



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Comparación de la producción de amilasas por *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y *Aspergillus parasiticus* NRRL-502, en fermentación sumergida utilizando maíz como sustrato.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

María Paola Solís Ares



MÉXICO, D.F.

2014



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.

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Proyectos: IN 225710 e IN 219813 en el periodo 2013-2014, dentro de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradezco a la DGAPA por la beca recibida.

Contenido

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Objetivos.....	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos particulares	2
Capítulo 3. Antecedentes.....	3
3.1 Generalidades de los hongos filamentosos	3
3.2 El género <i>Aspergillus</i>	4
3.3 <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>	5
3.4 Factores de virulencia de <i>Aspergillus</i>	6
3.4.1 Factores de virulencia no enzimáticos.....	6
3.4.1.2 Aflatoxinas.....	7
3.4.2 Factores de virulencia enzimáticos	10
3.5 Almidón.....	11
3.5.1 Gelatinización del almidón.....	12
3.6 Enzimas: Constitutivas e Inducibles.	13
3.7 Enzimas degradadoras de pared celular	15
3.8 Enzimas degradadoras del almidón	15
3.8.1 Alfa-amilasas	16
3.8.2 Beta amilasas.....	17
3.8.3 Glucoamilasas.....	18
3.8.4 Isoamilasa	19
3.9 Características de las amilasas de <i>A. flavus</i>	19
3.10 Sustratos complejos	21
3.10.1 Maíz (<i>Zea mays</i>)	21
3.10.2 Limón (<i>Citrus limonum</i>)	24

Capítulo 4. Materiales y Métodos.....	27
4.0 Materia prima.....	27
4.1 Microorganismos	27
4.2 Recuperación y mantenimiento de las cepas	27
4.3 Cosecha de esporas.....	27
4.4 Conteo de esporas por medio de conteo directo en la cámara de NeuBauer	28
4.5 Cultivo en medio líquido con fuentes ricas en almidón	28
4.6 Determinación de actividad enzimática (actividad amilolítica)	29
4.7 Concentración de filtrados enzimáticos por liofilización.....	29
4.8 Determinación de proteína por el método de Bradford	29
4.9 Análisis Electroforético (SDS- PAGE) y zimograma	30
Capítulo 5. Resultados.....	31
Parte I.....	31
Selección de la fuente de nitrógeno para crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> CECT-2687 y evaluación de su producción enzimática.	31
Comportamiento del pH a lo largo de las fermentaciones	32
a) Fermentación con NaNO ₃	32
b) Fermentación con (NH ₄) ₂ SO ₄	33
c) Fermentación sin fuente de nitrógeno	34
Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad amilolítica.	37
a) Fermentación con NaNO ₃	37
b) Fermentación con (NH ₄) ₂ SO ₄	39
c) Fermentación sin fuente de Nitrógeno:	40
d) Perfil electroforético y zimograma:	41
Parte II.....	43
Efecto del pH y diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> de la sección Flavi, en la producción de amilasas.	43
a) <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL- 502.....	44
b) <i>Aspergillus flavus</i> CECT- 2687	46
c) <i>Aspergillus flavus</i> NRRL- 6541.....	47
Parte III.....	54

Análisis de la producción amilolítica con sustratos no amiláceos:.....	54
Glucosa	55
Maltosa	55
Sacarosa	56
Cáscara de limón	60
- Inicio de la fermentación a pH 5	60
- Inicio de la fermentación a pH de 8	64
Capítulo 6. Conclusiones	69
Capítulo 7. Sugerencias.....	71
Capítulo 8. Bibliografía.....	72

Capítulo 1. Introducción

Los hongos filamentosos son organismos eucariotes pluricelulares. No son fotosintéticos, por lo que necesitan excretar enzimas para la absorción de materia orgánica; bajo esta característica los hongos pueden ser: parásitos (se alimentan de materia viva como parásitos obligados o facultativos) o saprófitos (se alimentan de materia orgánica muerta o en descomposición).

Dentro de los mohos, se encuentra el género *Aspergillus*, el cual es causante del deterioro de muchos productos alimenticios, además de que los productos metabólicos de su invasión fúngica suelen ser muy tóxicos.

Aspergillus flavus es la especie más ampliamente conocida del género *Aspergillus*. Se encuentra principalmente como saprófito en el suelo, reciclando nutrientes de residuos de plantas y animales; también presenta características de patógeno en un amplio rango de hospederos no específicos como: plantas, insectos, aves y mamíferos. Al encontrarse ampliamente distribuido en el suelo, es muy común encontrarlo como contaminante en cultivos agrícolas, donde sobresalen: el maíz, el cacahuate y el algodón.

A. flavus y *A. parasiticus* producen una familia de metabolitos altamente tóxicos y carcinogénicos llamados “aflatoxinas”, las cuales representan un riesgo para la salud del ser humano. Por su enorme impacto en la agricultura, es de suma importancia estudiar los factores que favorecen la propagación de este hongo en las plantas, en especial las enzimas que degradan polisacáridos, en este caso amilasas, pues juegan un papel importante en la patogenicidad al ser consideradas factores de virulencia.

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Evaluar el tipo y cantidad de enzimas amilolíticas producidas por 3 cepas distintas: *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 (cepas toxigénicas) y *Aspergillus Flavus* NRRL-6541 (cepa no toxigénica), utilizando como fuente de carbono diversos sustratos complejos en fermentación sumergida.

2.2 Objetivos particulares

- Determinar la actividad amilolítica de estas cepas en diferentes sustratos complejos
- Relacionar la actividad amilolítica entre cepas productoras y no productoras de toxinas.
- Evaluar el efecto del pH en las fermentaciones (5 y 8) y observar el cambio en los perfiles enzimáticos.
- Realizar un análisis electroforético (gel de electroforesis y zimograma) de los filtrados enzimáticos obtenidos de las fermentaciones.
- Preservar a largo plazo las cepas utilizadas (*Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 y *Aspergillus Flavus* NRRL-6541) del grupo de fisiología de hongos filamentosos de la Facultad de Química, UNAM, lo cual es de suma importancia al ser cepas de colección.

Capítulo 3. Antecedentes

3.1 Generalidades de los hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariontes, heterótrofos, morfológicamente complejos, aerobios y en general no motiles. La mayoría crece entre los 0 y 55°C, con una temperatura óptima entre los 20 y 30°C (Bonifaz, 2009), asimismo presentan unas estructuras tubulares formadas por múltiples células, denominadas hifas. En la mayoría de estos hongos, las hifas son tabicadas y presentan septos que delimitan cada célula (García, 2004).

Las hifas normalmente se desarrollan a partir de esporas, aunque también pueden originarse a partir de fragmentos de otras hifas, y crecen gracias al depósito de nuevos materiales en su extremo, ramificándose con mucha frecuencia hasta producir una maraña de filamentos que constituyen el micelio. En una colonia de hongo filamentoso se produce una diferenciación en las funciones del micelio, de tal forma que el micelio vegetativo penetra en el sustrato para obtener los nutrientes, mientras que el micelio aéreo se proyecta hacia el exterior de la colonia y produce las estructuras reproductoras (Lurá de Calafell, et al, 1997).

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedero (Pontón et al, 2002).

3.2 El género *Aspergillus*

Aspergillus es un género de hongos filamentosos considerados ubicuos, pues sus esporas se dispersan con facilidad a través de los ecosistemas, por medio de las corrientes de aire. Los miembros de este género no presentan exigencias nutricionales por lo que son capaces de crecer en sustratos simples, siempre y cuando la humedad lo permita; es por esto es que se encuentran en casi cualquier parte del mundo, aunque tienen preferencia por climas cálidos y tropicales (Pradal, 2012).

El género *Aspergillus* tiene un impacto económico, tanto positivo como negativo en la industria, agricultura y la medicina. La mayoría de los miembros de este género son útiles para la degradación de polisacáridos de plantas para la obtención de nutrientes asimilables, lo que los hace causantes del deterioro de muchos alimentos, principalmente el maíz y el cacahuete (Moreno, 1988).

Aspergillus es muy buen candidato para la producción industrial de enzimas, al ser capaz de secretar un numeroso grupo de estas. Tal es el caso de pectinasas, xilanasas, amilasas, celulasas, entre otras enzimas (Pandey, et al, 2008).

Algunas especies son consideradas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (Pradal, 2012).

3.3 *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* son hongos filamentosos ubicuos y patógenos oportunistas capaces de causar aspergilosis en humanos, animales e insectos. *A. flavus* infecta cosechas agrícolas donde sobresalen: el maíz, el cacahuate y el algodón; y produce los metabolitos carcinógenos más tóxicos y potentes, como las aflatoxinas, entre otras micotoxinas (Yu Jiu Jian et al, 2005).

Estas dos especies del género *Aspergillus*, están estrechamente relacionadas, al corresponder ambas, a la sección Flavi (Horn, 2009).

A pesar de esto se pueden identificar de acuerdo a su secuencia de ADN (Barros et al, 2007). Estas dos especies también son fáciles de distinguir fenotípicamente, *A. parasiticus* produce aflatoxinas B₁, B₂, G₁ and G₂, mientras que *A. flavus* típicamente solo produce aflatoxinas B, y ácido ciclopiazónico, el cual no es producido por *A. parasiticus*.

A. flavus es el hongo patógeno de alimentos más ampliamente reportado, y es una de las especies dominantes en los alimentos almacenados, particularmente granos, ya que es capaz de crecer en ambientes con Aw bajo y su crecimiento no se ve afectado por el pH, sino que puede crecer en todo el intervalo de pH 2,1 a 11,2, aunque las tasas de crecimiento son más lentas a pH <3,5. La temperatura óptima de crecimiento es cercana a los 33°C, aunque puede crecer a temperaturas tan bajas como 10-12 °C y tan altas como 50-55 °C (Dobson, 2011).

3.4 Factores de virulencia de *Aspergillus*

Los factores de virulencia se definen como aquellas propiedades, generalmente moléculas, que permiten al hongo causar daño o enfermedad en quien lo hospeda.

El desarrollo o expresión de tales factores, comienza por estímulos externos a la célula fúngica. Esos estímulos activan cascadas de señalización que provocan compuestos protectores (enzimas, determinantes antigénicos, receptores), causantes a su vez del desarrollo de la patogénesis. Existe una compleja red de interacciones que incluyen la participación de muchas moléculas, tanto por parte del huésped como del hongo, que permiten la expresión de diversas vías (Urribarren, 2011).

3.4.1 Factores de virulencia no enzimáticos

Definir la virulencia en especies de *Aspergillus* es muy difícil dado a la naturaleza oportunista de estos patógenos.

Una característica asociada con la virulencia de *Aspergillus sp.* es su amplia distribución, atribuida a su eficaz mecanismo de dispersión, donde el viento es el más importante medio de diseminación (Camacho, 2008).

Otro factor que presenta *Aspergillus* es la adherencia que le confiere la capacidad de colonizar tejidos, esto por el contenido de ácido siálico en la superficie de los conidios. El ácido siálico está formado por derivados negativamente cargados del ácido neuramínico (Pasqualotto, 2010).

Además, como ya se mencionó con anterioridad, dentro del género *Aspergillus* se encuentran algunas especies que son capaces de producir potentes toxinas, como las aflatoxinas y el ácido ciclopiazónico, las cuales pueden causar sensibilidad del tejido o necrosis, hasta extrema inmunodeficiencia y producir efectos mutagénicos y carcinogénicos tanto en el hombre como en animales (Di Pietro & Roncero, 2005).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular y termoestables. Pueden ser producidas en alimentos como resultado del crecimiento del hongo; algunas requieren condiciones especiales de humedad y temperatura para su producción (Díaz, 1997).

3.4.1.2 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos secundarios que químicamente corresponden a derivados isocumarínicos, producidos por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, principalmente (FAO, 2013).

Las aflatoxinas más importantes y más estudiadas se han clasificado en los tipos: B₁, B₂, G₁ y G₂ según su fluorescencia de color azul o verde en presencia de luz ultravioleta a 365 nm. (Blue/ Green). Se considera a la aflatoxina B₁ como el más poderoso agente cancerígeno conocido, ya que en dosis muy pequeñas (15 µg/kg), produce hepatomas en ratas.

A continuación, se muestra la estructura química de algunas aflatoxinas:

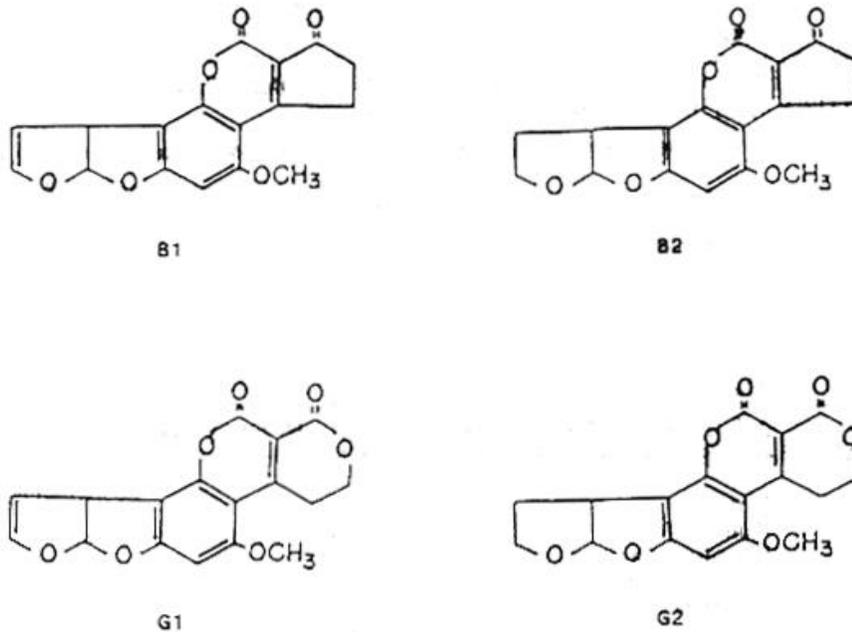


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas más representativas (FAO, 2013).

- Normatividad:

Según la Norma Oficial Mexicana: NOM-188-SSA1-2002: (Productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias) las aflatoxinas se definen como: metabolitos secundarios producidos por varios mohos, cuya estructura química es heterocíclica, pertenecientes al grupo de las bisfuranocumarinas. Poseen toxicidad aguda y crónica, así como efectos mutagénicos y carcinogénicos en animales y el hombre.

En los cereales no debe exceder de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas totales y en el caso de observarse concentraciones desde 21 y hasta 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el cereal únicamente podrá utilizarse para consumo animal, de acuerdo con la siguiente tabla, obtenida de dicha Norma Oficial Mexicana:

Especie/etapa de producción	Límite máximo µg/kg
Aves (excepto pollos de engorda)	100
Cerdos en engorda:	
Entre 25 y 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción de rumiantes:	100
De engorda en etapa de finalización:	300

Tabla 1. Apéndice normativo de la NOM-188-SSA1-2002. Límites máximos permitidos de aflatoxina en alimentos para consumo animal.

Según la norma mexicana NOM-247-SSA1-2008 (productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, semolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, semolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales), las aflatoxinas se definen como: metabolitos secundarios producidos por hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, que tienen efectos tóxicos y cancerígenos en animales, incluido el hombre.

La norma señala como límite máximo permitido, las cantidades siguientes:

Determinación	Límite máximo µg / kg
Aflatoxinas	20
Aflatoxinas para harina de maíz nixtamalizado	12

Tabla 2. Límite máximo permitido de aflatoxinas para alimentos en general y harina de maíz nixtamalizado. Fuente: NOM-247-SSA1-2008.

CODEX ALIMENTARIUS marca para la unión europea límites de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂) para nueces, frutos secos, cereales y especias. Los límites varían de acuerdo al producto, pero el rango va de 2-12 µg/kg para el tipo B₁ y de 4-15 µg/kg para aflatoxinas totales.

Para el caso de los alimentos para infantes, el límite es de 0.10 µg/kg para aflatoxina B₁ y 0.025 µg/kg para aflatoxina M₁.

En Estados Unidos de América, las normativas incluyen un límite de 20 µg/kg para aflatoxinas totales (B₁, B₂, G₁ y G₂). Límites más altos pueden aplicar en alimento para animales.

3.4.2 Factores de virulencia enzimáticos

Aspergillus sp. tiene la capacidad de producir enzimas tales como pectin-lisinas, celulasas, arabinasas, poligalacturonasas, entre otras polisacaridasas, que pueden alterar o degradar distintos polisacáridos presentes en las paredes celulares, así como proteasas y lipasas. Este complejo conjunto de enzimas constituye un importante factor de virulencia para *Aspergillus*, ya que le permite no solo penetrar el tejido del hospedero al mediar la maceración tisular y disgregación de la estructura de la pared, sino que es un mecanismo necesario para la obtención de nutrientes (Di Pietro & Roncero, 2005).

A pesar de ser un microorganismo patógeno, no tiene mucha acción sobre tejidos vivos y sanos, es decir, prefiere infestar granos con poca viabilidad. Este hongo tiene acceso a las semillas por vías secundarias como heridas, en el caso del maíz o agujeros hechos por larvas, en el caso de las cápsulas de algodón (Mellon, 2007).

El conjunto de enzimas amilolíticas es muy importante dentro de las hidrolasas de *A. flavus* por tener la habilidad de degradar la reserva de polisacáridos de las plantas y semillas (el almidón). En una investigación se encontró que durante la infección de este microorganismo en granos de maíz, la α -amilasa fue secretada produciendo azúcares de bajo peso molecular (glucosa, maltosa, maltotriosa) que a su vez, indujeron la biosíntesis de aflatoxina B1 (Woloshuk, et al, 1997).

Se sabe que un inhibidor de tripsina de 14kD es capaz de inhibir la acción de la α -amilasa, por lo que se ha propuesto como una estrategia de control ante la contaminación con aflatoxinas (Fakhoury & Woloshuk ,1999).

3.5 Almidón

El almidón es uno de los dos homopolisacáridos más importantes de los vegetales, además de la celulosa. Los almidones se presentan como reservas de carbohidratos para uso metabólico, para el embrión vegetal de las semillas, para la hibernación natural o para periodos de sequía (Smith, 1972).

El almidón está formado por una mezcla de amilosa y amilopectina. La amilosa es un polisacárido lineal perfecto, formado por unidades de α -D-glucosa con enlaces α -1,4, lo cual favorece la formación de estructuras helicoidales. La amilopectina posee una estructura compleja de cadenas ramificadas. En las cadenas principales, los monómeros de D-glucosa están unidos por enlaces α -1,4, y las ramificaciones se realizan mediante enlaces α -1,6, con un punto de ramificación de 15 a 30 unidades de glucosa (Herrera, 2003).

