



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CRECIMIENTO DE CEPAS DE *Aspergillus flavus* EN
MEDIO SÓLIDO Y LA RELACIÓN ENTRE LA FUENTE
DE CARBONO UTILIZADA Y LA SECRECIÓN DE
ENZIMAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

DIANA CASTAÑEDA GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2013



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Adriana Guadalupe Mejía Chávez
VOCAL	Aurora Irma Ortegón Avila
SECRETARIO	José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
1er. SUPLENTE	Beatriz Ruiz Villafán
2° SUPLENTE	Iliana Elvira González Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos
Departamento de Alimentos y Biotecnología
Conjunto E Laboratorio 312
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

ASESOR DE TEMA

Dr. Guillermo Aguilar Osorio _____

SUSTENTANTE

Diana Castañeda García _____

Este trabajo fue realizado por el apoyo de los proyectos IN 225710 e IN219813 del programa PAPIIT de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM. Agradezco a la DGAPA la beca recibida.

CONTENIDO

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN	6
-----------------------	---

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo general	9
2.2 Objetivos particulares	9

CAPÍTULO III

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
------------------------------------	----

CAPÍTULO IV

4. ANTECEDENTES	11
4.1 Componentes de la pared celular de plantas.....	11
4.2 Enzimas degradadoras de la pared celular de plantas	14
4.3 El género <i>Aspergillus</i>	17
4.3.1 Generalidades de <i>Aspergillus flavus</i>	19
4.4 Fermentación en estado sólido	20
4.5 Sustratos complejos	21
4.6 Aplicaciones industriales de las enzimas fúngicas.....	24

CAPÍTULO V

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Microorganismos.....	27
6.1.1 Cosecha de esporas	27
6.1.2 Conteo de esporas	27
6.2 Medios de cultivo	28
6.3 Condiciones de crecimiento	28
6.4 Características del crecimiento fúngico	29
6.5 Producción de enzimas en medio sólido	29
6.5.1 Extracción de enzimas.....	29
6.5.2 Determinación de la actividad enzimática	30
6.5.2.1 Actividad exo-pectinolítica	30
6.5.2.2 Actividad xilanolítica	30
6.5.2.3 Actividad de enzimas accesorias.....	31
6.6 Concentración de filtrados enzimáticos por liofilización	31
6.7 Determinación de proteína	31
6.8 Análisis electroforético	32

CAPÍTULO VI

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7.1 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541	33
7.1.1 Análisis de crecimiento	33
7.1.2 Producción enzimática	41
7.1.2.1 Actividad exo-xilanolítica	45
7.1.2.2 Actividad exo-pectinolítica	48
7.1.2.3 Actividad de enzimas accesorias	51
7.1.3 Producción de enzimas en cáscara de limón	57
7.1.3.1 Perfil electroforético	57
7.2 <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687	60
7.2.1 Análisis de crecimiento	60
7.2.2 Producción enzimática	66
7.2.2.1 Actividad exo-xilanolítica	68
7.2.2.2 Actividad exo-pectinolítica	70
7.2.2.3 Actividad de enzimas accesorias	76
7.2.4 Producción de enzimas en cáscara de limón	78
7.2.4.1 Perfil electroforético	80
7.3 Análisis integral	82

CAPÍTULO VII

8. CONCLUSIONES	85
9. SUGERENCIAS	87
10. BIBLIOGRAFÍA	88
11. ANEXO	95

Lista de Abreviaturas utilizadas y simbología

E	Desarrollo escaso
M	Desarrollo medio
A	Desarrollo abundante
NA	No aplica
NC	No cuantificable
C	Contaminada
IC	Índice de crecimiento
SC	sin fuente de carbono
Ara	arabinosa
Xil	xilosa
Ram	ramnosa
Glu	glucosa
Fru	fructosa
Gal	galactosa
AG	ácido galacturónico
Mal	maltosa
Raf	rafinosa
PC	pectina cítrica
PM	pectina de manzana
XH	xilano de haya
Xab	xilano de abedul
Xav	xilano de avena
CL	cáscara de limón
ST	salvado de trigo
OM	olote de maíz
HG	Homogalacturonano
RG I	Ramnogalacturonano I
RG II	Ramnogalacturonano I
XGA	Xilogalacturonano
aw	actividad de agua
b.s	base seca
rpm	revoluciones por minuto
h	hora
min	minuto
esp	esporas
d	destilada
U	unidad enzimática
PDA	agar papa dextrosa
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
SDS	dodecilsulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético
FES	Fermentación en estado sólido
FS	Fermentación sumergida
-	Esporulación nula
+	Esporulación escasa
++	Esporulación media
+++	Esporulación abundante

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

En la agricultura el género *Aspergillus* se ha considerado un problema grave debido a su prevalencia en el deterioro de los granos almacenados y como patógeno oportunista de los cultivos de campo, particularmente en condiciones de alta humedad (Christensen & Kaufman, 1969). Actualmente, es utilizado en diversos procesos industriales para elaborar diferentes productos que abarcan desde ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos y alimentos fermentados de varios tipos. Sus productos son generalmente considerados como GRAS (Generally Regarded As Safe), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos (Villena & Gutiérrez-Correa, 2003).

Aspergillus flavus es un hongo filamentoso saprófito que crece predominantemente en material vegetal muerto o en descomposición y que gracias a su ubicuidad en la naturaleza es ampliamente utilizado en la producción de enzimas pues posee la capacidad de secretar un gran número de ellas, incluyendo cutinasas, celulasas, proteasas, lipasas, amilasas para penetrar al tejido vegetal, además de xilanasas, pectinasas y otras enzimas accesorias; siendo estas tres últimas de interés para el presente trabajo.

En esta investigación se utilizaron dos cepas de *Aspergillus flavus*; perfectamente identificadas, NRRL 6541; cepa no toxigénica y la cepa CECT 2687 que si genera toxinas. Ambas cepas se desarrollaron en medios de cultivo sólidos con diferentes fuentes de carbono; azúcares simples, polisacáridos puros y sustratos complejos (residuos agrícolas) con la finalidad de evaluar su capacidad de crecimiento así como determinar y comparar las enzimas que se producen en los diversos medios, utilizando las mismas condiciones de crecimiento (pH y temperatura) para ambas cepas y fuentes de carbono.

La mayor parte de los residuos agrícolas se generan en grandes cantidades a lo largo del año y como alternativa para su eliminación es la combustión. Sin embargo, dichos residuos -por lo general- tienen una composición rica en azúcares, minerales y

proteínas, y por lo tanto, no deberían ser considerados como residuos sino como materias primas para otros procesos industriales. La presencia de varios nutrientes y humedad en estos residuos proporciona las condiciones adecuadas para el desarrollo de microorganismos, y esto abre grandes posibilidades para su reutilización en los procesos de fermentación en estado sólido (FES), ya que reproduce los procesos microbiológicos naturales, tales como el compostaje (Mussatto, et al, 2012).

La FES -sistema utilizado en este trabajo- se ha convertido en una tecnología potencial para la generación de productos de valor agregado tales como metabolitos secundarios biológicamente activos, incluyendo antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento de plantas, enzimas, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos, además ha sido testigo de un aumento sin precedentes en el interés para el desarrollo de bioprocesos, tales como la biodegradación de compuestos tóxicos, producción de biopesticidas y biocombustibles (Pandey, 2000, 2003).

Los procesos de FES presentan una serie de ventajas sobre las fermentaciones sumergidas (FS); los medios de cultivo son simples, presentan mayor productividad y concentración de productos, se utiliza menor volumen de agua, las enzimas son sensiblemente bajas a la represión catabólica o inducción (Aguilar, et al, 2001, Pandey, et al, 1999b) y además son de interés económico para países que tienen gran cantidad de residuos agroindustriales, los cuales pueden ser utilizados como materias primas de bajo costo (Pandey, 2003).

Acompañado de ese sistema de trabajo (FES), se mezcló con el uso de membranas porosas de policarbonato, que además de permitir la libre difusión de gases, agua, nutrientes y proteínas -sin que la hifa las atravesase- permite la visualización de la formación de conidióforos (Wösten et al, 1991). Ésta técnica permitirá estudiar la secreción de enzimas así como el crecimiento micelial.

La proteómica de hongos filamentosos se encuentra todavía en una etapa relativamente temprana de desarrollo, en particular en cuanto a proteínas secretadas, debido en parte a la falta de datos de la secuencia del genoma. Si bien, se han buscado secuencias del genoma de *A. flavus* con alta homología a marcadores de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés) de hidrolasas conocidas, que podrían estar

involucrados con la virulencia o patogenicidad fúngica y, presumiblemente, ayudar en la maceración de las paredes celulares de plantas e insectos (Mellon, et al, 2007), los mismos grupos de investigadores son conscientes de que la homología en las secuencias no demuestra que éstas resulten en enzimas activas; y aún más, afirman que, a pesar de las nuevas herramientas en genómica, la comprensión de las funciones biológicas de muchas de las hidrolasas de *Aspergillus flavus* ha de requerir investigación adicional. Sin embargo, se ha completado la secuenciación del genoma de *A. flavus* NRRL 3357 (Payne et al. 2006). Ésta información será trascendental para formular estrategias que permitan el control de contaminación por aflatoxinas en los cultivos de importancia económica.

CAPITULO II

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar el crecimiento de *Aspergillus flavus* en medio sólido empleando diferentes sustratos para evaluar la relación de la fuente de carbono utilizada con la producción de enzimas.

2.2 Objetivos particulares

Evaluar las características macroscópicas de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 y *Aspergillus flavus* CECT 2687 utilizando diversos sustratos simples y complejos.

Determinar las *preferencias nutricionales* de ambas cepas de acuerdo al índice de crecimiento medido en cada sustrato.

Determinar la producción de enzimas extracelulares mediante una fermentación en estado sólido y así comparar en función de la cepa y del tipo de sustrato.

Desarrollar una técnica que permita la obtención de enzimas secretadas en tiempos cortos de fermentación utilizando como sustrato cáscara de limón.

Realizar un análisis electroforético de los filtrados enzimáticos obtenidos en tiempos cortos de fermentación.

CAPITULO III

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Aspergillus* en la actualidad comprende aproximadamente 250 especies que se denominan colectivamente *Aspergilli* (Bennett, et al, 1992; Samson y Varga, 2010), siendo el hongo filamentoso más abundante del mundo así como el responsable del deterioro de muchos productos alimenticios.

Aspergillus flavus es un hongo con una gran distribución en la naturaleza, encontrándose en regiones tropicales y subtropicales. Tiene un alto significado en la agricultura debido a la producción de aflatoxinas carcinogénicas, lo cual reduce el valor de cultivos contaminados. Este hongo posee las características de ser un patógeno oportunista, infectando plantas, animales e insectos. Asimismo, es un microorganismo saprófito importante que crece sobre una gran variedad de sustratos simples y complejos (celulosa, quitina, pectina, xilano) y secreta una gran variedad de enzimas para su desarrollo; como proteasas, lipasas, amilasas, hidrolasa, etc., que han sido consideradas como factores de virulencia.

Con base en estudios anteriores del grupo de investigación, se sabe que existe gran variabilidad en el tipo de enzimas secretadas por cepas de *Aspergillus flavus* que dependen del origen de la cepa y el tipo de sustrato que utiliza como fuente de carbono, entre otros factores. Además de que el uso de residuos agrícolas mediante una fermentación en estado sólido permite obtener mejores resultados en la producción enzimática sobre una fermentación sumergida, aunado a la reutilización de estos residuos como sustratos naturales complejos que disminuyen los costos de producción y aumentan el valor agregado en los productos obtenidos.

El conocimiento del tipo de enzimas que produce el hongo durante la colonización vegetal, proporcionará información importante que permita formular estrategias para controlar la contaminación de cultivos con *Aspergillus flavus*.

CAPITULO IV

4. ANTECEDENTES

4.1 Componentes de la pared celular de plantas

La pared celular de plantas proporciona una barrera física entre los agentes patógenos y los contenidos internos de las células vegetales. Los polisacáridos de alto peso molecular, están reticulados por enlaces iónicos y covalentes en una red que resiste la penetración física (Vorwerk, et al, 2004) y tienen que ser degradados antes para que puedan ser utilizados como fuente de carbono en moléculas más sencillas. Los polisacáridos de la pared celular son los componentes orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza, constituyen el 90% de la pared celular y se puede dividir en tres grandes grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina (Coutinho, et al, 2009).

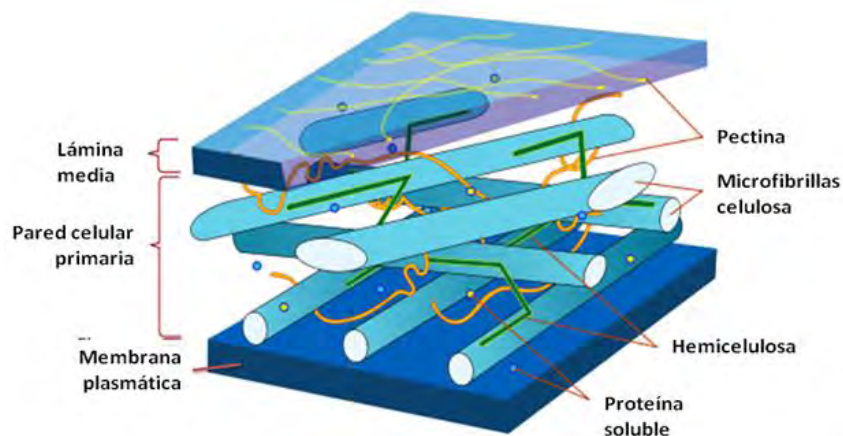


Figura 1. Estructura de la pared celular de plantas (Prasanna, et al, 2007)

Además de actuar como barrera eficaz de protección frente a organismos patógenos y depredadores, la pared celular de la planta cumple en primer lugar con la función esencial de mantener la forma de la célula y dotar al tejido de resistencia mecánica (Vorwerk, et al, 2004).

La composición de la pared celular de plantas varía considerablemente de una especie a otra y de las adhesiones dentro de las mismas (Hazen, et al, 2003). Se estima que la composición es la siguiente: 35% pectina, 25% celulosa, 20% hemicelulosa y 10% proteínas estructurales ricas en hidroxiprolina (Fig.1) (Prasanna, et al, 2007).

a) Celulosa

La celulosa comprende de 30-60% de lignocelulosa lo que la hace ser el biopolímero orgánico más abundante en la naturaleza (Rizk, et al, 2012). Además, la celulosa es el principal constituyente de la pared celular, se trata de un polímero lineal de residuos de glucosa (alrededor de 8000 a 12000 unidades), unidos por enlaces β -1,4. Estos enlaces están conectados con regiones amorfas y usualmente existe en forma cristalina (Li, et al, 2003). Se presenta como estructuras ordenadas, en forma de fibras, cuya principal función es el asegurar la rigidez de la pared celular de plantas (Lerouxel, et al, 2006).

b) Hemicelulosa

La hemicelulosa representa el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, pues comprende de 20-40% de la biomasa lignocelulótica (Rizk, et al, 2012). Es el polisacárido más heterogéneo y es la segunda estructura más abundante en la pared celular, cumple con la función de aglutinar las fibras cristalinas de celulosa, dando consistencia a la pared.

El principal polímero de hemicelulosa en cereales es el xilano, un polisacárido constituido por unidades de D-xilosa, unidas por enlaces β -1,4 (cadena principal) y puede ser sustituida por diferentes grupos como L-arabinosa, D-galactosa, acetil, feruloil y residuos de ácido glucurónico (Fig. 2). El segundo polímero más importante encontrado en la hemicelulosa es el glucomanano, que consiste en unidades de D-manosa y D-glucosa, unidas por enlaces β -1,4 y sustituidos con residuos de D-galactosa. Otro componente de la hemicelulosa es el xiloglucano, constituido por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 y sustituidas por unidades de D-xilosa (De Vries & Visser, 2001).

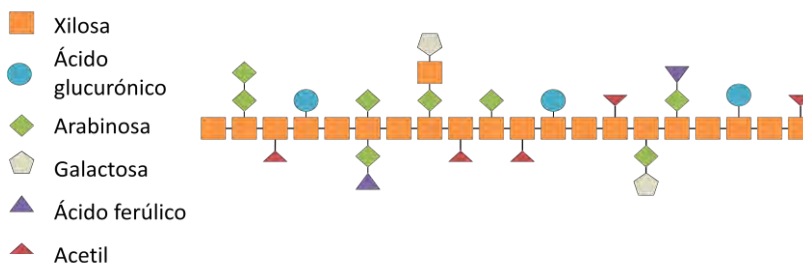


Figura 2. Representación esquemática del xilano (De Vries & Visser, 2001)

c) Pectina

Es el polisacárido más complejo y abundante de la pared celular de las plantas, constituye alrededor del 35% de peso seco, junto con otros polisacáridos a los cuales se encuentra asociada como son: la celulosa, la hemicelulosa (xilosa, galactomananos, xiloglucanos) y lignina; se encuentra localizada en la lámina media de los tejidos vegetales (Bonnin, et al, 2008). La pectina tiene funciones tanto en el crecimiento como en la morfología, desarrollo y defensa de la planta; además sirve como gelificante y estabilizante en diversos alimentos y en productos especiales que tienen efectos benéficos a la salud con múltiples usos médicos (Mohnen, 2008).

La pectina generalmente es dividida en regiones; homogalacturonano, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II y xilogalacturonano, la abundancia relativa de las diferentes regiones varía, siendo las dos primeras regiones los componentes principales (Scheller, et al, 2007). En la figura 3 se ilustran las cuatro regiones de la pectina. Todas estas regiones, juegan un papel importante en la adhesión de células adyacentes y tienen un gran impacto en la viscosidad y turbidez de jugos de frutas (Lozano, et al, 1990).

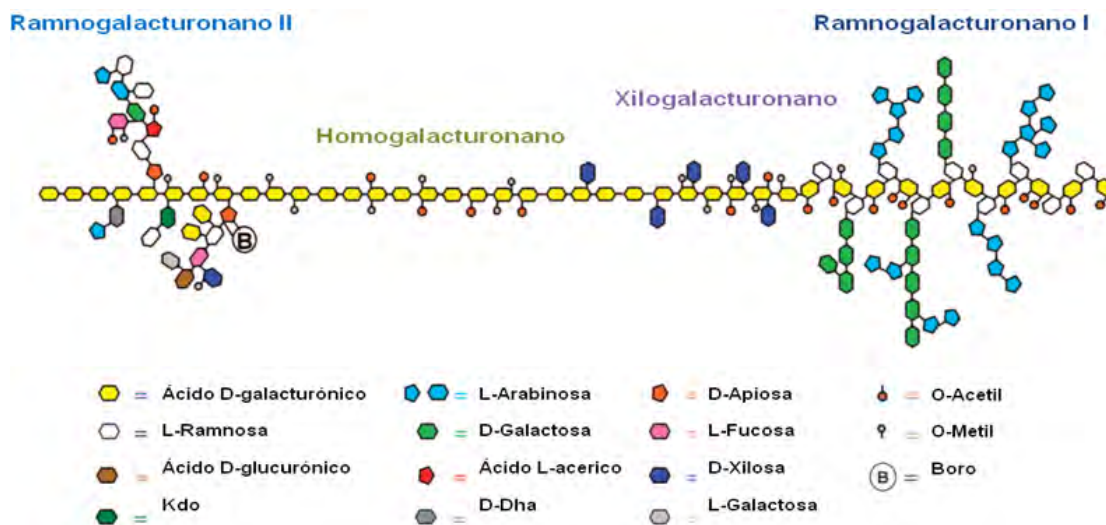


Figura 3. Esquema de la estructura de la pectina (Scheller, et al, 2007)

La región de homogalacturonano es esencialmente un polímero del ácido D-galacturónico, con un contenido de grupos metoxilo variables con los que conforman ésteres metílicos. Los monómeros del ácido galacturónico están unidos entre sí por enlaces glucosídicos α -D-(1-4) y es ocasionalmente interrumpida por monómeros de L-

ramnosa, y en forma menor por otros azúcares neutros tales como la fucosa, ácido glucorónico, xilosa, L-arabinosa y D-galactosa (Solis, et al, 2008). La región de ramnogalacturonano I consiste de dímeros de ácido D-galacturónico unidos por enlaces $\alpha(1-4)$ unidos a monómeros de L-ramnosa por enlaces $\alpha(1-2)$ (Minic & Jouanin, 2006). A la región homogalacturonano se le ha nombrado región lisa, por su casi nula ramificación, y a la región ramnogalacturonano se le ha nombrado región peluda, por su alta sustitución (Bonnin, et al, 2008).

4.2 Enzimas degradadoras de la pared celular de plantas

Las enzimas son biocatalizadores complejos de naturaleza proteica de gran especificidad y eficiencia, que aceleran la velocidad de reacciones que se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son responsables de las transformaciones metabólicas de los seres vivos (Beg, et al, 2001).

Para colonizar las plantas, microorganismos fúngicos han desarrollado estrategias para invadir dicho tejido y optimizar tanto su crecimiento como su propagación. Estos hongos, generalmente secretan una variedad de enzimas hidrolíticas, incluyendo cutinasas, celulasas, pectinasas y proteasas para penetrar al tejido vegetal. Después de la entrada, una estrategia para colonizar una especie de planta es a menudo la secreción de toxinas o compuestos semejantes a las hormonas de plantas que manipulan la fisiología de ésta para el beneficio del patógeno. Esta interferencia puede consistir simplemente en matar a las células vegetales con el fin de la absorción de nutrientes (Knogge, 1996).

a) Celulasas

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace. Hay tres grandes tipos de actividades celulolíticas que producen los hongos; las endoglucanasas, que hidrolizan los enlaces internos de la celulosa y produce residuos, que pueden ser degradados por la celobiohidrolasa que genera celobiosa que después es degradada por β -glucosidasa a glucosa (figura 4).

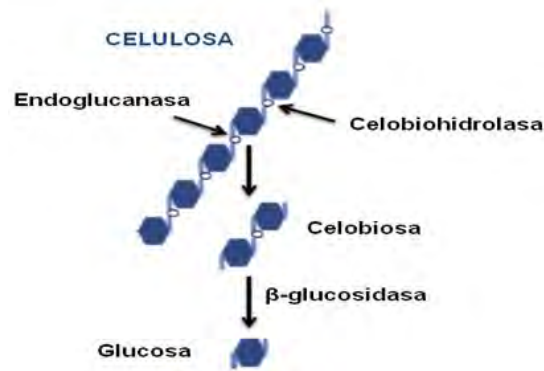


Figura 4. Enzimas celulolíticas mostrando su sitio de acción (Rizk, et al, 2012)

b) Xilanasas

La variable estructura y organización de la hemicelulosa requiere de la acción de muchas enzimas para su completa degradación (Shallom & Shoham, 2003). El xilano es el principal componente de la hemicelulosa y para su completa degradación se necesita un complejo enzimático que participa sinérgicamente (Sandrim, et al, 2004). En la figura 5 se muestran las enzimas xilanolíticas y su sitio de acción.

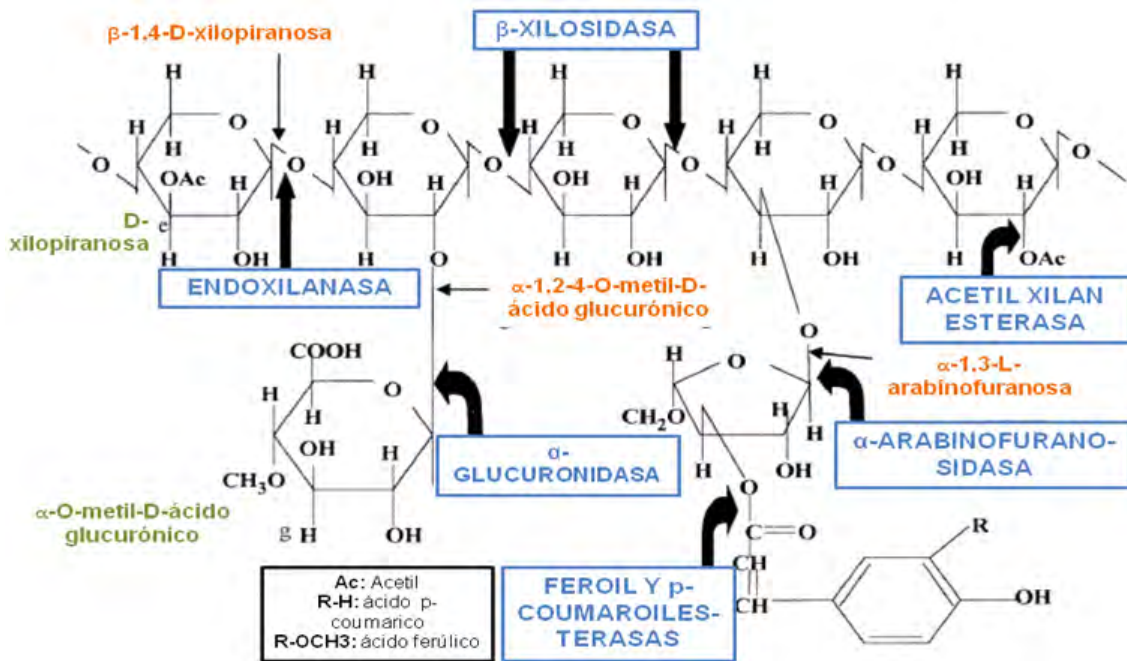


Figura 5. Esquema señalando el sitio de acción de las enzimas xilanolíticas (Beg, et al, 2001)

c) Pectinasas

La degradación de las pectinas involucra una compleja combinación de enzimas pectinolíticas dentro de las cuales se distinguen dos grupos: las pectinesterasas; las cuales remueven los grupos metoxil, y las despolimerasas (hidrolasas y liasas) que degradan la cadena principal; poligalacturonasas, pectatoliasas, y pectina liasas, (Yadav, et al, 2008). Estas enzimas, principalmente, son responsables de la degradación de las moléculas largas y complejas que se producen como polisacáridos estructurales en la lámina media (Kashyap, et al, 2001). En la figura 6 se muestra la estructura de la pectina y las enzimas que participan en su degradación.

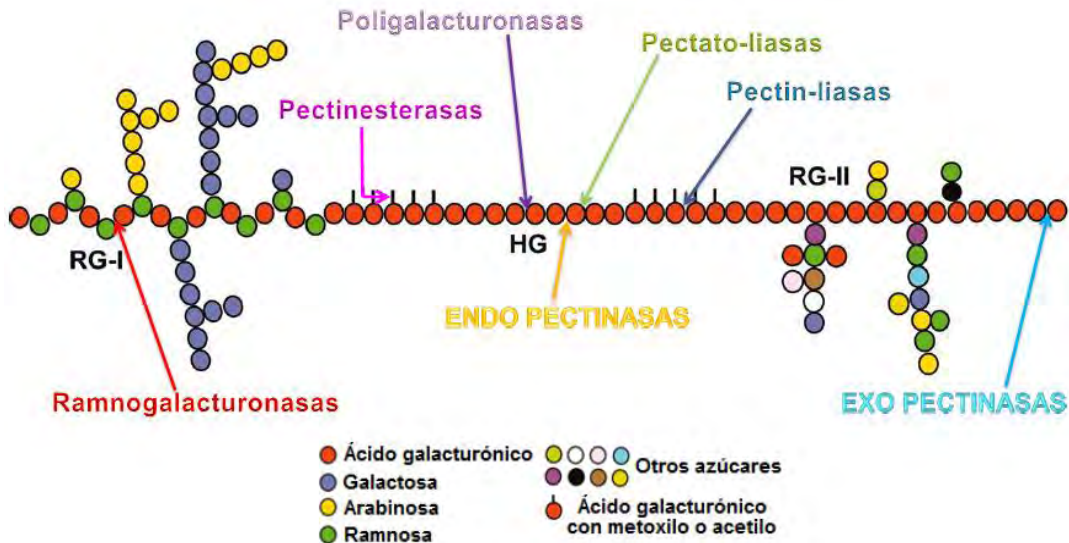


Figura 6. Enzimas pectinolíticas y sus sitios de acción
(Copyright ©2012 Adisseo. All rights)

d) Enzimas accesorias

Las enzimas accesorias participan conjuntamente con las celulasas, xilanasas y pectinasas para lograr la completa degradación de los polímeros de la pared celular de las plantas. Actúan en los sustituyentes de las cadenas laterales de los polisacáridos de la pared celular, algunas otras en los enlaces entre el residuo de la cadena principal y el sustituyente, mientras que otras enzimas rompen los enlaces internos o terminales de las cadenas laterales (De Vries & Visser, 2001).

4.3 El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez por el micólogo P. A. Micheli en 1729, al observar las esporas unidas a los conidióforos describiéndolo como “cabeza rugosa”. Este género ha sido clasificado muchas veces en función de su morfología y en la actualidad comprende aproximadamente 250 especies que se denominan colectivamente *Aspergilli* (Bennett, et al, 1992; Samson y Varga, 2010).

