.

5.5.3.2 Efecto de la cepa en la producción de actividad celulolítica en fermentación sumergida

Las cepas CECT 2687, FP-500 y N 402 produjeron los mayores niveles de actividad celulolítica en glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico.

La cepa FP-500 obtuvo la mayor actividad celulolítica en α -celulosa comparada con las demás cepas.

Las cepas CECT 2687 y FP-80 produjeron la mayor actividad en salvado de trigo, en comparación con las demás cepas.

Ninguna cepa produjo actividad en glucosa.

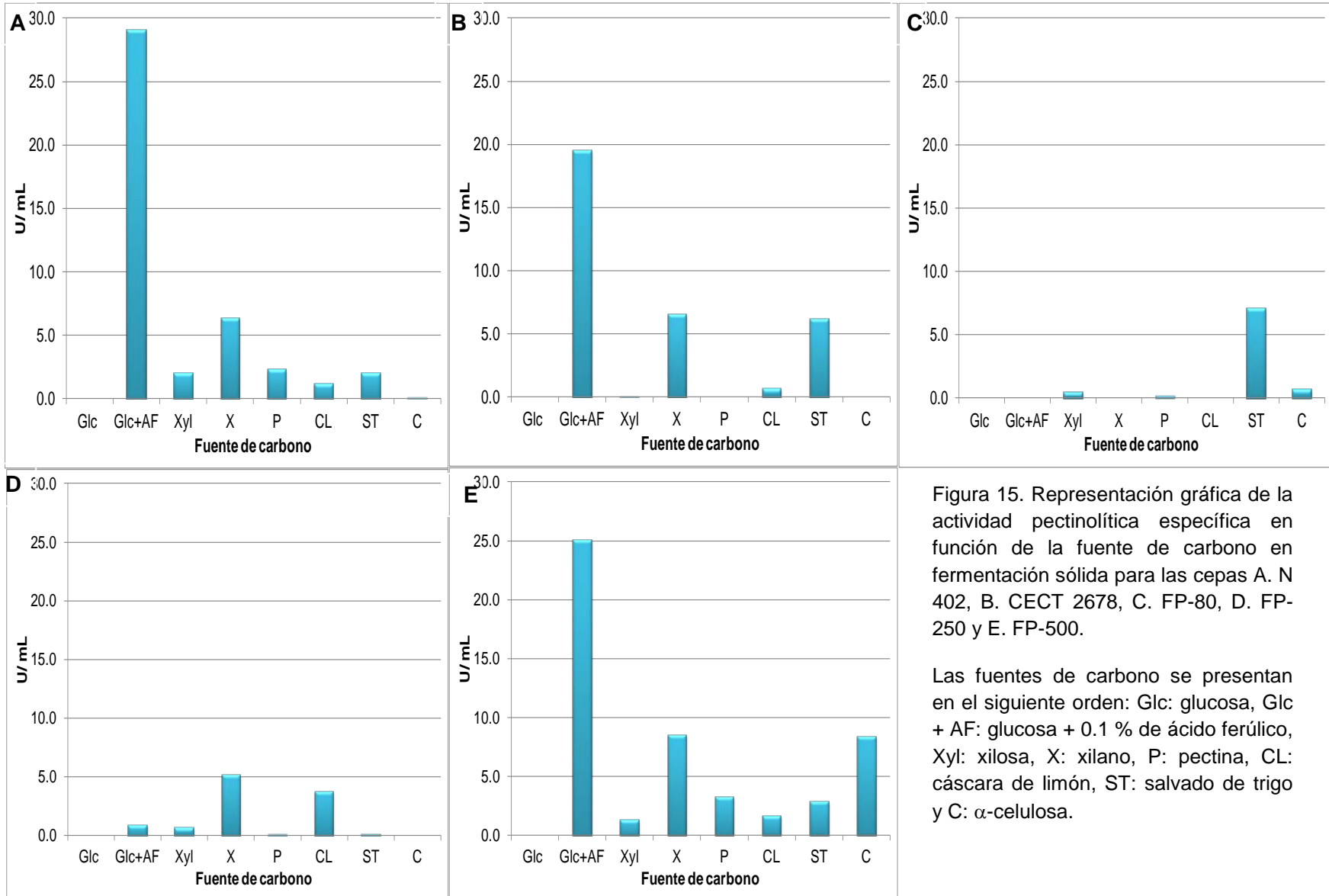


Figura 15. Representación gráfica de la actividad pectinolítica específica en función de la fuente de carbono en fermentación sólida para las cepas A. N 402, B. CECT 2678, C. FP-80, D. FP-250 y E. FP-500.