A continuación se muestra gráficamente la estructura de estos dos polisacáridos del almidón:

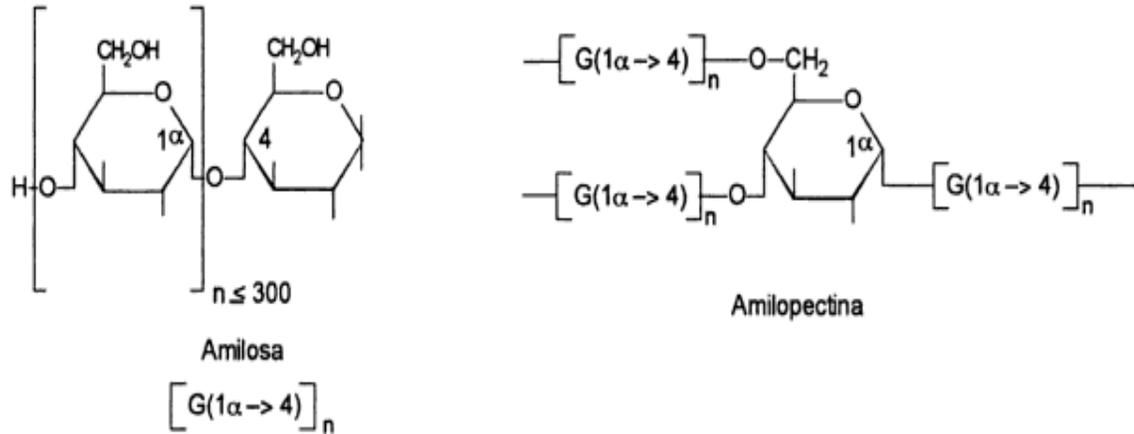


Figura 2. Estructura química de la amilosa y la amilopectina (Bolaños, 2003).

3.5.1 Gelatinización del almidón

Los gránulos de almidón son prácticamente insolubles en agua fría, pero a medida que se incrementa la temperatura cuando éstos se encuentran en una solución acuosa, se retiene agua y el gránulo empieza a hincharse aumentando de volumen. Cuando se alcanza una determinada temperatura, el gránulo alcanza su volumen máximo, si se administra más calor, el gránulo hinchado incapacitado para retener el líquido se rompe parcialmente, así la amilosa y la amilopectina se dispersan en el seno de la disolución. La gelatinización transforma los gránulos de almidón insolubles en una solución de las moléculas constituyentes en forma individual (Cruz, 2012).

A medida que aumenta el volumen de los gránulos, aumenta la viscosidad de la dispersión acuosa. Cuando los gránulos se rompen, la viscosidad se reduce hasta un valor estable en el que se produce un gel cuyas características físicas y químicas son diferentes en cada almidón. La temperatura de gelatinización es aquella en la cual se alcanza el máximo de viscosidad y se pierden la birrefringencia (índice de refracción de los gránulos) y el patrón de difracción de rayos X. Esta temperatura es realmente un intervalo, porque así los gránulos provengan de la misma fuente botánica, tienen diferente composición y organización, lo que origina que unos sean más resistentes que otros (Cruz, 2012).

La gelatinización del almidón es sumamente importante, pues se convierte en una fuente de carbohidratos fácilmente atacada por las amilasas (Slaughter, et al, 2001).

3.6 Enzimas: Constitutivas e Inducibles.

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que aumentan la velocidad de una reacción química y no son consumidas durante la reacción catalizada. Cada enzima tiene un sitio de activación específico por el cual se une con el sustrato para dar lugar al producto (Harvey, et al, 2011).

Las enzimas proporcionan una ruta de reacción alternativa con una energía de activación menor, sin cambiar la energía libre de sustratos o productos, por lo que tampoco altera el equilibrio de la reacción (McGilvery ,1977).

En el caso de los hongos filamentosos, hay enzimas que se necesitan durante todas las condiciones de crecimiento, estas enzimas se denominan constitutivas (González, 2009). Están presentes en la célula a concentraciones fijas, con independencia de los cambios producidos en el ambiente celular (Evans, 2008).

Las enzimas constitutivas son generalmente enzimas celulares clave requeridas para el crecimiento bajo todas las condiciones nutricionales y por tanto, se sintetizan continuamente en la célula en crecimiento, por otra parte, las enzimas inducibles son aquellas que se sintetizan solo cuando el sustrato requerido se encuentra presente en el medio de cultivo como única fuente de carbono; dicha sustancia se conoce como Inductor (Madigan, 2004).

Las enzimas inducibles se producen para que el hongo pueda tener acceso a energía y nutrientes; como ejemplo, la adición de celulosa estimula la actividad de celulasa en suelos húmedos (Shackle et al, 2000) lo que significa que la producción enzimática puede ser una respuesta inducible a la presencia de sustratos complejos. Sin embargo, los microorganismos solo pueden producir estas enzimas a expensas del crecimiento y metabolismo si la disponibilidad de nutrientes fácilmente asimilables es escasa (Asmar et al, 1994).

Basada en la teoría económica de los microorganismos, propuesta por Robert Koch en 1885, la producción enzimática puede ser inducida solo cuando ésta permita aumentar el grado de adquisición de recursos disponibles en el medio de crecimiento.

En el caso de la inducción de amilasas fúngicas, se requiere de un sustrato que contenga enlaces glucosídicos α -1,4, como por ejemplo: maltosa, dextrinas y almidón. La glucosa, como producto final de la hidrólisis, reprime la síntesis enzimática por represión catabólica, la cual se lleva a cabo bajo la acción del Gen Regulador CreA (Bhella & Altosaar, 1987).

Se ha reportado que factores como la composición del medio de cultivo, la concentración inicial del polisacárido, las condiciones de cultivo (T, pH, vel. de agitación) y el microorganismo en sí pueden controlar el mecanismo de regulación enzimática (Schmidell, 1988).

En un estudio se observó que la actividad de la glucoamilasa *de Aspergillus awamori* disminuyó cuando la concentración del substrato se incrementó a 2%. Además de la fuente de carbono, se ha sugerido que la fuente de nitrógeno tiene influencia sobre la producción y la actividad de las enzimas amilolíticas (Facciotti, 1989).

3.7 Enzimas degradadoras de pared celular

Los polisacáridos de la pared celular de plantas son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Se pueden agrupar en 3 grandes grupos que son: celulosa, hemicelulosa y pectina (DeVries & Visser, 2001).

A. flavus produce numerosas enzimas hidrolíticas: α -amilasas, pectinasas, proteasas y lipasas. Estas enzimas presuntamente sirven para la degradación polimérica y la captura de nutrientes, sin embargo la regulación de secreción de estas enzimas es complejo y sustrato-dependiente. Estas enzimas también juegan un papel importante en la defensa del hongo y actúan como factores de virulencia. Como ejemplo, en algunas especies, la producción de α -amilasa es crítica para la degradación del almidón y puede jugar un papel crítico en la inducción de la biosíntesis de aflatoxinas (Mellon, et al, 2007).

3.8 Enzimas degradadoras del almidón

Las amilasas son uno de los sistemas enzimáticos industriales más importantes y más antiguos. Estos comprenden hidrolasas que escinden moléculas de almidón a otras más finas como dextrinas, y polímeros progresivamente más pequeños, formados de unidades de glucosa (Gupta, 2003).

Esta familia de enzimas hidrolíticas está compuesta por proteínas catalíticas: α -amilasa, β -amilasa; glucoamilasa; isoamilasa ó pululanasa (Ashger, 2003); las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos vegetales, donde juegan un rol muy importante en la degradación del almidón en la germinación de las semillas; en tejidos animales, cumpliendo una misión digestiva; y en diversas especies de microorganismos como hongos y bacterias (Pavalli, 2007).

En el caso particular de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, las amilasas son indispensables para la digestión del almidón, y se ha observado que los azúcares de bajo peso molecular como: glucosa, maltosa y maltotriosa, productos del ataque amilolítico, inducen la biosíntesis de aflatoxinas (Mellon & Cotty, 2007).

Existen varios tipos de amilasas, los cuales se describen a continuación:

3.8.1 Alfa-amilasas

Son el conjunto más abundante e hidrolizan el enlace α -1,4 dentro de la molécula de almidón, por eso se conocen también como endo-amilasas (Gupta, 2003). Su nombre sistemático corresponde a E.C.3.2.1.1.

La hidrólisis de las α -amilasas, produce polímeros de menor tamaño llamados dextrinas. Este fenómeno provoca un rápido descenso en la viscosidad llamado licuefacción.

La enzima α -amilasa degrada la amilosa en maltosa y pequeños compuestos de glucosa. Sin embargo, esta enzima solo es capaz de degradar parcialmente la amilopectina y el glucógeno debido a que no es capaz de desdoblar los enlaces glicosídicos α -1,6 encontrados en los puntos de ramificación de la cadena del polisacárido (Kimura, 1995).

La inducción de la enzima α -amilasa requiere un sustrato que contenga enlaces α -1,4 glucosídicos, además de maltosa, dextrina y almidón. La Glucosa, así como es el producto final de la hidrólisis, tiene la posibilidad de reprimir la síntesis de enzima como un mecanismo conocido como represión catabólica (Carrillo, 2003).

3.8.2 Beta amilasas

Se le conoce con el nombre de enzima sacarogénica, pues actúa sobre la amilosa, rompiendo enlaces α -1,4 glucosídicos pero comienza su acción por el extremo libre no reductor del almidón, liberando maltosa al igual que la enzima α -amilasa.

Sobre la amilopectina actúa en las uniones α -1,4 de la cadena recta, y detiene su acción a distancia de 2 unidades de glucosa antes de atacar las uniones α -1,6. Se trata de una exo-amilasa, ya que actúa sobre el terminal de la molécula; mientras la amilosa es transformada totalmente en maltosa, la cadena ramificada de la amilopectina se conserva en un 40-45% sin hidrolizar (Bernfeld, 1955).

La enzima β -amilasa es reconocida como 1,4- α -D-glucan maltohidrolasa y su nombre sistemático corresponde al de E.C. 3.2.1.2. Su función es actuar en la reacción de hidrólisis de los enlaces α -1,4-glucosídicos del almidón con inversión en la configuración del carbono 1 pasándolo de la configuración α a la β ; así como de remover las unidades de maltosa continuas presentes en los terminales no-reductores de la cadena polisacárida. Los grupos sulfihidrilo son esenciales para la actividad, por lo que la enzima se inactiva por oxidación, por los metales pesados y sus sales. Su producto es β -maltosa (Oliveira et al, 2005).

La β -amilasa ha sido descrita como una proteína abundante la cual se puede encontrar en grandes cantidades tanto en tejidos de almacenamiento de almidón y órganos de plantas.

La α y β -amilasas pueden ser distinguidas una de otra, mediante el punto de inactivación que presentan a un pH determinado. La enzima α -amilasa es inactivada a un pH en el rango de 4.8 - 5.0. Mientras que a este mismo rango la β -amilasa es estable. La enzima E.C. 3.2.1.2., es inactivada en un pH alrededor de 6.0-7.0, y en caso recíproco, las α -amilasas son estables bajo estas condiciones (Olusanjo, et al, 2006).

3.8.3 Glucoamilasas

Son aquellas que liberan unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores del sustrato, que generalmente son dextrinas. Su función es actuar en la reacción de hidrólisis en cadenas de polisacáridos operando en los enlaces α -1,4-D-glucosa que están de manera residual después de haberse expuesto la cadena a la acción de α y β amilasa (Kimura, 2005).

El principal producto final de la acción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa, lo que la diferencia claramente de las α y β -amilasas. Esta enzima también produce pequeñas cantidades de oligosacáridos.

Esta enzima también es reconocida como amiloglucosidasa. En la nomenclatura internacional está identificada como α -1,4 D-glucano glucohidrolasa y su nombre sistemático E.C.3.2.1.3.

La sacarificación del almidón puede alcanzar hasta 96% de dextrosa. La acción de la enzima causa inversión de la configuración, produciendo β -glucosa. Las glucoamilasas son inactivas sobre almidón nativo. Su actividad es máxima entre pH 4 y 5.5, y temperatura alrededor de 55-65°C. La velocidad de reacción cae rápidamente a medida que disminuye el tamaño de la molécula de sustrato, siendo máxima sobre almidones previamente sometidos a licuefacción (Carrera, 2003).

3.8.4 Isoamilasa

La enzima isoamilasa hidroliza los enlaces α -1,6 glucosídicos quitando las ramas de la amilopectina o las dextrinas, por lo que se le conoce como enzima desramificadora. Si existe un acompañamiento general del complejo de las amilasas se puede lograr efectiva una degradación total del almidón (Durango, et al, 2008).

La enzima isoamilasa, reconocida oficialmente como glucógeno α -1,6-glucoanohidrolasa. Su nombre sistemático es E.C. 3.2.1.68. Actúa directamente sobre la amilopectina, glucógeno y dextrinas, pero es incapaz de hidrolizar las α -dextrinas límite. Su único producto de reacción es maltosa y su temperatura óptima está alrededor de 45 °C y el pH entre 4 y 5 (Schuster et al, 1972).

3.9 Características de las amilasas de *A. flavus*

A continuación se presentan algunas de las características de las amilasas de *Aspergillus flavus*, registradas en la base de datos: CADRE-Genomes, con la intención de comparar los pesos moleculares de las amilasas obtenidas experimentalmente en el gel de electroforesis SDS-PAGE, con las reportadas en la literatura.

Tabla 3. Características de las amilasas de *A. flavus*, reportadas en base de datos CADRE-genomes.

Nombre de la enzima	Peso promedio del residuo	carga	Punto isoeléctrico	Peso molecular	Número de residuos
1) α -Amilasa putativa AFLA_084340A (CADAFLAT00001213)	113.531	10.5	8.194	56,084.55	494
2) α -Amilasa putativa : AFLA_023480A (CADAFLAT00001724)	110.075	-9.5	5.052	60,431.30	549
3) α -Amilasa putativa AFLA_023490A (CADAFLAT00001725)	113.674	0.5	6.5669	60,588.04	533
4) α -Amilasa putativa : AFLA_026140 (CADAFLAG00001989)	109.826	-18.5	4.3563	54,803.10	499
5) Amilasa putativa AFLA_092490 (CADAFLAG00008934)	114.584	-17.5	4.4613	43,312.71	378
6) Amilasa putativa AFLA_123170 (CADAFLAG00009376)	114.421	-17.5	4.7370	66,592.84	582
7) α -Amilasa putativa AFLA_008520A (CADAFLAT00012963)	115.184	-7.0	5.8922	68,994.95	599

3.10 Sustratos complejos

3.10.1 Maíz (*Zea mays*)

La planta del maíz proviene de la subfamilia *Panicoideae*, dentro de las gramíneas. Es de porte robusto, de fácil desarrollo y producción anual; es de inflorescencia monoica, el tallo es erecto, de elevada longitud (puede alcanzar 4 metros de altura), es robusto y sin ramificaciones, las hojas son largas de gran tamaño, lanceoladas, alternas, paralelinervias; se encuentran abrazadas al tallo y por el haz presentan vellosidades, las hojas son afiladas y cortantes.

El maíz requiere una temperatura de 25° a 30°C, así como bastante incidencia de luz solar. Para alcanzar la germinación de la semilla, la temperatura debe oscilar entre 15° y 20°C. Es un cultivo exigente en agua (5 mm al día); sus necesidades hídricas van variando a lo largo del cultivo. Se adapta muy bien a todos los tipos de suelo pero suelos con pH de 6 a 7 son a los que mejor se adapta (Centro Agrónomo Tropical de Investigación y enseñanza, CATIE, 1990).

El maíz es el segundo cereal más importante y más consumido en el mundo, después del trigo (Mateo, 2005). Se utiliza principalmente para la elaboración de productos alimenticios tradicionales como las tortillas y tamales, pero también se utiliza para la obtención de aceite o en la fabricación de barnices, pinturas, cauchos artificiales, jabones y en la producción de almidones.

Las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, aún se utilizan hoy en día como forraje de calidad relativamente buena para alimentar a los rumiantes de muchos pequeños agricultores de los países en desarrollo. Los tallos erectos, que en algunas variedades son resistentes, se utilizan para construir cercas y muros duraderos.

El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas. En la primera, o fase vegetativa, se desarrollan y diferencian distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. La fase vegetativa consta de dos ciclos. En el primero se forman las primeras hojas y el desarrollo es ascendente; en este ciclo, la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción. En el segundo ciclo se desarrollan las hojas y los órganos de reproducción; este ciclo acaba con la emisión de los estigmas (Financiera Rural Mexicana, 2008).

La segunda fase, también llamada fase de reproducción, se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos. La etapa inicial de esta fase se caracteriza por el incremento de peso de las hojas y otras partes de la flor; durante la segunda etapa, el peso de los granos aumenta con rapidez (Tanaka & Yamaguchi, 1972).

3.10.1.1 Estructura del grano de maíz:

En la composición química del maíz influyen factores genéticos y ambientales. Su composición también depende de la parte a considerar; el pericarpio se caracteriza por su elevado contenido en fibra, constituida fundamentalmente por hemicelulosa, celulosa y lignina. El endospermo en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (88%), proteína (8%) y un contenido bajo de grasa; por último el germen se caracteriza por el alto contenido en grasa (33%) proteína (18.5%) y minerales (10.5%).

El componente principal del grano de maíz es el almidón, al que corresponde el 72-73% del peso del grano. También cuenta con azúcares sencillos como glucosa, sacarosa y fructosa, en cantidades que varían del 1 al 3% (Gil, 2010). El color de cada maíz es conferido por un grupo de pigmentos hidrosolubles llamados antocianinas.

Los granos de maíz se desarrollan mediante la acumulación de los productos de la fotosíntesis, la absorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta de maíz en la inflorescencia femenina denominada espiga (FAO, 2013).

El grano de maíz se denomina en botánica cariósida o cariopsis desnuda. En la figura 3 se muestran las tres estructuras físicas fundamentales del grano: el pericarpio, el endospermo y el germen o embrión.