A pesar de las técnicas nuevas tanto moleculares como bioquímicas, las estructuras morfológicas siguen siendo una importante característica para la clasificación de *Aspergillus*, que se identifica por una estructura morfológica típica: un conidióforo, que incluye un tallo y una cabeza conidial, que surge de la especialización de una estructura micelial llamada célula pie. Los conidióforos no son septados, se ensanchan hacia la punta y terminan en una estructura globosa, de incolora a amarillenta, llamadas vesículas. Las vesículas tienen una superficie total de alrededor de 10 a 15 mm de largo. Las conidias son producidas sucesivamente desde las puntas de las fialides, formando así cadenas no ramificadas y cada una contiene más de 100 conidias o esporas; son más o menos globosas y tienen 4-5 mm de diámetro pero ocasionalmente son más pequeñas.

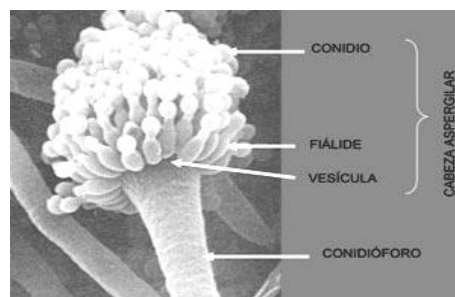


Figura 7. Estructuras de reproducción asexual de *Aspergillus* sp.
(Copyright © 2013. Facultad de Medicina. All rights)

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de las especies de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro (Kozakiewicz, 1989). Las especies difieren entre sí en cuanto a sus requerimientos nutricionales y de crecimiento; son capaces de asimilar minerales de medio mínimo y sobrevivir en simples fuentes de carbono y nitrógeno, sin requisitos de vitamina. La

mayoría son mesófilos, siendo su rango de temperatura de 10-40°C, creciendo con facilidad a temperaturas entre 15-30°C y con un aw que puede ir desde 0.78 hasta 0.95. Son microorganismos morfológicamente complejos, poseen diferentes formas a lo largo de su ciclo de vida, desde una estructura básica vegetativa (espora), hasta un filamento tubular (hifa). La hifa es donde se lleva a cabo el intercambio de sustancias con el ambiente, crece y se ramifica formando una estructura llamada micelio. Después de un cierto periodo vegetativo el crecimiento continúa con la reproducción, que se lleva a cabo por medio de la formación de esporas sexuales o asexuales (Smith, 1994).

En el reino de los hongos, las esporas son el mejor vehículo de distribución. Algunas esporas tienen morfologías complejas y ornamentaciones que reflejan funciones muy especializadas. Otras esporas son simplemente unicelulares y esféricas. Después de su formación, las esporas son liberadas hacia el ambiente por diferentes mecanismos, algunas son liberadas por la acción del agua o por el aire. Diversos hongos forman diferentes tipos de esporas al mismo tiempo, pueden ser por mecanismos sexuales o asexuales (De Vries & Dijksterhuis, 2006). La espora es una estructura altamente especializada para la reproducción, supervivencia y distribución de los hongos filamentosos. Se caracteriza por su mínimo gasto metabólico, bajo contenido de agua y poco o nulo movimiento citoplasmático. Las esporas asexuales se producen por división mitótica, mientras que las esporas sexuales se dividen por meiosis y son capaces de proveer nuevas recombinaciones genéticas. La respiración aeróbica es un requisito para la mayor parte de las esporas al iniciar su germinación, mientras que otras demandan dióxido de carbono, además de que requieren un nivel de humedad y temperatura favorables para iniciar con el proceso de germinación.

Cuando las esporas encuentran las condiciones para crecer, comienzan a germinar y forman una célula cilíndrica llamada hifa, el cual penetra y disuelve los nutrientes. (De Vries & Dijksterhuis, 2006). En un crecimiento superficial los hongos filamentosos presentan un crecimiento heterogéneo, con patrones que incluyen hifas aéreas, de superficie y sumergidas. En muchos hongos esta estructura forma agregados discretos que varían de tamaño, y tienen la cualidad de resistir las condiciones adversas del ambiente, como pH y la temperatura, cuando las condiciones de crecimiento son normales, se produce nuevo micelio y comienza la generación de esporas. Durante el

crecimiento del micelio las hifas de la punta son siempre consideradas como jóvenes, y la parte más alejada es progresivamente más vieja.

4.3.1 Generalidades de *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus es un hongo saprófito que tiene una distribución mundial frecuentemente aislado del suelo, especialmente de áreas tropicales y subtropicales, de forrajes y vegetación en descomposición, de semillas y granos almacenados y de varios tipos de productos comestibles (Mellon, et al, 2007). Se ha encontrado en trigo, avena, cebada, maíz, arroz, algodón, caña de azúcar, café, tomate, cebolla, rábano, guisante y cacahuete entre otras. Sin embargo, no solo se ha encontrado en plantas justo después de la cosecha o durante el almacenamiento, sino también en productos vegetales procesados como en harina de granos y cereales. Este organismo es también un patógeno oportunista y tiene importancia agronómica debido a que puede producir una potente aflatoxina carcinogénica durante la infección de semillas, lo que resulta la disminución en los valores de los cultivos (Mellon, et al, 2002).

Pertenece a la subdivisión de los Fungi Imperfecti que incluye a los hongos que se reproducen por mecanismos asexuales. Su ciclo de vida puede comprender de 2 etapas, una etapa asexual y otra sexual; la etapa asexual consiste en la producción de esporas por mitosis, también llamada etapa de conidiación. La fase sexual forma un cleistotecio -cuerpos fructíferos esféricos formados por una red de hifas- dentro de la cual se desarrollan esporas derivadas de un proceso de meiosis.

Tiene la gran capacidad de crecer en medios simples y complejos, ya que contiene un amplio paquete de enzimas que son capaces de degradar material vegetal. Produce numerosas enzimas hidrolíticas, α -amilasas, pectinasas, proteasas y lipasas. Estas enzimas se cree que son importantes para el ataque de hongos y su virulencia en permitir la utilización de nutrientes lipídico y ricos en proteínas (Mellon, et al, 2007).

En condiciones adversas *Aspergillus flavus* es capaz de sobrevivir por numerosas estructuras esféricas, resistentes llamadas esclerocios (Coley-Smith, et al, 1971), estas estructuras se proponen como formas residuales de cleistotecios (Geiser, et al, 1996). Cabe mencionar que, especies de *Aspergillus* con etapas sexuales conocidas, tienden

a ser actores secundarios en las infecciones de humanos, tal vez debido a su tendencia a producir menos esporas asexuales (Geiser, 2009).

En relación a las características macroscópicas de *Aspergillus flavus*, las colonias son de color verde oliváceo a verde amarillento, micelio blanco; esclerocios (masas redondeadas de micelio parecidos a los cleistotecios pero sin esporas sexuales), cuando están presentes, de color marrón oscuro a negro, variables en forma y tamaño; reverso incoloro, marrón claro o anaranjado; textura de la colonia variable, generalmente lanosa o aterciopelada (Abarca, 2000), tanto los esclerocios como los cleistotecios, son estructuras morfológicas que sirven como identificación entre una cepa y otra. Bennett (2010) comenta que los esclerocios, sirven como estructuras de descanso que permiten a las especies sobrevivir a condiciones adversas de crecimiento.

4.4 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido consiste en el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en materiales sólidos con baja disponibilidad de agua libre, aunque el sustrato debe poseer suficiente humedad para apoyar el crecimiento y el metabolismo de los mismos (Pandey, 2003, Moo-Young, et al, 1983, Raimbault, 1998). El sustrato -natural o inerte- es empleado como soporte sólido actuando como fuente de carbono (Pandey, et al, 1999a). El agua es esencial para el crecimiento microbiano y en FES está presente en cantidades pequeñas (Moo-Young, et al, 1983).

Las condiciones de cultivo son más similares al hábitat natural de los hongos filamentosos, por lo que estos son capaces de crecer y excretar grandes cantidades de enzimas. Después de la extracción las concentraciones enzimáticas son generalmente más grandes que las obtenidos por fermentación sumergida (FS) (Viniegra-González, 1998 y Castilho, et al, 2000), sin embargo, hay una escasez de información respecto a los estudios fisiológicos que comparan FES y FS cuando se trata de explicar porque los microorganismos producen mayores cantidades en el primer tipo de proceso que en comparación con el segundo (Viniegra-González, et al, 2003).

Las ventajas que presenta la utilización de FES para la producción de ciertos productos de interés, son diversas, como por ejemplo; los medios de cultivo son simples, el producto de interés se concentra, lo que facilita su purificación e incrementa su productividad. La cantidad de residuos generados es más pequeña que en la fermentación sumergida, existe menor demanda en la esterilización debido a la baja actividad del agua usada en este tipo de fermentación (Singhania, et al, 2009), menores costos de operación, mayor estabilidad a pH y temperaturas extremas (Holker, et al, 2004).

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).

La actividad de agua de un medio se ha atribuido como un parámetro fundamental para la transferencia de masa de agua y solutos a través de las células microbianas (Singhania, et al, 2009) ya que cumple con numerosas funciones en los sistemas biológicos, además de proporcionar nutrientes, neutraliza la cantidad de ciertos desechos o metabolitos. Sin embargo, se ha encontrado que la actividad de agua de un medio, afecta el mecanismo de crecimiento de los microorganismos, tiene un efecto sobre el crecimiento radial, en la producción de biomasa, en la evolución de germinación y esporulación, y de forma general en la actividad metabólica de una colonia de hongos (Gervais, et al, 1988; Gervais, et al, 2003).

4.5 Sustratos complejos

A los sustratos complejos se denominan residuos orgánicos que no han sufrido modificaciones o alteraciones en su estructura. Tanto los hongos saprófitos como patógenos utilizan como nutrientes compuestos en su estado natural. Si bien, el uso de este tipo de sustratos, permite evaluar de manera más detallada, la capacidad y el potencial que tienen los hongos para degradar diferentes tipos de sustratos y además conocer el tipo de enzimas que estos requieren para llevar a cabo dicha degradación.

El aprovechamiento de los residuos agroindustriales puede contribuir a reducir la contaminación ambiental mediante su incorporación a procesos como la fermentación en estado sólido (FES), donde puedan obtenerse productos de mayor valor agregado. La FES puede efectuarse con el uso de residuos y el empleo de hongos filamentosos para obtener complejos enzimáticos con actividad hemicelulolítica (Lagunas, et al, 2006) y pectinolítica de acuerdo al tipo de sustrato empleado. Para el empleo de estos sustratos, se dan pocos pre-tratamientos, generalmente un lavado previo y molido (Aguilar, et al, 2008).

a) Cáscara de limón

Dentro de los vegetales, los cítricos son las frutas con mayor contenido de pectina en todas sus partes. La cáscara de limón se le conoce a la corteza que rodea dicha baya cítrica, la cual es muy suave al tacto y le proporciona al limón su color y aroma tan característico (Ywassaki, 2011). La cáscara de limón constituye la materia prima para la fabricación de ácido cítrico, pectinas y aceites esenciales. La pectina se obtiene a partir de la cáscara deshidratada y es importante mencionar que en México y en otros países, la cáscara de limón es el insumo para la producción de pectina y aplicarlos en diferentes áreas de la industria. De cada tonelada de fruta fresca se obtienen 300 kg de cáscara fresca, que al ser deshidratada se reduce a 50 kg aproximadamente (Dussel, 2002).

De acuerdo a la fracción soluble en alcohol de la cáscara de limón, los componentes principales son mono y disacáridos, aceites esenciales y ceras, mientras que en la fracción insoluble contiene principalmente celulosa, lignina, pectina y hemicelulosa (Sinclair & Crandall, 1949). La composición proximal de la cáscara de limón es 81.6% de humedad, 1.5% de proteína, 0.3% de grasa, 16.0% de carbohidratos, incluyendo fibra, 0,6% de cenizas (calcio, fósforo, hierro, sodio y potasio) y en porciones mucho más bajas, vitamina A, tiamina, riboflavina y niacina (Morton, 1987).

b) Olote de maíz

En la mayoría de las actividades agropecuarias y agroindustriales, los residuos agrícolas o esquilmos, 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).

El residuo del desgranado del maíz (*Zea mays L.*) se conoce como olote de maíz, un tejido esponjoso y blanco que representa la médula donde se almacenan las reservas alimenticias del cereal. Está compuesto en base seca por celulosa (45 %), hemicelulosa (35 %) y lignina (15 %), de los cuales la hemicelulosa se compone mayoritariamente por xilano de olote (28-35 % b.s.) uno de los heteroxilanos complejos que contiene residuos de xilosa con enlaces β -1,4 (Saha y Bothast, 1999). Otros autores, mencionan, que el olote constituye un residuo de origen agrícola que tiene alto contenido de xilano (34%, b.s) y que en FES es útil como soporte y sustrato para inducir secreción de xilanasas (Pellerin, et al, 1991).

c) Salvado de trigo

El salvado es uno de los principales subproductos que se obtiene a partir de la molienda del grano de trigo. Proviene de las cinco capas más externas del grano, formadas por una primera capa exterior envuelta o cutícula, la segunda o epicarpio, la tercera o endocarpio, la cuarta capa denominada testa y la quinta, denominada aleurona. Los principales constituyentes del salvado de trigo son polisacáridos no amiláceos; 46%, almidón de 10-20%, proteínas de 15-22% y lignina de 4 a 8%. Los arabinoxilanos son los polisacáridos no amiláceos más abundantes (Zhang, 2011). Otro autor, menciona que contiene 32.9% de celulosa, 24.0% hemicelulosa y 8.9% lignina (Nigam, 2009). Su producción llega a ser de hasta 11 millones de toneladas por año en Estados Unidos (Perlack, et al, 2005) y de 154-185 x 10⁶ toneladas a nivel mundial (Sánchez, 2009). Referente a la cantidad anual en México de esquilmos provenientes del trigo, es de alrededor de 4 500 000 toneladas (Muñoz, 2012).

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

4.6 Aplicaciones industriales de las enzimas fúngicas

Desde tiempo atrás, las enzimas han jugado un papel central en diversos procesos de fabricación, tales como en la producción de vino, queso, pan, modificación de fécula, entre otros. Gracias al conocimiento del uso de microorganismos productores de enzimas y otros productos metabólicos se ha investigado el gran potencial de aplicaciones industriales (Beg, et al, 2009), especialmente los hongos filamentosos reciben mucha atención por sus posibles aplicaciones como productores de enzimas xilanolíticas.

Las cepas de *Aspergillus flavus* se utilizan para producir enzimas para procesamiento de alimentos y otros usos industriales (Chavalet et al, 1992; Van den Hondel et al, 1992, Ward et al, 1992), además de metabolitos secundarios; tales como el ácido cítrico (Benett, et al, 1992).

En la industria del papel y la pulpa, las xilanasas libres de celulasa permiten el bioblanqueamiento, reduciendo la cantidad de químicos blanqueadores utilizados, como el cloro, (De Vries y Visser, 2001; Subramaniyan & Prema, 2002; Bennett, 2010). En la industria de la panificación, estas enzimas solubilizan la fracción de arabinosilano en la masa, permitiendo que aumente el volumen del pan y la calidad de la masa (Bhat, 2000; De Vries & Visser, 2001). Otras aplicaciones son la producción de xilosa, xilobiosa y xilooligómeros, que pueden usarse como aditivos funcionales en alimentos o como endulzantes. Las galactosidasas se utilizan para mejorar la capacidad de gelificación de galactomananos, que tienen aplicaciones en la industria alimentaria, así como en las industrias cosméticas y farmacéuticas.

Las celulasas pueden ser usadas en la formulación de jabón en polvo, en la industria textil, en procesos que incluyen suplemento de alimento animal, en la extracción de jugos de frutas y vegetales así como en la fabricación de pulpa y papel (Rau, et al, 2008; Mandebvu, et al, 1999; Gusakov, et al, 2000; Camassola, 2007).

Las pectinasas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria para la producción de zumos, bebidas de frutas y vinos (Semenova, et al, 2006). La pectin metil esterasa y otros enzimas pectinolíticas también se utilizan para la producción de

puré de zanahoria (De Vries & Visser, 2001). En el caso de los jugos claros espumosos se añaden enzimas con el fin de aumentar el rendimiento de zumo durante el prensado y el colado del jugo para eliminar la materia suspendida para dar jugos claros brillantes (libre de turbidez) (Kashyap, et al, 2001).

De manera más específica; el empleo de enzimas en la industria alimentaria se basa en tres aspectos fundamentales:

- i. control de calidad de ciertos alimentos
- ii. modificación de las propiedades de algunos aditivos alimentarios así como de los propios alimentos y
- iii. producción de enzimas utilizadas como aditivos alimentarios (Aguilar, et al, 2008).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismos

Se utilizaron dos cepas *Aspergillus flavus*, las cuales están bien identificadas, una no es toxigénica; NRRL 6541 y otra si genera: CECT 2687.

Las cepas se activaron en agar papa dextrosa (PDA) mediante tres o cuatro perlas de esporas liofilizadas. Las placas se incubaron a 37 °C por 96 h. Se tomó una asada del cultivo seleccionado con un asa micológica estéril, que fue depositada al centro de una placa con agar Sabouraud; a continuación, el inóculo fue extendido en toda la placa utilizando un asa de Drigalsky. Las placas se incubaron a 37°C por 72 h. Las cepas se manejaron en una suspensión de esporas en solución salina isotónica con Tween 80 (ver anexo) y se resembraron quincenalmente en placas con agar Sabouraud mediante siembra masiva para mantener la cepa viable. Las placas se incubaron a 37°C por 72 h, posteriormente, se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

6.1.1 Cosecha de esporas

Se vertieron 10 mL de solución salina isotónica con tween 80 estéril en una de las cajas sembradas, y se raspó suavemente su superficie con un asa Drigalsky para recuperar las esporas. Una vez que éstas fueron liberadas, la suspensión se transfirió con pipeta a un tubo para centrifuga con tapón. Para lavar las esporas, se centrifugó la suspensión a 500 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante; a continuación, las esporas se resuspendieron hasta alcanzar un volumen de 10 mL de solución salina con tween; dicho lavado se realizó cuatro veces más.

6.1.2 Conteo de esporas

Se determinó la concentración de esporas en la suspensión final (10 mL) mediante el método de conteo directo con la cámara de Neubauer. Para ello se tomaron 20 µL de la suspensión que fueron depositados al centro de la cámara y se colocó un cubreobjetos. La cámara se observó al microscopio con el objetivo de 40x. Se contaron las esporas contenidas en 16 cuadros que conforman uno de los cuadrantes de la cámara para finalmente calcular la concentración de esporas mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\text{esporas}}{\text{mL}}\right) = (\# \text{ esporas contadas})(\text{vol cuadrante (mL)})(\# \text{ cuadrantes})(\text{factor de dilución})$$

6.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo contenían medio mínimo (ver anexo) más la fuente de carbono seleccionada, 25 mM para los azúcares simples, 1% para polisacáridos puros y de 3% para los sustratos complejos.

Las fuentes de carbono utilizadas fueron: L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa; D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-fructosa, L-ramnosa, ácido D-galacturónico, maltosa, lactosa, sacarosa y rafinosa; como polisacáridos puros: xilano de abedul, xilano de avena, xilano de haya, goma arábica, goma guar, almidón soluble, celulosa, caseína, pectina cítrica, pectina de manzana y como sustratos complejos: cáscara de limón, olote de maíz y salvado de trigo. Además de agar bacteriológico al 1.5%, los medios se ajustaron a pH de 6.00 antes de esterilizar a 121°C / 15 min a 15lb/in²

6.3 Condiciones de crecimiento

Se inocularon 10,000 esporas/placa de *Aspergillus flavus*, manejando tres diferentes condiciones de crecimiento:

- **Condición 1.** Inoculo central sobre el medio de cultivo sin membrana. Incubación durante 96 horas a 37°C. A esta condición se le llamará –más adelante para fines prácticos– *Análisis de crecimiento*.
- **Condición 2.** En condiciones estériles se colocó una membrana porosa de policarbonato (Isopore™ Membrane filters 0.2 µm) sobre el medio sólido y se inoculó la suspensión de esporas en la parte central de la placa. Incubación durante 96 horas a 37°C. Para esta condición se adoptará el nombre de: *Producción de las actividades enzimáticas en cultivos sólidos con diferentes fuentes de carbono*.
- **Condición 3.** Se realizaron diversos cortes circulares de 0.8 a 2.0 cm de diámetro (dependiendo el crecimiento de cada cepa) sobre toda la superficie de la placa, utilizando únicamente como sustrato cáscara de limón. Se inoculó en el centro de cada cilindro la misma concentración de esporas utilizadas en las condiciones anteriores. Incubación durante 24 y 48 horas a 37°C. Condición que será llamada como: *Producción de enzimas en cáscara de limón*.

Para las tres condiciones, las placas se dejaron absorber con tapa arriba durante 2 h en la campana, para seguido de ese tiempo dejarlas tapa abajo en la incubadora.

6.4 Características de crecimiento fúngico

Se evaluaron las características morfológicas de las colonias, el tipo de desarrollo, aspecto del micelio superficial (desarrollo, aspecto y color) así como del micelio profundo (reverso de la caja), diámetro de la colonia y su peso.

6.4.1 Medición del diámetro colonial

Las colonias fueron medidas desde el anverso y reverso de la placa, con una regla para las colonias circulares; para las colonias que no habían crecido con una figura definida, se trazó un círculo que ocupara en mayor medida el área de crecimiento de las cepas.

6.4.2 Medición de biomasa fúngica

Con ayuda de una espátula estéril se recuperó la biomasa en un cuadro de papel filtro previamente pesado y a peso constante. Posteriormente se colocó el papel filtro dentro de una caja petri en la incubadora a 80°C durante 48 horas. Se determinó su peso en seco.

6.5 Producción de enzimas en medio sólido

Para la producción de enzimas y la cuantificación de las mismas, se utilizó la condición 2 de crecimiento.

6.5.1 Extracción de enzimas

Ya retirada la membrana de la placa, se cortó una circunferencia de agar de un tamaño determinado, abarcando en la mayoría de los casos, el espacio en que creció el hongo (aproximadamente 5.0 cm), dicho cilindro de agar se pesó y maceró en un desmembrador durante 2 minutos a 2000 rpm. La pasta de agar obtenida se transfirió a un tubo de centrifuga al cual se adicionó 5mL de Buffer de acetatos 100 mM pH=5, el tubo se agitó en el vortex y enseguida se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos. El filtrado enzimático se decantó y el resto de agar se desechó. Del filtrado obtenido se determinó la actividad enzimática.

Para la condición 3, después de retirar todos los cilindros de las placas, se hicieron cortes transversales muy delgados para separar la colonia del hongo del resto del cilindro -donde se supone se encuentran las enzimas excretadas- y así macerarlos con

el desmembrador durante 1 min a 2000 rpm, con Buffer de acetatos 100 mM a pH=6. La pasta obtenida se agitó y se transfirió a un tubo para centrifugar a 500 rpm durante 5 min. Posteriormente se decantó y se recuperó el extracto para congelarlo a -70°C.

6.5.2 Determinación de actividades enzimáticas

6.5.2.1 Actividad exo-pectinolítica

Se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados por la pectina por el método DNS, usando una curva patrón de ácido galacturónico. El sistema de reacción consistió de 0.5 mL de sustrato (pectina de frutas cítricas al 1% (p/v), pH=5), con 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM a pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células a 45°C durante 20 min. Al término del tiempo de incubación se le adicionaron 2 mL de DNS y la mezcla se calentó a ebullición en baño María por 5 min, se le añadieron 5 mL de agua destilada y se homogeneizaron en el vortex. Finalmente se centrifugó a 500 rpm durante 5 min para eliminar pectina insoluble y se leyó a una longitud de onda de 575 nm en el espectrofotómetro. Respecto a los blancos, se incubaron sin muestra y tras la adición del DNS se les añadió 0.1 mL de filtrado enzimático y se continuó con la misma metodología que en las muestras. La actividad se expresa en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μ mol de ácido galacturónico en 20 min a las condiciones de ensayo.

6.5.2.2 Actividad xilanolítica

La actividad xilanolítica se determinó a través de la cuantificación de los azúcares reductores liberados del xilano por el método DNS, usando una curva de xilosa como patrón, obtenidos después de la incubación de 0.5 mL de xilano de abedul al 1% (p/v) + 0.4 mL de buffer de acetatos 100 mM a pH=5.0 y 0.1 mL de filtrado enzimático libre de células a 50°C durante 20 min. Al término del tiempo de incubación se le adicionó 1 mL de DNS y la mezcla se calentó a ebullición por 5 min., se le añadieron 5 mL de agua destilada y se leyó directo a una longitud de onda de 575 nm en el espectrofotómetro.

Una unidad (U) de actividad xilanolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μmol de xilosa en 20 min a las condiciones de ensayo.

6.5.2.3 Actividades de enzimas accesorias

La actividad de α y β - galactosidasa, α y β -glucosidasa, α y β - arabinosidasa, α y β - xilosidasa, α -ramnosidasa y β -manosidasa, se determinó usando pnp- α/β -D-galactopiranosido, pnp- α/β -D-glucopiranosido, pnp- α/β -L-arabinofuranosido, pnp- α/β -D-xilopiranosido, pnp- α -L-ramnopiranosido y pnp- β -D-manopiranosido como sustratos respectivamente. El sistema de reacción consistió en 100 μL de *p*-nitrofenol-*correspondiente* (1mg/mL en Buffer acetatos 50 mM a pH=5) más 25 μL de filtrado enzimático, incubado a 40°C durante 15 min. Transcurrido el tiempo se adicionaron 75 μL de Na_2CO_3 0.25 M para detener la reacción. Para calcular la concentración final se determinó usando una curva patrón con el reactivo *p*-nitrofenol a 0.05 mM, medida a una longitud de onda de 405 nm.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzimas necesaria para liberar 1 $\mu\text{mol/mL}$ de *p*-nitrofenol a las condiciones trabajadas.

6.6 Concentración de filtrados enzimáticos por liofilización

Se congelaron a -70 °C -durante toda la noche- los extractos obtenidos de los cilindros del medio con cascara de limón incubadas a 24 y 48 horas (condición 3). Se liofilizaron las muestras en tubos para centrifuga de 10 mL a 47×10^{-3} mbar y -49°C por 24 horas. Las muestras fueron resuspendidas en la menor cantidad posible de buffer de fosfatos 100 mM pH= 7.5.

6.7 Determinación de proteína

Para conocer cuanta proteína se obtuvo en la condición 3 de trabajo y determinar si es posible un análisis de espectrometría de masas, se realizó la determinación de proteína por el Método de Bradford. Se determinó por la cuantificación de la unión de un colorante, Comassie Blue G-250, a las proteínas usando una curva de albumina sérica bovina (0.1 mg/mL). El sistema de reacción consistió de 90 μL de H_2O , 10 μL de filtrado enzimático libre de células y 200 μL de reactivo de Bradford, a temperatura ambiente, durante 5 min. Se lee a una $\lambda=595$ nm en el espectrofotómetro.

6.8 Análisis electroforético

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS al 12% de acrilamida de 8 x 8 cm. Las muestras utilizadas fueron concentradas y resuspendidas en el volumen mínimo posible de buffer de corrimiento (Bio-Rad Laboratories) y se adicionó buffer de tratamiento desnaturalizante (ver anexo).

Se tomaron 10 μ L de muestra con 10 μ L de buffer de corrimiento (ver anexo) para cargar 20 μ L por carril, se llevó a cabo a corriente constante 15mA, a través de una unidad de geles verticales de 1.5 mmigtle Small SE-245 (HoferSci. Ins. USA). Después de este tiempo los geles fueron teñidos con una solución que contiene azul de Coomassie R-250 (ver anexo) durante dos horas con ligera agitación y se destiñeron con una solución de ácido acético al 10% v/v.

Antes de realizar la electroforesis en gel, la muestra tuvo un tratamiento previo con TCA al 10% para precipitar las proteínas presentes en los extractos enzimáticos. Se mezcló 1mL de la solución con la muestra, se agitaron y se dejó precipitar toda la noche en el congelador a -4°C . Pasado ese tiempo se volvió a agitar y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos y se desechó sobrenadante. Se adicionó 1mL de acetona fría, se agitó y se incubó durante 10 minutos a -4°C , pasado ese tiempo se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos y se removió sobrenadante. Este lavado se realizó 4 veces más. Finalmente se dejó secar la muestra en la incubadora para evaporar disolvente y así realizar electroforesis en gel.

CAPITULO VI

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de establecer la capacidad de crecimiento de las cepas utilizadas en diferentes fuentes de carbono y determinar sus preferencias nutricionales, se evaluó el crecimiento de dos cepas de *Aspergillus flavus* -una generadora de toxinas y otra que no produce- en una amplia variedad de fuentes de carbono que incluyen polisacáridos propios de la pared celular de las plantas y otras que no están presentes en la pared celular, además de azúcares simples (monosacáridos, disacáridos) debido a que la mayoría de los microorganismos aprovechan de mejor manera fuentes de carbono fácilmente asimilables, especialmente la glucosa, aunque también utilizan fructosa, manosa y galactosa como fuente de energía.