Las fuentes de carbono se presentan en el siguiente orden: Glc: glucosa, Glc + AF: glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico, Xyl: xilosa, X: xilano, P: pectina, CL: cáscara de limón, ST: salvado de trigo y C: α -celulosa.

5.6 Resultados de pH final de la fermentación sumergida

En la tabla se presenta el pH final, a las 72 h de incubación, de la fermentación sumergida en diferentes fuentes de carbono. El pH inicial fue pH= 5.

Tabla 5. Valores de pH final de la fermentación sumergida de las cepas en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono.

Cepa/ Fuente de carbono*	Glc	Xyl	Glc + 0.1% af	X	P	ST	CL	C
N 402	2.2	2.6	2.0	4.2	2.0	3.4	4.2	3.7
CECT 2687	5.9	6.1	5.5	7.3	7.3	7.7	7.5	5.5
FP-80	5.8	5.6	5.3	7.5	7.3	7.2	6.7	5.7
FP-250	3.6	3.5	3.3	5.6	4.1	5.0	6.2	4.7
FP-500	6.6	6.7	6.2	7.3	6.4	7.2	7.8	6.3

*Fuentes de carbono. Glc: glucosa, Xyl: xilosa, Glc + 0.1 % af: glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico, X: xilano, P: pectina, ST: salvado de trigo, CL: cáscara de limón y C: α -celulosa. El pH inicial fue 5.0.

5.6.1 Efecto en la actividad xilanólítica

De acuerdo a los resultados de actividad xilanólítica, la cepa FP-250 produjo los mayores valores de actividad en salvado de trigo y xilano. En la tabla se observa que esta cepa, a diferencia de las demás, mantuvo un pH más cercano al pH inicial de 5, estos resultados coinciden con experimentos realizados con anterioridad en los que se encontró que la producción de xilanasas para la cepa FP-500 se favoreció en pH= 5 en cultivo sumergido (Flores, 2009).

5.6.2 Efecto en la actividad exopectinolítica

La producción de actividad pectinolítica se favoreció en el sustrato glucosa + 0.1% de ácido ferúlico en las cepas N 402, FP-80, FP-250 y FP-500, de acuerdo a la tabla se observa que el pH estuvo en un intervalo de 2 a 3 en el caso de N 402 y FP-250, mientras que en las cepas FP-80 y FP-500 el pH final se encontró en un intervalo de 5 a 6. Estos valores de pH se encuentran cercanos al intervalo de producción de pectinasas (pH 3 a 5) y coinciden con los resultados obtenidos en experimentos anteriores en los que se encontró que el pH=3.2 favoreció la

producción de pectinasas para la cepa FP-500 en fermentación sumergida (Ollin, 2011)

5.6.3 Efecto en la actividad celulolítica

Las mayores actividades se presentaron en glucosa + 0.1% de ácido ferúlico en las cepas CECT 2687, FP-500 y N 402, para las dos primeras el pH final estuvo cercano al neutro, mientras que para la cepa N 402 el pH bajó hasta 2.

5.6.4 Efecto del pH en las cepas estudiadas

En la tabla 5 se observa que el pH se incrementó al final de la fermentación sumergida de las cepas FP-80, CECT-2687 y FP-500.

En el caso de la cepa N 402 se observó que el pH tendió a disminuir en todas las fuentes y en mayor medida en los medios con azúcares reductores y pectina.

Para la cepa FP-250, el valor de pH final disminuyó con respecto al inicial en los medios con azúcares reductores y pectina como fuentes de carbono. En cáscara de limón, xilano, salvado de trigo y α -celulosa el pH se incrementó.