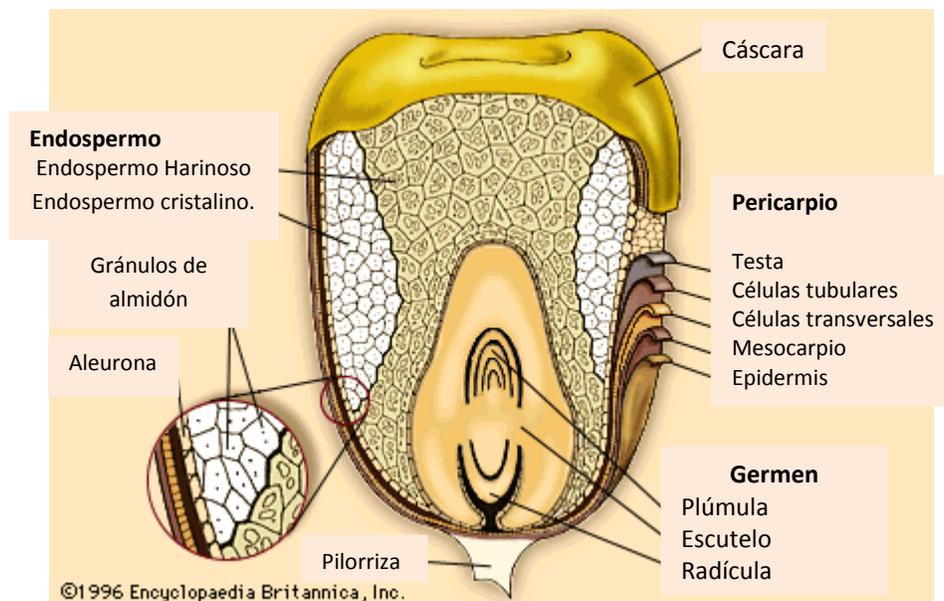


Figura 3. Morfología del grano de maíz (Taylor, 2004).

a) Pericarpio: Constituye la parte externa del grano. Representa el 5-6% del total del peso del grano. Está dividido en cuatro capas delgadas:

- Epicarpio: capa externa que cubre el grano.
- Mesocarpio: Capas constituidas por pocas células siendo la capa externa la más gruesa similar al epicarpio, mientras que las células de las capas internas son planas, de paredes delgadas.

- Células cruzadas: son capas de células de paredes delgadas, con muchos espacios intercelulares.

- Células tubulares: son capas de células largas paralelas, sin ramificaciones.

b) Endospermo: Representa alrededor del 80% del total del peso del grano. Está compuesto por tres tipos de células:

- Capa de aleurona: de una sola célula, contiene proteínas, aceite, vitaminas y minerales.

- Endospermo córneo: formado por células alargadas de forma irregular.

- Endospermo harinoso: se localiza en la parte central del grano; está constituido por células grandes en relación a otras células que componen el endospermo.

c) Embrión: representa entre el 8% y el 12% del peso del grano. Está conformado por:

- Escutelo: órgano encargado de la alimentación del embrión en el momento de su germinación.

- Eje embrionario: conformado por una plúmula, que posee de 5 a 6 hojas y una radícula (J.E. Ospina, 2002).

3.10.2 Limón (*Citrus limonum*)

El limón es un fruto cítrico que pertenece a la familia de las Rutáceas. El fruto denominado hesperidio, tiene la particularidad de que su endocarpio está formado por numerosas vesículas llenas de jugo. Su forma es ovalada o elíptica según la variedad (Gil, 2010).

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 extracción 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).

La cáscara de limón y en general la de todas las frutas cítricas, está conformada por dos regiones: el flavedo y el albedo. El flavedo es una capa conformada por aceites y pigmentos característicos mientras que el albedo es la parte blanca que está en contacto con el fruto (Petracek, 1996). El albedo se prolonga hasta el interior de la fruta, forman los gajos en las frutas cítricas (León, 2000).

La capa externa del flavedo se conoce como cutícula. La cutícula es una capa de polímero que juega un papel importante en el crecimiento y almacenamiento de los cítricos. Antes de la aplicación industrial de ceras, la cutícula sirve como barrera primaria entre la fruta y el medio ambiente. Consecuentemente la cutícula determina la tasa de intercambio de gases y metabolitos respiratorios como oxígeno y dióxido de carbono, etileno y compuestos volátiles que dan sabor como alcoholes y aldehídos. La cutícula también actúa como barrera para insectos y microorganismos que están preparados para consumir los frutos desprotegidos. Esta capa es esencialmente una matriz de poliésteres polimerizados (ceras) a partir de ácidos grasos hidroxilados, como por ejemplo el ácido 10,16-dihidroxihexadecanóico. También se pueden encontrar triterpenoides como esqualeno y friedelina (Cutler, 1982).

En general, los componentes principales de la cáscara de limón, se pueden dividir por su solubilidad en alcohol; los componentes solubles son mono y disacáridos, aceites esenciales y ceras, así como los insolubles: celulosa, lignina, pectina y hemicelulosa –componentes principales de la pared celular (Soriano, 2006).

La composición proximal de la cáscara de limón es 81.6% de humedad, 1.5% de proteína, 0.3% de grasa, 16% 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).

Capítulo 4. Materiales y Métodos

4.0 Materia prima

Se utilizó como sustrato para las fermentaciones: Maíz criollo (blanco, rojo, azul y pozolero) proveniente de sembradíos de la delegación Milpa Alta, México-Distrito Federal. A su vez, se utilizó maíz palomero comercial, harina de trigo (3 Estrellas) y harina de maíz (MASECA). También se usó la cáscara de limones obtenidos en la Ciudad de México y como sustratos simples: glucosa, maltosa y sacarosa (Sigma-Aldrich).

4.1 Microorganismos

Se utilizaron dos cepas *Aspergillus flavus* CECT-2687, la cual es una cepa productora de toxinas y NRRL-6541, que es no toxigénica. También se utilizó *Aspergillus parasiticus* NRRL-502, cepa toxigénica.

4.2 Recuperación y mantenimiento de las cepas

Se partió de una caja de Petri sembrada con cada una de las cepas a utilizar, las cuales se encontraban bien identificadas. De estas caja, se tomó una asada con un asa micológica estéril, se sembró por picadura en cajas con agar Sabouraud y se extendió el inóculo con un asa de Drigalski estéril. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C por 72 horas, posteriormente se almacenaron a 4°C.

4.3 Cosecha de esporas

Se adicionaron 10 mL de solución salina isotónica (0.9% p/v) con tween 80 (0.005% p/v) estéril a una placa sembrada, se raspó suavemente con un asa de Drigalski estéril, con el objetivo de obtener las esporas. Este volumen se transfirió con una pipeta a un tubo falcon con tapa.

Para lavar las esporas, se centrifugó la suspensión a 5000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante, se resuspendieron las esporas nuevamente utilizando solución salina estéril y se repitió el proceso de lavado 3 veces.

4.4 Conteo de esporas por medio de conteo directo en la cámara de NeuBauer

Para determinar la concentración de esporas en la suspensión final, se utilizó el método directo de la cámara de NeuBauer, para lo cual 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 mayor representatividad, se realizó el conteo en dos cuadrantes, y se determinó el promedio para finalmente obtener la concentración. Ejemplo de cálculo:

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

4.5 Cultivo en medio líquido con fuentes ricas en almidón

Para el cultivo se utilizaron 100mL de Medio Mínimo (0.6% p/v de NaNO₃, 0.15% p/v de KH₂PO₄, 0.05% p/v de KCl, 0.05% p/v de MgSO₄·7H₂O; pH=5) y Medio Basal (KH₂PO₄ 0.2% p/v, K₂HPO₄ 0.2% p/v y (NH₄)₂SO₄ 0.5% p/v), y se añadieron 1% ó 3% de fuente de carbono, utilizando sustratos ricos en almidón como los maíces rojo, azul, blanco, palomero, pozolero y se utilizaron como controles: harina de maíz, harina de trigo y almidón comercial, así como cáscara de limón, glucosa, maltosa y sacarosa.

El caldo se dejó en agitación por una hora y después se ajustó el pH a 5 u 8; posteriormente se esterilizó en el autoclave por 20 min a 15 lb de presión y 121°C. Se inoculó el medio con 1×10^6 esporas/mL de *A. flavus* CECT-2687, *A. flavus* NRRL-6541 y *A. parasiticus* NRRL-502. Los matraces se incubaron a 37°C por un máximo de 72 horas, a 300 rpm. Se tomaron muestras de aproximadamente 5 mL en condiciones de esterilidad para realizar pruebas posteriores. A estas muestras se les separó la biomasa por filtrado en equipo Millipore.

4.6 Determinación de actividad enzimática (actividad amilolítica)

Como sustrato se utilizó una solución de almidón PROLABO al 1% (gelatinizado) en solución amortiguadora de acetatos pH 5, 100 mM. A todos los tubos de ensayo, se les agregó 1 mL de sol de almidón, y posteriormente se les adicionó 0.1 mL de filtrado enzimático. Los tubos se incubaron a 40°C por una hora. Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción adicionando 0.1 ml de HCl 1M. Posteriormente se tomó 0.1 ml de los primeros tubos y se adicionó a tubos de ensayo con 2.4 mL de lugol. Se determinó la absorbancia de las muestras a $\lambda = 620$ nm en el espectrofotómetro, restando los blancos para cada muestra.

4.7 Concentración de filtrados enzimáticos por liofilización

Se tomaron 3mL de los filtrados finales de las fermentaciones, los cuales fueron congelados y liofilizados en tubos Falcon de 15mL a 36×10^{-3} mbar y -49°C por 24 horas. Las muestras fueron resuspendidas en 50 μ L de buffer de tanque (0.025 M TRIZMA-BASE, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3) 1X.

4.8 Determinación de proteína por el método de Bradford

El sistema de reacción consistió de 90 μ L de H₂O desionizada, 10 μ L de filtrado enzimático libre de células y 200 μ L de reactivo de Bradford, a temperatura ambiente, durante 5 min. Se lee a una $\lambda = 595$ nm en el espectrofotómetro. Como referencia se utilizó una curva de albumina sérica bovina.

4.9 Análisis Electroforético (SDS- PAGE) y zimograma

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida-SDS. El gel separador contiene acrilamida al 12% y bis-acrilamida al 2.7% (Bio-Rad Laboratories). Las muestras utilizadas fueron concentradas mediante liofilización y resuspendidas en el volumen mínimo posible de buffer de tanque (0.025 M TRIZMA-BASE, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3) 1X y se adicionó buffer de tratamiento desnaturizante (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, buffer Tris-HCl 125 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol 0.05%).

Se tomaron 5 μ L de muestra con 5 μ L de buffer de corrimiento, y al final se cargaron los pozos con 10 μ L por carril, se llevó a cabo a corriente constante 15mA, a través de una unidad de geles verticales de 1.5mm Mighty Small SE-245 (HoeferSci. Ins. USA). Después de este tiempo los geles fueron teñidos con una solución que contiene azul de Coomassie R-250 al 0.125%, metanol al 50% y ácido acético al 10% durante dos horas con ligera agitación y se destiñeron con una solución de ácido acético al 10% v/v.

Para el caso del zimograma, después de correr el gel, se dejó remojando en buffer renaturalizante durante 1.5 horas, transcurrido este tiempo, se dejó incubando en una solución de almidón PROLABO al 1% (gelatinizado) a temperatura ambiente por 1 hora. Trascurrido este tiempo, se reveló el gel con una solución de Lugol 1:10 y el resultado se registró fotográficamente.

Capítulo 5. Resultados

Parte I

Selección de la fuente de nitrógeno para crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT-2687 y evaluación de su producción enzimática.

Con el fin de evaluar la mejor fuente de nitrógeno en las fermentaciones líquidas, para el crecimiento de *Aspergillus flavus* y su posterior producción de amilasas, se probaron tres variantes de fuente de nitrógeno: NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y sin fuente de nitrógeno añadida (fermentación control).

Estos experimentos se llevaron a cabo, partiendo de que la fuente de nitrógeno utilizada en la fermentación, tiene una fuerte influencia sobre el pH de la misma, lo que influye directamente en la biosíntesis enzimática (Fang, 2002).

Mahmoud (1993) obtuvo la mayor producción de amilasas con *A. flavus* y *A. fumigatus* utilizando glicina y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno, mientras que Kundu, Das, y Grupta (1973) reportaron NaNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como las mejores fuentes de nitrógeno, para la producción amilolítica por *A. oryzae* en medio preparado con desechos de mejillones (Torrado, et al, 1998).

Las fuentes orgánicas de nitrógeno, promueven la actividad proteolítica (como se muestra en la tabla siguiente) por lo que no se utilizaron para los siguientes experimentos.

Fuentes de Nitrógeno 0.21 g N/L	Actividad Amilolítica (U/ml)	Actividad proteolítica (U/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄	60	6.0
Extracto de levadura	81.2	14.1
Caseína	19.7	12.1
Aminoácidos	89.8	11.6
Peptona	89.9	13.1
Alanina	40.9	5.9
NaNO ₃	61.2	5.6
NH ₄ NO ₃	80.0	5.3

Tabla 4. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de amilasas y proteasas por *A. niger* UO-1, (Salas et al, 2005).

A continuación se muestra el comportamiento del pH durante las fermentaciones (muestreo cada 24h durante 3 días).

Comportamiento del pH a lo largo de las fermentaciones

a) Fermentación con NaNO₃

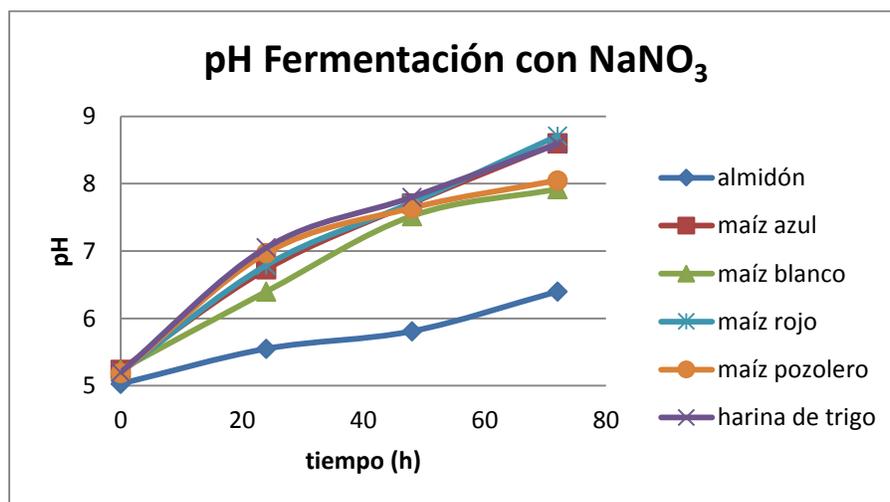


Figura 4. Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación con *Aspergillus flavus* CECT-2687, utilizando como fuente de nitrógeno: nitrato de sodio.

El pH del maíz azul, blanco, rojo, y pozolero, así como el del control (harina de trigo) subieron a lo largo de la fermentación, a diferencia del control de almidón, el cual no tiene una pendiente tan pronunciada. Esto se debe a que el almidón, a diferencia de los maíces y la harina de trigo, no contiene otros componentes como las proteínas. Sin embargo, si hubo crecimiento microbiano aunque su evolución fue más lenta que en los demás casos. La producción de amilasas se analizará más adelante.

b) Fermentación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

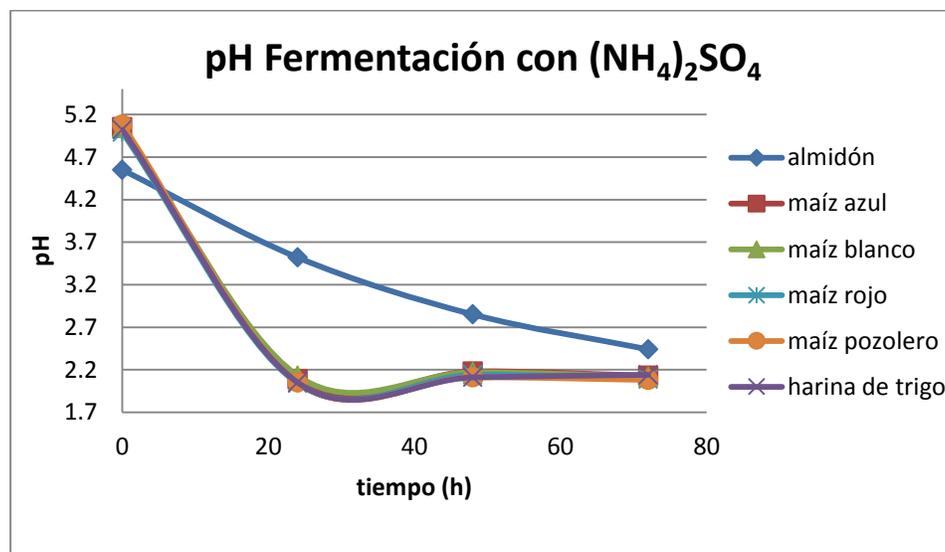


Figura 5. Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación con *A. flavus* CECT-2687, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno.

Los comportamientos para todos los sustratos fueron muy parecidos, a excepción del almidón. El pH del almidón descendió constantemente y de manera menos drástica que en el caso de los otros sustratos donde hubo un descenso muy notable entre las 0 y 24 h, y a partir de este tiempo permaneció prácticamente constante. Esto puede deberse al contenido de N intrínseco de cada sustrato, pues los maíces poseen cierto porcentaje de proteína (18.5% según FAO, 2013).

Por otra parte, al comparar los valores de pH de la figuras 1 y 2, puede notarse que en la figura 1 el pH asciende mientras que en la figura 2 el pH desciende hasta valores aproximados de 2. Estos son valores muy bajos para producción enzimática.

c) Fermentación sin fuente de nitrógeno

Para observar la influencia de la cantidad de nitrógeno contenido en los maíces, se realizó una fermentación donde no se añadió fuente de nitrógeno. El comportamiento del pH se observa a continuación.

Cabe mencionar que se decidió muestrear cada 12 horas, ya que los máximos de producción de actividad amilolítica se encuentran entre las 24 y 36 h de fermentación y en tiempos más largos la actividad tiende a disminuir rápidamente.

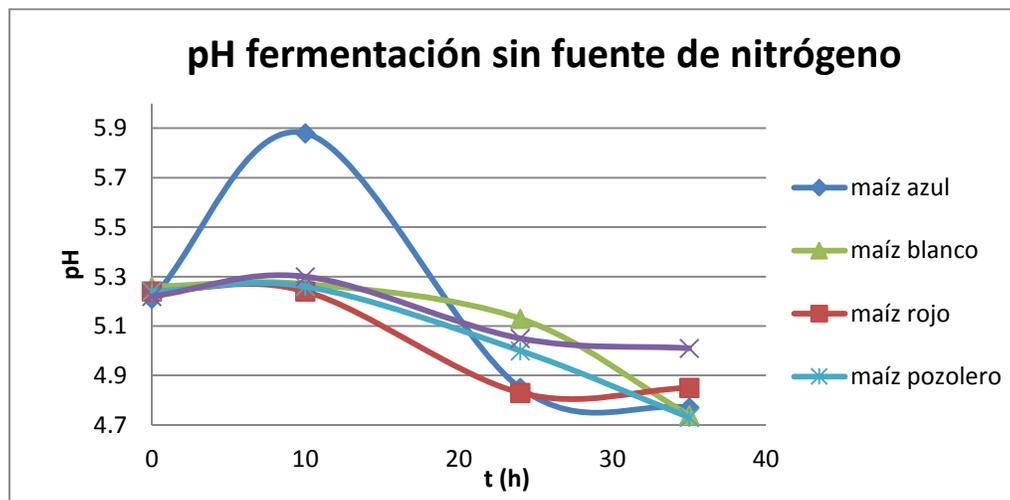


Figura 6. Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación con *A. flavus* CECT-2687, sin fuente de nitrógeno.