7.1 *Aspergillus flavus* NRRL 6541

7.1.1 Análisis de crecimiento (condición 1)

El microorganismo tuvo la capacidad de crecer en todas las fuentes de carbono, incluso en el medio que no contenía fuente adicionada de carbono, sin embargo su crecimiento fue escaso, presentando una colonia muy delgada de color blanco, sin evidente esporulación. Los hongos al estar en una condición de estrés -en este caso- en condiciones poco aptas para su crecimiento debido a la falta de nutrientes, tienen la habilidad de crecer con sus propios azúcares o solutos compatibles (De Vries & Dijksterhuis, 2006), que estos mismos generan en su metabolismo y de ellos alimentarse, como de trehalosa y algunos polialcoholes. Por esta razón, el desarrollo y esporulación no se ve favorecido.

En cuanto al desarrollo del hongo con los carbohidratos más sencillos se presentó un crecimiento un poco mayor en relación al obtenido con los polisacáridos puros y sustratos complejos, asimismo, la presencia de cleistotecios, se ve favorecida con los azúcares simples: ribosa, rafinosa, lactosa y sacarosa.

En las figuras 8, 9 y 10, se representa el crecimiento de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en azúcares simples, polisacáridos puros y sustratos complejos.

Las características de las colonias son similares con la mayoría de los azúcares; desarrollo miceliar denso, crecimiento radial, circunferencia blanca y filamentosa, esporulación amarilla o verde -según la fuente-, acumulación de biomasa (esporas) en la parte central del inóculo que se dispersan alrededor de la colonia, el aspecto del micelio superficial es algodonoso laxo, sin embargo con xilosa, manosa y glucosa, la colonia es más compacta. El aspecto del micelio profundo; es decir al reverso de la placa; no se nota cambio de color en el medio. Respecto al crecimiento con lactosa y sacarosa, el hongo crece más rápido extendiéndose casi en toda la placa con un aspecto algodonoso lanoso. Esto mostraría que la cepa tiene la capacidad de producir la enzima β -galactosidasa, fenómeno que se observa con los halos o circunferencias blancas en el medio con lactosa; siendo la fuente de carbono que produce el mayor crecimiento radial para este grupo de sustratos.

Tabla 1. Características coloniales de <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 6541 en azúcares simples durante las 96 horas de incubación				
Fuente de carbono / Tiempo	Diámetro colonia (mm) / Esporulación			Desarrollo
	48 h	72 h	96 h	
Sin fuente de Carbono	19	28	36	E
	-	-	-	
L-Arabinosa	25	35	49	A
	++	+++	+++	
D-Ribosa	20	40	60	A
	++	++	+++	
D-Xilosa	24	47	55	A
	++	+++	+++	
L-Ramnosa	22	46	55	A
	+	++	+++	
D-Glucosa	20	46	55	A
	+	+++	+++	
D-Fructosa	20	31	51	A
	++	++	+++	
D-Galactosa	17	35	45	M
	++	++	++	
D-Manosa	21	50	60	A
	++	+++	+++	
Ácido D-galacturónico	21	42	50	M
	+	+	++	
Lactosa	39	52	65	A
	-	+	++	
Maltosa	19	39	52	A
	++	++	+++	
Sacarosa	39	54	63	A
	+	++	+++	
Rafinosa	21	42	52	A
	+	++	++	

En la tabla 1 se muestra para el grupo de los azúcares simples, el diámetro de la colonia medido cada 24 horas a partir de las 48 horas de fermentación, además se asignó una clasificación de (-) a (+++) a la ausencia o cantidad de esporulación. Con la mayoría de los azúcares se observa que la esporulación comienza hasta las 48 horas de incubación, sin embargo para los disacáridos (lactosa y sacarosa) se nota un cambio de color -blanco a amarillo- a las 96 horas.

Respecto al crecimiento colonial en medios de cultivo con polisacáridos puros y sustratos complejos, el crecimiento fue un poco menor respecto a los azúcares simples, resultado que se esperaba ya que es más fácil para el hongo disponer de los nutrientes en una estructura sencilla y fácilmente asimilable. Además la esporulación se observó pasado las 24 horas, igual que en los azúcares simples, sin embargo, con goma arábiga no esporuló y su crecimiento fue similar al medio con únicamente agar, debido a su similar composición y naturaleza, mientras que con goma guar si hay esporulación y crecimiento abundante, textura aterciopelada, colonia color verde con circunferencia amarillenta. La ausencia de esporulación en goma arábiga, altera la formación de un micelio denso, ya que es un sustrato altamente viscoso, con bajo contenido de nutrientes, reduce valores de aw que no hace posible ni la germinación ni el crecimiento (Snow, 1949).

La colonia en xilano de abedul es casi 50% menor que las colonias formadas en xilano de avena o haya, el primero es más verde amarillento y en el segundo es verde pardo, además se observa el halo de degradación que se forma en el medio con xilano de avena, debido a las proteínas que este contiene.

En cuanto a los polisacáridos celulosa y almidón, cabe mencionar que existen diferencias significativas entre ellas en cuanto al crecimiento, ya que con celulosa fue escaso y lento, colonia blanca que se confundía con el color blanco del medio, así como esporulación escasa a las 96 horas; mientras que con almidón se observó el mayor diámetro de las colonias (para este grupo) con bastante esporulación (color amarilla), con aspecto compacto. Lo que significa que esta cepa es capaz de producir mayor cantidad de amilasas que celulasas.

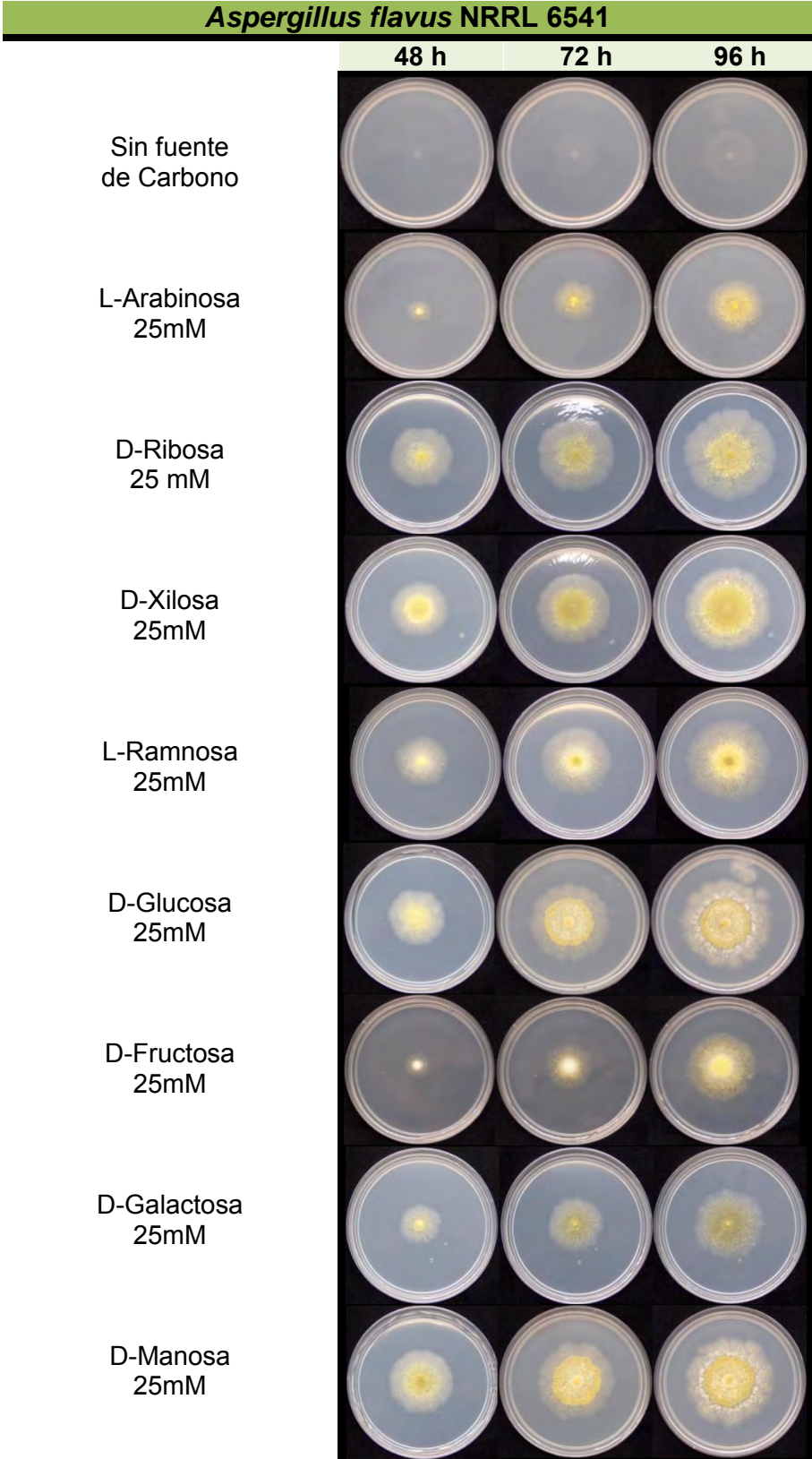


Figura 8. Registro fotográfico de las colonias de *A. flavus* NRRL 6541 en distintos medios de cultivo a las 48, 72 y 96 horas de incubación a 37°C, respectivamente.

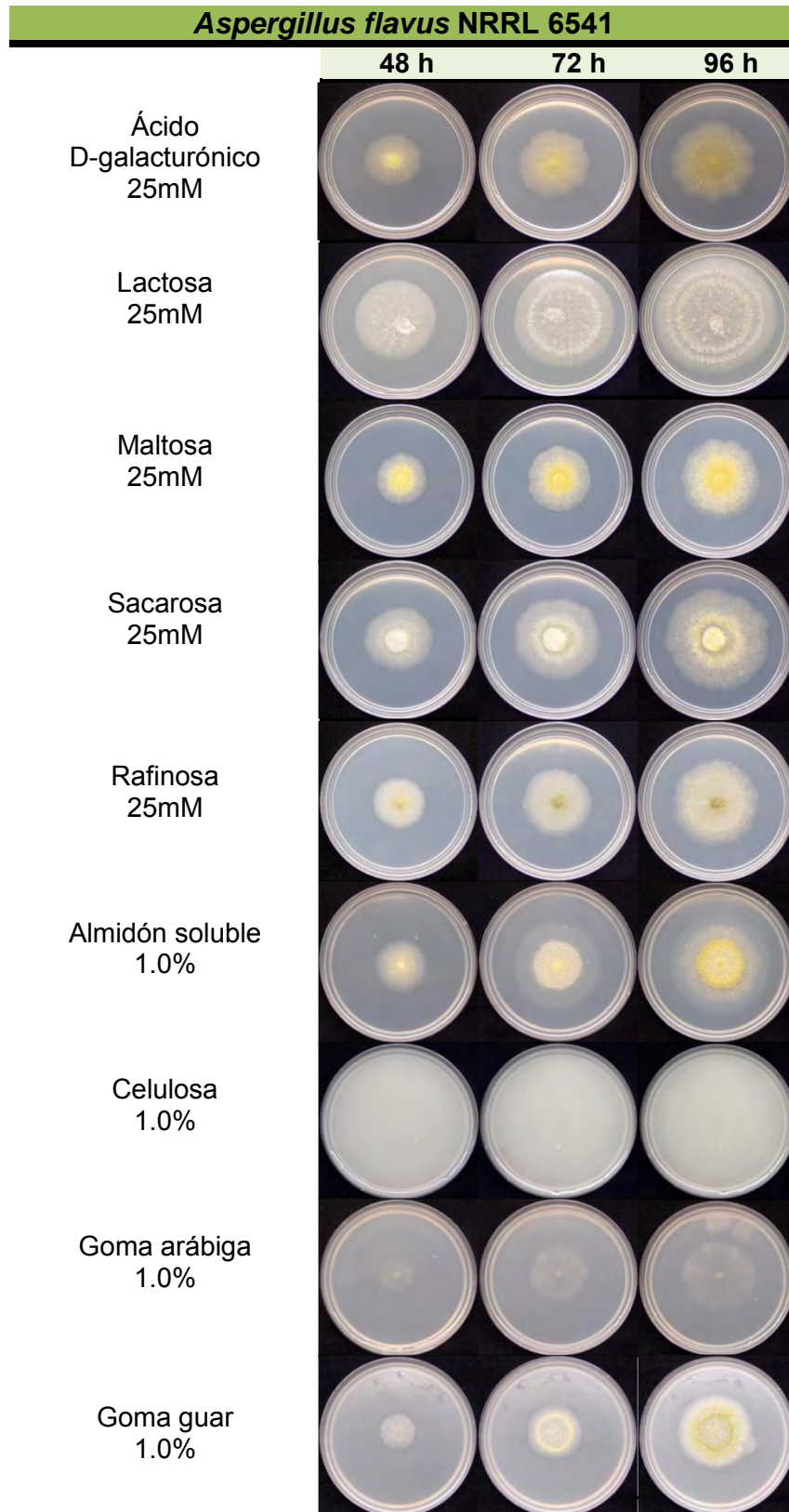


Figura 9. Registro fotográfico de las colonias de *A. flavus* NRRL 6541 en distintos medios de cultivo a las 48, 72 y 96 horas de incubación a 37°C, respectivamente.

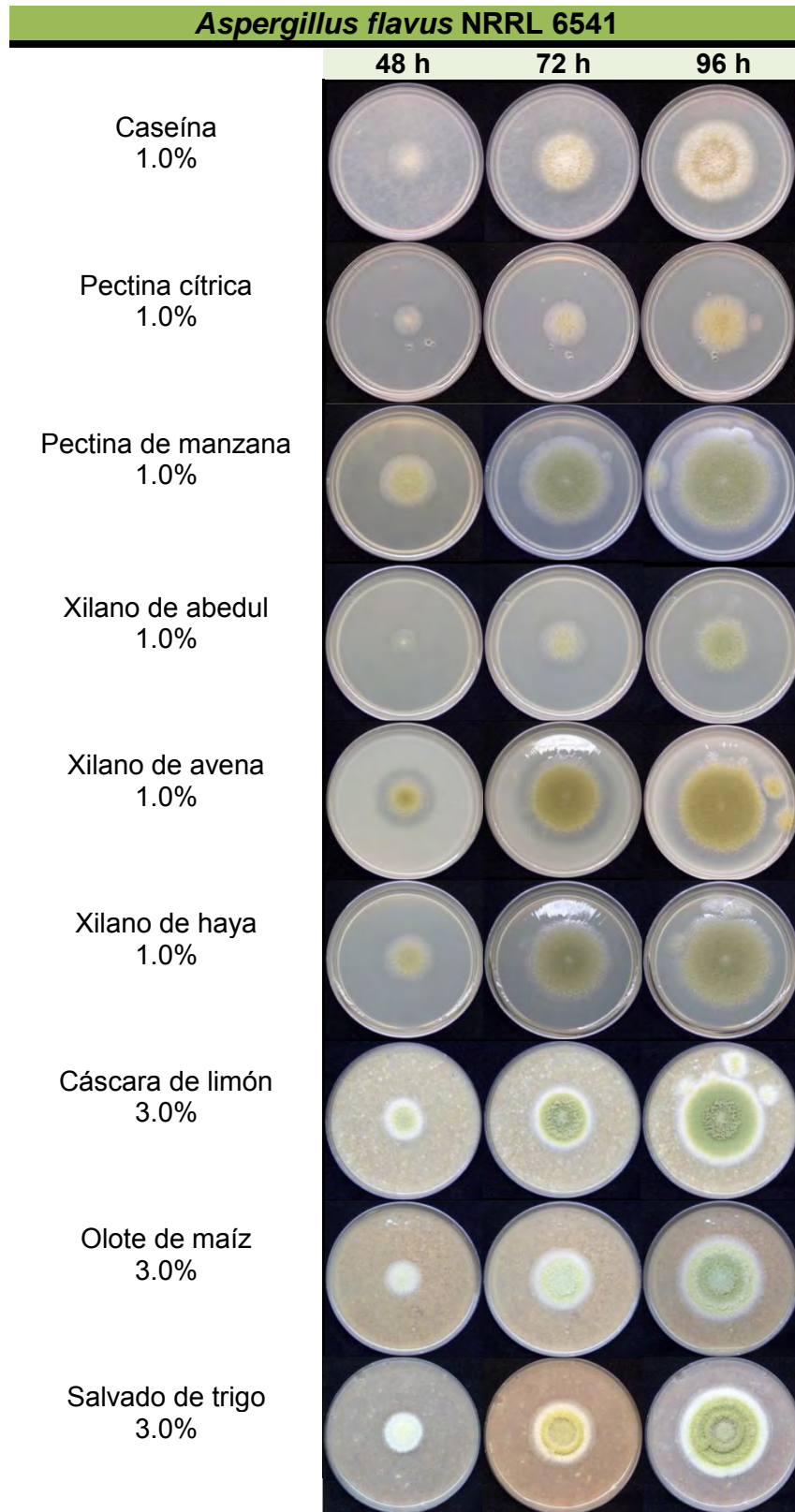


Figura 10. Registro fotográfico de las colonias de *A. flavus* NRRL 6541 en distintos medios de cultivo a las 48, 72 y 96 horas de incubación a 37°C, respectivamente.

Las colonias crecidas con pectina cítrica y de manzana son de color verde amarillento de aspecto compacto y de color verde pardo con circunferencia blanca, crecimiento abundante y textura aterciopelada, respectivamente.

Los hongos también poseen la habilidad de crecer en medios con alta concentración proteica, pues también producen proteasas capaces de desdoblar proteínas de alto peso molecular para asimilarlas en estructuras más simples, esto se observa en el medio con caseína -heteroproteína contenida en la leche- la colonia es de color blanca con ligera esporulación amarillo mostaza en el centro, textura algodonosa y con la presencia de un ligero halo de degradación alrededor de la colonia (figura10).

Tabla 2. Características coloniales de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en diferentes sustratos durante las 96 horas de incubación.

	Fuente de carbono / Tiempo	Diámetro colonia (mm) / Esporulación			Desarrollo
		48 h	72 h	96 h	
POLISACARIDOS PUROS	Almidón soluble	30	53	60	A
		+	++	+++	
	Celulosa	10	24	36	E
		-	-	+	
	Goma arábica	22	35	48	E
		-	-	-	
	Goma guar	22	35	49	A
		+	++	++	
	Caseína	25	40	57	A
		+	++	+++	
	Pectina cítrica	21	40	50	A
		+	++	+++	
	Pectina de manzana	16	32	45	A
	+	+++	+++		
Xilano de abedul	13	27	39	M	
	+	+	++		
Xilano de avena	23	35	57	A	
	++	+++	+++		
Xilano de haya	25	39	54	A	
	+	++	+++		
SUSTRATOS COMPLEJOS	Cáscara de limón	25	40	54	A
		+	+++	+++	
	Olote de maíz	25	41	59	A
		+	++	+++	
	Salvado de trigo	25	44	52	A
	+	++	+++		

Para el grupo de los sustratos complejos, en la tabla 2 se muestran las características macroscópicas, en general las colonias son voluminosas, crecimiento abundante, micelio aéreo algodonoso, la colonia es compacta con bastante esporulación (verde), circunferencia blanca y a diferencias de los otros 2 grupos de sustratos con estas

fuentes de carbono se observó a las 24 horas un crecimiento bastante notorio. Con cascara de limón y olote la colonia no presenta bordes como en salvado de trigo.

Si bien, como menciona Adams y colaboradores (1998), el agua es un parámetro principal que induce la esporulación así como la presencia de O₂ y nutrientes, en la mayoría de los sustratos ocurre una esporulación abundante en el centro del inóculo, y no en la zona periférica, debido al agotamiento de estos parámetros, ya que los cultivos de hongos poseen una habilidad importante sobre soportes sólidos, como la translocación de material entre las diferentes regiones de micelio.

La capacidad de crecimiento y desarrollo del hongo, se relacionan indirectamente con el crecimiento radial que presentaron las colonias en los diferentes medios de cultivo. El crecimiento en superficies solidas, generalmente agar, es usado en su mayoría en el mantenimiento de las cepas y en muy pocas ocasiones en procesos de producción de algún metabolito. En los años recientes el estudio del crecimiento en medio sólido se ha enfocado en comprender lo que ocurre en la invasión de material vegetal por los hongos, y de esta forma buscar alternativas para evitar o disminuir estos eventos (Bu'Lock, 1994). En el agar la colonia tiene un crecimiento isodiamétrico que presenta diferentes fases de crecimiento como cuando se encuentra en medio líquido.

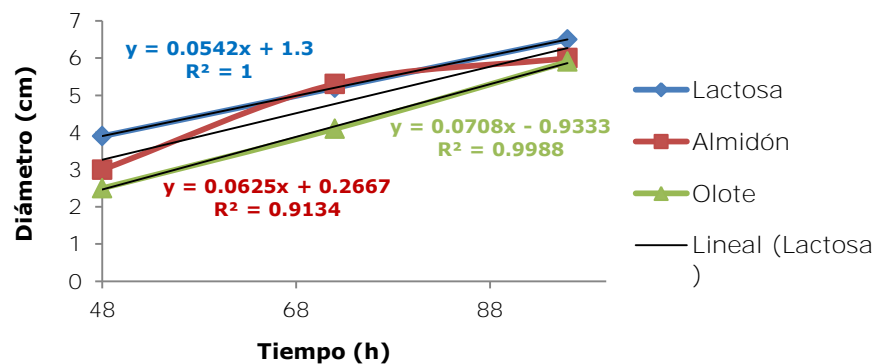
El crecimiento inicial de la biomasa de la colonia es exponencial, siguiendo la ecuación (Righelato, 1994):

$$x_t = x_0 e^{\mu t} = H\pi d r_t^2 = (\pi H d r_0^2) e^{\mu t}$$

Se asume que la colonia crece en forma de disco, con un radio r, un peso H y densidad d. Si se toma la ecuación en forma logarítmica se tiene:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t = \ln(r_t^2 \pi H d) = \ln(r_0^2 \pi H d) + \mu t \quad \text{ó} \quad \ln r_t = \ln r_0 + \mu t/2$$

Durante el crecimiento de la colonia los nutrientes entran por difusión en el centro, después de cierto tiempo de crecimiento esta entrada de nutrientes se vuelve menor que la demanda necesaria para todo el micelio, y únicamente el centro sigue con un crecimiento exponencial, mientras que toda la colonia presenta un crecimiento lineal (Righelato, 1994). Este fenómeno explicaría la morfología de las colonias antes descritas.



Gráfica 1. Representación gráfica del crecimiento máximo de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 medido en medio sólido.

En la gráfica 1 se representan los valores máximos de crecimiento de cada grupo de sustratos; lactosa, almidón y olote de maíz medidos a las 48, 72 y 96 horas de incubación, teniendo con lactosa el mayor crecimiento lineal de todas las fuentes de carbono empleadas.

La etapa temprana del crecimiento determina notablemente la morfología en su ulterior desarrollo, ya que la germinación de las esporas tiene una fuerte influencia sobre el crecimiento y productividad. Ya que esta primera parte sólo ofrece información cualitativa y no acerca de la producción enzimática, se realizó la segunda condición, para establecer si existe una relación con el diámetro de la colonia y concentración de esporas con la productividad de la cepa pues Osherov (2001) comenta que influye.

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

En la figura 11 se expone el registro fotográfico de la condición 2 y en la tabla 3 se presentan las mediciones físicas de todas y cada una de las colonias crecidas en los diferentes sustratos al final de la fermentación, como el diámetro, peso seco, desarrollo colonial y cantidad de esporulación.

En este caso se analizaron las características de crecimiento y la producción de enzimas utilizando una membrana de policarbonato en la placa y sobre esta el inóculo. Generalmente, el cuerpo de un hongo se diferencia en una parte vegetativa que absorbe nutrientes y una parte reproductiva.

***Aspergillus flavus* NRRL 6541**

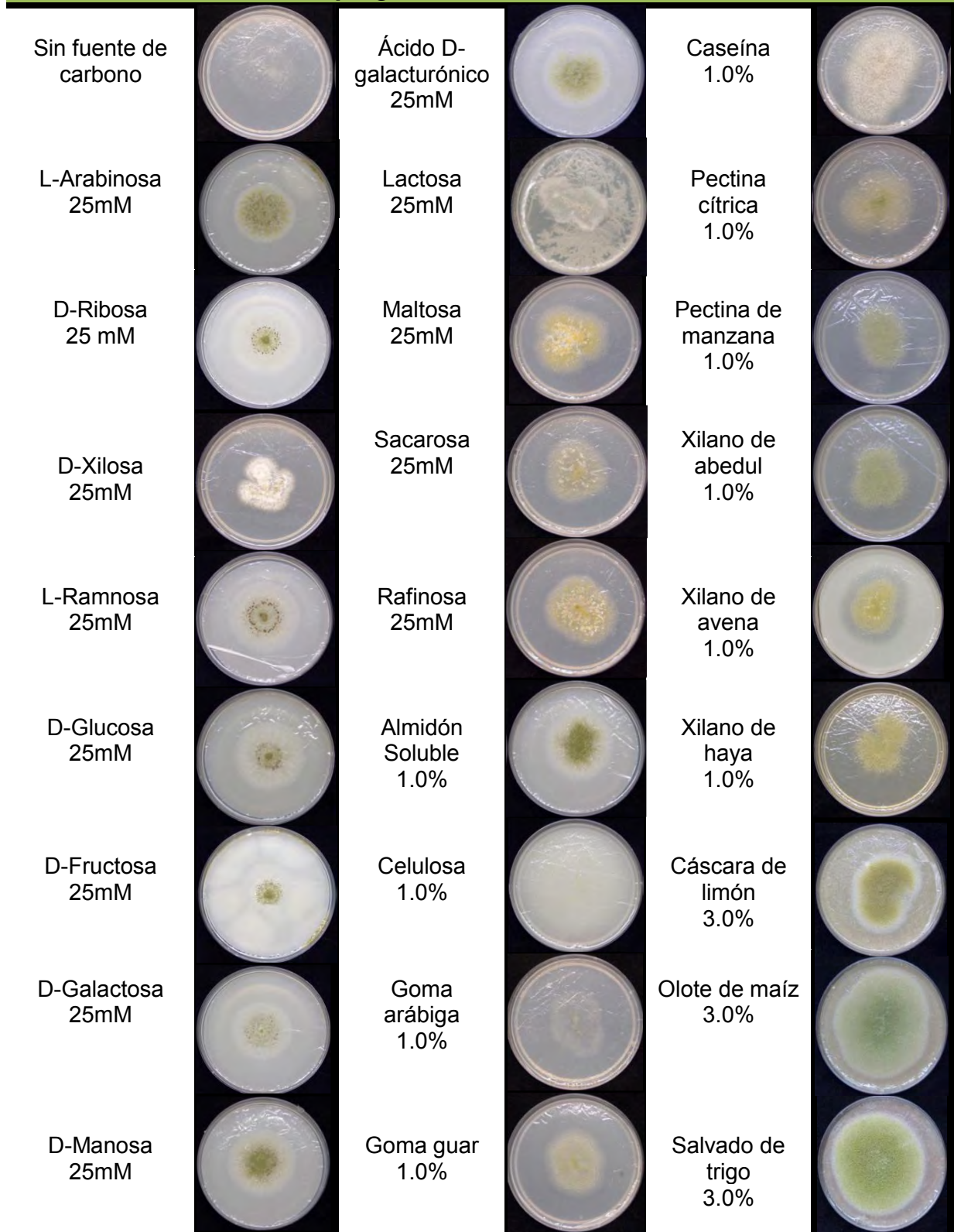


Figura 11. Colonias de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en diferentes fuentes de carbono (condición 2) a las 96 horas de incubación a 37°C.

El verdadero cuerpo del hongo -cuerpo vegetativo- está escondido, formado por una red de filamentos microscópicos inmersa en el sustrato, denominado micelio vegetativo. Se observa que en todas las fuentes de carbono hay crecimiento, apenas perceptible en la placa sin fuente añadida y con celulosa. Comparando con la condición 1, el crecimiento de algunas colonias no es radial, presentan un aspecto algodonoso, con desarrollo medio a abundante. Sin embargo hay excepciones, con maltosa y sacarosa se obtuvo el mayor crecimiento para su grupo, así como en la biomasa; con el primero se presenta casi la mayor cantidad de biomasa si no fuera por la rafinosa que ocupa el primer lugar en desarrollo fúngico.

Para el grupo de los polisacáridos puros, la caseína produjo la mayor cantidad de biomasa teniendo el mayor crecimiento superficial, mientras que para los sustratos complejos fue con salvado de trigo donde se obtuvo mayor diámetro colonial así como la masa fúngica.