5.7 Discusión de la actividad producida en fermentación sólida y sumergida

5.7.1 Observaciones generales

Los azúcares simples promovieron en mayor medida el desarrollo de biomasa en comparación con carbohidratos y sustratos complejos en fermentación sólida y sumergida.

En fermentación sólida los sustratos con menor desarrollo fueron α -celulosa, olote de maíz y glucosa + 0.1% de ácido ferúlico, este último sólo se estudió cualitativamente en este tipo de fermentación. En comparación con las fuentes de carbono que promovieron mayor desarrollo de biomasa, se observó que estas fuentes promovieron mejores actividades enzimáticas.

A continuación se discute en general el efecto de los sustratos en la actividad enzimática a pesar de que cada sustrato tuvo un efecto distinto en cada cepa.

Se observó que en las fuentes α -celulosa, xilano, salvado de trigo y olote de maíz se produjo en mayor medida actividad xilanólítica específica y en xilano y salvado de trigo se produjo mayor actividad xilanólítica en fermentación sumergida. Las fuentes que menor actividad xilanólítica produjeron fueron cáscara de limón, pectina, xilosa, glucosa y glucosa + ácido ferúlico, este último en fermentación sumergida, aunque el ácido ferúlico promovió mayor producción de actividad.

Las cepas FP-500, CECT 2687 y FP-80 produjeron el mayor nivel de actividad xilanólítica específica en α -celulosa. El olote de maíz indujo mayor actividad xilanólítica en las cepas nativas FP-80 y FP-250 en comparación con las demás cepas.

En pectina, cáscara de limón, olote de maíz y α -celulosa en fermentación sólida se presentó en mayor proporción actividad exopectinolítica, mientras que en fermentación sumergida esta actividad se vio favorecida en ácido ferúlico, pectina, xilano, cáscara de limón, salvado de trigo y α -celulosa, en ácido ferúlico también se observaron mayores niveles de actividad celulolítica. Las fuentes glucosa y xilosa produjeron baja actividad pectinolítica en ambos tipos de fermentación. En

cáscara de limón no se produjeron mayores niveles de actividad pectinolítica comparado con los niveles producidos en pectina debido a que la cáscara utilizada contenía una proporción elevada de azúcares reductores lo cual pudo haber reprimido la inducción enzimática.

En fermentación sólida las fuentes salvado de trigo, xilano, α -celulosa, olote de maíz, pectina y xilosa produjeron los mayores niveles de actividad celulolítica. En fermentación sumergida el ácido ferúlico indujo el mayor nivel de actividad celulolítica, mientras que la fuente glucosa no indujo actividad en ninguna cepa.

Se observó menor represión catabólica en fermentación sólida comparada con la fermentación sumergida de acuerdo a los resultados de cuantificación de actividad enzimática en glucosa y xilosa como fuente de carbono.

5.7.2 Observaciones del efecto del sustrato y el tipo de fermentación en las cepas estudiadas

5.7.2.1 *Aspergillus niger* N 402

Se observó que la cepa N 402 produjo mejores niveles de actividad xilanolítica cuando utilizó xilano como fuente de carbono en comparación en los casos en los que utilizó sustratos complejos en ambos tipos de fermentación. Esto puede indicar que la cepa FP-250 tiene mayor capacidad de producción de actividad xilanolítica en sustratos complejos comparada con la cepa N 402, ya que esta cepa utilizó también salvado de trigo para la producción de actividad xilanolítica en fermentación sumergida y obtuvo mayores niveles de actividad en fermentación sumergida cuando se inoculó en olote de maíz y α -celulosa.

En ácido ferúlico la cepa *Aspergillus niger* N 402 produjo la actividad celulolítica más alta en fermentación sumergida. La fuente glucosa indujo valores medios de actividad pectinolítica específica para esta cepa.

5.7.2.2 *Aspergillus flavus* CECT 2687

La cepa CECT 2687 produjo niveles altos de actividad xilanolítica específica en salvado de trigo y α -celulosa. Se desarrolló utilizando etilferulato como única fuente de carbono. El ácido ferúlico indujo una alta actividad celulolítica en

fermentación sumergida en esta cepa. La fuente glucosa indujo valores medios de actividad pectinolítica específica para esta cepa. En fermentación sólida esta cepa produjo los niveles más altos de actividad exopectinolítica específica en pectina y α -celulosa.