A diferencia de las fermentaciones donde se utilizó fuente de nitrógeno (amonio o nitrato), en este caso los valores de pH descendieron levemente. Solo el maíz azul tuvo un pico a las 10h, esto puede deberse a que el contenido intrínseco de nitrógeno, de este maíz en particular, es más alto que los otros; sin embargo este dato no se conoce pues el contenido de nitrógeno en los diferentes tipos de maíz, no fue determinado.

Al observar las figuras 4 ,5 y 6, se comprueba una vez más que la fuente de nitrógeno tiene importante influencia sobre valores de pH a lo largo de la fermentación.

Como ejemplo de la influencia de la fuente de nitrógeno y el pH a lo largo de la fermentación, se tiene a la producción de celulasas por *A. fumigatus* (Stewart, 1981). Durante el crecimiento en celulosa con amonio como fuente de nitrógeno, las especies acidificaron el medio, lo que resultó en una alta producción de celulasa, comparada con cultivos donde se utilizó nitrato como fuente de nitrógeno. (DeVries & Visser, 2001).

Después de realizar estos experimentos se decidió continuar usando el medio con NaNO_3 para la producción de amilasas, ya que con el medio que contiene sulfato de amonio se acidifica demasiado el pH y eso no es óptimo para la producción enzimática. Además de fijar la fuente de nitrógeno, también se agregó otra fuente de almidón para su comparación, esta fue harina de maíz.

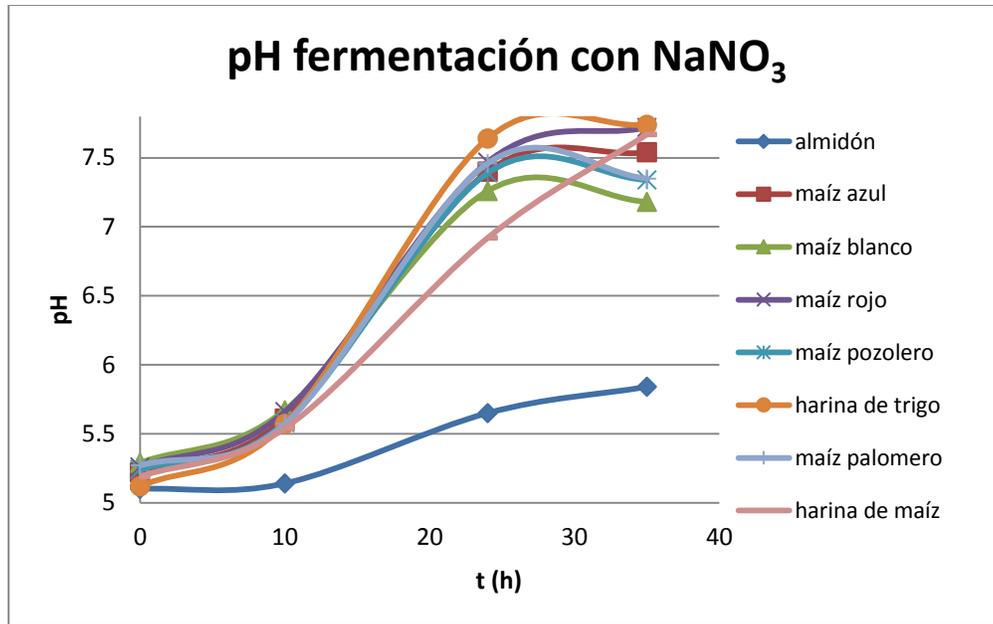


Figura 7. Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación, con *A. flavus* CECT-2687, utilizando NaNO_3 . Muestreo cada 12 h.

Al comparar con la figura 1, se puede ver que el comportamiento fue igual, para todos los sustratos los valores de pH subieron, siendo el almidón el menos pronunciado. Cabe mencionar que visualmente, el crecimiento del hongo en almidón fue mucho menor que en los casos de maíces y harinas.

Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad amilolítica.

a) Fermentación con NaNO_3

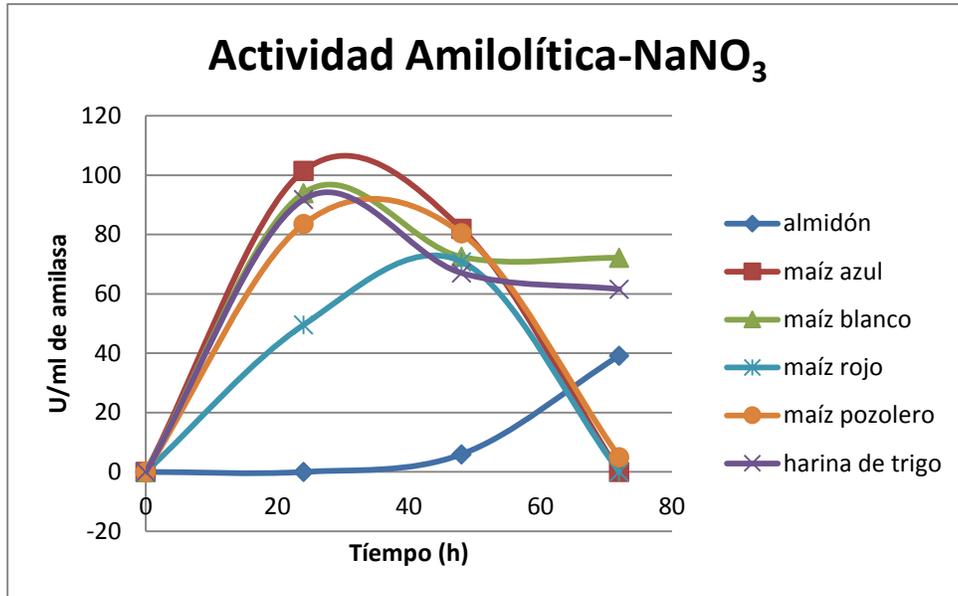


Figura 8. Comportamiento de la actividad amilolítica a lo largo de la fermentación con *A. flavus* CECT- 2687, utilizando NaNO_3 . Muestreo cada 24 h.

Aquí se puede observar y comprobar que la actividad amilolítica es totalmente dependiente del pH, en el caso del almidón, que fue el único caso donde el pH no se elevó pronunciadamente, tampoco encontramos actividad significativa de amilasas, de hecho, es la actividad más baja reportada.

También es notable que la actividad más alta se registró a las 24h, y a partir de ahí disminuyó drásticamente en el caso del maíz azul, rojo y pozolero, y en el caso de la harina de trigo y el maíz blanco, la actividad se mantuvo prácticamente constante después de las 48h.

Al comparar los resultados obtenidos, se puede intuir que el pH óptimo para la producción de amilasas por *Aspergillus flavus*, bajo las condiciones dadas de fermentación, va en un rango de 6.5 a 8. (pH correspondiente a los tiempos de 24 y 48 h donde se observó la mayor actividad).

La bibliografía apunta que el pH óptimo para la producción de amilasas es de 7, para *Aspergillus sp.* en general (Alhasan, 1992)

Al saber que las actividades más altas se dan entre las 24 y 48 horas, se decidió realizar otra fermentación bajo las mismas condiciones, pero muestreando cada 12 horas, hasta 36 horas.

La baja en la actividad, después de las 24 horas, se atribuye a que la actividad amilolítica está regulada por el suministro de carbohidratos, y después de este tiempo pudo haber represión catabólica por la glucosa liberada de la hidrólisis del almidón como es el caso de un estudio de producción de amilasas por *A. ochraceus*, donde la actividad amilolítica máxima se dio a las 24h, con un posterior decremento en la cantidad de este sistema enzimático (de 60 U/ml a 10 U/ml aproximadamente) (Nahas, 2002).

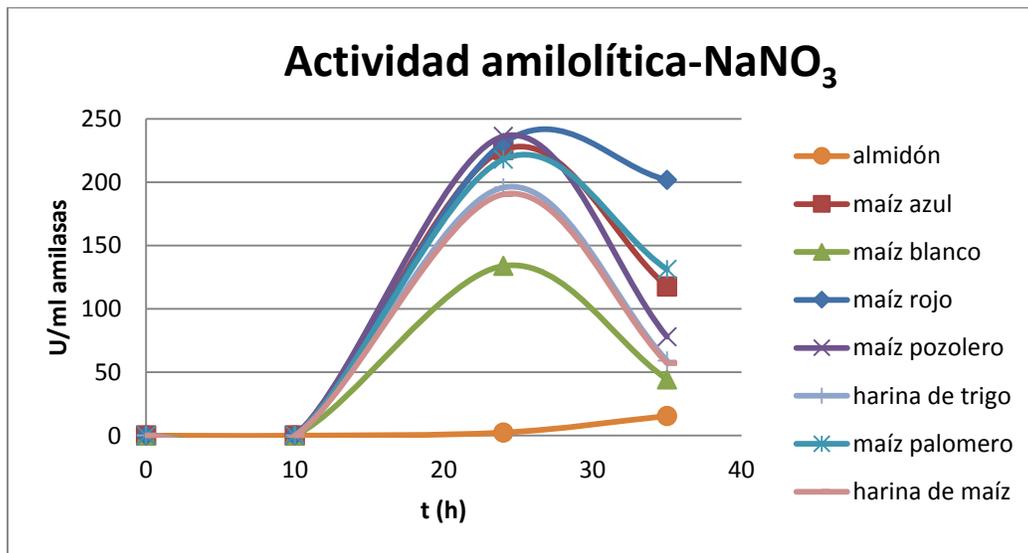


Figura 9. Comportamiento de la actividad amilolítica a lo largo de la fermentación con NaNO_3 , muestreo cada 12 h. cepa: *Aspergillus flavus* CECT-2687.

b) Fermentación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Utilizando sulfato de amonio no se encontró actividad amilolítica, para ningún sustrato a ningún tiempo. Esto puede deberse a que la enzima no se haya producido o bien a que la enzima si fue producida pero inactivada por las condiciones de alta acidez en el medio. Los valores de pH fueron extremadamente bajos, por lo que las enzimas pudieron haberse desnaturalizado o hidrolizado por proteasas ácidas.

En la literatura se reporta que las amilasas y la proteasas son estables en un amplio rango de pH (3 a 9). Siendo un pH entre 4 y 5, donde se encuentran las actividades más altas de ambas enzimas (Sangeeta, 2012).

Hay reportes que describen que las amilasas y las proteasas son enzimas concomitantes, es decir, que siempre se producen ambas (Karbalaie, 2007) por lo que se puede intuir que la pequeña cantidad amilasas producidas (debidas al pH extremadamente bajo) fueron degradadas por proteasas.

El sulfato de amonio es el mejor compuesto ya que aporta al mismo tiempo azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos, sin embargo, la disminución del pH, no la hace la fuente idónea para el crecimiento de *Aspergillus flavus*, ni para su propia producción de amilasas.

c) Fermentación sin fuente de Nitrógeno:

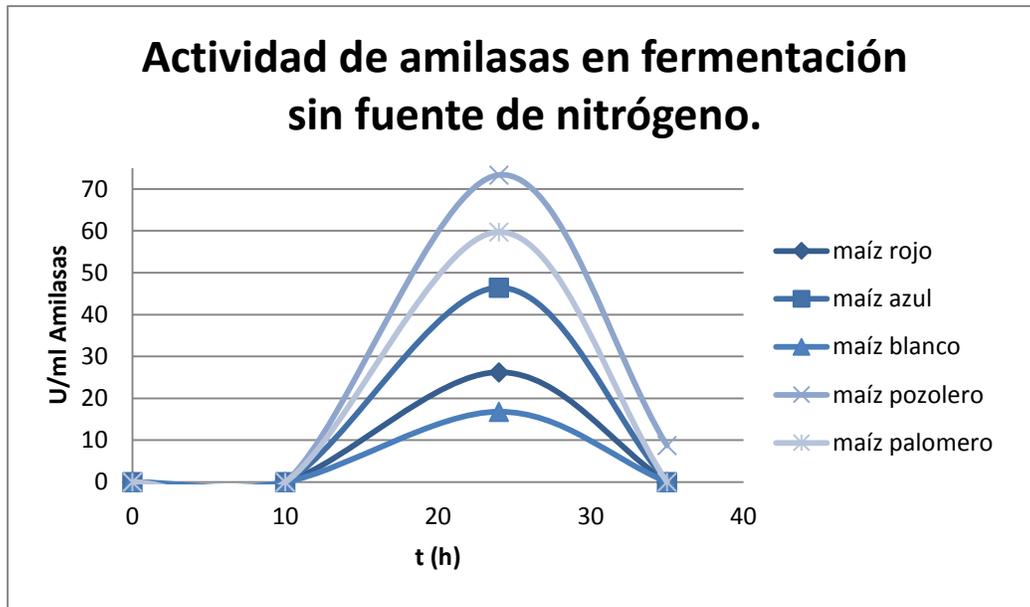


Figura 10. Actividad amilolítica a lo largo de la fermentación SIN fuente de nitrógeno. (Fermentación Control) Cepa: *A. flavus* CECT-2687.

Para la fermentación con NaNO_3 (figura 9) y sin fuente de Nitrógeno (figura 10), no se encontró actividad amilolítica, esto puede deberse a que el método utilizado no fue tan sensible para detectar la presencia de amilasas, las cuales se intuye, estaban en muy bajas concentraciones por el corto tiempo desde el inicio de la fermentación.

Por otro lado, se observa que las actividades de la fermentación sin fuente de nitrógeno son considerablemente más bajas, es decir, *A. flavus* puede crecer en medios con maíz, aún sin fuente de nitrógeno añadida, porque el maíz tiene cierta proporción de proteína, sin embargo lo hace en menor medida.

En ambos casos se observa que el maíz blanco tuvo la menor actividad, y por lo que se mencionó anteriormente, se sugiere que puede tratarse del maíz con menor cantidad de proteína.

También se observa en las dos figuras (6 Y 7) que la actividad disminuye después de las 24 h. esto puede deberse a varios factores como que las amilasas se hayan desnaturalizado por efecto del pH durante la fermentación, como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, en un trabajo reportado en el grupo de fisiología de hongos filamentosos, se sabe que *A. flavus* produce proteasas en grandes cantidades cuando se le pone maíz como sustrato, por lo que se puede suponer que la pérdida de amilasas se deba a la hidrólisis por las proteasas producidas simultáneamente. En otros trabajos del grupo de investigación se ha documentado este efecto. En el caso de la fermentación con NaNO_3 , la actividad disminuye después de las 24 horas y para algunos casos es nula o indetectable a las 72 horas. Para la fermentación sin fuente de nitrógeno, la actividad es nula a las 36 horas para todos los sustratos.

d) Perfil electroforético y zimograma:

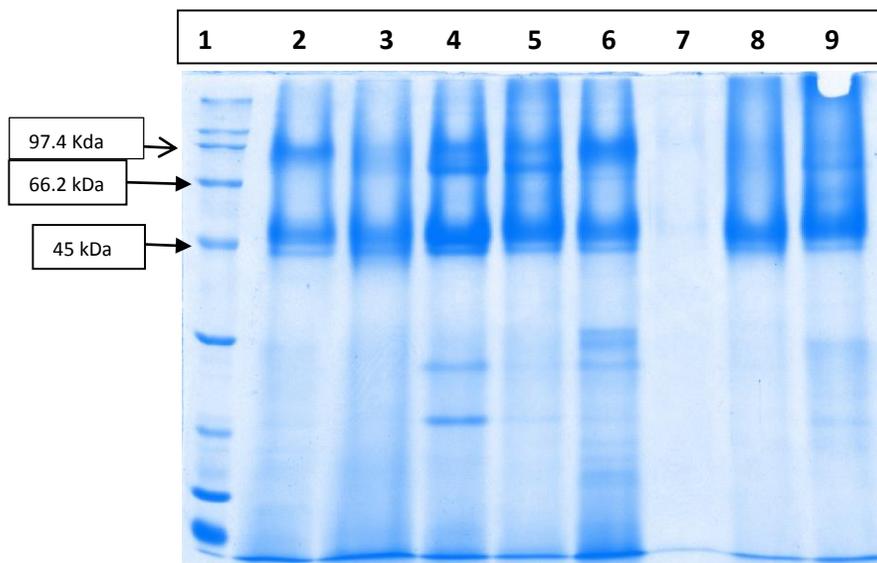


Figura 11. Gel de electroforesis SDS-PAGE para filtrados enzimáticos de maíz utilizando medio mínimo: 1) Marcador de PM, 2) maíz rojo, 3) maíz azul, 4) maíz blanco, 5) maíz pozolero, 6) maíz palomero, 7) almidón, 8) Harina de trigo, 9) Harina de maíz. Cepa: *A. flavus* CECT-2687.

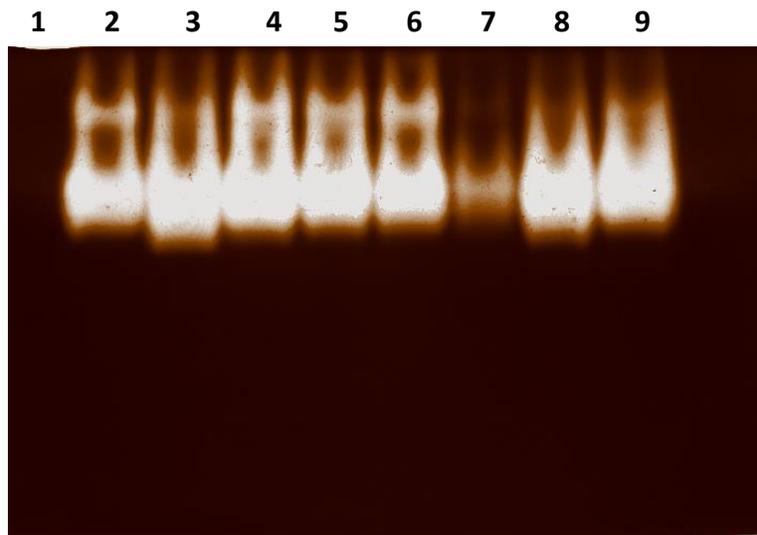


Figura 12. Zimograma. 1) Marcador de PM, 2) maíz rojo, 3) maíz azul, 4) maíz blanco, 5) maíz pozolero, 6) maíz palomero, 7) almidón, 8) Harina de trigo, 9) Harina de maíz. Cepa: *A. flavus* CECT-2687.