En general, el crecimiento fue mayor con cascara de limón, olote de maíz y salvado de trigo, la colonia casi ocupa toda el área de la placa Petri y también se ve reflejado en el peso de la biomasa, lo que quiere decir que al hongo se le facilita crecer más rápido con estos sustratos. Estos resultados explicarían la *preferencia nutricional* por parte del hongo, es decir, una simple clasificación de las fuentes de carbono en función del desarrollo de hongo utilizando la determinación del Índice de crecimiento (IC) reportado en la tabla 3.

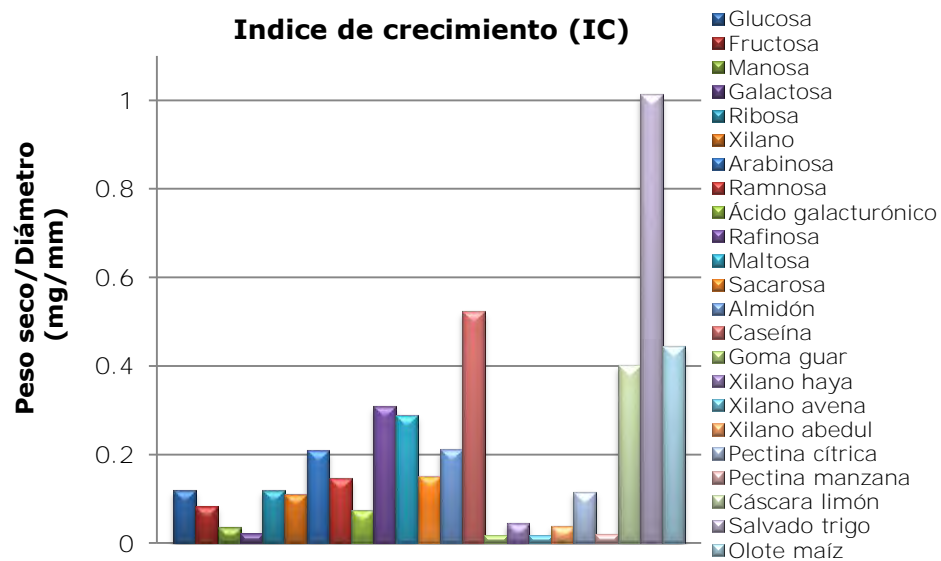
La determinación del IC se estableció por medio de una relación peso seco/diámetro de las colonias crecidas en los diferentes sustratos, obteniéndose así la capacidad del hongo que tiene al crecer en ese tipo de sustrato y a su vez, una relación directamente proporcional al grado de preferencia al sustrato que este dispone. Un valor cercano o igual a uno indica que ese sustrato es *ideal* para un crecimiento abundante. El *IC* se puede interpretar de mejor manera en la gráfica 2.

Tabla 3. Mediciones de las colonias de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en los diferentes medios de cultivo (condición 2) a las 96 horas de incubación

	Fuente de carbono	Peso seco (mg)	Diámetro (mm)	Desarrollo	Esporulación	IC= (mg/mm)
CARBOHIDRATOS SIMPLES	Sin fuente	NC	NA	E	-	NA
	L-Arabinosa	9.4	45	M	++	0.21
	D-Ribosa	5.5	46	E	+	0.12
	D-Xilosa	5.2	47	A	+++	0.11
	L-Ramnosa	6.6	45	E	+	0.21
	D-Glucosa	6.0	50	E	+	0.12
	D-Fructosa	3.7	45	E	+	0.08
	D-Galactosa	1.0	45	E	+	0.02
	D-Manosa	2.0	55	M	++	0.04
	Ácido D-galacturónico	3.8	51	M	++	0.07
	Lactosa	C	NA	NA	NA	NA
	Maltosa	16.2	56	M	++	0.29
	Sacarosa	8.5	56	M	++	0.15
	Rafinosa	16.4	53	M	++	0.31
POLISACARIDOS PUROS	Almidón soluble	11.0	52	M	+++	0.21
	Celulosa	NC	NA	E	-	NA
	Goma arábiga	NC	NA	E	-	NA
	Goma guar	0.8	47	E	+	0.02
	Caseína	30.9	59	M	+	0.52
	Pectina cítrica	5.8	50	M	++	0.12
	Pectina de manzana	0.9	43	M	++	0.02
	Xilano de abedul	1.8	47	M	++	0.04
	Xilano de avena	0.7	42	M	++	0.02
	Xilano de haya	2.1	47	M	++	0.04
SUSTRATOS COMPLEJOS	Cáscara de limón	20.5	51	A	+++	0.40
	Olote de maíz	33.4	75	A	+++	0.45
	Salvado de trigo	81.1	80	A	+++	1.01

Si bien, los azúcares simples son moléculas sencillas -estructuralmente hablando- que los hacen fácilmente digeribles y favorables para su absorción, ya que el hongo no requerirá de una alta maquinaria de enzimas para utilizarlo ni gastará mucha energía para su aprovechamiento, sin embargo, a pesar de eso, los carbohidratos simples no resultan ser los *preferidos* primordialmente, pues sus valores de *IC* son menores a 0.31, destacándose rafinosa, seguido de maltosa, ramnosa y arabinosa como los azúcares

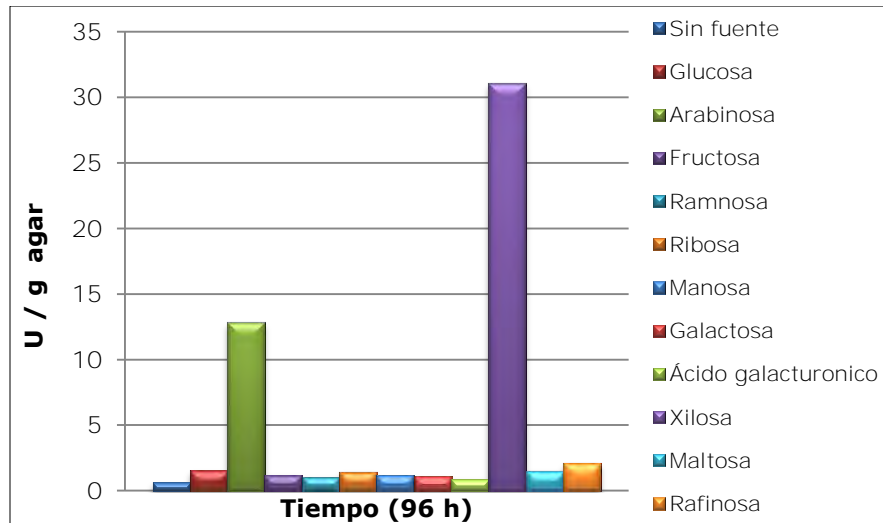
simples más *preferidos* a comparación de galactosa, manosa, ácido galacturónico con los valores más bajos, incluso los valores para glucosa y fructosa no se esperaban debido a que son los sustratos más usados por los microorganismos debido a su amplia distribución en la naturaleza. Para los polisacáridos puros, fueron menos preferidos por esta cepa, con valores de 0.02 y 0.04 para la pectina de manzana y los xilanos de diferente naturaleza, además del escaso crecimiento en goma arábiga y celulosa, sin embargo se destacó la caseína como el polisacárido puro preferido con un valor de 0.52, seguido de almidón soluble y pectina cítrica. De acuerdo a los valores del *índice de crecimiento (IC)* o densidad se afirma que los sustratos complejos son los que favorecen el mayor crecimiento de esta cepa, en cuanto a crecimiento radial así como en volumen del micelio, siendo así, como sustrato *ideal*, el salvado de trigo.



Gráfica 2. Representación gráfica de las preferencias nutricionales de *Aspergillus flavus* NRRL 6541, mediante el IC.

7.1.2.1 Actividad exo xilanolítica

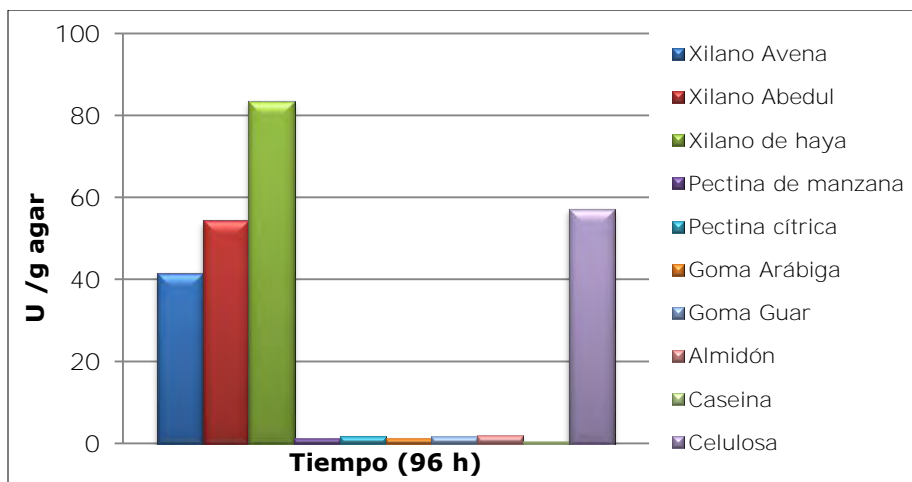
Se muestra la actividad xilanolítica en los medios de cultivo que contenían xilosa y arabinosa (Gráfica 3), ya que forman parte de la estructura del xilano; cadena lineal de monómeros de xilosa y algunas ramificaciones de arabinosa en los extremos; y actúan como inductores.



Gráfica 3. Producción de actividad xilanolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en cultivos sólidos con sustratos simples

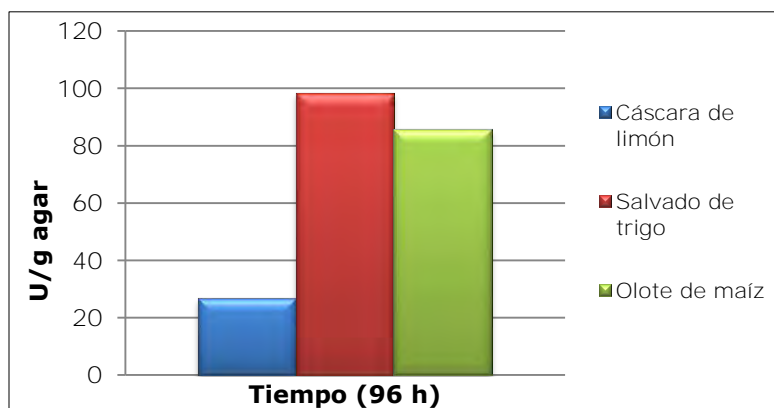
Así también era de esperarse que en el medio sin fuente de carbono no se obtuvieran unidades importantes de actividad, ya que como se había mencionado anteriormente, no tiene los nutrimentos necesarios para que el hongo crezca y mucho menos tiene la capacidad de producir enzimas para degradar el agar. Al medio con lactosa no se pudo determinar actividad enzimática debido a la contaminación que mostró la cepa con presencia de levadura, tampoco para el medio con sacarosa puesto que este disacárido tiene la propiedad de ser un azúcar no reductor. Con los demás carbohidratos simples glucosa, galactosa y ácido galacturónico no se estimula la cantidad suficiente de enzimas xilanolíticas para degradarlos.

Respecto a la actividad xilanolítica medida en los medios con polisacáridos puros, era de esperarse obtener unidades de mayor magnitud con xilano por ser inductor de xilanasas; siendo el de haya el mayor con 83.6 U/g, seguido de xilano de abedul con 54.3 U/g y por último 41.5 U/g para xilano de avena. Estos resultados pueden relacionarse con la cantidad de biomasa generada, ya que se obtuvo mayor crecimiento con xilano de haya. Asimismo se observa una alta actividad en el medio con celulosa. Con pectina cítrica y de manzana era lógico esperar baja actividad (gráfica 4).



Gráfica 4. Producción de actividad xilanolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en cultivos sólidos con distintos polisacáridos puros.

Se cuantificó mayor actividad xilanolítica con los sustratos complejos, salvado de trigo y olote de maíz, con 98.5 U/g y 86.0 U/g respectivamente; gracias a su composición rica en hemicelulosa. Con salvado -sustrato que favoreció más esta producción-, el hongo tuvo que producir una mayor cantidad de enzima quizá porque los azúcares fácilmente asimilables eran prácticamente nulos y tuvo que emplear los sustratos complejos presentes para su desarrollo, además de que se observa un comportamiento directamente proporcional con su crecimiento, pues se obtuvo mayor biomasa en salvado de trigo seguido de olote de maíz y finalmente en cáscara de limón, que tuvo poca actividad xilanolítica a comparación de los otros dos sustratos naturales (Gráfica 5).

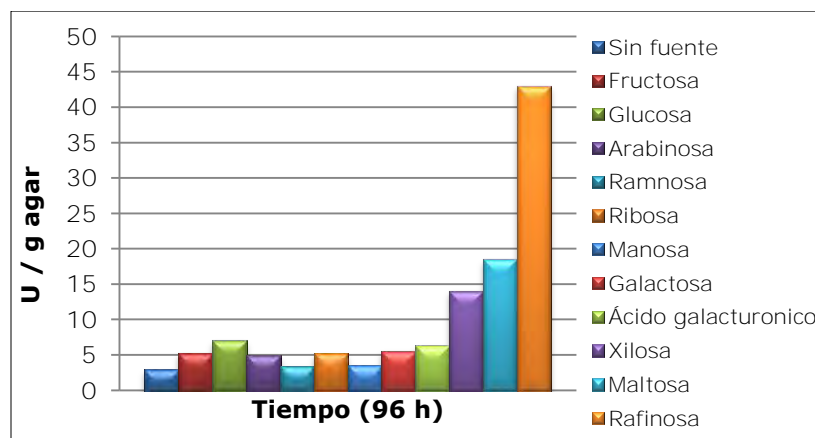


Gráfica 5. Producción de actividad xilanolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en cultivos sólidos con sustratos complejos.

7.1.2.2 Actividad exo-pectinolítica

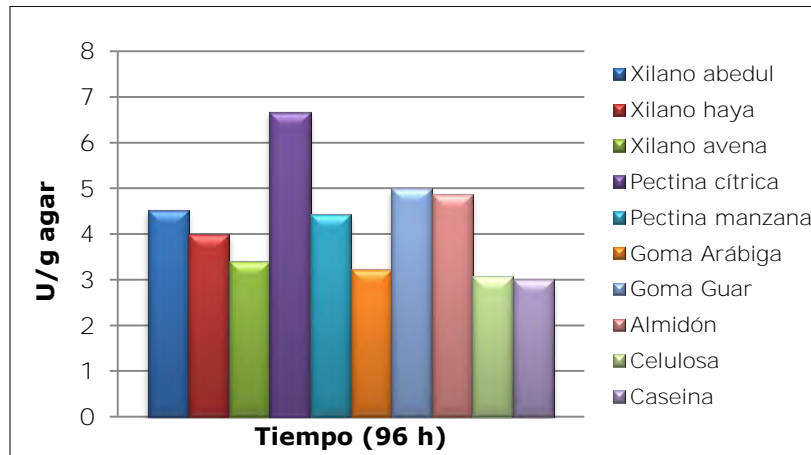
Referente a la actividad exo-pectinolítica, se muestra en la gráfica 6 que la mejor actividad se presentó en los medios de cultivo con rafinosa, maltosa, xilosa, glucosa y ácido galacturónico con 43.0 U/g, 18.5 U/g, 14.0 U/g, 7.0 U/g y 6.3 U/g respectivamente. Con xilosa y ácido galacturónico si era esperado obtener una notable actividad porque son azúcares que están presentes en la estructura de la pectina, sin embargo, se obtuvo mayor actividad con xilosa que con el monómero principal de dicho polisacárido. Además tampoco se esperaba que con rafinosa se obtuviera la mayor actividad (de todos los grupos de sustratos), simplemente por ser un oligosacárido compuesto por unidades principales de sacarosa (azúcar no reductor) aunque también contiene unidades de galactosa. Siendo un enlace glucosídico débil, este microorganismo es capaz de desdoblar la rafinosa, favoreciendo un crecimiento abundante así como la producción de pectinasas.

La actividad exo-pectinolítica medida en medios de cultivos con polisacáridos puros, resultó ser baja y similar entre ellas, resaltando que con pectina cítrica como fuente de carbono se tiene la mayor actividad (6.7 U/g), seguido de goma guar (5.0 U/g), almidón (4.9 U/g), xilano de abedul (4.5 U/g), pectina de manzana (4.4 U/g), mientras la menor actividad fue con caseína (3.0 U/g).



Gráfica 6. Producción de actividad pectinolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en cultivos sólidos con azúcares simples

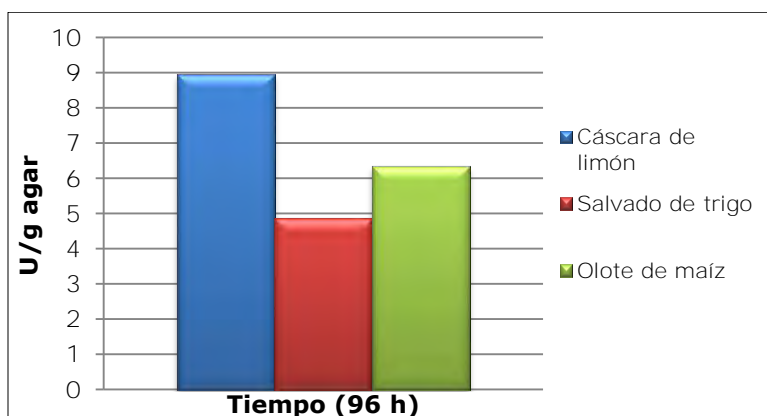
Dada la alta actividad con pectina cítrica, se observa cierto fenómeno de inducción, sin embargo llama la atención porque con pectina de manzana no se obtuvo esa misma respuesta ya que con xilano de abedul y almidón se detectó mayor actividad, cuando estos sustratos evidentemente son inductores de xilanasas (gráfica 7).



Gráfica 7. Producción de actividad pectinolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en cultivos sólidos con polisacáridos puros

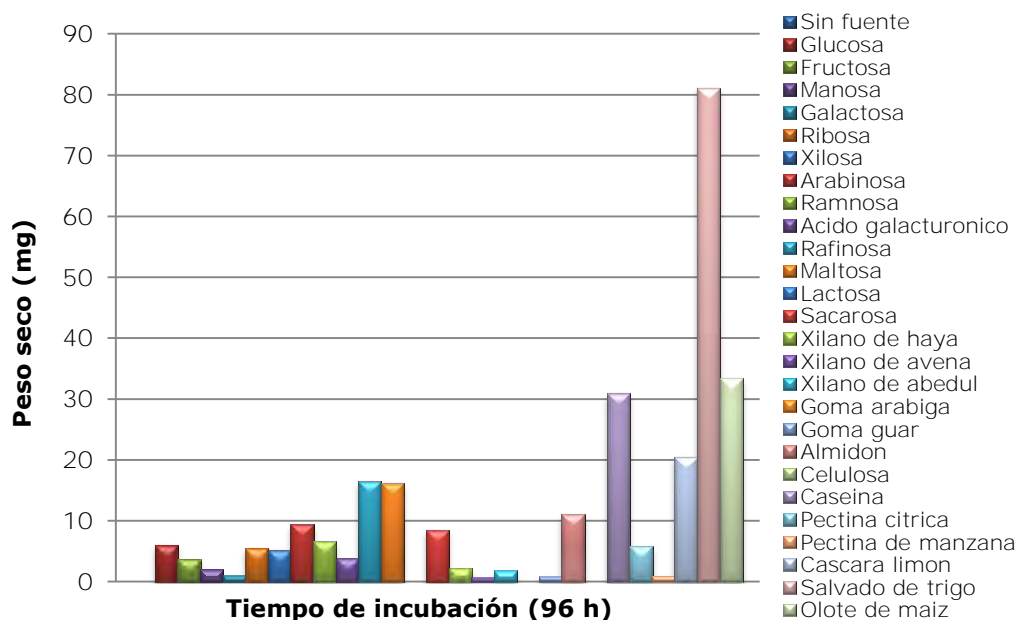
En la gráfica 8 se observa tal como se esperaba, una alta actividad pectinolítica con cascara de limón (8.9 U/g). Respecto a los otros dos sustratos naturales éste residuo agrícola, contiene mayoritariamente pectina en su pared celular, así que el hongo para poder crecer necesita de este complejo paquete enzimático para disponer del mismo y asimilar en unidades más simples (ácido galacturónico, ramnosa y arabinosa, entre otros). Comparando los resultados de ambas actividades enzimáticas con este tipo de sustratos, esta cepa posee mayor facilidad de producir enzimas xilanolíticas que pectinolíticas. La baja actividad con salvado y olote explica que estas fuentes de carbono no inducen la producción de pectinasas.

Los datos obtenidos anteriormente sugieren que el metabolismo del hongo en cuanto a la producción de enzimas hidrolíticas, disminuye considerablemente cuando éste no esporuló, como en los medios de cultivo con goma arábica y celulosa. Una posible explicación a este fenómeno, se relaciona con la intervención de la parte reproductiva de los hongos en la activación del metabolismo, y por consecuencia, en la producción de muchas enzimas que se requieren para la síntesis y modificación de polisacáridos de la pared celular.



Gráfica 8. Producción de actividad pectinolítica de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en cultivos sólidos con sustratos complejos

Dado que la mejor producción enzimática se logró cuando el hongo fue capaz de formar esporas y colonias con desarrollo abundante, se observa en la gráfica 9 que mientras el sustrato aumenta su complejidad estructural y nutricional, existe una relación proporcional en la generación de biomasa celular (sustratos complejos > polisacáridos puros > azúcares simples).



Gráfica 9. Biomasa de la colonia de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en cultivos sólidos utilizando diversas fuentes de carbono.

7.1.2.3 Actividad de enzimas accesorias

Como se ha mencionado en el Capítulo IV, existen otras enzimas complementarias que participan en la degradación de la pared celular, actuando en enlaces específicos de residuos de oligosacáridos generados por la hidrólisis general de los polímeros que constituyen -en este caso- a los sustratos empleados en el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

En esta sección los resultados se presentan también en gráficas construidas con los valores de actividad para cada una de las enzimas accesorias, por sustrato, y para contar con un panorama más claro, se seleccionaron los valores de actividad más elevados de cada condición. Únicamente para este ensayo las unidades de actividad (U) equivale a nmol/mL.

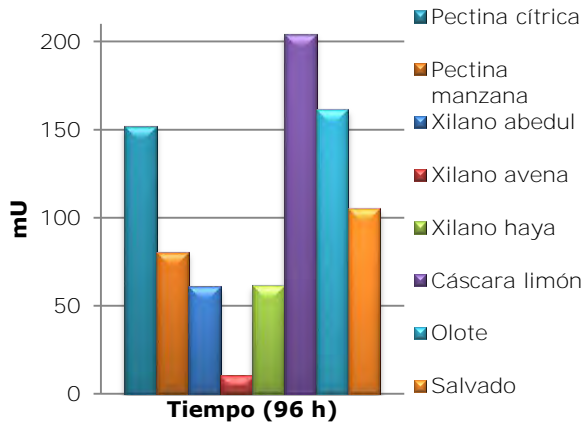
Se observa en la gráfica 10 que la mayor actividad para la α -glucosidasa fue determinado en el filtrado enzimático con cáscara de limón (204.12 mU), seguido de olote de maíz, pectina cítrica y salvado de trigo con valores de 161.20 mU, 151.76 mU y 105.71 mU respectivamente. Además de que para los filtrados con xilano de abedul y haya resultaron muy similares entre sí, 60.77mU y 61.63mU respectivamente. Sin embargo la actividad más pequeña fue con xilano de avena (10.13 mU) que resultó diez veces menor que los sustratos olote y salvado. De igual forma para la actividad de la β -glucosidasa (gráfica 11), con xilano de avena (47.04 mU) fue mucho menor respecto a los otros xilanos; de abedul con 227.20 y de haya 326.87 mU. Para pectina cítrica y manzana, los valores resultan casi despreciables a comparación de los demás sustratos. El sustrato que indujo mayor β -glucosidasa fue con olote de maíz (678.80 mU), seguido de salvado con 549.18 mU, mientras que con cáscara de limón, la actividad de α y β -glucosidasa es similar. A rasgos generales, la β -glucosidasa se produjo 4 ó 5 veces más que α -glucosidasa, sobre todo con olote de maíz y salvado de trigo, ya que al ser degradados por las celulasas correspondientes generan celobiosa (β -glucopiranosidos) e inducen la producción de la β -glucosidasa.

Respecto a la actividad de α -galactosidasa (gráfica 12), se obtuvo en el filtrado que contiene únicamente agar como fuente nutricional, un valor de 63.35mU, mientras que con otros polisacáridos como goma guar y arábica se obtuvieron valores menores

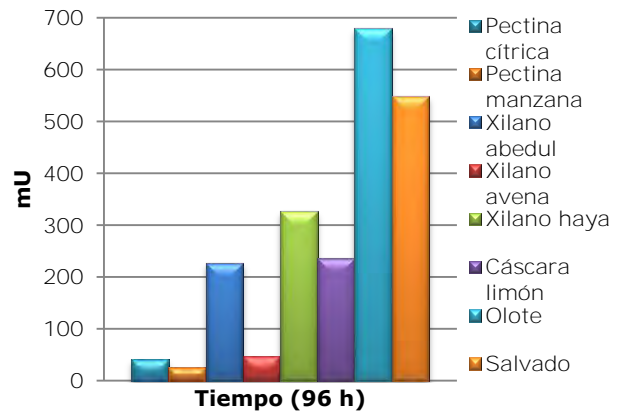
(18.50 y 29.87mU respectivamente). Esto es por la composición que poseen y su origen natural.

El agar es obtenido de algas de la clase *Rhodophyceae*, la goma arábica es extraída de la resina de árboles *Acacia Senegal* y la goma guar se obtiene del endospermo de la semilla leguminosa *Cyamopsis tetragonolobus*. Estructuralmente la goma guar es un heteropolisacarido neutro, cuya estructura química corresponde a un galactomanano ramificado, formada por una cadena lineal de unidades de β -D-manopiranosas unidas por enlaces $\beta(1,4)$ a la cual se le unen residuos de α -D-galactopiranosas a través de enlaces $\alpha(1,6)$ (Badui, 1990) por lo que se esperaría primero mayor actividad para β -manosidasa por la composición del mismo, sin embargo para la actividad de β -galactosidasas (gráfica 13) en la goma guar resultó tener un valor casi 50 veces más, con un valor de 898.54 mU. Respecto a la goma arábica, es un heteropolisacárido ramificado complejo formado por una cadena lineal de D-galactosa unidas por enlaces $\beta(1,4)$ y $\beta(1,6)$ con ramificaciones de D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa y ácido D-glucourónico, por medio de enlaces $\beta(1,3)$ (Fennema, 1996), esto explicaría evidentemente la magnitud 20 veces más en la actividad de β -galactosidasas que α -galactosidasa (696.82 mU). Si bien, el valor de actividad en agar es bajo, se esperaba que fuera así, ya que el agar o agarosa es un dímero constituido por una β -D-galactosa unida en (1,3) y de un 3,6 anhidro-L-galactosa unido en (1,4) (Sambrook, et al, 1989; Ausubel, et al, 1994; Davis, et al, 1986) por lo que induce en mayor medida la producción de esta enzima, sin embargo no se mostró actividad para β -galactosidasas.

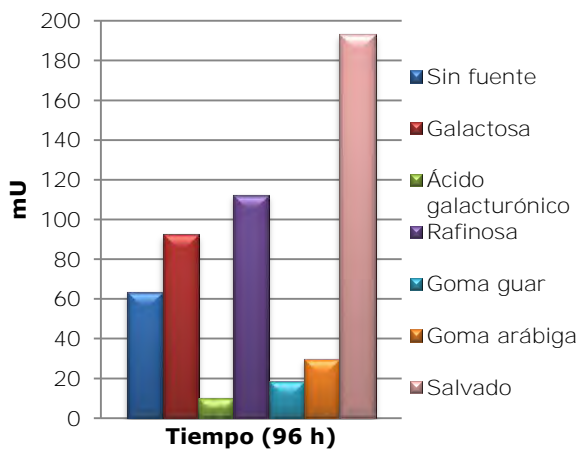
Los valores máximos para α -galactosidasa fueron con salvado (192.96 mU), rafinosa (112.27 mU) y galactosa (92.53 mU) y para ácido galacturónico casi despreciable. El salvado de trigo es un sustrato potencial para la producción de α -galactosidasa (Cruz and Park, 1982; Annunziato et al,1986 y Wang et al, 2004), si bien la galactosa podría actuar como inductor, la rafinosa también, pues la hidrólisis parcial de este oligosacárido da una mezcla de glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa y melibiosa; éste último, isómero de la lactosa (6- β -D-galactopiranosido-D-glucopiranosas), explicaría también la actividad de la β -galactosidasa (187.81 mU) (Smith, et al, 1970).