La cepa CECT 2687 y FP-80 produjeron en fermentación sumergida los mayores niveles de actividad celulolítica cuando utilizaron salvado de trigo como fuente de carbono, en comparación con las demás cepas.

5.7.2.3 FP-80

La cepa FP-80 se desarrolló utilizando etilferulato como única fuente de carbono. Produjo una actividad xilanolítica específica alta en α -celulosa. Se observaron los menores niveles de actividad pectinolítica en fermentación sólida comparada con las demás cepas. Se observó también que la cepa FP-80 produjo mayores niveles de actividad enzimática en fermentación sólida que en fermentación líquida.

Las cepas FP-80 y FP-250 produjeron los mejores valores de actividad xilanolítica específica en olote de maíz. Esto puede deberse a que como cepas nativas tienen mayor capacidad de degradación de olote de maíz que es un sustrato al semejante a los que se encuentran en la naturaleza y en donde se han adaptado a su utilización.

5.7.2.4 FP-250

En fermentación sumergida la cepa FP-250 produjo el doble de actividad xilanolítica en salvado de trigo y xilano en comparación con las demás cepas. También esta cepa produjo el mayor nivel de actividad xilanolítica utilizando xilosa como fuente de carbono en fermentación sumergida. En fermentación sólida produjo niveles altos de actividad celulolítica en olote de maíz y los valores más altos de actividad exopectinolítica específica en pectina

5.7.2.5 FP-500

En fermentación sólida la cepa FP-500 produjo el mayor nivel de actividad xilanolítica en salvado de trigo y la segunda más alta en α -celulosa. Además, produjo los niveles más altos de actividad exopectinolítica específica en

comparación con las demás cepas, los valores más altos de actividad se produjeron en pectina, cáscara de limón y olote de maíz. También produjo mayores niveles de actividad celulolítica específica en más sustratos que las demás cepas estudiadas. La cepa FP-500 es una cepa con capacidad de producción de feruloilesterasa de acuerdo a los resultados observados en medio sólido con etilferulato como fuente de carbono, esto coincide con los resultados en fermentación sólida donde se observó que fue la cepa que mejor se desarrolló en glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico como fuente de carbono. Se observó además que en fermentación sumergida, la cepa FP-500 fue de las tres cepas que produjeron mayor actividad pectinolítica y celulolítica en glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico como fuente de carbono. La fuente glucosa indujo valores medios de actividad pectinolítica específica para esta cepa. En fermentación sumergida, la cepa FP-500 produjo el mejor nivel de actividad celulolítica cuando utilizo α -celulosa como fuente de carbono.

En fermentación sólida las cepas nativas FP-80, FP-250 y FP-500 tuvieron mayores niveles de producción de actividad celulolítica específica.

5.7.3 Observaciones en los sustratos

5.7.3.1 Glucosa + 0.1 % de ácido ferúlico

Se observó que la adición de ácido ferúlico a glucosa al 1% indujo la producción de actividad pectinolítica y celulolítica en fermentación sumergida. Fue uno de los sustratos donde se desarrollaron menos las cepas. La cepa FP-500 fue la cepa que mejor se desarrolló en este sustrato al ser incubada en fermentación sólida.

5.7.3.2 α -Celulosa

En esta fuente las cepas se desarrollaron más lento que en las demás fuentes de carbono.

Para las cepas CECT 2687, FP-80 y FP-500 se produjeron niveles mayores de actividad xilanolítica en fermentación sólida que en fermentación sumergida. Se obtuvieron resultados ligeramente mayores en fermentación sumergida para la producción de actividad pectinolítica, mientras que para la producción de actividad

celulolítica se obtuvieron resultados mayores en fermentación sólida, excepto para la cepa FP-500.

5.7.3.3 Xilano

En esta fuente de carbono las tres actividades enzimáticas resultaron mayores en fermentación sumergida. Tanto en fermentación sumergida como en fermentación sólida se promovió la actividad xilanolítica.

5.7.3.4 Pectina

En pectina se promovió la actividad pectinolítica y celulolítica tanto en fermentación sólida como en fermentación líquida.