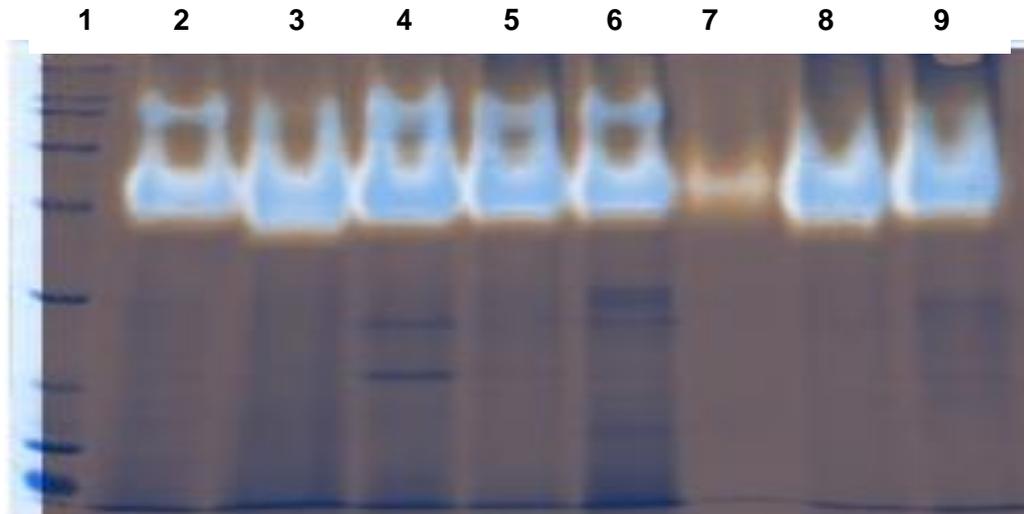


Figura 13. Relación de actividad amilolítica. 1) Marcador de PM, 2) maíz rojo, 3) maíz azul, 4) maíz blanco, 5) maíz pozolero, 6) maíz palomero, 7) almidón, 8) Harina de trigo, 9) Harina de maíz. Cepa: *A. flavus* CECT-2687.

Para casi todos los casos, se observan bandas fuertes y concentradas alrededor de los 50 a 60 kDa, lo que corresponde a amilasas (CADRE-Genomes). Sólo el carril no. 7 mostró una banda pequeña y poco intensa correspondiente al almidón comercial, que como ya se había mostrado, no es el sustrato más adecuado para la producción de amilasas.

Se observan bandas con pesos moleculares más altos (alrededor de los 97kDa), lo que puede deberse a la presencia de agregados enzimáticos (en este caso dímeros), o a la presencia de amiloglucosidasas, que son amilasas de mayor tamaño y por tanto, mayor peso molecular.

Parte II

Efecto del pH y diferentes cepas de *Aspergillus* de la sección Flavi, en la producción de amilasas.

Conociendo que la mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento de *Aspergillus flavus* fue NaNO₃, se utilizó en las fermentaciones líquidas con el fin de evaluar el tipo y cantidad de enzimas amilolíticas producidas por 3 cepas distintas: *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 (cepas toxigénicas) y *Aspergillus flavus* NRRL-6541 (cepa no toxigénica). Para este experimento, se decidió utilizar solamente 3 sustratos (maíz blanco, rojo y azul).

Cabe mencionar que se utilizó pH de 8 pues se conoce que el pH de los tejidos vegetales va en un rango de 6 a 7.5. Además, se quiso utilizar el rango de pH de 5 y 8 pues se conoce que es el pH de estabilidad de una α -amilasa purificada de *A. flavus*, encontrándose a pH =6, la mayor actividad amilolítica (Khoo et.al, 1994).

Se sabe que el rango de pH óptimo para que actúen las amilasas fúngicas va de 4 a 7 a 50°C (Tomasik, 2012). Como ejemplos, se conoce que el pH óptimo para la producción de amilasas por *A. niger* es de 5 (Djekrif et al, 2006) y para la producción de glucoamilasas por *Aspergillus sp.* es de 5.8 (Ellaiah, 2002).

Por lo anterior se utilizaron valores de pH de 5 y 8 para determinar el tipo de amilasas que se producen a cada pH, pues se conoce de antemano que la biosíntesis enzimática es dependiente del pH.

Un ejemplo es el caso de la producción de poligalacturonasas por *A. kawachii*, donde se utilizaron medios de cultivo a 2 diferentes valores de pH. Del medio de cultivo a pH 2, se logró purificar 2 poligalacturonasas, mientras que a pH de 5, solo se logró purificar una.

La secuencia amino terminal de estas enzimas era diferente, demostrando que el pH del medio de cultivo influencia fuertemente la producción enzimática (De Vries & Visser, 2001).

A continuación se muestra el efecto del pH sobre la producción amilolítica de las 3 cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*.

a) *Aspergillus parasiticus* NRRL- 502

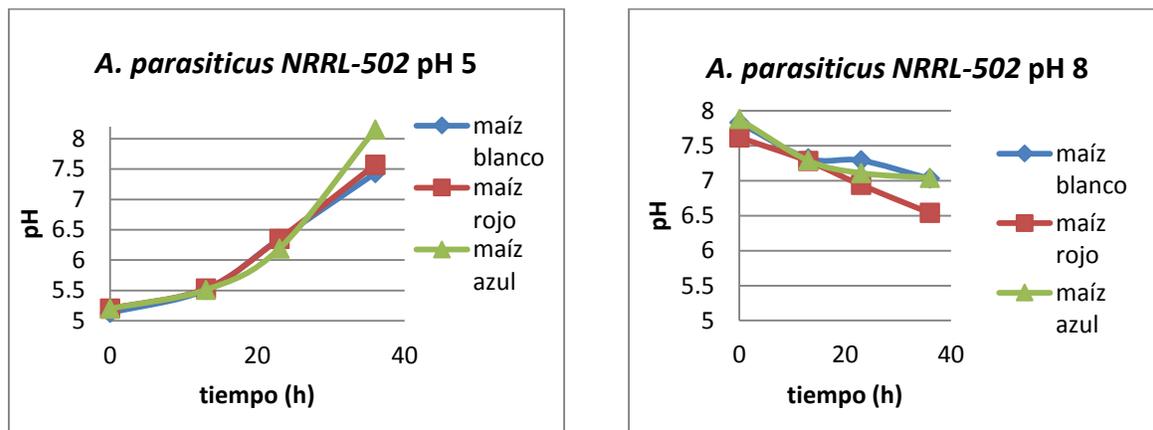


Figura 14. Perfil de pH en fermentación utilizando *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 a pH 5 y 8.

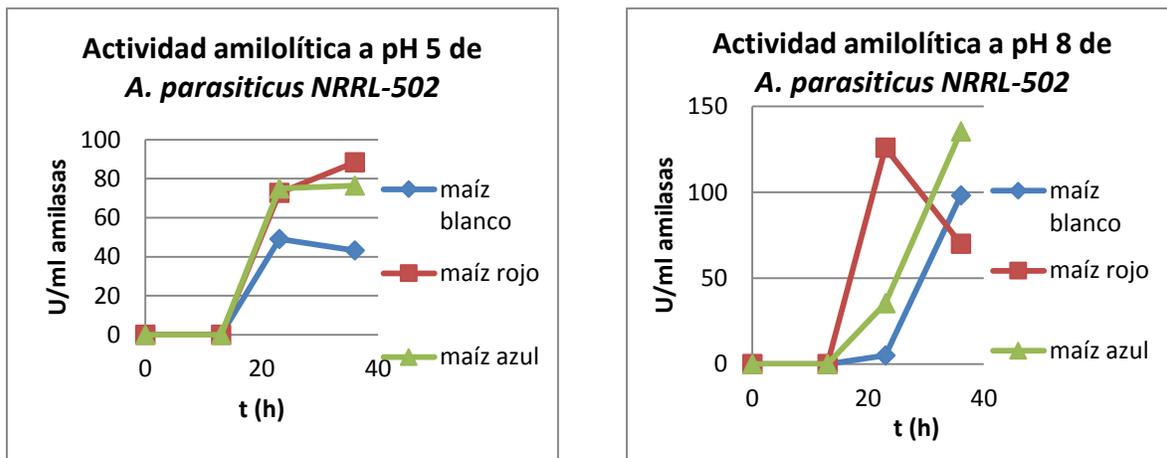


Figura 15. Actividad amilolítica de *A. parasiticus* NRRL- 502 a pH 5 y 8.

En el caso de la fermentación a pH 5, se observa un aumento desde pH 5 hasta 7.5-8, muy parecido para los 3 sustratos utilizados. En cambio en la fermentación donde se partió con pH de 8, el pH disminuye hasta valores de 6.4 para el maíz rojo, en los casos del maíz blanco y el maíz azul, el descenso fue menos pronunciado y el valor final de pH fue cercano a 7.

La actividad amilolítica en el caso de la fermentación a pH 5, alcanza su máximo a las 24 h en el caso del maíz blanco y a las 36 h para el maíz rojo y el maíz azul, los cuales presentaron, a su vez, mayor cantidad de enzimas amilolíticas que el maíz blanco.

Para la fermentación que partió con pH de 8, se observa un comportamiento parecido en el caso del maíz blanco y azul, los cuales tuvieron un pico máximo de actividad a las 36 h, mientras que el maíz rojo alcanzó su máximo a las 24 h, y tuvo un descenso de actividad a las 36h. Cabe mencionar que a las 24 h, la actividad amilolítica en el maíz blanco es mínima.

A ambos valores de pH coincidió el maíz blanco como el sustrato con el que se produce la menor actividad amilolítica. Cabe mencionar que los valores de actividad amilolítica, fueron mayores en la fermentación con pH inicial de 8.

b) *Aspergillus flavus* CECT- 2687

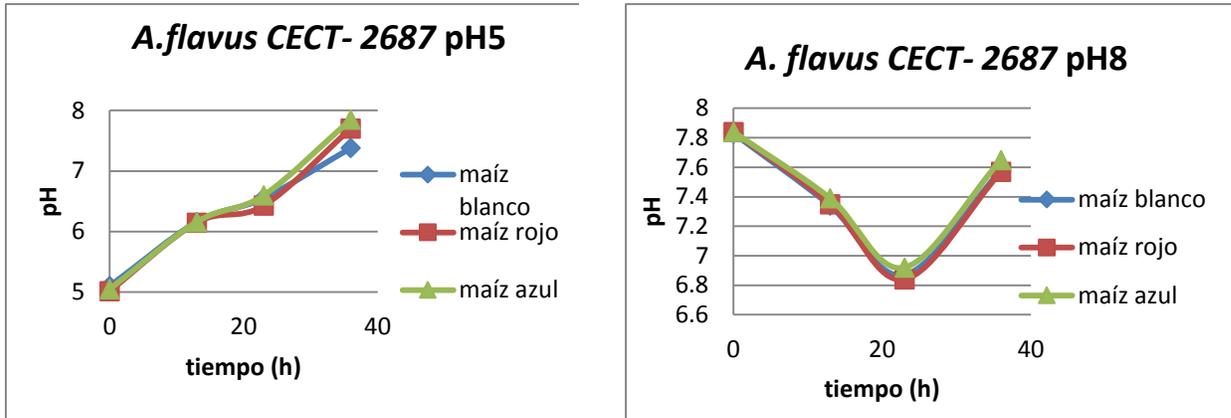


Figura 16. Comportamiento del pH en fermentación utilizando *Aspergillus flavus* CECT-2687 a pH 5 y 8.

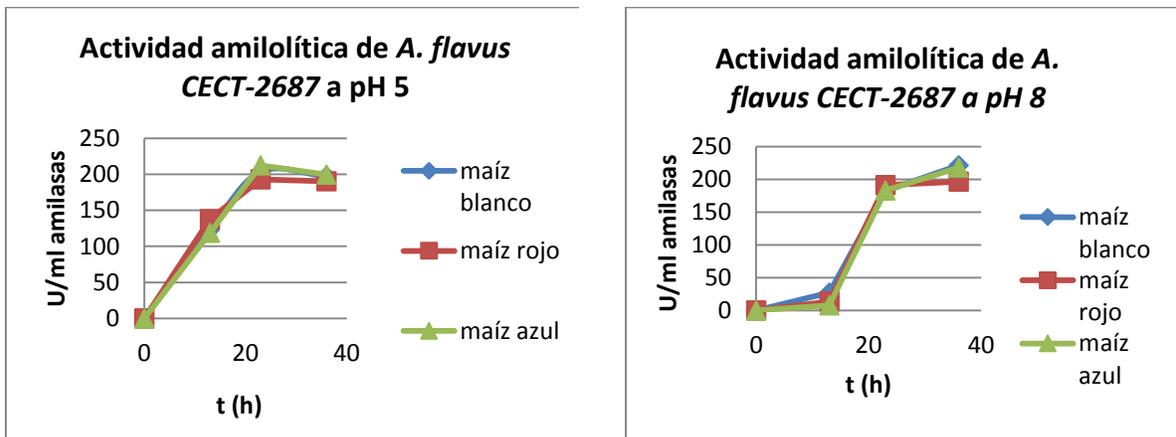


Figura 17. Actividad amilolítica de *A. flavus* CECT-2687 a pH 5 y 8.

Para la fermentación que comenzó a pH de 5, el comportamiento del pH fue muy parecido para todos los sustratos; es notable que el cambio entre 12 y 24 horas fue muy poco, mientras que en los otros tiempos, la elevación fue súbita. Cabe notar también que el pH del maíz blanco fue el menor al final de la fermentación.

En la fermentación que comenzó en pH de 8, los comportamientos son casi idénticos entre los 3 sustratos, habiendo un descenso entre 0 y 24 h, y un incremento en el pH de 24 a 36h.

La actividad en la fermentación a pH 5 ascendió y a las 24 h, se observa un pico máximo de actividad, después se observa menor actividad a las 36 h. En el caso de la fermentación a pH 8, la actividad fue muy poca o nula de 0 a 12 h y después se observa un un alza significativa de actividad amilolítica. A las 36 horas aumentó la actividad amilolítica en el caso del maíz blanco y azul, mientras que en el caso del maíz rojo, la actividad prosiguió constante.

c) *Aspergillus flavus* NRRL- 6541

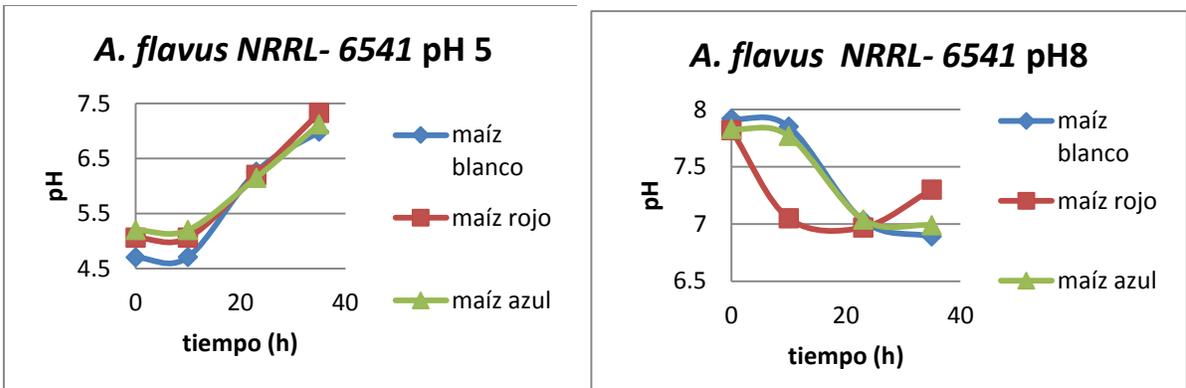


Figura 18. Comportamiento del pH en fermentación utilizando *Aspergillus flavus* NRRL-6541 a pH 5 y 8.

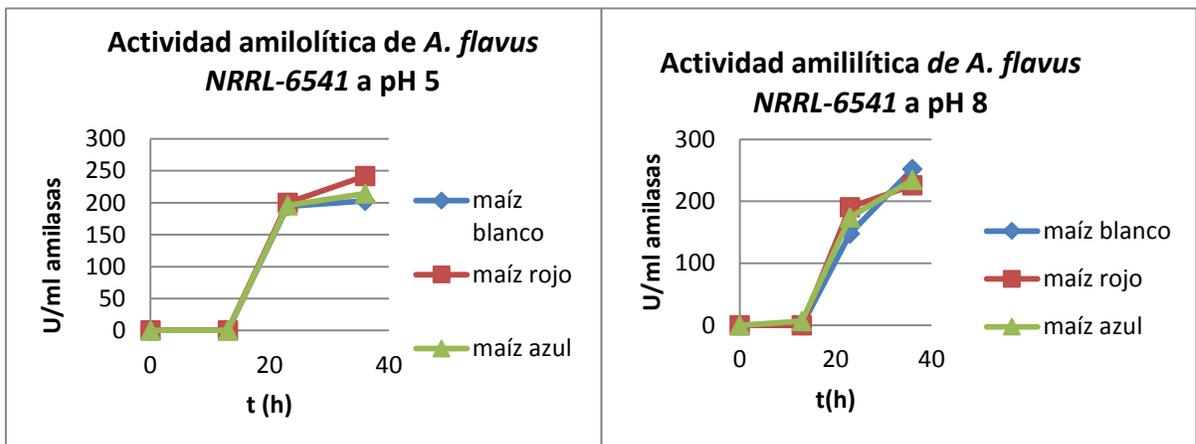


Figura 19. Actividad amilolítica de *A. flavus* NRRL-6541 a pH 5 y 8.

En el caso de la fermentación con *A. flavus* NRRL-6541, los comportamientos del pH fueron completamente diferentes. En la fermentación que partió de un pH de 5, los valores de pH ascendieron poco a las 24 h, pero después se observa un marcado aumento de estos valores entre 24 y 36h. Para la fermentación que partió de pH 8, los valores descendieron, siendo los comportamientos de las fermentaciones con maíz blanco y maíz azul muy parecidas, mientras que el pH de la fermentación con maíz rojo, descendió de manera más acelerada hasta las 24 h después de las cuales, tuvo una ascenso hasta las 36 h.

Las actividades amilolíticas a ambos valores de pH (5 y 8) son sumamente parecidas. En la figura 17, donde se muestran las gráficas de ambas condiciones, se puede observar que de 0 a 12 h, la actividad amilolítica es nula o indetectable, después se observa una pendiente marcada de las 12 a las 24 h. Para el caso de la fermentación a pH 5, donde se utilizó maíz rojo, se obtuvo mayor concentración de amilasas a las 36 h, mientras que el maíz rojo y el maíz azul, permanecieron prácticamente constantes. Para la fermentación a pH 8, se obtuvo mayor actividad amilolítica para los 3 sustratos utilizados: maíz rojo, azul y blanco.

Una de las diferencias entre los maíces utilizados es su coloración, está dada por pigmentos flavonoides llamados antocianinas. Algunos flavonoides han mostrado tener efectos antifúngicos (Medina et al, 2004).

Por la causa anterior, se esperaba que las fermentaciones con maíces rojo y azul, tuvieran menor actividad amilolítica que las fermentaciones con maíz blanco.