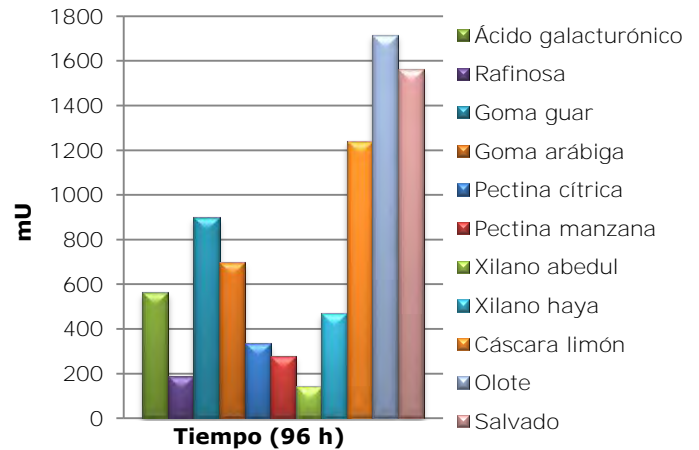
Gráfica 10. Actividad de α -glucosidasa de *A. flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono



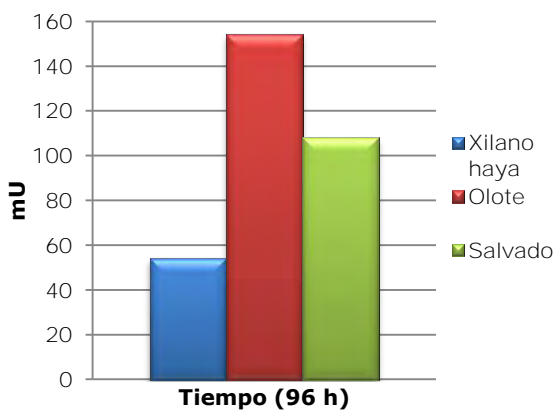
Gráfica 11. Actividad de β -glucosidasa de *A. flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono



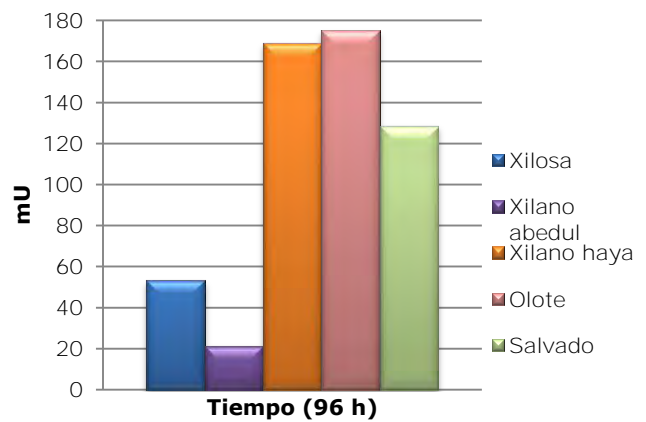
Gráfica 12. Actividad de α -galactosidasa de *A. flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 13. Actividad de β -galactosidasa de *A. flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 13. Actividad de α -xilosidasa de *A. flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 14. Actividad de β -xilosidasa de *A. flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono

Respecto a los valores generales de la actividad de β -galactosidasa (gráfica 13), las magnitudes fueron dos veces más que la α -galactosidasa (gráfica 11), pues el valor máximo fue de 1715.70 mU para olote de maíz, seguido de salvado de trigo con 1562.49 mU y cáscara de limón con 1239.74 mU. Esto de igual manera se debe una composición rica en xilano y pectina –respectivamente- y la hidrólisis consecuente da por resultado oligopiranosidos (inductores de estas enzimas). Con los polisacáridos puros no se obtienen valores altos con respecto a los sustratos complejos; pectina de manzana y cítrica dan valores similares (278.80 y 333.73 mU respectivamente).

De acuerdo a la actividad de α y β -xilosidasa (gráficas 14 y 15) se obtuvieron resultados en menor cantidad de medios a comparación de las demás actividades, ya que como la literatura lo reporta, la expresión de enzimas xilanolíticas está sujeta a inducción específica en presencia de xilano o xilosa, por dicha razón se expresaron en olote de maíz, salvado de trigo, xilano de haya, xilano de abedul y xilosa y no en otros medios debido a la represión catabólica mediada por el gen CreA (De Vries & Visser, 2001). En ambas actividades el olote de maíz produjo mayor cantidad de α -xilosidasa con 154.33 mU y 174.94 mU para β -xilosidasa; esto es a que dicho sustrato contiene 31.9% de hemicelulosa más de lo que contiene el salvado de trigo (24%) (Nigam, 2009). Para este último sus valores fueron de 107.98 mU (α -xilosidasa) y 128.58 mU (β -xilosidasa), muy similares entre actividades con el mismo sustrato.

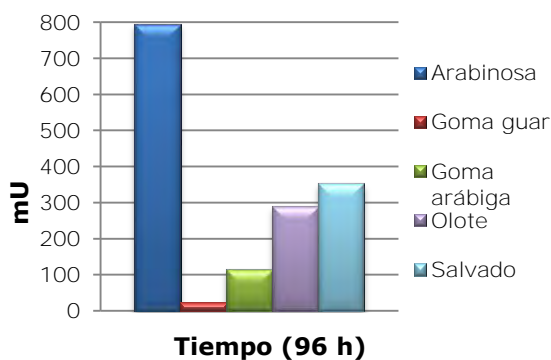
Con xilano de haya se obtuvo 168.93 mU para β -xilosidasa y 53.91 mU para α -xilosidasa, siendo la primera dos veces más efectiva para este sustrato. Si bien, como se mencionó anteriormente, existen otros inductores para estas enzimas, aunque con magnitudes muy inferiores: xilano de abedul y xilosa, 21.29 y 53.05 mU respectivamente (gráfica 14), sin embargo con xilano de avena no se detectó actividad.

Los xilanos de cereales contienen grandes cantidades de L-arabinosa y por lo tanto se hacen referencia a menudo como arabinoxilanos, que consisten en unidades de D-xilopiranosil enlazados por α -(1,4) vinculados con unidades de L-arabinofuranosil enlazados mediante α -(1,2) y/o α -(1,3) como residuos individuales o como cadenas laterales cortas (Zhang, et al, 2011; De Vries & Visser, 2001). La producción de arabinofuranosidasas es inducida en presencia de arabinoxilano y en L-arabinosa (Ramon, et. al., 1993), justo como se obtuvo en el presente trabajo, para α -

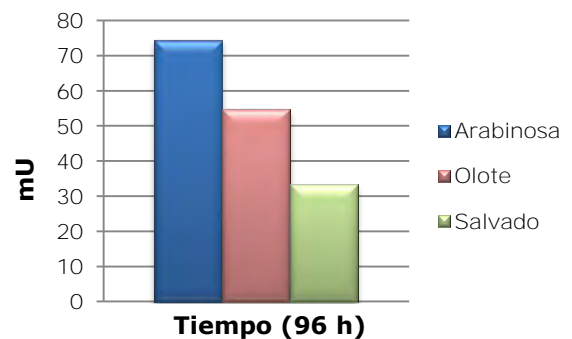
arabinofuranosidasa en el medio con arabinosa se tiene un valor de 794.68 mU y para β -arabinofuranosidasa 74.51 mU, siendo 10 veces más activa que la segunda.

Siguiendo con la misma línea, el salvado de trigo tiene como principal polisacárido en su estructura no amilácea, arabinosilano (Zhang, et al, 2011), dando valores de 352.62 mU para α -arabinofuranosidasas y 33.30 mU para β -arabinofuranosidasas. Mientras que con olote de maíz se obtuvieron valores de 288.24 mU y 54.76 mU de actividad en α y β -arabinofuranosidasa, respectivamente. Asimismo, con goma arábiga se produjo α -arabinofuranosidasa (113.99 mU), resultado esperado debido a sus ramificaciones de monómeros de arabinosa vinculadas a una cadena lineal de galactosa, lo que produciría a mayor medida dicha producción, mientras que con goma guar resultó casi despreciable (gráficas 15 y 16).

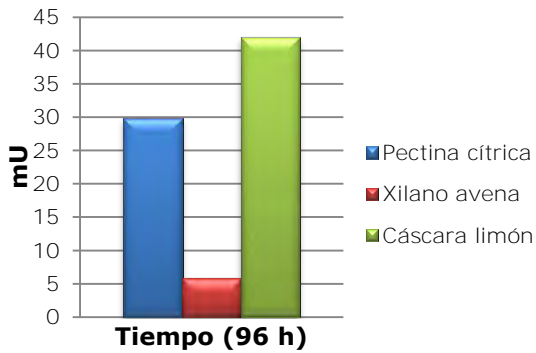
Acerca de la enzima α -ramnosidasa (gráfica 18), se obtuvo sólo con ramnosa como sustrato (793.82 mU). Si bien, se hubiese esperado dicha producción con otras fuentes de carbono que contengan pectina debido a los residuos de ramnosa en su “región peluda”, sin embargo lo descrito por Yadav (2010) y Tamayo-Ramos (2012) apelaría a dicho resultado, pues la producción de α -L-ramnosidasas en eucariotas se controla en el nivel transcripcional por la fuente de carbono, es decir, la inducción por L-ramnosa, y la represión por glucosa y otras fuentes de carbono.



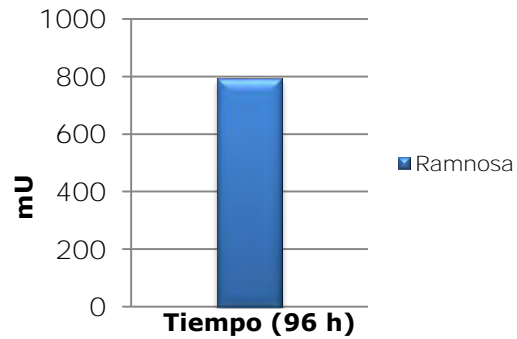
Gráfica 15. Actividad de α -arabinofuranosidasa de *A. flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 16. Actividad de β -arabinofuranosidasa de *A. flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 17. Actividad de β -manosidasa de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 con distintas fuentes de carbono.



Gráfica 18. Actividad de α -ramnosidasa de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 en medio con ramnosa

Las β -manosidasas son exo-enzimas que liberan manosa del extremo no reductor de manooligosacáridos tales como la manobiosa y manotriosa (De Vries & Visser, 2001) provenientes de la degradación de galactomanano, por acción conjunta de otras enzimas como las endo- β -manosidasas y β -mananasas (McCleary, 1991). En la gráfica 17, se observa la actividad de la β -manosidasa siendo con cáscara de limón (41.89 mU) el principal productor, seguido de pectina cítrica con 29.87 mU y un valor casi despreciable para xilano de avena (5.84 mU).

Si bien, el galactomanano es el segundo grupo de estructuras hemicelulolíticas presentes en la pared celular, y son encontrados comúnmente en leguminosas, representando hasta el 38% del peso seco en la semilla, aunque también ha sido encontrado en especies de otras plantas como las palmas (Dea, & Morrison, 1975; Dey, 1978), resulta interesante los datos arrojados pues se esperaría que la producción de estas enzimas fuera en sustratos ricos en hemicelulosa y en las mismas gomas arábica y guar; sin embargo en el medio con xilano de avena se obtuvo una cantidad muy pequeña en comparación de los sustratos que contienen pectina. La ausencia de β -manosidasa en otros cultivos se refleja en la incapacidad para producir azúcares monoméricos de los galactomananos.

7.1.4 Producción de enzimas en cáscara de limón

En la figura 12, se observan las diferencias morfológicas de las colonias sembradas en medio sólido con cascara de limón, para analizar el perfil proteico de tiempos cortos de fermentación.

En la fotografía de lado izquierdo (24 h) se observa un desarrollo escaso sin evidente esporulación, colonias circulares, blancas de aspecto algodonoso laxo; mientras que las colonias de la imagen derecha (48 h) presentan un desarrollo abundante y voluminoso, de color verde brillante en el centro (comienza esporulación) y la circunferencia blanca, de aspecto algodonoso compacto.

Se esperaba obtener baja concentración de proteína a las 24 horas y a las 48 horas más cantidad de proteína.

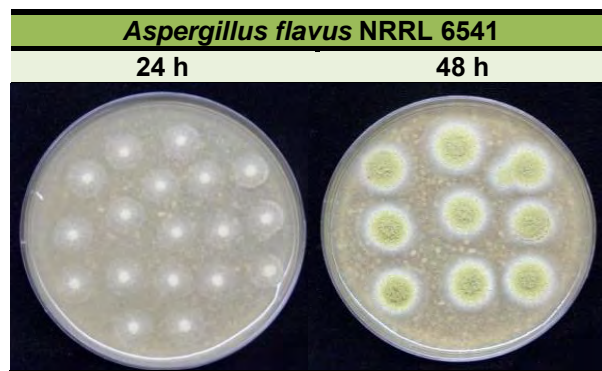


Figura 12. Desarrollo de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 a diferentes tiempos de incubación

7.1.4.1 Perfil electroforético de los filtrados enzimáticos obtenidos en cultivos sólidos.

Los geles de electroforesis se realizaron únicamente para ésta condición. A continuación en la figura 13 se observan los perfiles enzimáticos de los filtrados producidos por esta cepa; en los carriles 2, 3 y 4 está por triplicado la muestra de las 24 horas de incubación, donde se observan dos bandas (apenas visibles) de bajo peso molecular -flecha roja de lado derecho- de 78.4 y 68.9 KDa respectivamente. Esas mismas bandas pueden observarse en el duplicado de la muestra de las 48 horas de

(carriles 5 y 6) con un peso molecular de 75.9, 77.3 KDa y 67.4, 67.9 KDa respectivamente. Asimismo se observa en ambos carriles una mayor concentración de proteína, pues las bandas son más gruesas y visibles que a las 24 horas; sin duda alguna, el hongo produce mayor cantidad de enzimas para utilizar este sustrato así como en la esporulación que se presenta. También se observa en los carriles 5 y 6 otra banda intensa en el rango de 45 y 31 KDa, que de acuerdo al programa *ImageLab 3.0*[®] es una proteína que pesa 37.2 KDa (flecha verde).

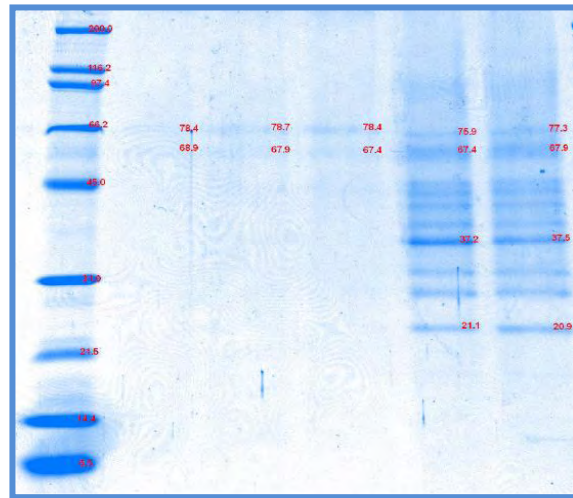


Figura 13. Gel de electroforesis SDS-PAGE 12%. Concentrados de filtrados enzimáticos de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 obtenidos a las 24 horas (2,3,4) y a las 48 horas de incubación (5, 6) a 37°C en medio sólido con cáscara de limón al 3%. Marcador de peso molecular (1).

Debido a la baja concentración proteica observada en el gel anterior para la condición de 24 horas, se repitió el experimento, esta vez utilizando 4 placas Petri con mayor número de cilindros y de inóculos, para así obtener una mayor concentración de proteína y verlo con facilidad en el gel. Con el filtrado libre de células, se corrieron las muestras en las mismas condiciones.

En la figura 14, en los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se observan las primeras dos bandas que se muestran en el gel anterior, bandas que tienen pesos similares entre sí, de un rango de 63.2 a 75.5 KDa, lo que quiere decir que el procedimiento si fue reproducible y que existen proteínas de ese peso molecular que se excretan en tiempos cortos (flecha roja). Además se observa otra banda intensa de aproximadamente 42.7 kDa (flecha

azul) la cual puede ser la misma, observada en la figura anterior –carril 5 y 6– en la condición de 48 horas, sólo que poco recorrida hacia abajo. También se observa una banda de bajo peso molecular, 27.9 KDa (flecha anaranjada).

De acuerdo al sustrato que se empleó para detectar el tipo de enzimas exploradoras a las primeras horas de fermentación, la cáscara de limón contiene en su mayor parte pectina, por lo que al ser un inductor de pectinasas se esperaría que la mayor parte de las bandas detectadas en la siguiente figura sean -si bien como lo cita el autor Yadav (2008)- de enzimas pectinolíticas de bajo peso molecular como pectiniliasas; 38 KDa.

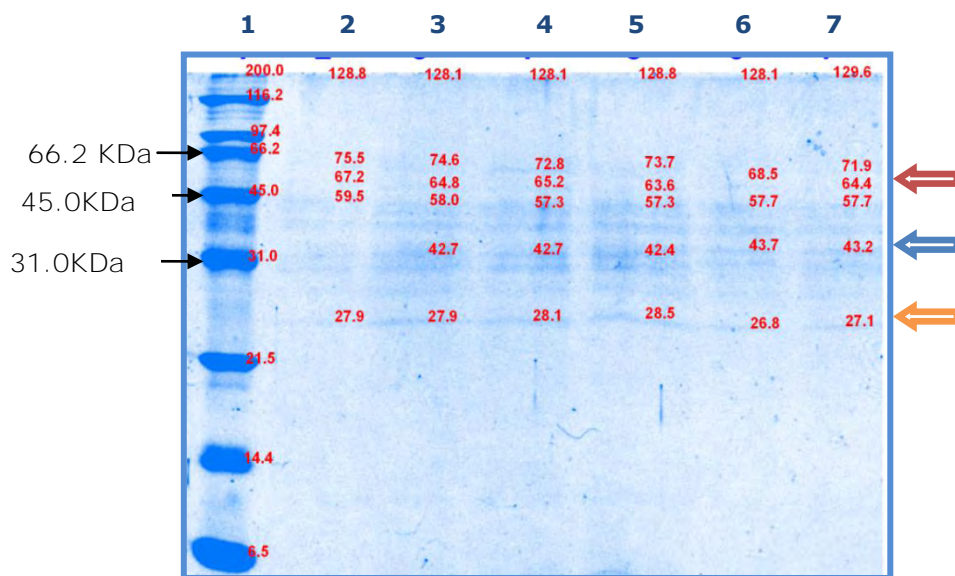


Figura 14. Gel de electroforesis SDS-PAGE 12%. Concentrados de filtrados enzimáticos de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 obtenidos a las 24 horas (2-7) a 37°C en medio mínimo con cáscara de limón al 3%. Marcador de peso molecular (1).

De acuerdo al método de Bradford, se obtuvo menor cantidad de proteína a las 24 horas con 18.78 µg/mL y más cantidad –evidentemente- a las 48 horas; 44.27µg/mL, poco más de la mitad. Debido a la baja cantidad de proteína no se pudo cuantificar actividad enzimática.

7.2 *Aspergillus flavus* CECT 2687

7.2.1 Análisis de crecimiento (condición 1)

Se evaluó otra cepa de *Aspergillus flavus*, identificada como generadora de toxinas: CECT 2687; utilizando menos sustratos que la cepa anterior. En las figuras 15 y 16 se muestra el registro fotográfico de las colonias crecidas en diversas fuentes de carbono.

De manera general, esta cepa tuvo la capacidad de crecer en todas las fuentes de carbono, además no se observa una reproducción sexual pues no hay presencia de cleistotecios. A diferencia del crecimiento de la otra cepa, esta es más lenta con un crecimiento radial más pequeño.

Las características coloniales con los azúcares simples son similares, de color amarillo, con acumulación de esporas en el centro del inóculo, circunferencia blanca y filamentosa, presentan desarrollo medio a abundante, con aspecto algodonoso laxo; mientras que el aspecto del micelio profundo es de color homogéneo (amarillo-crema). Sin embargo, para el medio sin fuente de carbono el crecimiento es escaso y lento, sin aparente esporulación, colonia blanca (apenas perceptible). El mayor crecimiento fue con xilosa, rafinosa y maltosa. Con galactosa el desarrollo del micelio es medio, colonia con diámetro ligeramente menor a las demás, debido a que la presencia de nitratos como fuente de nitrógeno, la enzima galE exhibe una fuerte reducción en el crecimiento con D-galactosa (Fekete, et al., 2008).

De igual manera que la cepa anterior, la esporulación no se presenta a las 24 horas de incubación, ya que la nutrición de los hongos es por absorción y su crecimiento es lento, sin embargo a las 48 horas, en los medios con xilosa, ramnosa, maltosa y rafinosa comienza la esporulación, haciéndose cada vez más evidente al paso de los días. Se observa en la tabla 5 que al tener una esporulación abundante, está relacionado con un desarrollo de la misma intensidad, a excepción del medio con glucosa.

Tabla 5. Características coloniales de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en diversas fuentes de carbono durante las 96 horas de incubación

Fuente de carbono / Tiempo	Diámetro colonia (mm)/Esporulación			Desarrollo
	48 hrs	72 hrs	96 hrs	
Sin fuente de Carbono	7	12	16	E
L-Arabinosa	-	-	-	M
	15	21	31	
	-	+	++	
D-Xilosa	12	23	33	A
	+	++	+++	
L-Ramnosa	12	20	26	A
	+	++	+++	
D-Glucosa	10	20	31	A
	-	+	++	
D-Fructosa	10	20	30	A
	-	++	+++	
D-Galactosa	8	13	25	M
	-	+	+	
Ácido D-galacturónico	11	20	28	M
	-	+	++	
Maltosa	15	25	33	A
	+	+	+++	
Rafinosa	15	23	33	A
	+	+	+++	

Varios investigadores han estudiado que la presencia de rafinosa como fuente de carbono estimula la producción de aflatoxina 4 veces en medios de crecimiento definidos químicamente, utilizando *Aspergillus flavus* (Mellon & Cotty, 1999; Mellon, et al, 2000). Por lo tanto, si esta cepa produce toxinas con este sustrato, también mayor cantidad de masa celular, que podría observarse de manera indirecta con el diámetro máximo (33 mm) de la colonia.

Las características coloniales con polisacáridos puros y sustratos complejos, difieren un tanto de las colonias con azúcares simples, pues son de color verde oliva que se va degradando a color amarillento en la parte más alejada del centro, con la circunferencia blanca; la textura es algodonosa laxa, con desarrollo abundante. La esporulación comenzó a las 48 horas en todos los sustratos, acentuándose a partir de las 72 horas, sin embargo, el diámetro radial como la cantidad de esporulación con los sustratos complejos es mayor con respecto a los polisacáridos puros. El mayor crecimiento radial fue con pectina cítrica y con olote de maíz (tabla 6).

Los nutrimentos necesarios para el crecimiento son obtenidos por absorción a través de la pared celular del micelio vegetativo que penetra al medio. Estos nutrimentos deben

encontrarse en forma soluble, por lo que el hongo secreta enzimas al medio para degradar los que son insolubles (García, 2004) si bien, podría relacionarse con el halo de degradación que se presentan en los medios con polisacáridos puros; xilano de abedul, avena y haya, siendo no muy claro en éste último, pues las hifas jóvenes que se encuentran en la circunferencia de la colonia son blanquecinas brillosas que impiden o dificultan la diferencia de ambas situaciones.

Sin embargo en donde si es evidente la presencia del halo es en xilano de abedul y avena; sustratos insolubles, además de contener una alta cantidad de proteína y fibra, son buenos inductores de enzimas xilanolíticas y dicha actividad podría valorarse de acuerdo al diámetro del halo de degradación alrededor de cada colonia.

Evidentemente, no es una forma acertada de saberlo pero si se podría esperar que en el medio con xilano de abedul se genere más actividad, ya que el mayor halo de degradación -medido a las 96 horas- fue en ese medio, con un diámetro aproximado de 10 mm y su colonia a ese tiempo fue de 28 mm, con una esporulación sin embargo en la figura 16 se puede observar que en el medio con xilano de avena, la colonia es ligeramente mayor que en abedul, el halo en este medio alcanzó 7 mm; apenas con una unidad de diferencia el diámetro máximo es de 29 mm, y se hace más evidente debido al color del medio blanco a traslúcido. Si bien, se puede observar de mejor manera en la condición 2 y consecuentemente la actividad xilanolítica, tal como sucedió en la cepa NRRL 6541, los mayores diámetros en este tipo de xilanos fue en abedul y haya, siendo éste último el que generó mayor cantidad de enzimas xilanolíticas.

Se podría decir que tanto el polisacárido puro; pectina cítrica y el sustrato complejo; cáscara de limón, tienen una composición similar; sin embargo, el crecimiento de esta cepa es diferente, en el primero es un micelio amarillento, no muy definida su circunferencia y en el segundo es un micelio verde oliváceo, algodonoso y compacto; con una circunferencia bien definida y blanca, además de una esporulación abundante.

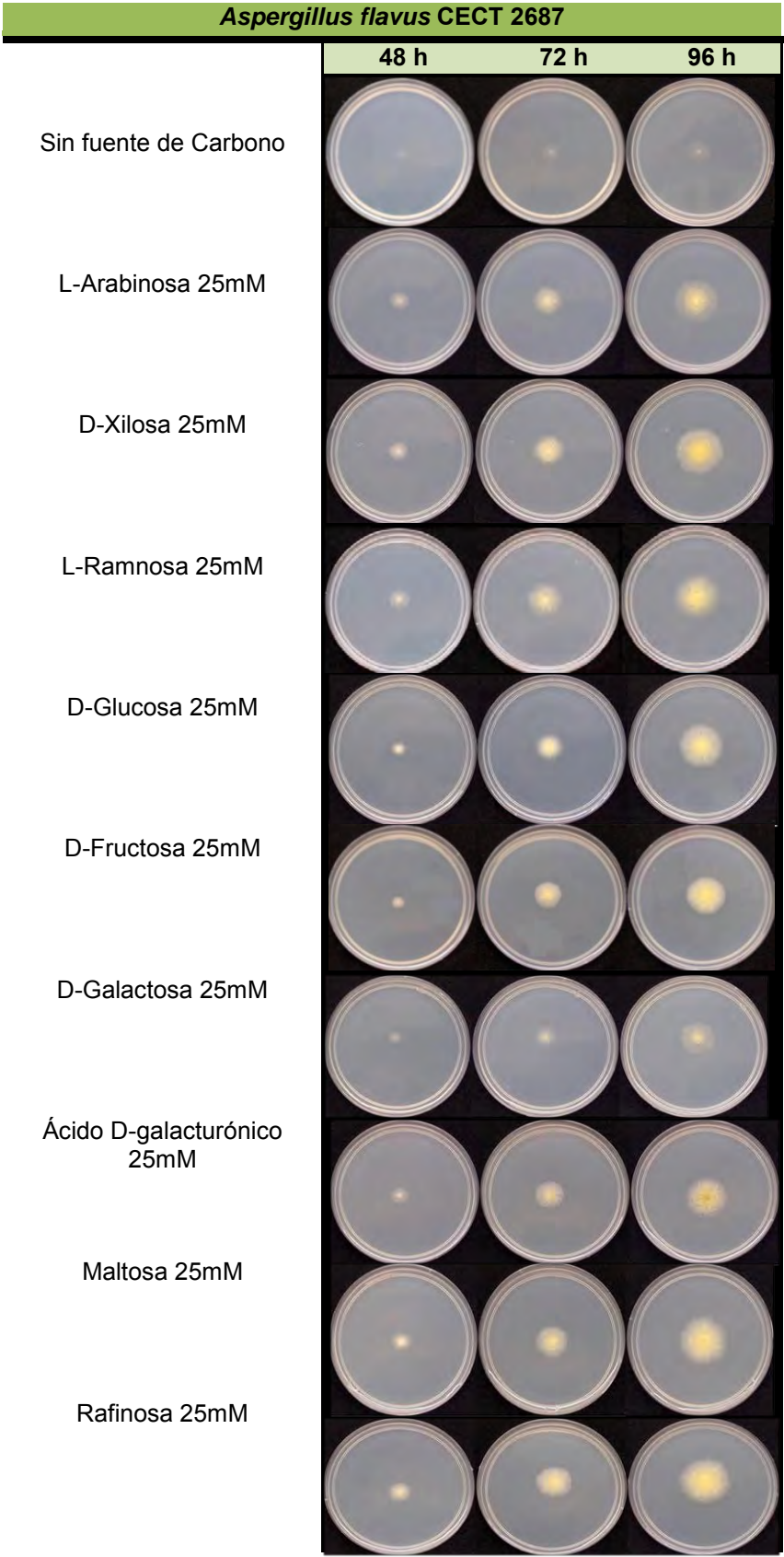


Figura 15. Registro fotográfico de las colonias de *A. flavus* CECT 2687 en varios sustratos simples a las 48, 72 y 96 horas de incubación a 37°C, respectivamente.