5.7.3.5 Olote de maíz

La fuente de carbono olote de maíz sólo se estudió en fermentación sólida. Este sustrato indujo principalmente actividad xilanolítica específica aunque produce niveles medios de las actividades pectinolítica y celulolítica específicas. Se observó que las cepas nativas FP-80 y FP-250 produjeron mayor actividad xilanolítica que las cepas control al usar esta fuente.

5.7.3.6 Salvado de trigo

En salvado de trigo se promovió principalmente actividad xilanolítica, se obtuvieron actividades exopectinolítica y celulolítica de medias a bajas en ambos tipos de fermentación para todas las cepas.

Se obtuvieron actividades enzimáticas más altas en fermentación sumergida.

5.7.3.7 Cáscara de limón.

En este sustrato se observó el mejor desarrollo micelial, esto pudo deberse a la alta concentración de azúcares reductores contenidos en la cáscara mismos que reprimieron la inducción de la actividad pectinolítica en fermentación sumergida. En fermentación sólida este sustrato indujo en mayor medida la producción de actividad pectinolítica. En fermentación sumergida se indujo principalmente la actividad xilanolítica, aunque produjo niveles de medios a bajos de actividad pectinolítica y celulolítica.

5.7.3.8 Glucosa

Se observó menor represión catabólica en fermentación sólida.

En fermentación sólida se indujo en mayor proporción actividad pectinolítica.

5.7.3.9 Xilosa

Las actividades enzimáticas fueron mayores en fermentación sólida.

Tanto en glucosa como en xilosa se observaron los mejores desarrollos de biomasa.

5.7.4 Diferencias encontradas en función del tipo de fermentación

Se observó menor represión catabólica en fermentación sólida, esto se observó en las fuentes glucosa y xilosa.

Las fuentes de carbono salvado de trigo, cáscara de limón y xilano indujeron mayor actividad xilanolítica en fermentación sumergida.

Para la mayoría de las cepas las fuentes de carbono pectina y α -celulosa produjeron mayores niveles de actividad celulolítica en fermentación sólida que en fermentación sumergida.

Se observó que las cepas FP-500, FP-250 y N 402 en algunos sustratos produjeron mayores niveles de actividad en fermentación sumergida que en fermentación sólida. Los casos en los que se observó esto fue para la cepa FP-500 en salvado de trigo mayor actividad pectinolítica y mayor actividad celulolítica en α -celulosa y pectina. Las cepas N 402 y FP-250 en fermentación sumergida presentaron mayor actividad xilanolítica en α -celulosa, mayor actividad pectinolítica en α -celulosa y salvado de trigo y mayor actividad celulolítica en cáscara de limón, comparadas con la actividad obtenida en fermentación sólida.

5.8 Resultados resguardos

El cepario originalmente constaba de 78 cepas. Estas cepas se encontraban conservadas en dos tipos de resguardo, el primero en refrigeración en medio sólido y glicerol, el segundo conservado por desecación a temperatura ambiente en leche descremada y sílica gel.

Como primera etapa se resembró el cepario a partir de los resguardos en los que se encontraban, se observó en general que las cepas tuvieron un crecimiento lento; algunas tuvieron una morfología diferente a la indicada en la información del resguardo, estas cepas sufrieron una contaminación durante el tiempo en que se conservaron y algunas de estas ya no pudieron recuperarse; otras cepas no pudieron recuperarse en esta etapa debido a que los resguardos con los que se contaba eran mayores a 10 años. Se incorporaron nuevas cepas a partir de algunas que se encontraron como contaminantes de cepas originales del cepario, o como contaminantes de otros sustratos, se revisó que la morfología colonial y la morfología microscópica coincidieran con la de *Aspergillus* para integrar estas cepas al cepario.

Después de la etapa de resiembra, prosiguió la etapa de activación; se observó que las cepas crecieran a un ritmo normal y que los cultivos estuvieran puros para realizar sus resguardos.

En la etapa de recuperación el cepario se resembró en medios sólidos PDA, Sabouraud y medio mínimo para *Aspergillus*. A partir del cultivo puro de cada cepa se realizaron tres tipos de resguardos. Los tres tipos de resguardos se realizaron por duplicado para cada cepa.