Sin embargo, esto no se cumplió, pues se puede observar claramente en el caso de la fermentación donde se utilizó *A. parasiticus* NRRL-502, que en las fermentaciones con maíz blanco, se observó la más baja actividad.

En el caso de la fermentación con *A. flavus* CECT-2687, el comportamiento de la actividad amilolítica es muy parecida entre maíces para ambas condiciones de pH.

Finalmente, para la cepa de *A. flavus* NRRL-6541, para la fermentación con pH de 5, el maíz blanco y el azul, vuelven a presentar comportamientos parecidos, siendo la actividad de la fermentación con maíz blanco, ligeramente menor. La fermentación a pH 8 con *A. flavus* NRRL-6541, es el único caso donde la actividad de la fermentación con maíz blanco es la más alta, sin embargo, la diferencia de actividades entre los 3 maíces es muy poca, por lo que se sugiere que este parámetro (pigmentos), no influye de manera significativa en la producción amilolítica, y tampoco parece tener influencia sobre estas 3 cepas de *Aspergillus* de la sección Flavi.

Otra de las variantes en este experimento, fue si las cepas eran o no productoras de aflatoxinas; cabe mencionar que *A. flavus* NRRL-6541 es una cepa NO toxigénica, mientras que *A. parasiticus* NRRL-502 y *A. flavus* CECT-2687 si son cepas toxigénicas.

La literatura reporta que las cepas toxigénicas de la sección Flavi, presentan una incidencia de esclerocios y actividad proteolítica mayor que las que no son toxigénicas. Pero en términos generales, las actividades medias de ambos grupos son semejantes, sin diferencias significativas. Solo la actividad de ureasa difiere significativamente entre las cepas productoras y no productoras de toxinas (Sanchíz et al, 1984).

La cepa que mayor actividad amilolítica presentó, a ambos valores de pH (5 y 8), resultó ser *A. flavus* NRRL-6541 (no toxigénica), con valores cercanos a las 250 U/ml de amilasas.

La producción por las cepas toxigénicas fue menor. Con *A. flavus* CECT-2687, se obtuvieron actividades cercanas a las 200 U/ml de amilasas, mientras que *A. parasiticus* NRRL-502 obtuvieron los valores más bajos de actividad amilolítica (alrededor de 90 U/ml para la fermentación que comenzó a pH= 5 y 140 U/ml en la fermentación a pH=8).

Según estos experimentos, se podría pensar que la cepas no toxigénicas de la sección Flavi (en este caso *A. flavus* NRRL-6541), tienen una producción mayor de actividad amilolítica, pero esto no necesariamente es cierto, ya que como indica la literatura, las cepas toxigénicas producen mayor cantidad de proteasas, las cuales pueden degradar a su vez, las amilasas producidas, por lo que ciertamente se espera que la actividad amilolítica de las cepas toxigénicas sea menor, como ocurrió en el experimento anterior.

Como se puede observar en las figuras 20 y 21, y teniendo en cuenta los zimogramas, se puede notar que cuando la fermentación inicia a un valor de pH cercano a 5, se observan 2 bandas de actividad amilolítica en cada carril, mientras que cuando la fermentación inicia a valores de pH cercanos a 8, solamente aparece una banda por carril, correspondientes a las bandas del gel de proteína que oscilan entre los 31 y los 66kDa aproximadamente.

Esto sugiere que cuando la fermentación inicia a pH de 5, se está dando la producción de una enzima inducible con un peso aproximado de 97.4 a 116 kDa.

Una de las probables enzimas producidas pueden ser las amiloglucosidasas, las cuales tienen un peso molecular de 97 kDa (Regand, et al, 2011).

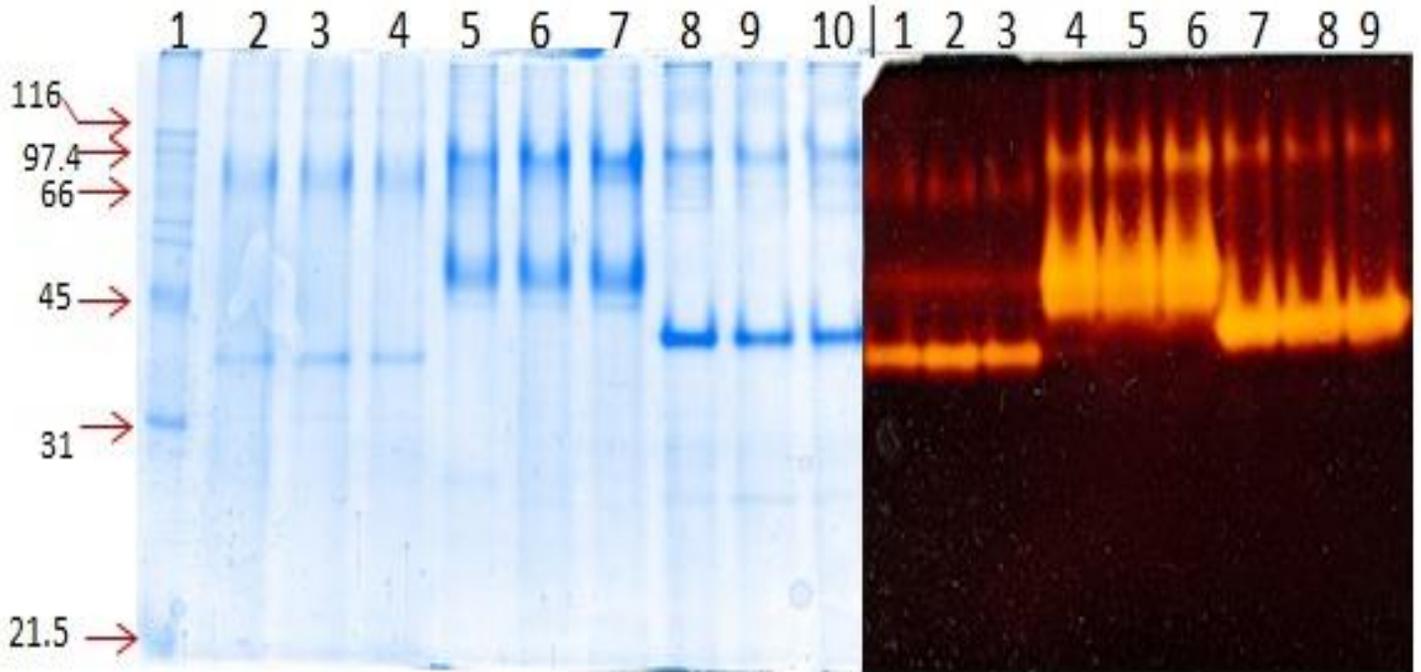


Figura 20. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% y zimograma, para filtrados enzimáticos de maíz utilizando medio mínimo y valor de pH inicial de 5:

Gel de proteína: 1) Marcador de PM, 2) maíz blanco y *A. parasiticus* NRRL-502, 3) maíz rojo y *A. parasiticus* NRRL-502, 4) maíz azul y *A. parasiticus* NRRL-502, 5) maíz blanco y *A. flavus* CECT-2687, 6) maíz rojo y *A. flavus* CECT-2687, 7) maíz azul y *A. flavus* CECT-2687, 8) maíz blanco y *A. flavus* NRRL-6541, 9) maíz rojo y *A. flavus* NRRL-6541, 10) maíz azul y *A. flavus* NRRL-6541.

Zimograma: 1) maíz blanco y *A. parasiticus* NRRL-502, 2) maíz rojo y *A. parasiticus* NRRL-502, 3) maíz azul y *A. parasiticus* NRRL-502, 4) maíz blanco y *A. flavus* CECT-2687, 5) maíz rojo y *A. flavus* CECT-2687, 6) maíz azul y *A. flavus* CECT-2687, 7) maíz blanco y *A. flavus* NRRL-6541, 8) maíz rojo y *A. flavus* NRRL-6541, 9) maíz azul y *A. flavus* NRRL-654

En ambos geles (figuras 20 y 21) se observa que las amilasas de mayor peso molecular corresponden a *A. flavus* CECT-2687, mientras que las de menor peso molecular corresponden a *A. parasiticus* NRRL-502.

También se puede observar que las bandas que corresponden a *A. flavus* CECT-2687, son las más grandes y difundidas, esto debido a una mayor concentración de amilasas en el filtrado.

En el caso de las bandas del zimograma correspondientes a *A. parasiticus* NRRL-502 y a *A. flavus* NRRL-6541, las bandas son más pequeñas, por lo que se sugiere que la concentración de proteína en los filtrados era menor, (a consecuencia de la menor producción enzimática en el medio de cultivo) o que las α -amilasas se encuentran en menor proporción que en el sistema amilolítico producido por *A. flavus* CECT-2687.

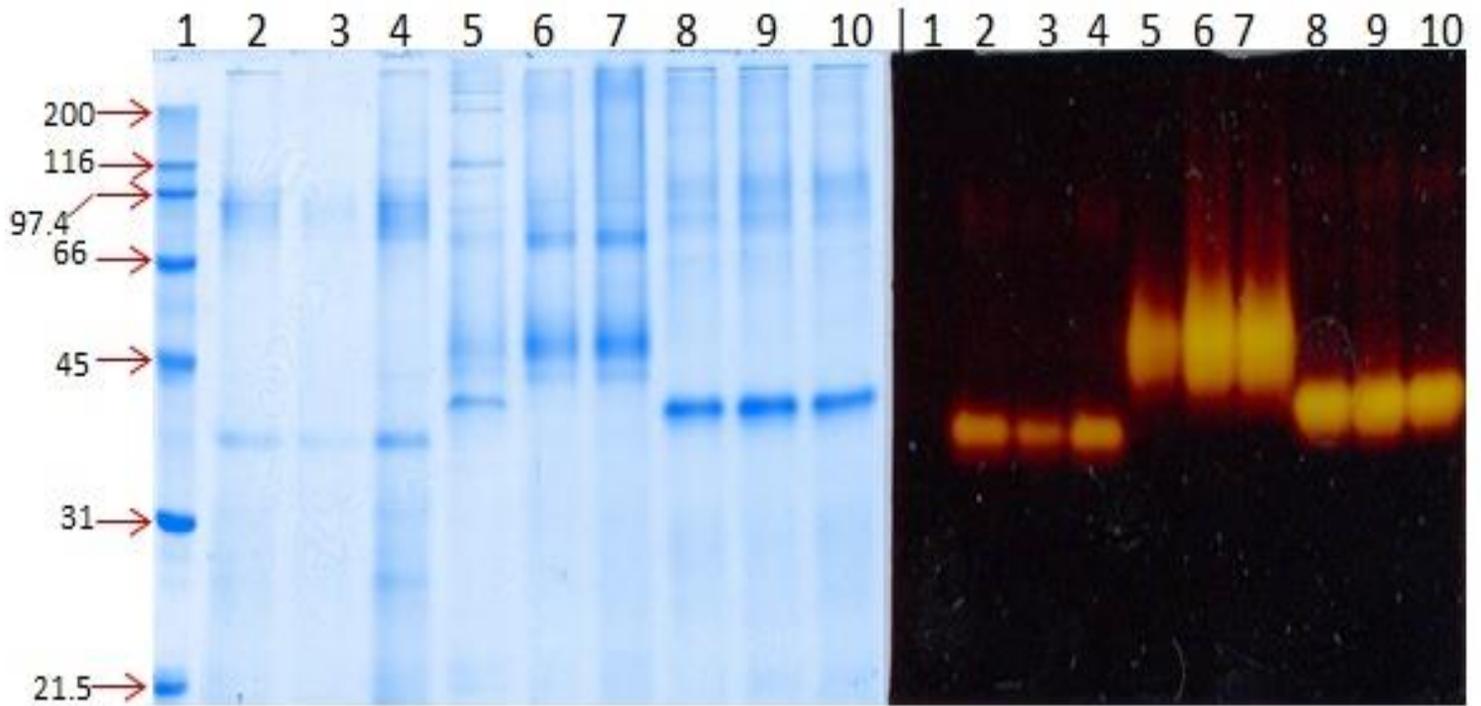


Figura 21. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% y zimograma, para filtrados enzimáticos de maíz utilizando medio mínimo y valor de pH inicial de 8:

1) Marcador de PM, 2) maíz blanco y *A. parasiticus* NRRL-502, 3) maíz rojo y *A. parasiticus* NRRL-502, 4) maíz azul y *A. parasiticus* NRRL-502, 5) maíz blanco y *A. flavus* CECT-2687, 6) maíz rojo y *A. flavus* CECT-2687, 7) maíz azul y *A. flavus* CECT-2687, 8) maíz blanco y *A. flavus* NRRL-6541, 9) maíz rojo y *A. flavus* NRRL-6541, 10) maíz azul y *A. flavus* NRRL-6541.

Zimograma: 1) Marcador de PM, 2) maíz blanco y *A. parasiticus* NRRL-502, 3) maíz rojo y *A. parasiticus* NRRL-502, 4) maíz azul y *A. parasiticus* NRRL-502, 5) maíz blanco y *A. flavus* CECT-2687, 6) maíz rojo y *A. flavus* CECT-2687, 7) maíz azul y *A. flavus* CECT-2687, 8) maíz blanco y *A. flavus* NRRL-6541, 9) maíz rojo y *A. flavus* NRRL-6541, 10) maíz azul y *A. flavus* NRRL-6541.

Parte III

Análisis de la producción amilolítica con sustratos no amiláceos:

Con el fin de evaluar si las amilasas producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus* son inducibles o constitutivas se decidió probar con sustratos no amiláceos y observar su capacidad de producir o no este sistema enzimático, a valores de pH de 5 y 8.

Para esta parte se utilizaron glucosa, sacarosa y maltosa. Se eligió la glucosa, pues este monosacárido es el represor por excelencia de la biosíntesis de enzimas microbianas, ya que en su presencia, la expresión de genes estructurales requeridos para la utilización de otras fuentes alternativas de carbón disminuye. En general, la represión por glucosa está mediada por la acción de proteínas específicas que regulan la transcripción al unirse a secuencias promotoras de genes blanco (Trumbly, 1992). Como ejemplo tenemos al gen CreA, que se ha caracterizado de *A. nidulans* (Dowzer & Kelly 1991) y *A. niger* (Drysdale, et al, 1993) y el cual es un gen regulador, que media la represión catabólica por carbono (Bailey & Arst, 1977).

Asimismo se utilizó maltosa, pues se reportó que fue el mejor inductor de la producción de α -amilasa por *Aspergillus oryzae* (Yabuki, 1977) y *A. awamori* (Attia, 1974), de entre varias fuentes de carbono probadas.

También se utilizó sacarosa, el cual es un disacárido, conformado por glucosa y fructosa, con enlaces α -1,2, que sirve como un control para comparación.

En estos experimentos con las fuentes de carbono solas, el crecimiento de los hongos fue deficiente por lo que fue necesario agregar 0.1% de extracto de levadura para favorecer el crecimiento de los 3 microorganismos de estudio y su producción enzimática.

A continuación se muestran las gráficas de pH y actividad amilolítica a lo largo de la fermentación:

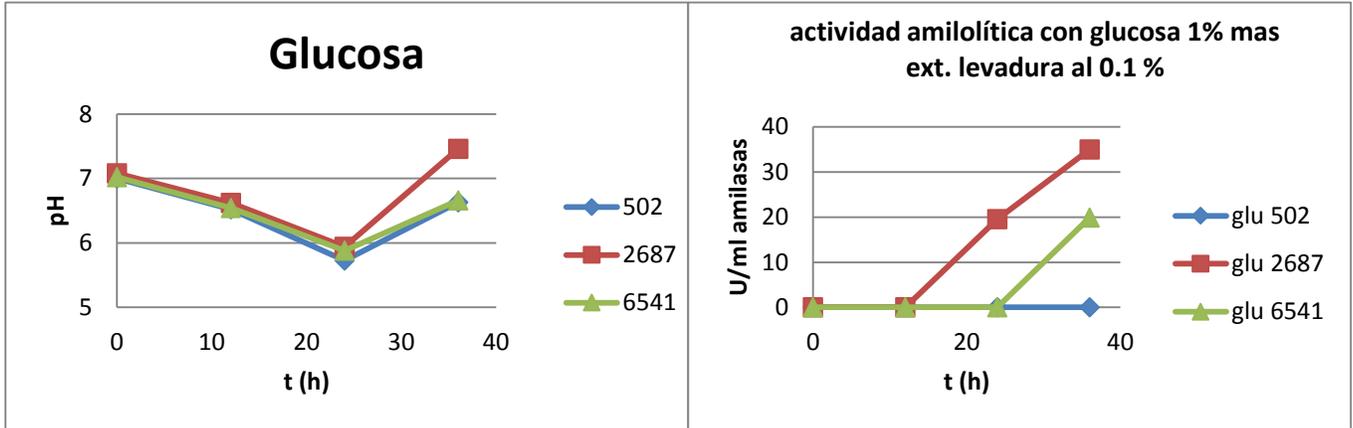


Figura 22. Comportamiento del pH y Actividad amilolítica de la fermentación utilizando Glucosa +0.1% de extracto de levadura.

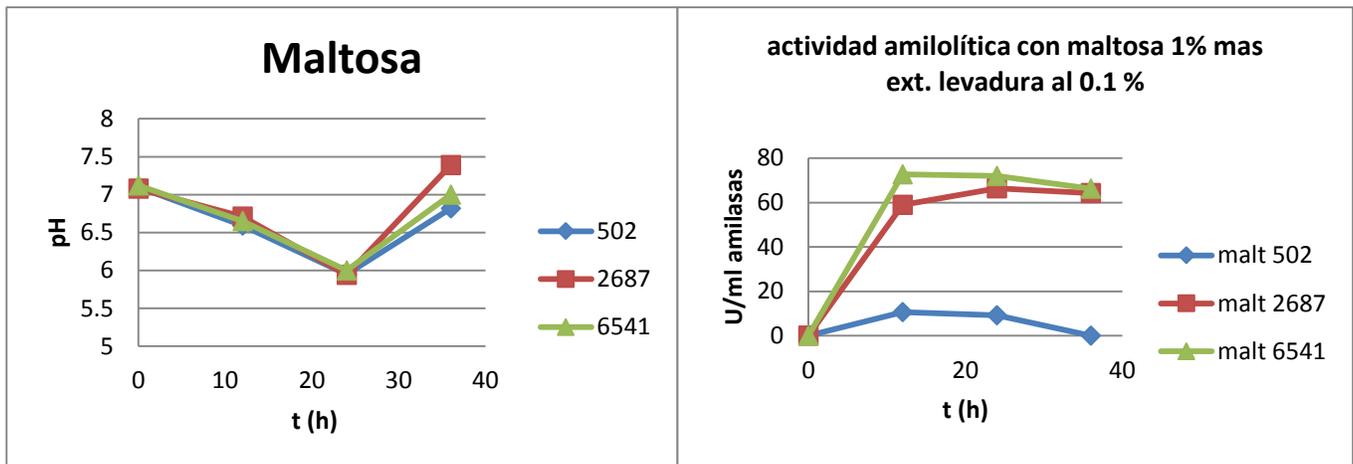


Figura 23. Comportamiento del pH y Actividad amilolítica de la fermentación utilizando Maltosa + 0.1% de extracto de levadura.