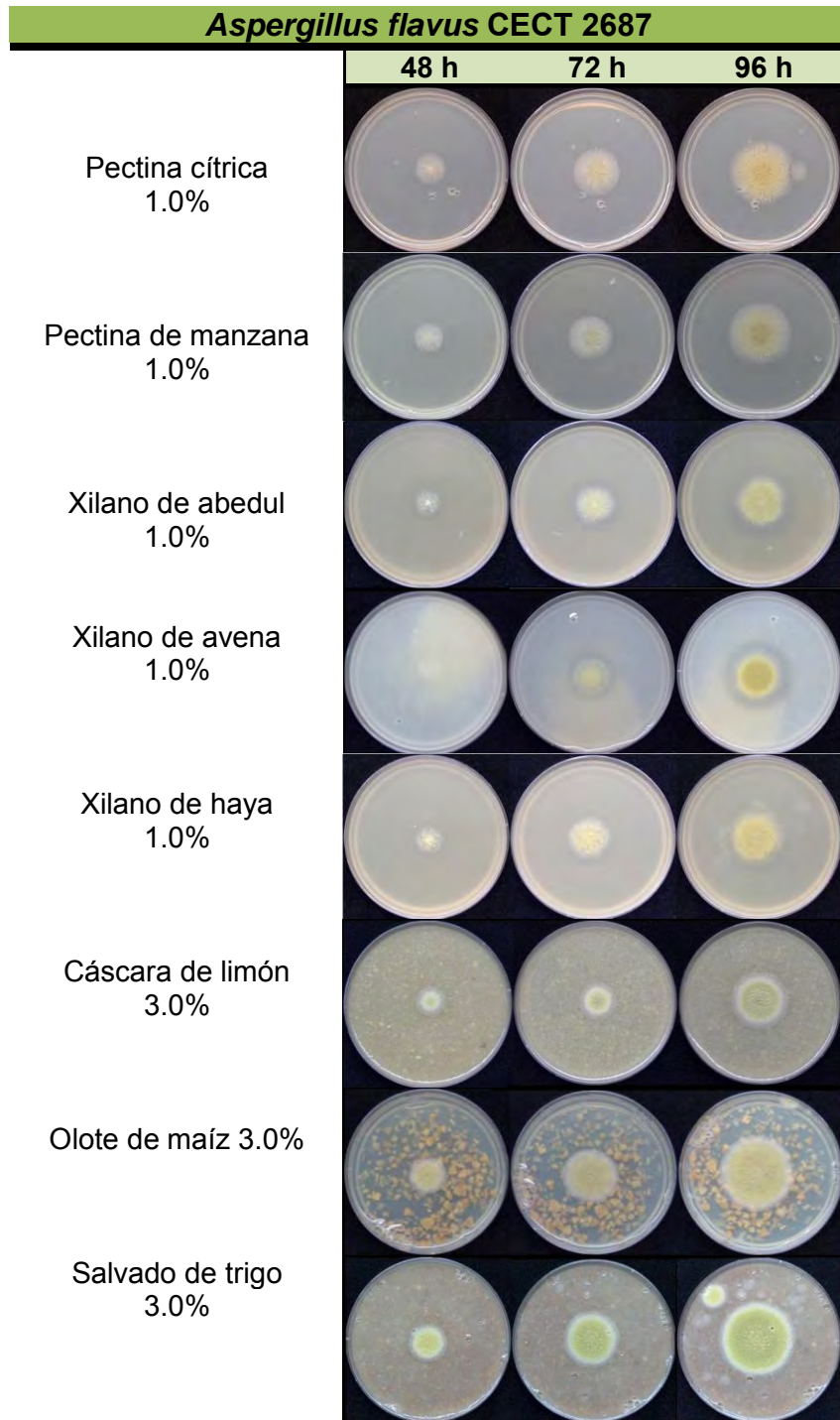


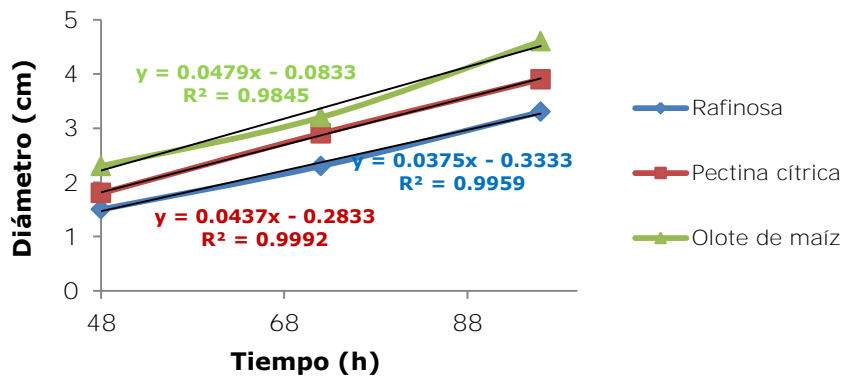
Figura 16. Registro fotográfico de las colonias de *A. flavus* CECT 2687 con varias fuentes de carbono a las 48, 72 y 96 horas de incubación a 37°C, respectivamente.

El crecimiento de los hongos se produce en los extremos de las hifas y se denomina, por esto crecimiento distal o apical. En este proceso, la hifa se va extendiendo y el citoplasma fluye hacia la nueva parte. Al crecer, también se va ramificando y cada ramificación, a su vez, continúa el crecimiento apical y así sucesivamente hasta que se

forma una maraña visible de filamentos. Mientras existan nutrientes disponibles, el crecimiento por elongación de las hifas puede continuar aunque, a la vez, las partes más viejas del micelio pierden poco a poco su contenido citoplasmático y mueren (García, 2004). Dicho crecimiento lineal, se observa en la gráfica 19, para cada grupo de sustratos, mostrándose el máximo diámetro para cada caso.

Tabla 6. Características coloniales de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en diversas fuentes de carbono (condición 1) durante las 96 horas de incubación

	Fuente de carbono / Tiempo	Diámetro colonia (mm) / Esporulación			Desarrollo
		48 hrs	72 hrs	96 hrs	
POLISACARIDOS PUROS	Pectina cítrica	18 +	29 +	39 ++	A
	Pectina de manzana	17 +	27 +	37 ++	A
	Xilano de abedul	15 +	24 ++	28 ++	A
	Xilano de avena	15 +	22 ++	29 +++	A
	Xilano de haya	19 +	25 ++	35 +++	A
	Cáscara de limón	20 ++	30 +++	39 +++	A
	Olote de maíz	23 ++	32 +++	46 +++	A
SUSTRATOS COMPLEJOS	Salvado de trigo	23 ++	33 +++	45 +++	A



Gráfica 19. Representación gráfica del crecimiento máximo de *Aspergillus flavus* CECT 2687 medido en medio sólido.

El crecimiento del hongo puede ser dividido cualitativamente, según Kavanagh, (2005) las curvas de crecimiento presentan tres fases: la primera es una fase de no crecimiento evidente, seguida de una fase de rápido crecimiento y finalmente una fase sin crecimiento neto o de autólisis y disminución en peso seco. Aunque no todos los hongos cumplen este esquema, en los resultados observados, se observan curvas de

dos fases, en la que el crecimiento inicial es seguido de una segunda fase; ya que de acuerdo a la gráfica 19 y a los diámetros medidos el hongo sigue creciendo de manera lineal. La primera fase -sin crecimiento aparente- tiene dos componentes: una fase anterior a la germinación de esporas y una fase en que el crecimiento se presenta pero no se evidencia. La segunda fase se puede representar como síntesis de polisacáridos; sin un aumento en otros componentes celulares, o puede depender en una movilización de nitrógeno de hifas más viejas y su uso para crecimiento neto, este es reutilizado después de agotar fuentes exógenas de nitrógeno disponible (Cochrane, 1963). En esta fase ocurre un rápido crecimiento y un desarrollo del micelio cuyo crecimiento ocurre en las extremidades de las hifas. Las células al interior del micelio no contribuyen al crecimiento neto, aportan nutrientes a células periféricas, especialmente a estructuras aéreas. También, ocurre la utilización de carbohidratos, nitrógeno y fosfato en el medio. En cuanto a la tercera fase (que pudiera ser estudiada a detalle durante más días de fermentación y con la utilización de las membranas para monitorear la pérdida de peso) se debe a dos factores principales: la acumulación de metabolitos tóxicos, ácidos orgánicos en medios con gran cantidad de carbohidratos y de amoníaco en medios con alto contenido de nitrógeno, y el agotamiento de la fuente de carbono. Asimismo en esta fase las células realizan un metabolismo secundario, específicamente rutas metabólicas que no son esenciales para las células pero que están involucradas en la supervivencia del organismo (Kendrick, 2000).

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

Si bien, la medición del diámetro de las colonias durante varios intervalos de tiempo, pueden ser traducidos como tasas de crecimiento, que son con frecuencia lineales en períodos bastantes largos, tal como se observó en la gráfica anterior, sin embargo, el diámetro de las colonias como una medida de la biomasa generada no implica por sí solo la densidad de colonia (Taniwaki, et al, 2006) ni su producción enzimática. Por eso, la necesidad de cuantificar lo que produce en esta condición, pues los hongos filamentosos, tienen la capacidad de secretar grandes cantidades de proteínas en su medio de crecimiento (Weenink, et al, 2006).

Aspergillus flavus CECT 2687

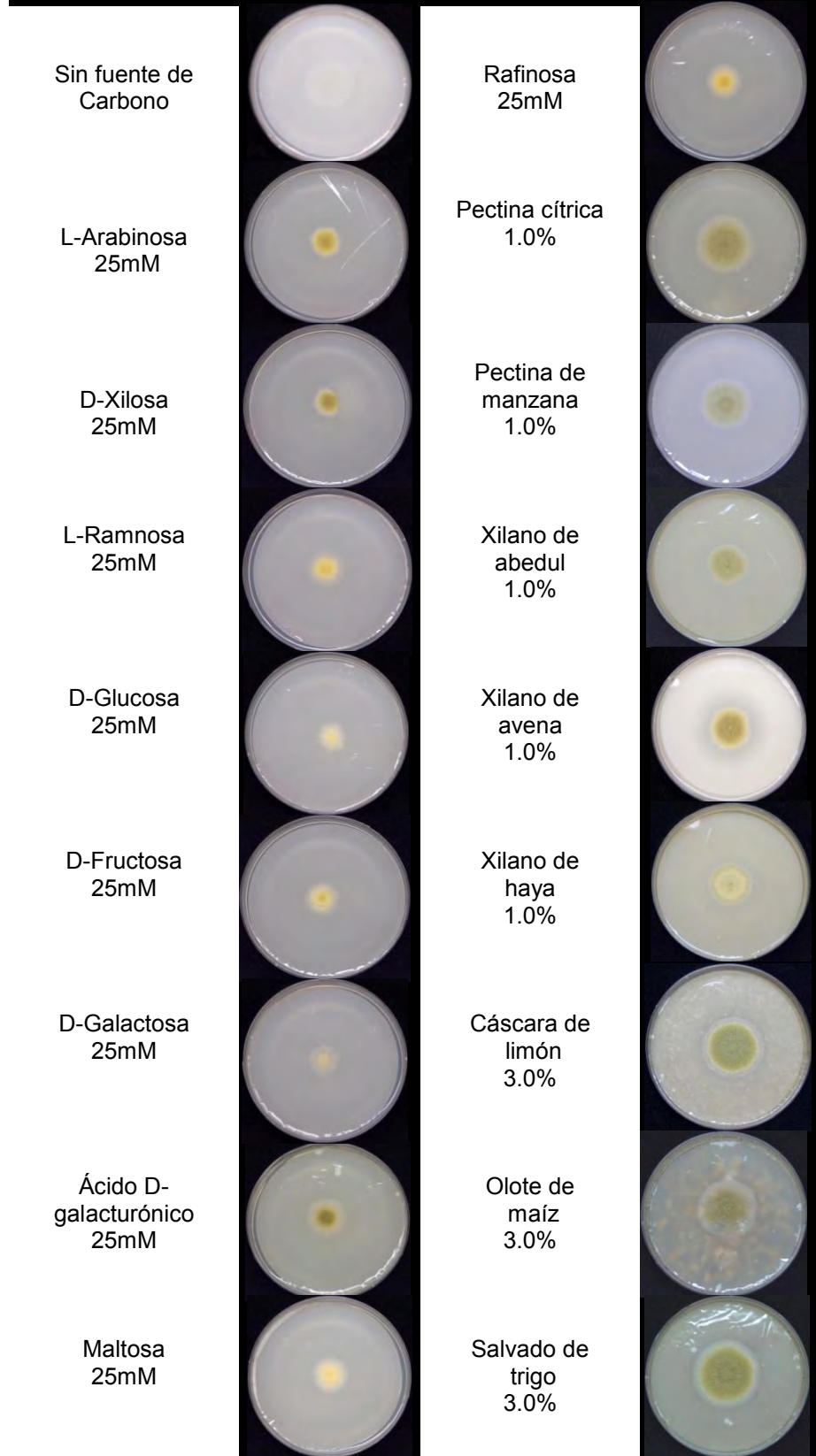


Figura 17. Colonias de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en diferentes fuentes de carbono (condición 2) a las 96 horas de incubación a 37°C.

Si bien, las características macroscópicas de las colonias son muy similares a las de la condición 1, sin embargo son de menor tamaño debido a la presencia de la membrana, además muestran un crecimiento totalmente circular, más uniformidad y adherencia, lo que también facilita la recuperación de la biomasa.

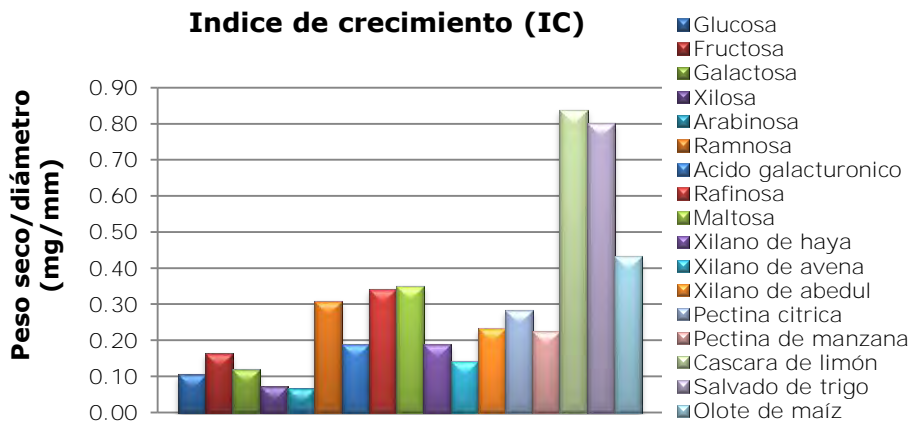
Tabla 7. Mediciones de las colonias de <i>Aspergillus flavus</i> CECT 2687 en diferentes fuentes de carbono (condición 2) a las 96 horas de incubación.						
Fuente de carbono	Peso seco (mg)	Diámetro (mm)	Desarrollo	Esporulación	IC= (mg/mm)	
Sin fuente de Carbono	NC	14	E	-	NA	
CARBOHIDRATOS SIMPLES	L-Arabinosa	1.0	15	M	++	0.07
	D-Xilosa	1.3	18	M	++	0.07
	L-Ramnosa	7.4	24	M	++	0.31
	D-Glucosa	2.1	20	M	+	0.11
	D-Fructosa	3.4	21	M	++	0.16
	D-Galactosa	2.4	20	M	+	0.12
	Ácido D-galacturónico	4.7	25	M	++	0.19
Maltosa	7.0	20	M	++	0.35	
Rafinosa	6.8	20	M	++	0.34	
POLISACARIDOS PUROS	Pectina cítrica	9.3	33	A	+++	0.28
	Pectina de manzana	7.4	33	A	++	0.22
	Xilano de abedul	5.8	25	A	++	0.23
	Xilano de avena	3.7	26	A	+++	0.14
	Xilano de haya	4.7	25	M	++	0.19
SUSTRATOS COMPLEJOS	Cáscara de limón	31	37	A	+++	0.84
	Olote de maíz	15.1	35	A	+++	0.43
	Salvado de trigo	32	40	A	+++	0.80

Con los azúcares simples las colonias son de color amarillo, desarrollo medio y aspecto algodonoso laxo, con excepción del ácido galacturónico que es de color verde pardo y con xilosa es blanco; con los sustratos más complejos, las colonias son de color verde oliváceo a excepción del xilano de haya con un color más amarillento. La colonia crecida en el medio con xilano de haya, presentó un desarrollo medio, textura

aterciopelada y sin presencia de halo de degradación (como en la condición 1), con xilano de avena y abedul, si se observa halo de 6 mm y de 4 mm respectivamente, siendo más evidente en el primero. Las colonias crecidas en ambos tipos de pectina, su textura resultó ser un poco viscosa, de aspecto aterciopelado (figura 17).

Así como aumenta el diámetro colonial al tener un sustrato más complejo, la biomasa generada también, siendo el salvado de trigo el mayor generador de masa celular (32 mg) y diámetro (40 mm); una relación directamente proporcional, con un valor de 0.80 para su índice de crecimiento, mientras que con cáscara de limón se generó poco menos de ambos parámetros físicos sin embargo es el de mayor preferencia nutricional por esta cepa o mejor dicho, este sustrato se clasifica como la primer fuente de carbono en función al desarrollo del hongo (mayor densidad celular) con un IC de 0.84. En cambio, en el medio con arabinosa, a pesar de ser un azúcar simple, genera el menor diámetro y por consecuencia una baja cantidad de biomasa; siendo el menos *ideal* para su crecimiento con un IC de 0.07, igual que xilosa.

En la gráfica 20 se observa con mayor detalle las preferencias nutricionales, mediante una clasificación de las fuentes de carbono que desarrollaron un mayor crecimiento celular determinado por el IC. En primer lugar la cáscara de limón, seguido de salvado de trigo, pectina cítrica, maltosa y rafinosa (clasificado de acuerdo al grupo de sustratos).

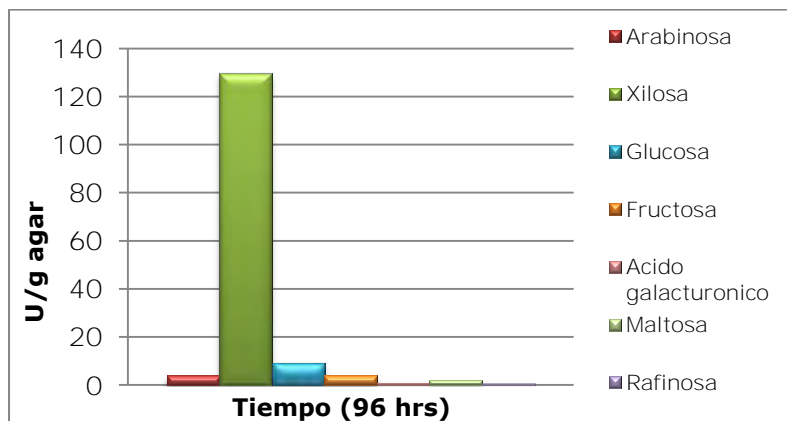


Gráfica 20. Representación gráfica de las preferencias nutricionales de *Aspergillus flavus* CECT 2687, mediante el IC.

7.2.2.1 Actividad xilanolítica

La periferia de la colonia está expuesta al material orgánico inexplorado, mientras que su centro está rodeado por un sustrato que en parte ha sido utilizado para su desarrollo. La colonización del hongo por el micelio en sustratos sólidos se da por extensión de la hifa, sin embargo se sabe poco de las diferencias entre hifas del centro y de la periferia, en términos del tipo de enzimas que producen. Sin embargo, una propiedad importante de cultivos fúngicos en soportes sólidos, es la translocación de material entre diferentes regiones del micelio (Viniestra-González, et al, 2006). Estudios previos de la secreción de proteínas han empleado membranas de policarbonato localizadas sobre el agar con los nutrientes, en donde se inocula el hongo y se estudia la producción de enzimas.

En esta sección los resultados se presentan también en gráficas construidas con los valores de actividad xilanolítica al final de la fermentación sólida, por grupo de sustrato; con las actividades máximas en una gráfica de barras.



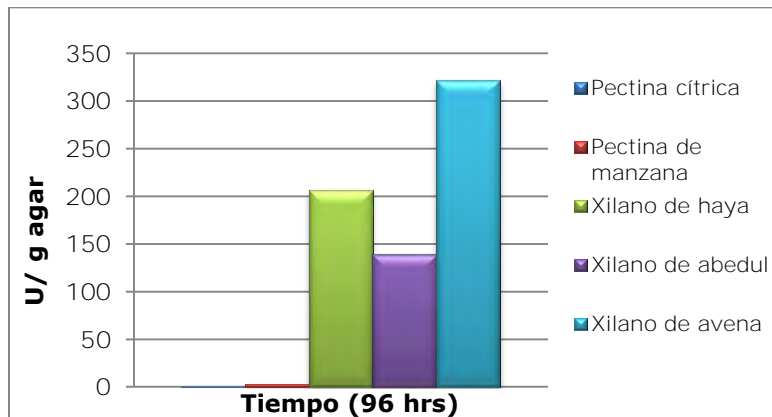
Gráfica 21. Producción de actividad xilanolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en cultivos sólidos con azúcares simples

En el caso de los azúcares simples (arabinosa, glucosa, fructosa, ácido galacturónico, maltosa y rafinosa), los valores de actividad xilanolítica resultan despreciables (Gráfica 21), siendo al menos 12 veces más bajos que en el medio que contenía xilosa, siendo muy evidente el valor de 129.75 U/g ciertamente por ser inductor. Resultados muy similares a los de la cepa anterior.

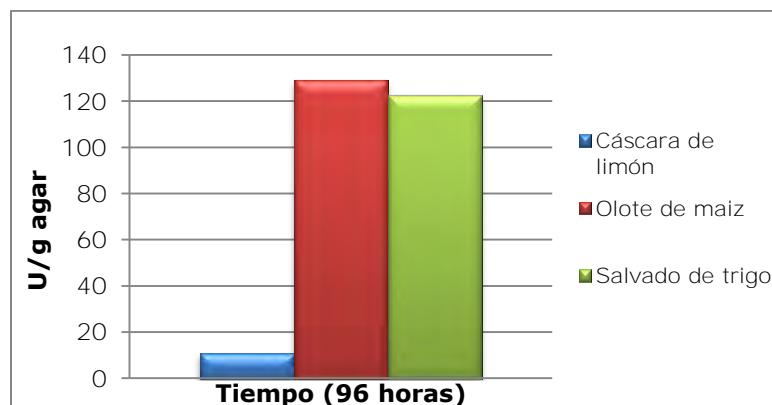
Es claro que los niveles más altos de actividad xilanolítica se obtuvieron con los sustratos más ricos en xilano, en el caso de los polisacáridos puros (Gráfica 22); xilano

de haya, xilano de abedul y xilano de avena con valores de 206.56, 138.97 y 321.52 u/g respectivamente. En cuanto a los polisacáridos con alto contenido de pectina, resultó casi nula la cantidad expresada de enzimas xilanolíticas.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente en las características físicas observadas en los medios de cultivo, se descarta la idea de que la presencia o magnitud de un halo de degradación, valore la actividad xilanolítica; ya que el xilano de abedul (con el halo más grande alrededor de la colonia) resultó ser el sustrato menos productor de dichas enzimas, mientras que, xilano de avena con un halo ligeramente menor al anterior, resultó ser el mejor productor de enzimas xilanolíticas. En comparación con la cepa anterior, xilano de avena resultó ser el menor productor que xilano de haya.



Gráfica 22. Producción de actividad xilanolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en cultivos sólidos con polisacáridos puros



Gráfica 23. Producción de actividad xilanolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en cultivos sólidos con sustratos complejos

Si bien, se hubiese esperado, que en el grupo de los sustratos complejos (gráfica 23) se obtendrían valores mucho más altos respecto a los polisacáridos puros, no fue así a

pesar de que contienen grandes cantidades de xilano, sin embargo el olote resulta el mejor inductor de xilanasas para este grupo con un valor de 128.92 U/g seguido de salvado de trigo 122.58 U/g. Valores contrarios a la cepa anterior y evidentemente, para cáscara de limón, 12 veces menos producción (10.62 u/g).

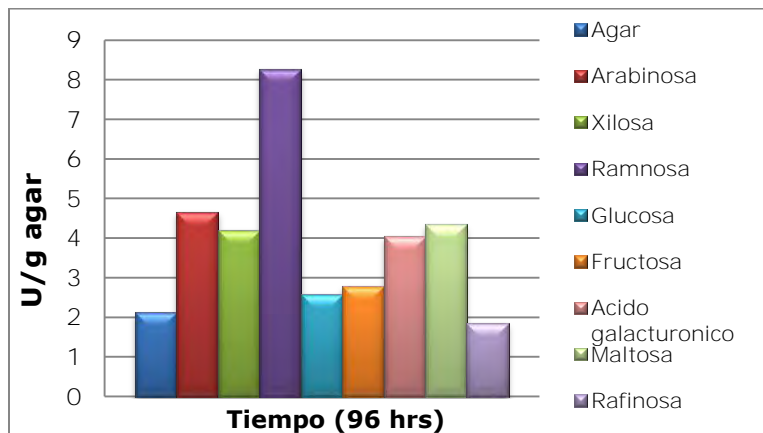
Se han encontrado enzimas xilanolíticas producidas por todos los *Aspergilli*, en medio con xilosa, sustratos crudos que contienen xilano, pero no en otros monómeros como la glucosa, galactosa o sustratos poliméricos como la pectina. Sin embargo, varias enzimas celulolíticas también se producen en la presencia de xilano y xilosa. Existe además mucha información generada respecto a las fuentes de carbono capaces de inducir estas enzimas. Todos los autores consultados concluyen que tanto el xilano como la D-xilosa resultan fuertes inductores de la expresión de las xilanasas en su conjunto (Hrmová, et al, 1991; Lockington, et al, 2002; De Vries, 2003) tal como se observó en las gráficas 21 y 22. En cuanto a otros carbohidratos, se han llevado a cabo experimentos con resultados positivos para la expresión de xilanasas empleando L-arabinosa (Hrmová, 1991) homodisacáridos de xilosa (xilobiosas) (Hrmová, 1991; De Vries, 2003), encontrando niveles de actividad particularmente altos en aquéllos con uniones β -1,2; y por supuesto, con fuentes de carbono complejas, como partes de plantas (De Vries, 2003), que en realidad generan una mezcla de enzimas degradadoras de pared celular (gráfica 23).

7.2.2.2 Actividad pectinolítica

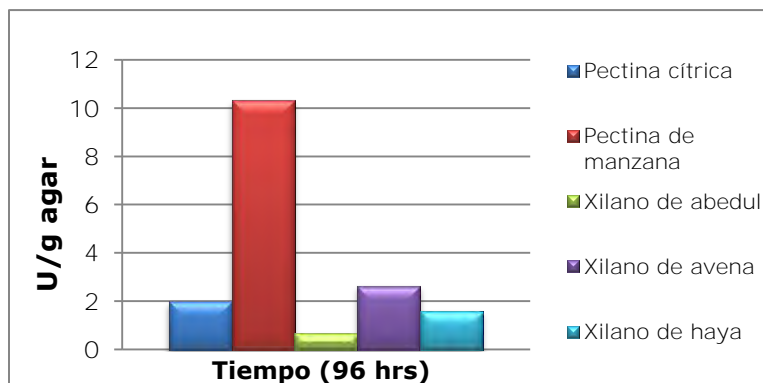
En contraste con la actividad xilanolítica, se obtuvo menor producción de enzimas pectinolíticas aunque si en todos los sustratos utilizados, los cuales se representan en las siguientes gráficas. Si bien, con únicamente agar (gráfica 24), se produjeron pectinasas, aunque baja (2.12 U/g) la cepa a pesar de tener este tipo de polisacárido natural es capaz de producirlas. Seguido de los medios donde la cepa produjo también cantidades menores (glucosa, fructosa y rafinosa) que ciertamente no actúan como fuertes inductores. De manera contraria, sucedió en el medio con ácido galacturónico que a pesar de ser buen inductor de pectinasas, no fue el mayor productor (4.04 U/g), incluso con xilosa se produjo mayor cantidad, lo que respalda el planteamiento de Mach (2003), en cuanto que los verdaderos inductores de los sistemas de regulación de

enzimas degradadoras de la pared celular son pequeños oligosacáridos liberados de la degradación de los polímeros.

Siguiendo esta línea, el ácido galacturónico no actuó realmente como inductor, o no como uno tan fuerte como sus oligómeros; y puede pensarse que dado su papel –en lugar de inductor– se haya tornado en represor, como describen Aguilar y Huitrón (1987). Así como el ácido galacturónico es considerado el principal inductor de genes pectinolíticos, otros azúcares tales como; arabinosa, ramnosa y galactosa, están también involucrados en la inducción de un subconjunto de genes pectinolíticos en *A. niger* (De Vries, et al, 2002), obteniendo así la mayor producción con ramnosa (8.27 U/g) mientras con xilosa, arabinosa y maltosa, resultó tener una magnitud similar entre ellas y prácticamente la mitad de lo que se obtuvo con ramnosa.