En la figura 16 se muestran algunos ejemplos de los tres tipos de resguardos realizados.



Figura 16. Resguardos del cepario a) Resguardo en PDA y glicerol b) Resguardo en sílica gel y c) Resguardo de cosecha de esporas en leche descremada

Estos resguardos mantendrán viables las cepas en un periodo de uno a dos años en el caso del resguardo en PDA con glicerol mantenido en refrigeración, de 3 a 5 años en el caso del resguardo en sílica gel, y por un periodo de 10 años en el caso de la congelación de cosecha de esporas en leche descremada.

Capítulo 6. Conclusiones

1. Se observó que todas las cepas de *Aspergillus* estudiadas pudieron desarrollarse en sustratos complejos en medio sólido. Esto hace de interés su estudio para conocer su fisiología y para utilizar sus enzimas en diferentes aplicaciones industriales.
2. Se observó que las cepas silvestres se desarrollaron mejor utilizando fuentes complejas de carbono en fermentación sólida en comparación con las cepas de colección. Lo que puede indicar una pérdida en la actividad enzimática de las cepas de colección y hace de interés estudiar la producción enzimática de las cepas autóctonas para su aplicación industrial.
3. De acuerdo a la relación peso seco/ diámetro (mg/ mm) se clasificaron a las fuentes de carbono en tres grupos, los azúcares reductores glucosa y xilosa, los cuáles son de fácil asimilación y presentaron valores cercanos y mayores a uno, las fuentes con menor facilidad de degradación que presentaron valores entre 0.6 y 0.2, xilano, pectina, cáscara de limón y salvado de trigo y por último las fuentes de difícil degradación, olote de maíz y α -celulosa, las cuáles presentaron valores menores a 0.3.
4. En fermentación sólida, la actividad xilanolítica específica se vio favorecida por los sustratos α -celulosa, xilano, salvado de trigo y olote de maíz. Los sustratos pectina, cáscara de limón, olote de maíz y α -celulosa promovieron en mayor medida la actividad exopectinolítica específica. Se observó que los sustratos salvado de trigo, xilano, xilosa, α -celulosa, olote de maíz y pectina promovieron mayor actividad celulolítica específica.
5. En fermentación sumergida se observó que la actividad xilanolítica se promovió principalmente por los sustratos xilano y salvado de trigo. Se

produjo mayor actividad exopectinolítica en fermentación sumergida debido a la inducción por ácido ferúlico y en los sustratos xilano y pectina. El ácido ferúlico también indujo la actividad celulolítica en fermentación sumergida, los sustratos xilano, salvado de trigo y α -celulosa también promovieron la producción de esta actividad.

6. La cepa N 402 produjo mayor actividad xilanolítica cuando utilizó xilano como fuente de carbono en fermentación sólida. En fermentación sumergida esta cepa produjo los valores más altos de actividad exopectinolítica y celulolítica en ácido ferúlico.
7. La cepa *Aspergillus flavus* CECT 2687 se desarrolló en etilferulato como única fuente de carbono. Además produjo los valores más altos de actividad xilanolítica específica en α -celulosa y de actividad exopectinolítica específica en α -celulosa.
8. La cepa FP-80 se desarrolló utilizando etilferulato como única fuente de carbono. Produjo una actividad celulolítica específica alta en α -celulosa. Se observó también que la cepa FP-80 produjo mayores niveles de actividad enzimática en fermentación sólida que en fermentación líquida. Las cepas FP-80 y FP-250 produjeron los mejores valores de actividad xilanolítica específica en olote de maíz.
9. Las cepas autóctonas FP-80, FP-250 y *Aspergillus flavipes* FP-500 produjeron los valores más altos de actividad celulolítica específica en comparación con las cepas de colección.
10. La cepa FP-250 obtuvo la mayor actividad xilanolítica en xilano y salvado de trigo en fermentación sumergida.
11. Se observó que la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 fue la única en presentar halo de degradación cuando utilizó etilferulato como única fuente

de carbono, así mismo presentó un buen crecimiento en glucosa + 0.1% de ácido ferúlico. Estos resultados de ensayos cualitativos, señalan a la cepa FP-500 *Aspergillus flavipes* como una cepa con potencial de producción de la enzima feruloilesterasa. En fermentación sólida, la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 produjo los mayores niveles de actividad xilanolítica en los sustratos xilano y salvado de trigo; la mayor actividad exopectinolítica en los sustratos cáscara de limón, pectina y olote de maíz. En fermentación sumergida produjo la mayor actividad celulolítica en ácido ferúlico y en α -celulosa.