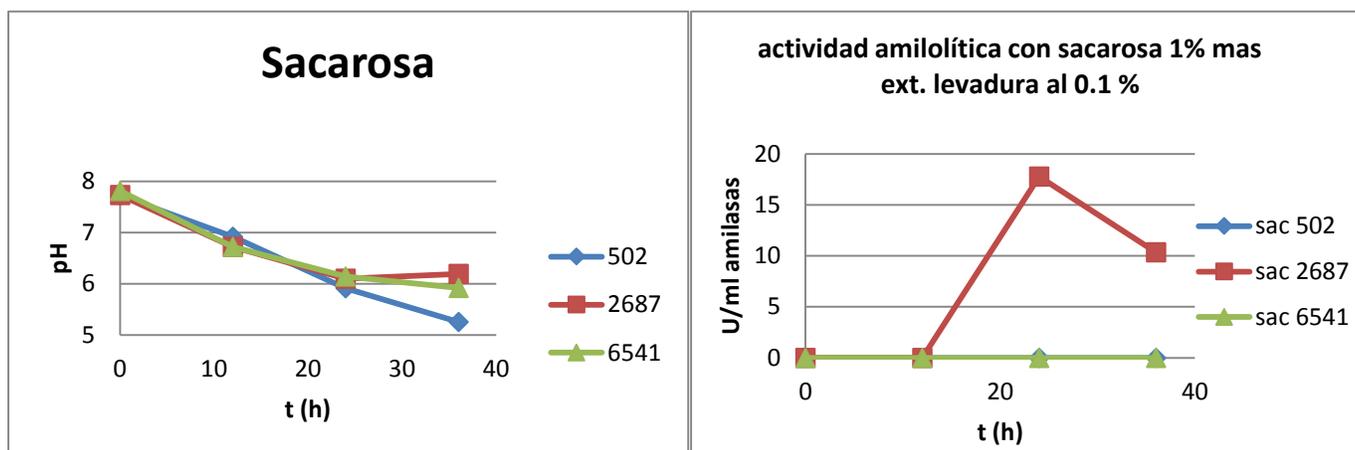


Figura 24. Comportamiento del pH y Actividad amilolítica de la fermentación utilizando Sacarosa + 1% de extracto de levadura.

En cuanto al pH, se observan comportamientos muy parecidos para glucosa y maltosa (figuras 22 y 23), tendiendo a bajar hasta las 24 h, con un incremento posterior.

Mientras que en el caso de la sacarosa (figura 24), el pH tiende a bajar para la cepa de *A. flavus* NRRL-502 hasta las 36 horas y para *A. flavus* CECT-2687 y *A. flavus* NRRL-6541, los valores de pH permanecen prácticamente constantes de 24 a 36h.

Para el caso de las actividades amilolíticas, al saber que la glucosa es el represor catabólico por excelencia, se esperaba una actividad amilolítica muy baja o nula. Sin embargo, no fue el caso de *A. flavus* CECT-2687 donde se obtuvo una actividad máxima mayor a 30 U/ml (fig. 22).

Para el caso de la maltosa (fig. 23), se obtuvieron las actividades amilolíticas más altas, muy similares para *A. flavus* CECT-2687 y *A. flavus* NRRL-6541.

Con la sacarosa, (figura 24) se logró cuantificar actividad amilolítica en el caso de *A. flavus* CECT-2687. Lo que sugiere que esta cepa es capaz de producir enzima invertasa que es necesaria para la asimilación de esta fuente de carbono.

La enzima invertasa, también conocida como β -fructofuranosidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa (Ashokkumar et al, 2001). Su producción se ha reportado en *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* (Reddy et al, 2010) y hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium* y *Penicillium* (Mussato et al, 2009).

Un ejemplo es *A. niger*, el cual es un hongo filamentoso considerado GRAS y es extensamente empleado en biotecnología e industria farmacéutica y alimentaria por su extensa producción de invertasa. Esta enzima es producida también por otras especies de *Aspergillus* como: *A. ficcum* (Peberdy 1993; James & Simpson 1996) *A. fumigatus* (Rezende, 1999) y *A. flavus* (Matrai et al. 2000).

Se observó que *A. flavus* CECT-2687 tuvo la mayor actividad amilolítica usando como sustratos: glucosa y sacarosa. *A. flavus* NRRL-6541 produjo amilasas en presencia de glucosa y maltosa, mientras que en sacarosa no se detectó esta actividad.

Las amilasas de *A. parasiticus* NRRL-502 fueron indetectables, usando sacarosa y glucosa como fuentes de carbono, y cuando se utilizó maltosa, la actividad amilolítica fue baja (menor a 20 U/ml) en relación con lo producido por *A. flavus* CECT-2687 y *A. flavus* NRRL- 6541.

Estos resultados sugieren que *A. flavus* CECT-2687 produce amilasas en forma constitutiva ya que se encontró actividad amilolítica, usando una fuente de carbono que normalmente funciona como represor catabólico: glucosa (figura 22).

En el caso de la cepa de *A. flavus* NRRL-6541 produce actividad amilolítica constitutiva pero solo en glucosa y en el inductor (maltosa) la actividad fue baja.

En este experimento se observa que las actividades amilolíticas en general, fueron bajas, por esto se espera tener una baja cantidad de proteína en los filtrados, por lo que se decidió correr solamente el zimograma, ya que esta herramienta es más sensible a bajas concentraciones de enzima.

En la figura 25, se observa que las bandas de los carriles 4 ,5 y 6, correspondientes a la fermentación con maltosa, son bandas claras, anchas e intensas, esto era de esperarse, pues como se mencionó, la maltosa es el azúcar inductor de producción enzimática por excelencia.

Por otro lado, también se observan bandas de actividad en el caso de glucosa, lo que no se esperaba pues la glucosa es un azúcar que funciona como represor catabólico.

Asimismo, hubo actividad amilolítica en el caso de los filtrados de la fermentación donde se utilizó sacarosa como fuente de carbono, (carriles 7, 8 y 9).

A pesar de que en algunos casos no se detectó actividad amilolítica en la determinación en tubo de ensayo, en el zimograma de la figura 25 sí se observa actividad en todas las bandas, lo que nos confirma que el zimograma es un método de determinación mucho más sensible.

Al haber obtenido actividad amilolítica en todas las bandas del zimograma, tanto en las bandas correspondientes a maltosa (azúcar inductor) como en las bandas correspondientes a glucosa y sacarosa (no inductores), se puede concluir que las amilasas de *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y *Aspergillus parasiticus* NRRL-502, son constitutivas, o son insensibles a la represión catabólica.

Cabe mencionar que todas las bandas del zimograma en la figura 25, tienen un peso molecular aproximado, entre 31 y 45 kDa, lo que corresponde al peso de las amilasas reportado por la base de datos: CADRE GENOMES.

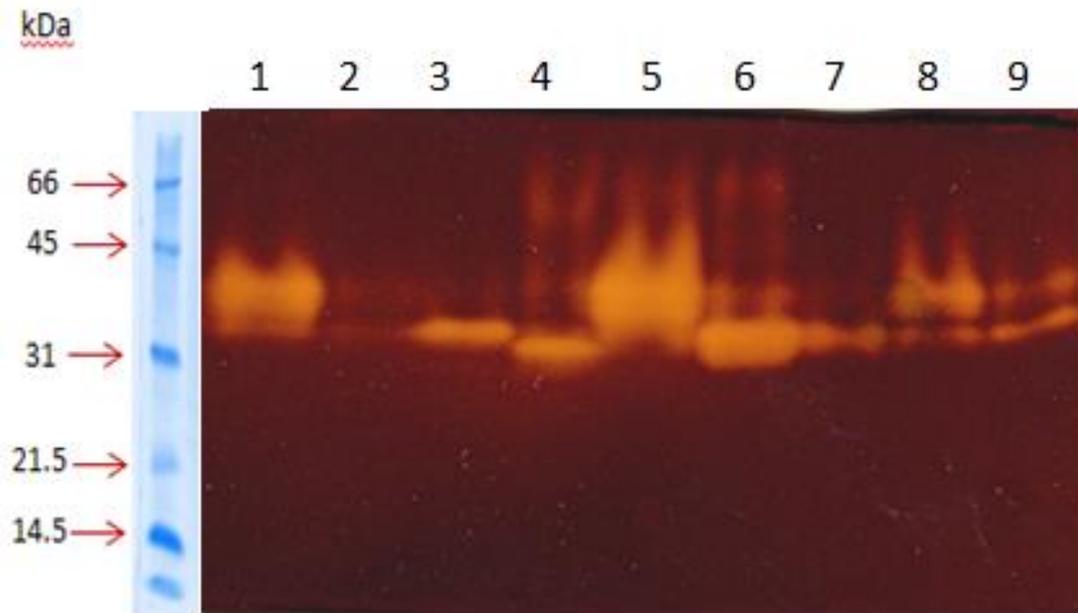


Figura 25. Zimograma de la fermentación donde se utilizaron 3 diferentes fuentes de carbono (Glucosa, Maltosa y Sacarosa) con las 3 cepas de estudio:

1) Glu 1% con *A. parasiticus* NRRL-502, 2) Glu 1% con *A. flavus* CECT- 2687, 3) Glu 1% con *A. flavus* NRRL- 6541, 4) Malt 1% con *A. parasiticus* NRRL-502, 5) Malt 1% con *A. flavus* CECT-2687, 6) Malt 1% con *A.flavus* NRRL-6541, 7) Sac 1% con *A. parasiticus* NRRL-502, 8) Sac 1% con *A. flavus* CECT-2687, 9) Sac 1% con *A. flavus* NRRL-6541.

Posterior a los experimentos con azúcares simples, se utilizó cáscara limón, el cual es un sustrato que contiene muy poco o nulo almidón en su composición. Cabe mencionar que la concentración de la cáscara de limón en el medio fue de 1% y 3% y también se comparó con maíz rojo al 3%. El pH se ajustó a valores de 5 y 8, como en las fermentaciones anteriores.

Cáscara de limón

- Inicio de la fermentación a pH 5

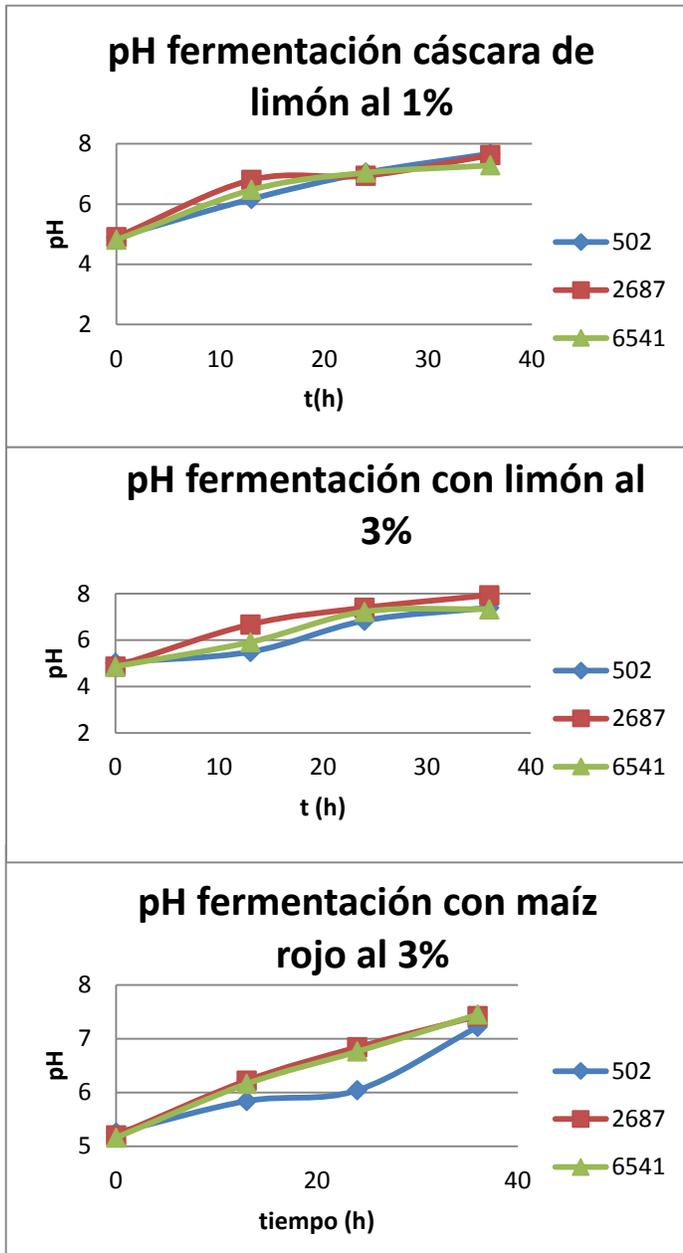


Fig. 28. Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación, utilizando como sustrato cáscara de limón al 1% 3%, y maíz rojo al 3% para comparación.

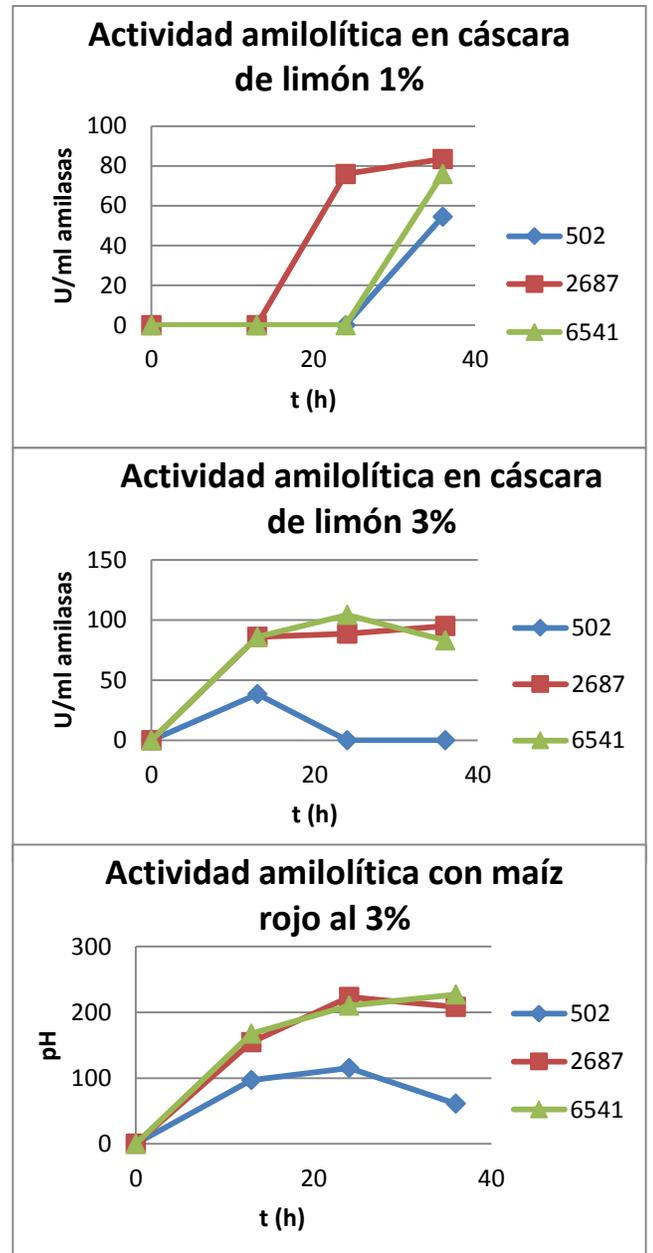


Fig 29. Actividad amilolítica a lo largo de la fermentación, utilizando como sustrato cáscara de limón al 1% y 3% y maíz rojo al 3% para comparación.

Como se mencionó, la cáscara de limón no es un sustrato rico en almidón, sin embargo, se cuantificaron actividades hasta de 80 U/ml aproximadamente para la fermentación con cáscara de limón al 1% (por *A. flavus* CECT -2687 y *A. flavus* NRRL-6541). En el caso de la cáscara de limón al 3%, la actividad más alta fue de 100 U/ml a las 24 h, por *A. flavus* NRRL-6541. Para ambos casos, se observa que *A. parasiticus* NRRL- 502 tuvo la menor producción amilolítica de las tres cepas empleadas.

En el caso de la fermentación donde se utilizó cáscara de limón al 3%, a pesar de contener 3 veces más fuente de carbono que en la fermentación con cáscara de limón al 1%, el aumento en la actividad amilolítica es de solo un 25%. Sin embargo, la actividad se produce más rápidamente cuando la cáscara de limón se agrega al 3%.

Haciendo la comparación con lo obtenido usando maíz rojo al 3%, se observa que la actividad amilolítica fue significativamente mayor que en las fermentaciones con cáscara de limón, teniendo actividades mayores a las 200 U/ml. Y consistentemente, *A. parasiticus* NRRL-502 tuvo la menor actividad amilolítica reportada. Cabe mencionar que *A. parasiticus* NRRL-502 también obtuvo los valores más bajos de actividad amilolítica en las fermentaciones con maíz rojo, blanco y azul al 1%.

En la figura 26, correspondiente al gel de proteínas y al zimógrama donde se utilizó limón (sustrato no amiláceo) se observan bandas muy tenues, lo que es de esperarse pues desde la medición de actividad amilolítica, se obtuvieron valores de actividad muy bajos (alrededor de 100 U/ml de amilasas).

A pesar de que se utilizó cáscara de limón al 1 y 3% , no se observan bandas más concentradas en los carriles de 3%, (carriles 4, 5 y 6) lo que sugiere que la concentración del sustrato no es un factor influyente en la producción amilolítica por estos tres grupos de *Aspergillus* sección Flavi. (La tendencia es la misma, tanto en el gel de proteína como en el zimograma).

Por otro lado, también se corrieron fermentaciones con maíz rojo al 3% a manera de control o para tener un criterio comparativo; sobre todo en el zimograma, los carriles 7, 8 y 9, correspondientes a esta fermentación, se observan más degradados, con bandas de mayor intensidad, aunque las bandas no se observan concentradas en el gel de proteína, muestra de la sensibilidad que tiene el zimograma para la detección del sistema amilolítico.

En cuanto a los pesos moleculares, las bandas de interés se encuentran entre los 31 y 45 kDa, correspondientes a las amilasas de *Aspergillus flavus*, según la base de datos CADRE-GENOMES.