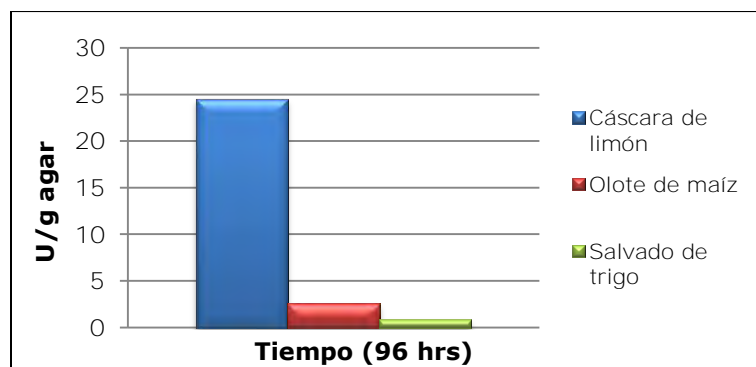


Gráfica 24. Producción de actividad pectinolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en cultivos sólidos con distintos azúcares simples.



Gráfica 25. Producción de actividad pectinolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en cultivos sólidos con diferentes polisacáridos puros.

La baja actividad con los diferentes tipos de xilano (gráfica 25), sustratos puros sin ningún residuo de ácido galacturónico, respondería entonces a la falta de inductor para pectinasas, sobretodo en xilano de abedul que fue prácticamente cero. Sin embargo, para xilano de avena (2.64 U/g) resultó ser ligeramente mayor que con xilano de haya (1.59 U/g) pero muy similar al medio con pectina cítrica (1.99 U/g). Lo que resulta interesante saber porque éste polisacárido no fue el máximo productor de pectinasas, cuando desde una primera perspectiva, la pectina cítrica obtenida de frutos cítricos contiene una alta cantidad de ácido galacturónico; 85% (Sigma-Aldrich, 2013), más de lo que contiene la pectina de manzana: 70 a 75% de pectina esterificada (Sigma-Aldrich, 2013) y además resultó ser el principal polisacárido productor (3.46 U/g). Si bien, ambos tipos de pectina tienen una composición de azúcar muy similar, lo que difiere –de acuerdo al fabricante- es la cantidad de pectina esterificada.

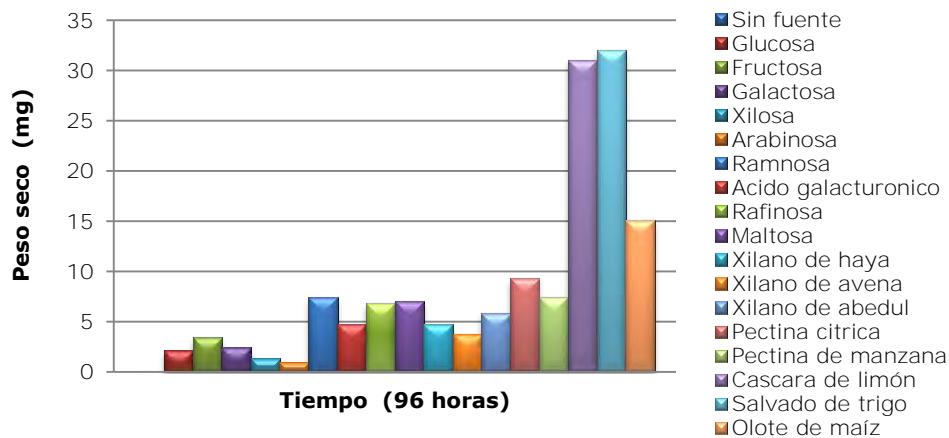


Gráfica 26. Producción de actividad pectinolítica de *Aspergillus flavus* CECT 2687 en cultivos sólidos con sustratos complejos.

Se ha sugerido que algunos microorganismos pueden producir bajos niveles de actividades constitutivos basales que degradan el sustrato polimérico, y que los productos de bajo peso molecular de la reacción sirven como inductores o fuentes de energía para promover el crecimiento celular y para inducir otras pectinasas (Leone & Van Den Heuvel, 1986); lo que podría explicar la pequeña diferencia en cuanto a la actividad pectinolítica.

Entre las frutas y hortalizas, los cítricos son los que tienen el más alto contenido de pectina en todas sus partes: la cáscara, el albedo y jugo (Rai et al, 2006) tal y como se resalta en la actividad de exo-pectinasas producidas en sustratos complejos (gráfica 26), donde la cáscara de limón fue el sustrato que presentó mayor actividad; 24.51 U/g,

esto debe responder a que es la fuente de carbono compleja con mayor contenido de pectina; aunque se hubiera esperado cierta coincidencia con el comportamiento de la pectina cítrica; tal como se observó en la cepa anterior. Si bien, la exo-pectinasa puede expresarse de forma constitutiva como sugieren De Vries y Visser (2001), también es cierto que su expresión puede verse favorecida en respuesta a polímeros de ácido galacturónico, (Martínez-Trujillo, et al, 2009) e incluso fuentes complejas como el maíz (Panda, et al, 2004); produciéndose así una escasa producción en sustratos que no contienen pectina evidentemente -olote de maíz y salvado de trigo- resultando casi despreciable a comparación de cáscara de limón (2.60 y 0.87 U/g, respectivamente). Cierta comportamiento se ve reflejado en la cepa anterior.



Gráfica 27. Biomasa de las colonias de *Aspergillus flavus* CECT 2687 crecidos en los diferentes medios de cultivo.

Si bien, la cantidad de biomasa generada por esta cepa no involucra la producción de enzimas hidrolíticas, si se puede asemejar una relación, tal como se observa en la gráfica 27; donde los sustratos complejos generaron –por mucho- mayor cantidad de biomasa (salvado de trigo) seguido de los polisacáridos puros (pectina cítrica) y finalmente los azúcares simples (ramnosa). Asimismo, es importante resaltar que aunque la pectina cítrica haya sido el sustrato *ideal* por el IC o por su cantidad de biomasa generada, no indica que es el mejor sustrato para producir la mayor cantidad de enzimas pectinolíticas.

En este sistema, una gran fracción de la masa de fermentación está ocupada por aire intersticial y la biomasa está en contacto con un alto nivel de humedad adsorbida a la superficie o en las partículas sólidas de apoyo a las células microbianas (Viniegra-

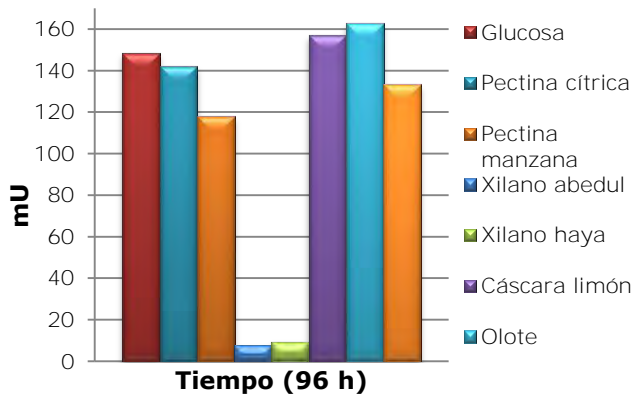
González, 1997). Esta propiedad de los sistemas FES parece ser de importancia, ya que ayuda a obtener altos rendimientos de enzima por gramo de biomasa.

7.2.2.3 Actividad de enzimas accesorias

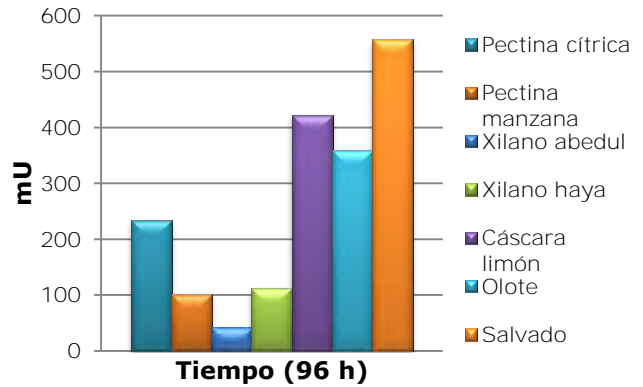
Las actividades de α y β -glucosidasa se muestran en las gráficas 28 y 29, respectivamente, donde de primera instancia se observa que esta cepa es capaz de generar mayor cantidad de β -glucosidasas (casi 4 veces más que α -glucosidasas) aunque en menor cantidad de sustratos, siendo más selectivo. Se puede observar la similitud entre los sustratos xilano de abedul y xilano de haya en ambas actividades, siendo el primero, el peor productor de glucosidasas, con valores casi despreciables. Asimismo, los sustratos complejos muestran ser los mejores productores de β -glucosidasa, tal como el salvado de trigo (557.78 mU), seguido de cáscara de limón con un valor de 422.15 mU y de olote de maíz con un valor menor (358.63 mU) mostrando discrepancia con la actividad de α -glucosidasa, ya que este último resultó ser el mejor productor de esta enzima con un valor de 162,63 mU, seguido –de igual manera- de cáscara de limón; 156.91 mU y finalmente salvado de trigo; 133.45 mU.

Los valores de α -glucosidasa son muy similares a los obtenidos en los polisacáridos puros; pectina cítrica (142.03 mU) y de manzana (118.00 mU), siendo la primera con un valor relativamente más alto que la otra pero similar a la de cascara de limón. Sin embargo, este comportamiento no se observa en la gráfica 29, donde los polisacáridos puros resultaron ser al menos dos veces menos productores que los sustratos complejos; pectina cítrica y de manzana, con valores de 233.30 mU y 101.12 mU, respectivamente.

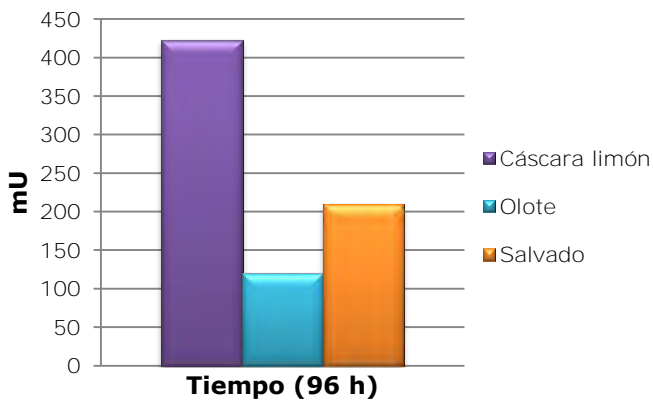
De acuerdo a la actividad de β - galactosidasa (gráfica 31), se obtuvo mayor producción en más sustratos –igual que en la cepa anterior-, siendo con salvado de trigo el valor máximo (1987.81 mU), seguido de un polisacárido puro que si bien no tienen la misma estructura poseen oligosacáridos de galactosa aunque en diferente magnitud; pectina de manzana (1566.35 mU). Este último muy similar a cáscara de limón con 1506.27 mU.



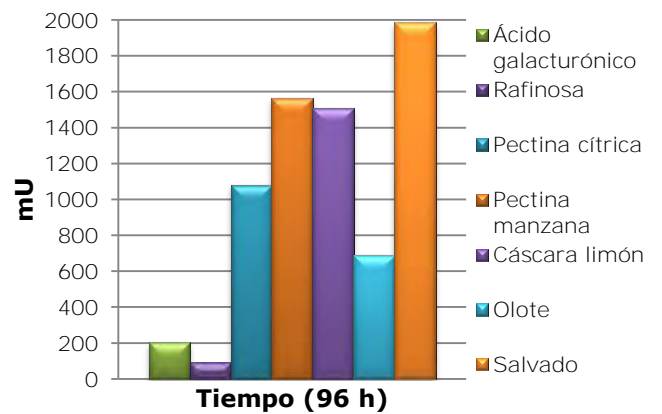
Gráfica 28. Actividad de α - glucosidasa de *A. flavus* CECT 2687 con distintas fuentes de carbono



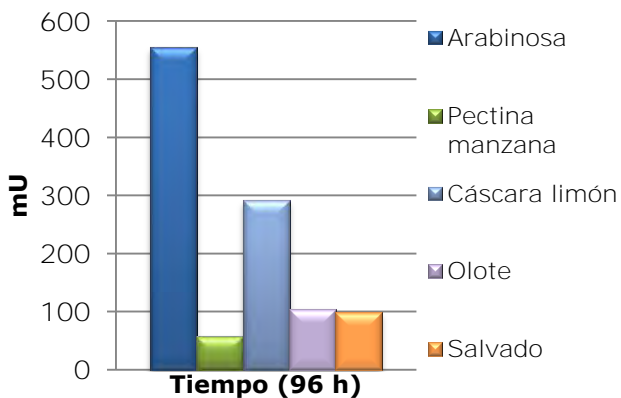
Gráfica 29. Actividad de β - glucosidasa de *A. flavus* CECT 2687 con distintas fuentes de carbono



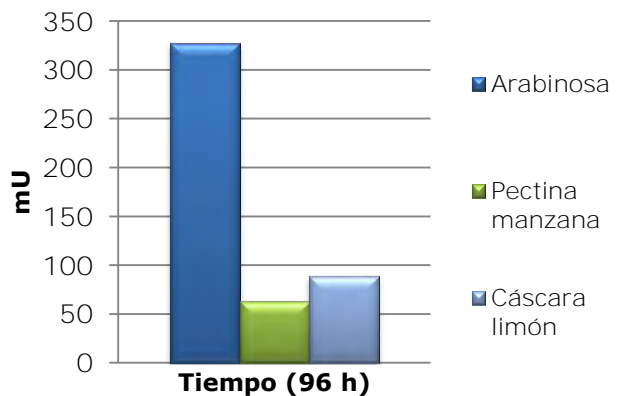
Gráfica 30. Actividad de α - galactosidasa de *A. flavus* CECT 2687 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 31. Actividad de β - galactosidasa de *A. flavus* CECT 2687 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 32. Actividad de α - arabinofuranosidasa de *A. flavus* CECT 2687 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 33. Actividad de β - arabinofuranosidasa de *A. flavus* CECT 2687 con distintas fuentes de carbono

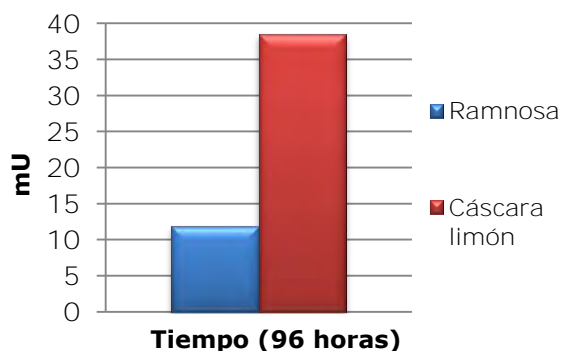
Otro polisacárido puro muy similar a los dos anteriores -en cuanto a la presencia de pectina se refiere- el medio con pectina cítrica (1082.23 mU) resultó también ser un buen productor de esta enzima. Siguiendo con la misma actividad, los valores de ácido galacturónico y rafinosa resultan prácticamente despreciables en comparación con los demás sustratos. Aunque el olote de maíz y el salvado de trigo son un poco similares en cuanto a la cantidad de hemicelulosa, siendo el primero el que contiene mayor proporción, resultó ser el menor productor del grupo (689.10 mU), casi 6 veces más de lo producido en la gráfica 30.

Con olote de maíz, se obtuvo la menor producción de α -galactosidasas con un valor de 120.00 mU, seguido -de manera ascendente- de salvado de trigo (209.27 mU). Si bien un sustrato potencial para la producción de esta enzima, tal como lo mencionó Cruz and Park (1982), Annunziato (1986) y Wang (2004), no resultó ser el principal productor sino el medio que contenía cáscara de limón (423.00 mU); sustrato que contiene oligosacáridos de galactosa en la región llamada ramnogalacturonano I.

Residuos de L-Arabinosil son altamente distribuidos en algunas hemicelulosas, tales como arabinano, arabinoxilano, goma arábica, y arabinogalactano. α -L-arabinofuranosidasa (α -L-arabinofuranosido arabinofuranohidrolasa, EC 3.2.1.55, AF) es una enzima accesoria implicada en liberar arabinosa de esos sustratos (Saha, 2000). En cuanto al presente trabajo, la producción de β -arabinofuranosidasas fue más selectivo y en menor cantidad que las α -arabinofuranosidasas. Sin lugar a duda, en ambas actividades, el medio con arabinosa resultó ser el principal sustrato productor, obteniéndose ligeramente más en la gráfica 32; 555.19 mU y en la gráfica 33 se obtuvo un valor de 327.73 mU; resultados que coinciden con Ramon (1993) y con Van der Veen (1993); la inducción de arabinasas extracelulares en *Aspergillus* ocurrió también con arabinosa. Asimismo en ambas gráficas, el segundo productor de dicha enzima fue el medio con cáscara de limón, resultando más evidente en la actividad de α -arabinofuranosidasa (290.82 mU). El sustrato con menor producción fue el que contenía pectina de manzana, con valores muy similares en ambas actividades 58.20 y 62.49 mU respectivamente.

La actividad de α -arabinofuranosidasa con los otros sustratos complejos: olote de maíz (105.55 mU) y salvado de trigo (99.40 mU) fue en menor medida, sin embargo, el arabinoxilano proveniente del salvado contiene además de manosa, galactosa y glucosa en una pequeña proporción, 65.8% de xilosa y 33.5% arabinosa (Gruppen et al, 1992) lo que también explicaría su degradación por β - xilosidasas reportada en la gráfica 33 con un valor de 46.18 mU; siendo el único sustrato donde se observó actividad de esta enzima para esta cepa (comportamiento contrario a la cepa NRRL 6541).

El azúcar reductor, ramnosa, como se observó en la cepa anterior, actúa como inductor de α -ramnosidasas (gráfica 32) siendo 80 veces menos productor (11.85 mU) que la cepa no toxigénica. Demostrando que la cepa CECT 2687 no es la indicada para generar este tipo de enzimas. También se observó actividad con cáscara de limón (38.15 mU), si bien por el ramnogalaturonano presente en dicho sustrato; aunque en la literatura pertinente no se encuentra reportada la producción de ramnogalacturonasas por *Aspergillus flavus*, y tampoco existe reporte sobre el uso de desechos de alimentos, tales como cáscara de limón para realizar pruebas de producción de este sistema enzimático, este ensayo empleado para cuantificar tanto α -ramnosidasas –que catalizan la hidrólisis de residuos no reductores de ramnosa terminales en polisacáridos– como galactosidasas permiten conocer que es todo un conjunto de enzimas accesorias que participan en la degradación de una estructura tan compleja.



Gráfica 32. Actividad de α -ramnosidasas de *A. flavus* CECT 2687 con distintas fuentes de carbono



Gráfica 33. Actividad de β -xilosidasas de *A. flavus* CECT 2687 con salvado de trigo

7.2.3 Producción de enzimas en cáscara de limón

En la figura 18 se observan las diversas colonias a las 24 y 48 horas de fermentación sólida, utilizando para esta condición, únicamente un sustrato como fuente de carbono. Tanto los cilindros como las colonias a las 24 horas tuvieron un diámetro de 0.8 cm, desarrollo escaso, sin esporulación, micelio blanco de aspecto algodonoso laxo, mientras que a las 48 horas las colonias crecieron hasta 1.3 cm de diámetro (justo del tamaño del cilindro), de color verde pálido, esporulación evidente –principalmente en el centro del inóculo– con desarrollo abundante y aspecto aterciopelado.

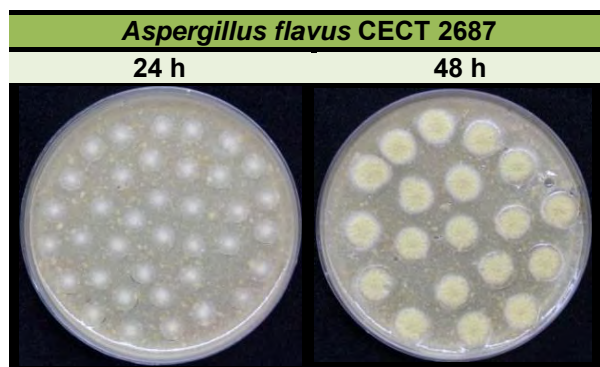


Figura 18. Desarrollo de *Aspergillus flavus* CECT 2687 a diferentes tiempos de incubación

7.2.3.1 Perfil electroforético de los filtrados enzimáticos obtenidos en cultivos sólidos.

Con el objeto de conocer si es posible la obtención de proteínas excretadas en tiempos cortos de fermentación, se eligió cáscara de limón para realizar dicha condición. Evidentemente se encontrará una relación en la morfología de las colonias a las 24 y 48 horas con sus perfiles electroforéticos

En la figura 19 se muestra el perfil electroforético de las muestras de 24 horas (carriles 2, 3 y 4) y a las 48 horas (carril 6). Se realizó por duplicado cambiando la concentración tanto del Buffer de carga como de la relación del buffer-muestra, obteniéndose evidentemente una imagen más clara en los carriles 4 (24 h) y 6 (48 h).

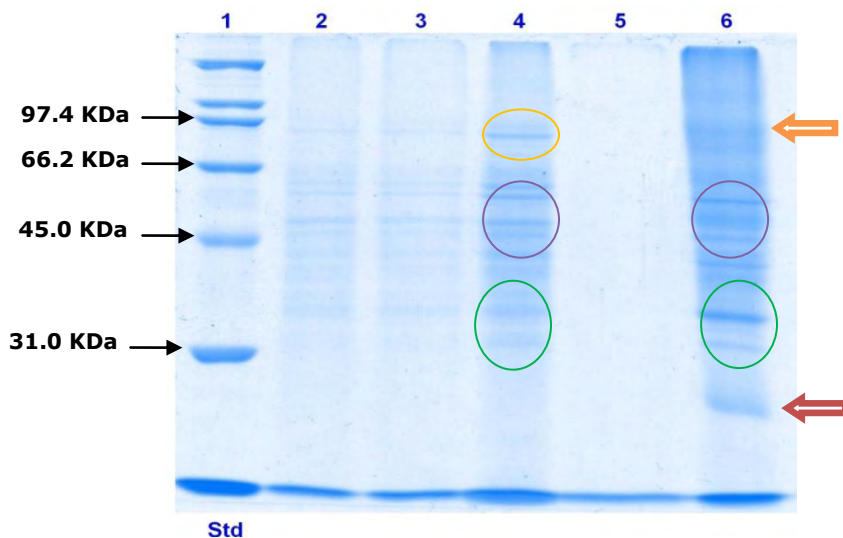


Figura 19. Gel de electroforesis SDS-PAGE. Concentrados de filtrados enzimáticos de *Aspergillus flavus* CECT 2687 obtenidos a las 24 horas (2,3,4) y a las 48 horas de incubación (6) a 37°C en medio sólido con cáscara de limón al 3%. Marcador de peso molecular (1).

De manera general ambas muestras presentan las mismas bandas, siendo más evidentes y más intensas en el carril 6; si bien por la mayor cantidad de proteína recuperada y concentrada. En el carril 4 –óvalo color anaranjado- se muestra la primer banda de 97.0 KDa y en el carril 6 –flecha anaranjada- no se observa bien pero se tienen dos líneas un poco desplazadas con pesos de 98.8 y 92.3 Kda respectivamente, lo que coincide con la primer muestra; asimismo, las siguientes bandas inferiores muestran cierta congruencia en ambas muestras, círculos morados; carril 4: 75.0, 72.1 y 63.5 KDa y para el carril 6: 78.1, 70.7 y 64.4 KDa. Siguiendo a pesos moleculares más bajos se encuentran en los óvalos verdes, para carril 4; 41.2 y 35.2 KDa y para el carril 6 se muestran las bandas mucho mas intensas con pesos moleculares bastantes cercanos; 40.0 y 34.7 KDa; lo que indica que ciertamente la cepa produce desde tiempos muy cortos de fermentación enzimas que le permiten hidrolizar los polímeros presentes en este medio tan complejo y mediante pase el tiempo excreta mayor cantidad y tal vez enzimas más complejas, dependiendo del metabolismo y de la ruta que tome el hongo para la degradación y absorción de los nutrimentos. Ciertamente, se puede observar este comportamiento en el carril 6 -flecha roja- una banda de 25.9 KDa que al parecer no se encuentra en los carriles de la muestra de 24 horas. Sin embargo, para conocer de forma más detallada que tipo de enzimas participan en esta degradación, se necesitaría un análisis complementario de espectrometría de masas.

De acuerdo a la cuantificación de proteína por el método de Bradford, se tuvo más cantidad a las 48 horas (33.40 µg/mL) y a las 24 horas casi la mitad (17.57µg/mL). Debido a la baja cantidad de proteína no se pudo cuantificar actividad enzimática xilanolítica ni pectinolítica.

7.3 Análisis integral

Aspergillus flavus es conocido por producir aflatoxinas (Rao, et. al., 1965) y ciertamente dichaproducción y concentración es dependiente tanto de la cepa como de las condiciones de crecimiento, es decir, una consecuencia combinada de la función genética de la cepa y de su entorno (Blumenthal, 2004; Cotty, et. al., 1994). Por esta razón, se trabajó con dos tipos de cepas, una que genera toxinas y otra que no, para que describir el comportamiento de las mismas en diversas fuentes de carbono así como su producción enzimática y evidentemente encontrar si dicha toxicidad está relacionada con la secreción de enzimas; sin embargo en ningún estudio se ha encontrado dicha relación.

Ahora bien, mediante un análisis descriptivo y cualitativo, las dos cepas expresaron enzimas pectinolíticas y xilanolíticas mostrando casi el mismo comportamiento de producción. En cuanto a magnitud se refiere, ambas cepas generaron más xilanasas que pectinasas, aunque con algunas diferencias entre los mismos sustratos. Si bien, es posible que cepas no tóxicas se seleccionan como organismos de producción (Blumenthal, 2004), en el presente trabajo no se encontraron grandes diferencias entre ambas cepas que permitan establecer lo anterior.

La producción xilanolítica de la cepa no tóxica -NRRL 6541- está por debajo de la cepa tóxica, si bien con valores similares hubo una excepción en el medio con xilosa, xilano de avena y olote de maíz, siendo más evidente la diferencia con los dos primeros sustratos (A.1 y B.1, fig. 20). Sucediendo todo lo contrario en la producción de pectinasas, la cepa NRRL 6541 está ligeramente por arriba de la cepa CECT, estando más evidente en el medio con maltosa y rafinosa (A.2, fig, 20); aunque existen excepciones, con pectina de manzana y cáscara de limón la cepa toxigénica produce más enzimas pectinolíticas que la otra (B.2 y C.2, fig. 20).

Tal como examinaron Mateles y Adye (1965) a 17 compuestos de carbono usados por *A. flavus*, e informaron que la sacarosa, fructosa, y glucosa eran las mejores fuentes de carbono para la producción de aflatoxina, así como en rafinosa (Mellon & Cotty, 1999) y en maltosa (Thapar, 1988), lo que podría explicar por qué la baja producción de pectinasas por la cepa CECT 2687.