12. Los valores más altos de producción de actividad xilanolítica y pectinolítica en fermentación sumergida tuvieron lugar en los intervalos de pH en los que se ha observado anteriormente mayor producción.
13. Se observó menor represión catabólica en fermentación sólida
14. Algunos sustratos promovieron mayores valores de actividad en fermentación sumergida comparada con la fermentación sólida, sin embargo, es posible que al optimizar los parámetros de recuperación enzimática en fermentación sólida esto no sea significativo.

Capítulo 7. Bibliografía

Acuña Argüelles, M.E.; Gutiérrez Rojas, M.; Viniegra- González, G.; Favela Torres, E. (1995), Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 808-814.

Akimitsu, K., Isshiki, a., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D., & Prusky, D. (2004). Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(6), 271–275.

Aquino, S., Ferreira, F., Helena, D., Ribeiro, B., Corrêa, B., Greiner, R., Lucia, A., et al. (2005). EVALUATION OF VIABILITY OF ASPERGILLUS FLAVUS AND AFLATOXINS DEGRADATION IN IRRADIATED SAMPLES OF MAIZE, 352-356.

Carlile, M. J. (1994). *The fungi*. London: Academic.

Castilho, L. R., Medronho, R. A., & Alves, T. L. M. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*, 71, 45-50.

Chang, P.-K., & Ehrlich, K. C. (2010). What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *International journal of food microbiology*, 138(3), 189-99. Elsevier

De Vries R.P., *Accessory enzymes from Aspergillus involved in xylan and pectin degradation*, Universidad Wageningen, 1999, 1-47 pp.

De Vries P., Visser, J., & de Graaff, L. H. (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Research in Microbiology*, 150(4), 281–285.

Donaghy, J., Kelly, P. F., & McKay, a M. (1998). Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(2), 257-60.

Ehrlich, K.C., 2008. Genetic diversity in *Aspergillus flavus* and its implications for agriculture. In: Varga, J., Samson, R.A. (Eds.), *Aspergillus in the genomics era*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 233–247.

Faulds, C. B., et. al. (1997). Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 157, 239-244.

- Flores, L. (2009). Identificación de las características de las xilanas producidas por *Aspergillus flavipes* FP-500. Tesis de Maestría. TESE- UNAM.
- Gao, J., Liu, Z., & Yu, J. (2007). Identification of *Aspergillus* section Flavi in maize in northeastern China. *Mycopathologia*, 164(2), 91–5.
- Graminha, E. B. N., Gonçalves, a. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. a. a., Da Silva, R., & Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144(1-2), 1–22.
- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M., Trigui, S., Bouabdallah, F., & Gargouri, A. (2002). Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(5), 662–666. doi:10.1016/S0141-0229(02)00029-7
- Harny, C. (2011). Methods of maintaining and preserving fungal culture to improve viability. *Rehabilitation of Tropical Rainforest Ecosystems*, (October), 263-268.
- Harris, B. J. (n.d.). How to Preserve Fungal Cultures.
- Herrera T., U. M. (2004). *El reino de los hongos, Micología básica y aplicada*. México D. F.: UNAM. Fondo de Cultura Económica.
- Hölker U, Lenz J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? *Curr Opin Microbiol* 2005;8:301–6.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N. Y Beg, Q.K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied and Microbial Biotechnology*.
- Humber, R. A. (1997). Fungi: Preservation of cultures. En L. Lacey, *Manual Of Techniques in Insect Pathology* (págs. 269-278). London: Academic Press.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Wu, H., Xu, D., Tang, Z., & Shen, Q. (2011). Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(5), 717–725.
- Lockington, R. a, Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C. J., & Kelly, J. M. (2002). Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 37(2), 190–6.

Lodish H, B. A. (2000). En B. A. Lodish H, *Molecular cell biology*. New York, USA: W. H. Freeman.