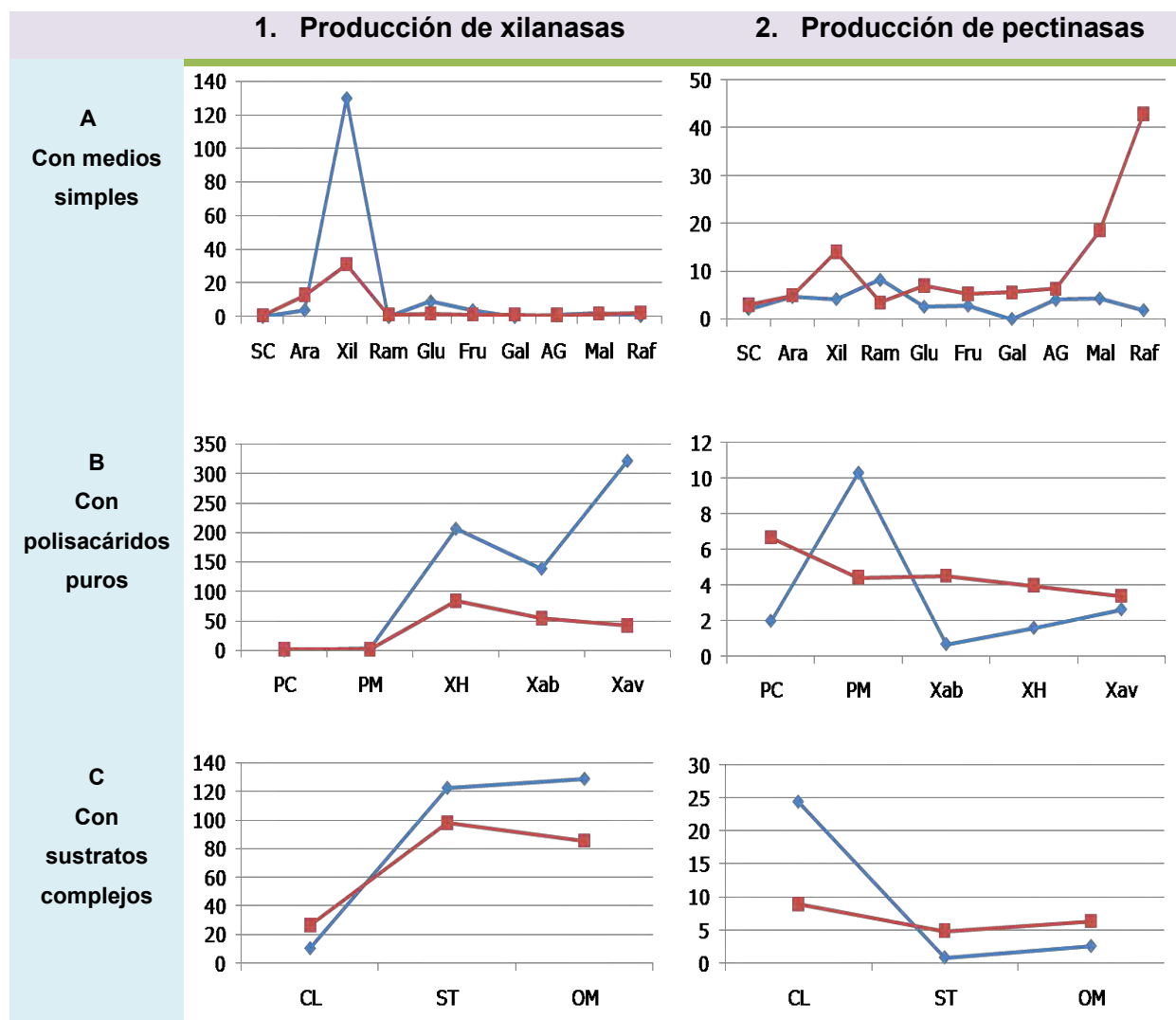


Figura 20. Comparativo de las producciones enzimáticas (U/g) de las cepas de *Aspergillus flavus*; NRRL 6541 (rojo) y CECT 2687 (azul) en los diferentes medios utilizados.

Si bien, no se ha encontrado la relación de toxicidad con la producción de enzimas, se ha identificado en hidrolasas de *A. flavus* que probablemente difunden en los tejidos de plantas, como las pectinasas y proteasas, mientras que probablemente se limitan a la adquisición de nutrientes e inducción de la síntesis de aflatoxinas. Aunque se tiene poca información acerca de las hidrolasas que participan en la biosíntesis de

aflatoxinas, información de diversos estudios han demostrado en pruebas de amilasas producidas por *A. flavus* que durante el crecimiento en granos de maíz juegan un papel importante en la capacidad de producir aflatoxinas, así como las lipasas (Cleveland, et al, 2004); además las cepas toxigénicas presentan actividad proteolítica y una incidencia de esclerocios mayor que las no toxigénicas (Sanchis, et al, 1984).

CAPÍTULO VII

8. CONCLUSIONES

Las cepas de *Aspergillus flavus* (NRRL 6541 y CECT 2687) poseen la capacidad de utilizar todas las fuentes de carbono empleadas en este trabajo y expresar sus sistemas enzimáticos que variaron de acuerdo al sustrato en el que crecieron.

Las diferentes condiciones de crecimiento que se emplearon mediante una fermentación en estado sólido, permitieron describir y obtener información útil acerca del comportamiento de *Aspergillus flavus* en diversas fuentes de carbono.

Se analizaron las características morfológicas de ambas cepas en los diversos medios de cultivo. *Aspergillus flavus* NRRL 6541 presenta un mayor crecimiento radial con azúcares simples (específicamente con lactosa), además de la presencia de cleistotecios. La cepa CECT 2687 tuvo un crecimiento menor que la anterior, sin embargo, con los sustratos complejos se obtuvo el mayor crecimiento (olote de maíz).

Se desarrolló un sistema de crecimiento en placa utilizando membranas de policarbonato que permitió la cuantificación de biomasa, la producción de enzimas y la evaluación de las características morfológicas. Sin embargo, el crecimiento radial de ambas cepas fue ligeramente menor respecto a los medios que no tenían membrana.

Se determinaron las *preferencias nutricionales* de acuerdo al mayor índice de crecimiento obtenido. Para la cepa NRRL 6541 fue con salvado de trigo mientras que para la cepa CECT 2687 fue con cáscara de limón.

El uso de residuos agrícolas permitió evaluar de manera más detallada, la capacidad y el potencial que tienen los hongos para degradar diferentes tipos de sustratos de difícil degradación, además se conocieron el tipo de enzimas que estos requieren para llevar a cabo dicha degradación.

Se desarrolló una técnica para la obtención de enzimas a partir de una fermentación en estado sólido. Para la cepa NRRL 6541 la mayor producción de enzimas xilanolíticas fue con el sustrato de mayor preferencia nutricional (salvado de trigo) mientras que para la producción de pectinasas fue con rafinosa. Con cáscara de limón y xilano de haya se

obtuvo la mayor producción pectinolítica y xilanolítica, respectivamente, para la cepa CECT 2687.

La producción de pectinasas por ambas cepas es mucho más reducida que con respecto a la de xilanasas. Evidentemente los medios con azúcares simples resultaron ser los menos ideales para obtener grandes magnitudes de producción, en cambio los polisacáridos puros resultaron producir mayor cantidad de xilanasas por la cepa toxigénica.

Con los azúcares simples; maltosa y rafinosa, se obtuvieron resultados interesantes en la producción de xilanasas y pectinasas; asimismo dieron los valores altos en el índice de crecimiento de su grupo de sustratos.

Los sustratos complejos resultaron ser los mejores inductores de las enzimas accesorias medidas, siguiendo el mismo comportamiento para ambas cepas aunque con la excepción de que la cepa CECT 2687 generó únicamente β -xilosidasas con salvado de trigo mientras que la cepa NRRL 6541 generó α y β -xilosidasas con olote de maíz y β -manosidasas con cáscara de limón.

Se desarrolló un sistema para la obtención de proteína generada en tiempos muy cortos de fermentación en un sustrato complejo como la cáscara de limón, cuantificando mayor cantidad de proteína a las 48 horas que a las 24 horas; sin embargo, la cepa que genera mayor cantidad de proteína es la cepa no toxigénica. Existiendo coincidencia en ambas cepas entre las bandas 4 y 7 del marcador de peso molecular, tratándose de enzimas pectinolíticas en su mayoría.

9. SUGERENCIAS

Además de cumplir con los objetivos planteados, la contribución de un trabajo de investigación no ha de limitarse únicamente a la generación de información y el análisis de la misma, sino deberían plantearse estudios complementarios para ampliar y aprovechar la información generada.

La primera de las propuestas que anteriormente ha sido mencionada, es realizar un análisis de espectrometría de masas para los filtrados enzimáticos obtenidos de la fermentación sólida en cáscara de limón, con el objeto de conocer qué tipo de enzimas exploradoras se tienen a las 24 y 48 horas de fermentación.

Se propone realizar una cuantificación de biomasa cada 24 horas en un tiempo más prolongado así como la determinación enzimática generada por dicha cantidad para conocer más acerca de su metabolismo, además de mejorar la técnica de producción, cortando el agar antes de inocular para evitar la difusión de enzimas en toda la superficie.

Si bien, de manera cualitativa no se pudo determinar si existe una relación de la toxicidad de la cepa CECT 2687 con su producción de enzimas ya que la respuesta fue muy similar a la cepa no toxigénica, para tener una visión más amplia y profundizar en la presente investigación, se requerirán ensayos adicionales que involucren tanto la determinación de toxinas así como la actividad de amilasas, lipasas y proteasas en diversas fuentes de carbono.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca, María Lourdes. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*;17:S79-S84
2. Adams, T.H., Wieser, J.K., & Yu, Jae-Hyuk. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and molecular Biology reviews*; 62 (1); 35–54.
3. Aguilar, G., C. Huitrón. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(11), 690–696.
4. Aguilar, C.N., C. Augur, E. Favela-Torres and G. Viniegra-González (2001). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochem.*, 36: 565-570.
5. Aguilar, C. N., Gutiérrez-Sánchez, G., Alvarado-Barragán, L., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernandez, J. L., Contreras-Esquivel, J. C. (2008). Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*; 4(4): 354-366.
6. Alkorta I, Gabirsu C, Lhama MJ, Serra JL. (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. *ProcBiochem*. 33: 21-8.
7. Amaikel, S., & P. Keller, N., (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology Volume 49*,107-133
8. Annunziato, M.E., Mohaney, R.R., Mudgett, R.E., (1986). Production of a-galactosidase from *Aspergillus oryzae* grown in solid state culture. *J. Food Sci.* 51, 1370–1371.
9. Ausubel, F., Brent, M.R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994). *Current protocols in molecular biology*, vol. 1. *Current Protocols*. New York N.Y.3.
10. Badui, Dergal Salvador. *Química de los Alimentos*. Facultad de Química. UNAM. Ed. Alhambra Mexicana, 2a ed. México, D.F. Pp. 110-112
11. Be Miller, J.N., (1986). An introduction to pectins: Structure and properties. In: Fishman, M.L., Jem, J.J. (Eds.), *Chemistry and Functions of Pectins*, ACS Symposium Series 310. American Chemical Society, Washington, DC.
12. Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiology Biotechnology*; 56:326–338
13. Bennett J.W, Klich MA, ed. (1992). *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Stoneham, MA:Butterworth-Heinemann. 448 pp.
14. Bennett, J.W. (2009). *Aspergillus: a primer for the novice*. *Medical Mycology*, 47(1), S5-S12
15. Bennett, J.W. (2010). An Overview of the Genus *Aspergillus*. *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*. Norfolk: Caister Academic Press. Chapter 1; 1-1
16. Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-83.
17. Blumenthal, Cynthia Z. (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 39: 214–228
18. Bonifaz Trujillo, J. Alexandro. *Micología médica*. Mac Graw Hill. México, 2009. Pp.
19. Bonnin, E., Clavurier, K., Daniel, S., Kauppinen, S., Mikkelsen, J., & Thibault, J. (2008). Pectin acetylsterases from *Aspergillus* are able to deacetylate homogalacturonano as well as rhamnagalacturonano. *Carbohydrate polymers*, 411-418.
20. Bu'Lock, J.D. (1994) Secondary metabolism in fungi and its relationships to grow and development. *Aspergillus*. Ed. Plenum Press, New York. 33-55.
21. Camassola, M., & Dillon, A. J. P. (2007). *Journal of Applied Microbiology*, 102, 478–485.
22. Castilho, L. R., Medronho, R. A., Alvesa, Tito L.M. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*; 71, 45-50

23. Chevalet, L., Tiraby, G., Cabane, B. and Loison, G. (1992) Transformation of *Aspergillus flavus*, construction of urate oxidase-deficient mutants by gene disruption. *Curr. Genet.* 21, 447-453.
24. Christensen, C.M., & Kaufman, H.K. (1969). *Grain Storage: The Role of Fungi in Quality Loss* (Minneapolis: Univ. Minnesota Press).
25. Cleveland, T.E., Yu, J., Bhatnagar, D., Chen, Zhi-Yuan, Brown, R.L., Chang, Perng-Kuang and Cary, J.W. (2004) Progress in Elucidating the Molecular Basis of the Host Plant—*Aspergillus flavus* Interaction, a Basis for Devising Strategies to Reduce Aflatoxin Contamination in Crops. *Journal of Toxicology. TOXIN REVIEWS* Vol. 23, Nos. 2 & 3, pp. 345–380.
26. Cochrane, V. (1963). *Physiology of Fungi*. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. 524 pg.
27. Coley-Smith JR, Cooke RC. (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. *Annu Rev Phytopathol.* 9: 65-92.
28. Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D.S., and Elias, K.S. (1994). Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. *The Genus Aspergillus, Edited by Keith A. Powell et al.*, Plenum Press, New York, 1-27.
29. Coutinho, P.M., R. Andersen, M., Kolenova, K., et. al. (2009). Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier Vol.46. 161-169
30. Cruz, R., Park, Y.K., (1982). Production of fungal α -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. *J. Food Sci.* 47, 1973–1975.
31. Davis, N., Diener, U. L. (1968). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. *Appl. Microbiol.* 16:158–159.
32. Davis, L. G., Dibner, M.D., and Battey, J.F. (1986). *Basic methods in molecular biology*. Elsevier, New York, N.Y.
33. Dea, I.C.M., and Morrison. A. (1975) Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31:241–312.
34. De Vries, R., & Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 65, pp. 497-522.
35. De Vries, R. P., Jansen, J., Aguilar, G., Parenicová, L., Joosten, V., Wülfert, F., Benen, J. A. E., Visser, J. (2002). Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *Federation of European Biochemical Sciences*, 530, 41-47.
36. De Vries, R. (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(1);10-20.
37. De Vries, R.P. & Dijksterhuis, J. (2006). Compatible solutes and fungal development. *Biochemistry Journal*. 399, e3–e5.
38. Dey, P. M. (1978) Biochemistry of plant galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35:3411–376
39. Dussel Peters Enrique (2002). Territorio y competitividad en la agroindustria en México. Editores Plaza y Valdes. México. Págs. 144.145
40. Fekete, E., Padra, J., Szentirmai, A., Karaffa, L. (2008). Lactose and D-Galactose catabolism in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55 (2), 119–124
41. Fennema, Owen R. *Food Chemistry*. Ed. Marcel Dekker, 3ra ed. Madison, Wisconsin. Pp. 207, 217-218.
42. García Cortés, Vera. *Introducción a la microbiología*. 2ª ed. Editorial universidad Estatal a distancia. San José, Costa Rica. 2004, pp: 86-98
43. Geiser DM, Timberlake WE, Arnold ML. (1996) Loss of meiosis in *Aspergillus*. *MolBiolEvol.* 13: 809-817.
44. Geiser, D. M. (2009). Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology*, 47(1), S21_S26
45. Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., Bensoussan, M. (1988). Influence of water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi, *Biotechnol. Bioeng.* 31; 457–463.
46. Gervais, P. & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13; 85–101
47. Gifford, Danna R., Schoustra, Sijmen E. (2013). Modelling colony population growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Theoretical Biology*; 320, 124–130.

48. Gruppen, H., Hamer, R.J., Voragen, A.G.J. (1992) Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. *J Cereal Sci*;16:53–67.
49. Gusakov, A. V., Berlin, A. G., Popova, N. N., Okunev, O. N., Sinitsyn, A. O., & Sinitsyn, A. P. (2000). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 88, 119–126.
50. Hazen, S. et al. (2003) Quantitative trait loci and comparative genomics of cereal cell wall composition. *Plant Physiol.* 132, 263–271
51. Holker, U., Hofer, M., Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64; 175–186.
52. Hrmová, M, Petráková, E., & Biely, P. (1991). Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. *Journal of general microbiology*, 137(3), 541-7.
53. Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem* 2005; 40: 2931-44.
54. Kashyap, D.R., Vohra, P.K. Chopra, S. Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review *Bioresource Technology*; 77, 215-227
55. Kavanagh, K. Ed. (2005). *Fungi Biology and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra. 297 pg.
56. Kendrick, B. (2000). *The fifth kingdom, Third Edition*. Focus Publishing, Massachusetts, EUA, 373 pg.
57. Knogge, Wolfgang (1996). *Fungal Infection of Plants. The Plant Cell*, Vol. 8, 1711-1722
58. Lagunas, I., García, B.E., Castaño, T. E., Regalado, G., C., Avila G. E., (2006). Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimentos balanceado para pollo de engorda. *Vet. Méx.*, 37(1); 1-13
59. Leone, G., & Van Den Heuvel, J. (1987). Constitutive exo- pectinase produced by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 on different carbon source *Can. J. Bot.* 65, 2133-2141.
60. Lerouxel, O., Cavalier, D. M., Liepman, A. H., & Keegstra, K. (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides-a complex process. *Current Opinion in plant biology*, 621-630.
61. Li, X., Dong, X., Zhao, C., et al. (2003). Isolation and some properties of cellulosedegrading *Vibrio sp.* LX-3 with agar-liquefying ability from soil, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19; 375–379
62. 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.
63. López Munguía, A., García Garibay, M., Quintero Ramirez, R. (2004). *Biología Alimentaria*. Ediciones Limusa Noriega. México. Pág. 585.
64. Lozano P, Manjon A, Iborra JL, Galvez DM. (1990) Characteristics of the immobilized pectin lyase activity from a commercial pectolytic enzyme preparation. *Acta Biotechnol.* 10:531–9.
65. Mach, R. L., & Zeilinger, S. (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 515-22.
66. Mandevvu, P., West, J. W., Froetschel, M. A., Hatfield, R. D., Gates, R. N., & Hill, G. M. (1999). *Animal Feed Science and Technology*, 77, 317–329.
67. 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.
68. Mateles, R.I., Adye, J.C. (1965). Production of aflatoxins in submerged culture. *Appl. Microbiol.* 13:208–221.
69. Mellon, J.E.; Cotty, P.J. (1999). Raffinose content may influence cottonseed susceptibility to aflatoxin contamination. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 883-886.
70. Mellon, J.E., Dowd, M.K., Cotty, P.J. (2002). Time Course Study of Substrate Utilization by *Aspergillus flavus* in Medium Simulating Corn (*Zea mays*) Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 648-652

71. Mellon, J. E., Cotty, P.J., Dowd, M.K. (2007). *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 77, pp. 497–504.
72. Minic, Z., & Jouanin, I. (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. Plant physiology and biochemistry, 435-449.
73. Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. Current opinion in plant biology, 11(3), 266-77.2008
74. Moo-Young, M., Moreira, A., & Tengerdy, R. (1983). Principles of solid state fermentation. In: Fungal Biotechnology, Smith, J., D. Berry and B. Kristiansen (Eds.). Edward Arnold Publishers, London, pp: 117-144.
75. Morton Francés, Julia. (1987). Fruits of warm climates. Editorial Media Incorporated. Miami, USA. Págs.160-168.
76. Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., & Teixeira, J.A. (2012). Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. Industrial Waste, 6: 121-140.
77. Nigam, P.S. (2009). Production of bioactive secondary metabolites, In: *Biotechnology for Agro- Industrial Residues Utilization*, Nigam, P.S., & Pandey, A. (Eds.) pp. 129-145, Springer, Netherlands.
78. Oshero, May G.S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. FEMS MicrobiolLett. 199:153–60.
79. Ovando-Chacón, S., & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y ciencia, 111-120.
80. Panda, T., Nair, S. R., & Kumar, M. P. (2004). Regulation of synthesis of the pectolytic enzymes of *Aspergillus niger*. Enzyme and Microbial Technology, 34(5), 466-473.
81. Pandey A, Azmi W, Singh J, Banerjee UC. (1999a). Types of fermentation and factors affecting it. In: Joshi VK, Pandey A, editors. Biotechnology: Food Fermentation. New Delhi: Educational Publishers. 383–426.
82. Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P. (1999b). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. CurrSci. 77(1):149–162.
83. Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D. (2000) New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. Process Biochemistry, 35, 1153–1169
84. Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. Vol. 13, Issues 2–3, 81–84
85. Payne, G.A., Nierman, W.C., Wortman, J.R., Pritchard, B.L., Brown, D., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Machida, M., y Yu, J. (2006). Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. Med Mycology Suppl. 44; 9-11.
86. Pellerin P, Gosselin M, Lepoutre JP, Samain E, DEbeire P. (1991) Enzymatic production of oligosaccharides from corncob xylan. Enzyme MicrobTechnol 13:617-623.
87. Perlack, Robert; Wright, Lynn; Turhollow, Anthony; Graham, Robin; Stokes, Bryce; Erbah, Donald. (2005). Bioenergy and bioproducts industry:the technical feasibility of a billion-ton annual supply. US Department of Energy and U.S Department of agriculture. Oak Ridge, Tennessee
88. 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
89. Rai, P., Majumdar, G.C., DasGupta, S. (2006). Modeling of sucrose permeation through a pectin gel during ultrafiltration of depectinized Mosambi (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice. Journal of Food Science, Vol.71;2, E87-E94.
90. Raimbault M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Journal of Biotechnology; 1:4-28.
91. Ramon, D., van der Veen, P., and Visser, J. (1993). Arabinan degrading enzymes from *Aspergillus nidulans*: induction and purification. FEMS Microbiol. Lett. 113:15–22.
92. Rao, K.S., Madhavan, T.V., Tulpule, P.G. (1965) Incidence of toxigénica strains of *Aspergillus flavus* affecting groundnut crop in certain coastal districts of Andhra Pradesh. Indian J Med Res; 1196-1199.
93. Rau, M., Heidemann, C., Pascoalín, A. M., XimenesFilho, E., Camassola, M., Dillon, A. J. P., et al. (2008). Biocatalysis and Biotransformation, 26, 383–390.
94. Righelato, R.C (1994) Growth Kinetics of mycelial fungi. *Aspergillus*. 79-100 Ed. Plenum Press, New York.

95. Rizk, M., Antranikian, G., Elleuche, S. (2012). End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. *Biochemistry Biophys Res Commun.* 428 (1):1-5.
96. Saha B.C. y Bothast R.J. (1999). Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Appl Biochem Biotechnol* 76:65-77.
97. Saha, Badal C. (2000) α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18;403–423.
98. Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme E. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *AdvApplMicrobiol*;39: 213-94.
99. Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.2.
100. Samson, R.A. & Varga, J. (2010) Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Aspergillus Molecular Biology and Genomics* (Machida M & Gomi K, eds), pp. 19–40. Caister Academic Press, Norfolk.
101. Sánchez, Carmen. (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 185-194
102. Sanchis, V., Vinas, I., Jimenez., M. & Hernandez, E. (1984) Diferencias morfológicas y enzimáticas entre cepas de *Aspergillus flavus* productoras y no productoras de aflatoxinas. *An. Biol. Spec. Sect. 1*, 109-114.
103. Sandrim, V., Rizzatti, A., & Terenzi, H. (2004). Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochemistry*, 1823-1828.
104. Scheller, H.V., Jensen, J. K., Sorensen, S. O., Harholt, J., Geshi, N. (2007) Biosynthesis of pectin. *Physiologia Plantarum*; 129: 283–295.
105. Semenova M, Sinityna O, Morozova V, et al. Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry. *ApplBiochemMicrobiol* 2006; 42: 598-602.
106. Shallon, D., & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Ecology and industrial microbiology*, 219-228.
107. Sinclair, B. Walton and Crandall, R. Paul. (1949). Carbohydrate Fractions of Lemon Peel. *Plant Physiology*. Págs. 681-705.
108. Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C. R., Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 44; 13–18.
109. Smith, J. (1994). The structure and development of filamentous fungi. *Aspergillus*. Plenum Fresh, 1-15.
110. Smith, L.O., Cristol, S.J. (1970) *Química Orgánica*. Editorial Reverté Barcelona, San Martín, Pp 738.
111. Snow, D. (1949). The germination of mould spores at controlled humidities *Ann. Appl. Biol.* 36; 1–13.
112. Solis, S., Loeza, J., Segura, G., Tello, J., Reyes, N., Lappe, P., et. al. (2008). Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase-overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus nivos* CH-Y-1043. *Enzyme and Microbial Technology*, 123-128.
113. Subramaniyan, & Prema. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews biotechnology*, 33-64.
114. Tamayo-Ramos, J.A., Flippi, M., Pardo, E., Manzanares, P., and Orejas, M. (2012) L-Rhamnose induction of *Aspergillus nidulans* α -rhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA-independent mechanism acting at the level of inducer uptake. *Microbial Cell Factories*; 11:26; 1-17.
115. Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Hocking, A.D. & Fleet, G.H. (2006) Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. *Food Science and Technology*; 49-67
116. Tarrand, J. J., Han, X. Y., Kontoyiannis, D. P., May, G. S. (2005). *Aspergillus* Hyphae in Infected Tissue: Evidence of Physiologic. *Journal of Clinical Microbiology.* 43 (1); 382–386
117. Thapar, G.S. (1988) Metabolic behaviour of aflatoxin producing strain and non-toxigenic strain of *Aspergillus flavus* to different sources of nitrogen and glucose concentration. *Mycopathologia*;102:9-12.
118. Trinci, A.P.J., Collinge, A. (1973). Influence of l-sorbose on the growth and morphology of *Neurospora crassa*, *J. Gen. Microbiol.* 78; 179–192.

119. Van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. and van Gorcom, R.F.M. (1992). Production of extracellular proteins by the filamentous fungus *Aspergillus*. Anton. Leeuwen. 61, 153-160.
120. Van der Veen P, Flipphi M.A., Voragen A.G.J., Visser J. (1993) Induction of extracellular arabinases on monomeric substrates in *Aspergillus niger*. Arch Microbiol; 159:66–71.
121. Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Revista peruana de biología, 78-87.
122. Viniegra-González, G. (1997). Solid-State Fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring. In: Advances in Solid-State Fermentation, S. Roussos, B.K. Lonsane, M. Raimbault, G. Viniegra-González (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; 5–22.
123. Viniegra-González, G. (1998). Strategies for the selection of mold strains geared to produce enzymes on solid substrates, In: E. Galindo, O.T. Ramírez (Eds.), Advances in Bioprocess Engineering II, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 123–136
124. Viniegra-González, G., Favela-Torres, E. Aguilar, C. N. Romero-Gomez, S. de J. Díaz -Godínez, G. Christopher Augur. (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Biochemical Engineering Journal. 13; 157–167
125. Viniegra-González, G. & Favela-Torres, E. (2006). Why Solid-State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression?. Food Technology Biotechnology. 44 (3); 397–406.
126. Vorwerk, S., Somerville, S., & Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. Trends in plant science ,203-209.
127. Wang, C.L., Li, D.F., Lu, Wang, W.Q., Lai, C.H., (2004). Influence of cultivation conditions on the a-galactosidase biosynthesis from a novel strain of *Penicillium sp.* in solid-state fermentation. Lett. Appl. Microbiol. 39, 369–375.
128. Ward, P.P., Lo, J.Y., Duke, M., May, G.S., Headon, D.R. and Conneely, O.M. (1992) Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. Bio/Technology. 10, 784-789
129. Weenink, X.O., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J., Ram, A.F.J. (2006) A new method for screening and isolation of hypersecretion mutants in *Aspergillus niger*. Applied Microbial and Cell Physiology; 69: 711–717.
130. Wösten, H.A.B., Moukha, S.M., Sietsma, J. H., Wessels, J.G.H. (1991). Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology; 137: 2017-2023.
131. Yadav, S., Kumar, P., Yadav, D., Singh, K. (2008). Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. Process Biochemistry, 43(1), 547-552.
132. Yadav, V., Yadav, P. K., Yadav, S., Yadav, K.D.S. (2010) α -L-Rhamnosidase: A review. Process Biochemistry; 45: 1226–1235.
133. 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.
134. Zhang, Y. P., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances , 452-481.
135. 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.

Referencias electrónicas consultadas:

1. Adisseo. [en línea] Dirección URL:
<https://www.adisseo.biz/Productguides/RovabioGuide/versatility.aspx>. [15/07/2012]
2. ASPERGILOSIS. Facultad de Medicina. [en línea] Dirección URL:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html> [31/05/2013]
3. Protein Precipitation Procedures. [en línea] Dirección URL:
<http://www.biochem.uwo.ca/wits/bmsl/protocols.html>. [18/09/2012].
4. SAGARPA. Desarrollo rural. [en línea] Muñoz, S.S, 2013. Dirección URL:
<http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamiento%20de%20esquilmo%20s.pdf> [18/06/2013]
5. Sigma-Aldrich, 2013 [en línea] Dirección URL:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/76282?lang=es®ion=MX> y
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p9135?lang=es®ion=MX> [20/07/2013]
6. Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas. [en línea] Dirección URL: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM7/7> [19/06/2013]

ANEXO

Composición química de las sustancias empleadas

- **Medio mínimo**

0.6% p/v NaNO₃
0.15% p/v KH₂PO₄
0.05% p/v KCl
0.05% p/v MgSO₄·7H₂O
Ajustar a pH de 6.00

- **Solución salina isotónica con Tween 80**

0.9% p/v NaCl
0.005% v/v Tween 80

- **Buffer de corrimiento**

0.025 mM Tris-HCl
0.192 M glicina
0.1% SDS
Ajustar a pH de 8.3

- **Buffer de tratamiento desnaturizante**

4% SDS
20% glicerol
10% 2-mercaptoetanol
125 mM buffer Tris-HCl
0.05 % azul de bromofenol
Ajustar a pH de 6.8

- **Azul de Coomasie R-250**

0.125% azul de Coomasie R-250
50% metanol
10% ácido acético