MacCabe, a P., Orejas, M., Tamayo, E. N., Villanueva, a, & Ramón, D. (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of biotechnology*, 96(1), 43–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142142>

Maldonado, M.C. and Strasser de Saad, A. M. (1998), Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 34-38.

Martínez-Trujillo, A., Aranda, J. S., Gómez-sánchez, C., Trejo-aguilar, B., & Aguilar-osorio, G. (2009). FP-500 CONSTITUTIVE AND INDUCIBLE PECTINOLYTIC ENZYMES FROM ASPERGILLUS FLAVIPES FP-500 AND THEIR MODULATION BY PH AND CARBON SOURCE THEIR MODULATION BY PH AND CARBON SOURCE. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 40–47.

Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. a. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology advances*, 29(3), 365-73. Elsevier Inc.

Mathew, S., & Abraham, T. E. (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical reviews in biotechnology*, 24(2-3), 59-83.

Meijer, M., Houbraken, J. a M. P., Dalhuijsen, S., Samson, R. a, & de Vries, R. P. (2011). Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Studies in mycology*, 69(1), 19–30. doi:10.3114/sim.2011.69.02

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-77. 2008

Mossel, D. (2002). *Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad microbiológica de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.

Muñoz, S. S. (20 de Agosto de 2012). SAGARPA. Obtenido de SAGARPA: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamien%20de%20esquilmos.pdf>

- Naidu, G. and Panda, T. (1999), Performance of pectolytic enzymes during hydrolisis of pectic substances under assay conditions: a statistical approach. *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 116-124.
- Nakasone, K. K. (1994). Preservation and distribution of fungi.
- Neutelings, G. (2011). Lignin variability in plant cell walls: contribution of new models. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, *181*(4), 379-86. Elsevier Ireland Ltd. 2011
- Nigam PS, Pandey A. Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. In: Nigam PS, Pandey A, editors. *Biotechnology for agro- industrial residues utilization*. first ed. Netherlands: Springer; 2009. p. 197–221.
- Ollin, P. (2011). Evaluación del uso de pectinasas obtenidas de *Aspergillus flavipes* FP-500 para la producción de jugo de naranja y su comparación con preparaciones enzimáticas comerciales. Tesis, Facultad de Química: UNAM.
- Pontecorvo, G., J.A. Roper, L.M. Hemmons, K.D. Macdonald & A.W.J. Bufton, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5: 141-238.
- Prasanna, V., Prabha, T. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Fruit ripening phenomena-an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, *47*(1), 1-19.
- Raghavarao KSMS, Ranganathan TV, Karanth NG. Some engineering aspects of solid- state fermentation. *Biochem Eng J* 2003;*13*:127–35.
- Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins, 527–534.
- Ruijter, J. Visser, G. (1997). Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiology Letters*.
- Saito K, Takakuwa N, Oda Y. Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. *Microbiol Res* 2004;*159*:83–6.
- Schäfer, T., Borchert, W., Skovgard, V., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., et al. (2007). *Industrial Enzymes*, (December 2006), 59-131. doi:10.1007/10
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *44*(1), 13-18.

Solís Pereira, S.; Favela Torres, E.; Viniegra González, G.; Gutiérrez Rojas, M. (1993), Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 36-41.

Subramaniyan, S., & Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews in biotechnology*, *22*(1), 33–64.

Suckling Colin J., *Enzyme Chemistry, Impact and applications*, Chapman and Hall, Great Britain, 1990

TAPPI Test Method T250. Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp. In Tappi Test Methods. Atlanta, GA: Technical Association of the pulp and paper industry.

Taragano, V. M., & Pílosof, A. M. . (1999). Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, *25*(3-5), 411-419.

Vries RP de, Visser J (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**: 497–522.

Vries RP de (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**: 10–20.

Ywassaki, L. A., & Canniatti-Brazaca, S. G. (2011). Ascorbic acid and pectin in different sizes and parts of citric fruits. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *31*(2), 319–326.

Zhang, Y., Pitkänen, L., Douglade, J., Tenkanen, M., Remond, C., & Joly, C. (2011). Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions. *Carbohydrate Polymers*, *86*(2), 852–859.