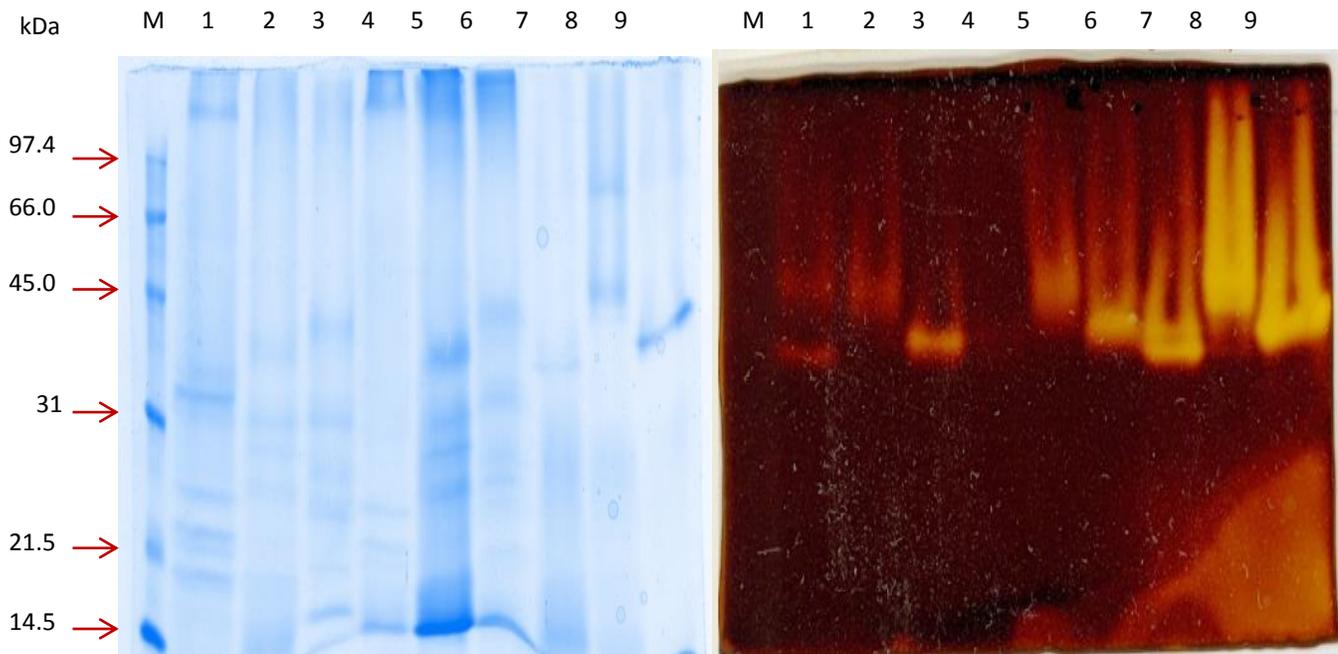


Figura 26. Gel de electroforesis SDS-PAGE y zimograma de la fermentación con cáscara de limón al 1% y 3% y maíz rojo al 3%, iniciando a un pH de 5:

M) Marcador de PM , 1) cáscara de limón al 1% con *A. parasiticus* NRRL-502, 2) CL 1% con *A.flavus* CECT-2687, 3) CL1% con *A. flavus* NRRL-6541, 4) CL 3% con *A. parasiticus* NRRL-502, 5) CL 3% con *A.flavus* CECT-2687, 6) CL3% con *A. flavus* NRRL-6541, 7)maíz rojo al 3% con *A. parasiticus* NRRL-502, 8) MR 3% con *A. flavus* CECT-2687, 9) MR 3% con *A. flavus* NRRL-6541.

Zimograma: M) Marcador de peso molecular, 1) Cáscara de Limón al 1% con *A. parasiticus* NRRL-502, 2) CL 1% con *A.flavus* CECT-2687, 3) CL1% con *A. flavus* NRRL-6541, 4) CL 3% con *A. parasiticus* NRRL-502, 5) CL 3% con *A.flavus* CECT-2687, 6) CL3% con *A. flavus* NRRL-6541, 7)maíz rojo al 3% con *A. parasiticus* NRRL-502, 8) MR 3% con *A. flavus* CECT-2687, 9) MR 3% con *A. flavus* NRRL-654.

- Inicio de la fermentación a pH de 8

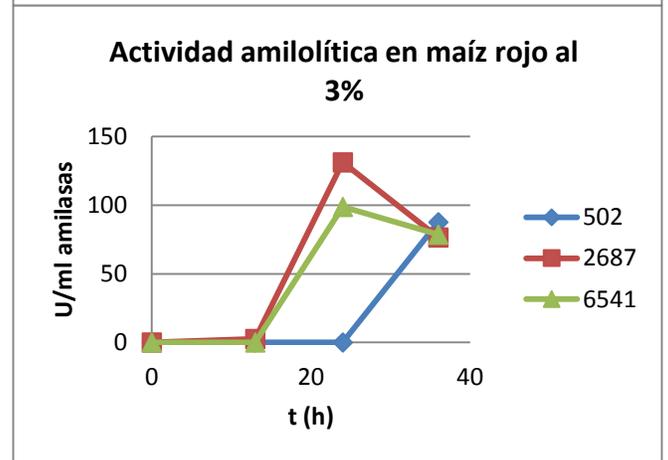
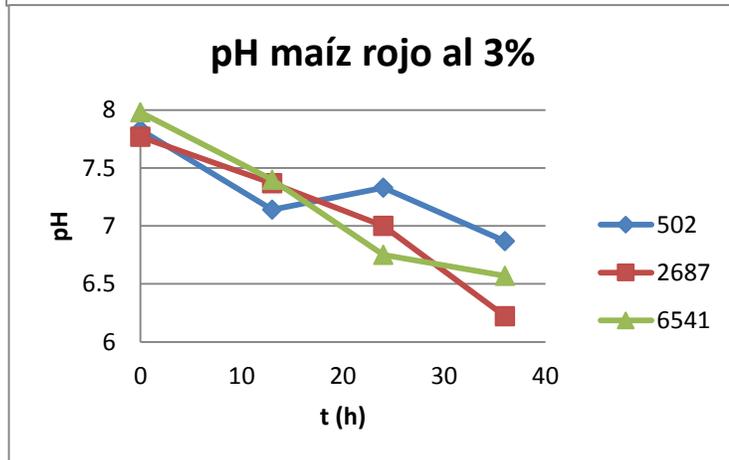
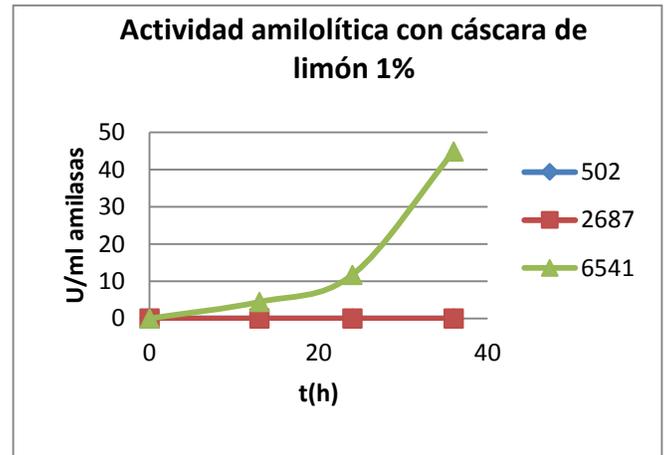
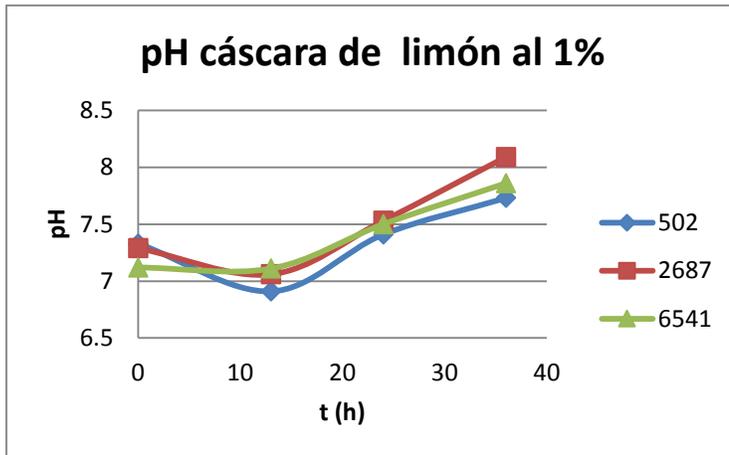


Figura 27: Comportamiento del pH a lo largo de la fermentación utilizando Cáscara de limón al 1% y maíz rojo al 3% como comparación.

Figura 28: Actividad amilolítica a lo largo de la fermentación, utilizando como sustratos: cascara de limón al 1% y maíz rojo al 3%

En estas fermentaciones donde el pH inicial se trató de ajustar a 8, cabe mencionar que en el caso de la cáscara de limón al 3%, fue imposible ajustar el valor del pH, debido a que después de la esterilización del medio, el valor del pH descendía drásticamente, por lo que después de varios intentos, se decidió trabajar solo con cáscara de limón al 1% y maíz rojo al 3% para comparar valores de actividad amilolítica.

En el caso de la fermentación con cáscara de limón al 1% a pH de 8, se obtuvo un valor de actividad amilolítica menor que a pH de 5 (50 U/ml aprox. contra 80 U/ml a pH=5) por *A. flavus* NRRL-6541, y actividad nula o indetectable para *A. flavus* CECT-2687 y *A. parasiticus* NRRL-502; Esto sugiere que empezar a un pH tan básico, no es favorable para la producción de este sistema enzimático, o que se favorece la actividad de proteasas.

Para la fermentación con maíz rojo al 3%, es útil comparar los resultados de actividad amilolítica a pH de 5 y 8. La actividad amilolítica más alta en ambos casos, fue de *A. flavus* NRRL-6541 y *A. flavus* CECT -2687. La actividad amilolítica fue más abundante a pH de 5, con 225 U/ml aproximadamente (a las 36 h) contra 130 U/ml a pH de 8 (a las 24 h).

Cuando la fermentación con maíz al 3%, empezó a pH de 8, se observa que no hay actividad entre 0 y 12 horas para *A. flavus* NRRL-6541 y *A. flavus* CECT -2687, mientras que para *A. parasiticus* NRRL-502, hay actividad hasta las 36 horas, lo que sugiere que ese no es el pH ideal para el crecimiento del microorganismo y su posterior producción amilolítica.

Los comportamientos de *A. flavus* NRRL-6541 y *A. flavus* CECT -2687 en cuanto a la actividad amilolítica, sugieren que estas dos cepas son más parecidas entre sí, de lo que lo son con *A. parasiticus* NRRL-502, a pesar de que las 3 cepas pertenecen a la sección Flavi.

Cabe destacar que *A. flavus* NRRL-6541 es una cepa no productora de toxinas, y *A. flavus* CECT-2687 si lo es; para estos últimos experimentos, la capacidad de producción de toxinas no parece ser un factor que influya significativamente en la producción de amilasas por Aspergilli de la sección Flavi, lo que coincide con la literatura citada (Sanchíz et al, 1984).

En los geles de proteína de ambas fermentaciones, iniciando a pH de 5 y 8, se pueden observar bandas que van de los 31 a los 45kDa aproximadamente; intervalo de pesos en que, según la base de datos de CADRE-Genomes, se encuentran las amilasas.

Aunque las bandas son mucho menos intensas en el caso de la cáscara de limón (al compararlas con las bandas correspondientes al maíz rojo, utilizado como control), si se observa degradación en el zimograma. (Figura 29).

La banda más intensa de los filtrados de cáscara de limón, corresponde a *A. parasiticus* NRRL-502; se observa que las bandas del zimograma se encuentran a la misma altura por lo que se sugiere que las amilasas producidas por los 3 organismos de estudio en cáscara de limón, cuentan con aproximadamente el mismo peso molecular.

En el caso de las bandas correspondientes a la fermentación con maíz al 3%, la banda más intensa corresponde a con *A. flavus* CECT-2687, esto corrobora que la cantidad de α -amilasa producida por este microorganismo es mayor a la producida por *A. flavus* NRRL-6541 y *A. parasiticus* NRRL-502, como se mencionó para los zimogramas de las figuras 20 y 21.

Además se observa la misma tendencia en todos los zimogramas, donde el peso de las amilasas producidas por *A. flavus* CECT-2687, es mayor en comparación con el peso de las amilasas de las otras dos cepas de estudio.

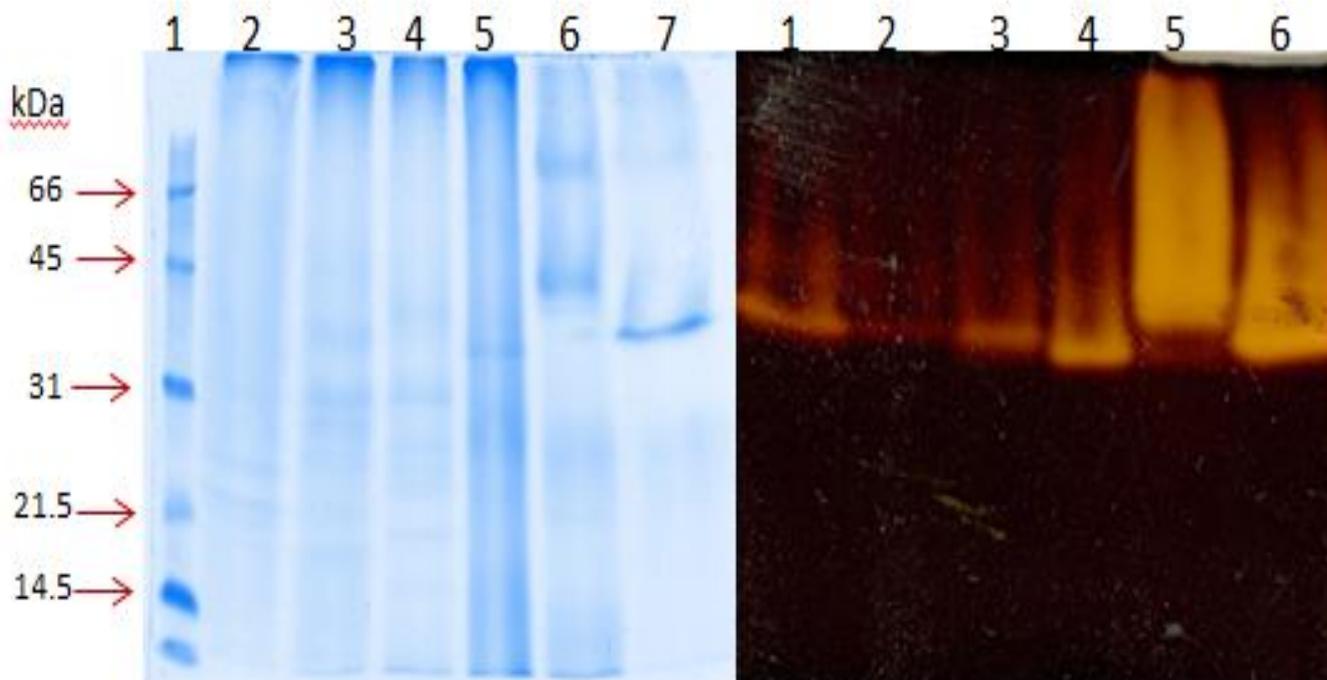


Figura 29. Gel de electroforesis SDS-PAGE y zimograma de la fermentación con cáscara de limón al 1% y maíz rojo al 3%, iniciando a un pH de 8:

1) Marcador de PM, 2) cáscara de limón al 1% con *A. parasiticus* NRRL-502, 3) CL 1% con *A. flavus* CECT-2687, 4) CL1% con *A. flavus* NRRL-6541, 5) MR al 3% con *A. parasiticus* NRRL-502, 9) MR 3% con *A. flavus* CECT-2687, 10) MR 3% con *A. flavus* NRRL-6541.

Zimograma: 1) Cáscara de limón al 1% con *A. parasiticus* NRRL-502, 2) CL 1% con *A. flavus* CECT-2687, 3) CL1% con *A. flavus* NRRL-6541, 4) MR al 3% con *A. parasiticus* NRRL-502, 5) MR 3% con *A. flavus* CECT-2687, 6) MR 3% con *A. flavus* NRRL-6541.

Al observar que hay una producción significativa de amilasas en la cáscara de limón, se sugiere que este sistema enzimático amilolítico es constitutivo, es decir, las amilasas se van a producir aunque el almidón no sea la fuente principal de carbono. En este caso, la fuente más abundante de carbono (en la cáscara de limón) es la pectina.

Además de la cáscara de limón, se obtuvo actividad amilolítica en todos demás sustratos probados: maíz blanco, rojo, azul, palomero, pozolero, almidón, harina de trigo y maíz, así como glucosa, maltosa y sacarosa; y a ambos valores de pH de inicio de la fermentación (5 y 8), confirmando así, que las amilasas de las 3 cepas utilizadas, son constitutivas, según los resultados obtenidos en este estudio.

Capítulo 6. Conclusiones

- La mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT-2687 es el nitrato de sodio (NaNO_3).
- El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizado como fuente de N, acidifica el medio drásticamente ($\text{pH}=2$), y en este caso no se detectó la actividad amilolítica. Lo que indica que a valores de pH tan bajos, no hay producción de amilasas por *A. flavus* CECT-2687.
- El pH a lo largo de la fermentación tiene una fuerte influencia sobre la producción de amilasas por las 3 cepas probadas de *Aspergilli* sección Flavi.
- Las actividades amilolíticas de las 3 cepas estudiadas, tienden a ser ligeramente mayores cuando el pH inicial de la fermentación se ajusta a 8.
- Los pigmentos flavonoides del maíz no son factores influyentes en la producción de amilasas por las 3 cepas de estudio.
- La cepa con menor actividad amilolítica fue *A. parasiticus* NRRL-502. seguida por *A. flavus* CECT-2687 (Cepas toxigénicas).

- En el perfil electroforético de las fermentaciones ajustadas a pH 5, donde se utilizaron sustratos amiláceos, se observan bandas alrededor de los 97.5kDa, lo que nos habla de la producción de enzimas inducibles a este valor de pH. Se sugiere que son amiloglucosidasas por corresponder con el peso molecular.
- En valores iniciales de fermentación a 5 u 8, y en todos los sustratos utilizados (ricos o no en almidón) se observan bandas entre los 31 a 45 kDa, correspondientes a las amilasas de *Aspergillus sp.* (CADRE-GENOMES). Por lo tanto, las amilasas son enzimas constitutivas.
- Se observan bandas de actividad en el zimograma, cuando se utilizan glucosa y sacarosa como fuentes de carbono en las fermentaciones, lo que sugiere que las amilasas de *Aspergillus flavus CECT-2687*, *Aspergillus flavus NRRL-6541* y *Aspergillus parasiticus NRRL-502*, son insensibles a la represión catabólica.

Capítulo 7. Sugerencias

Durante el trabajo experimental de esta tesis, fue posible cumplir los objetivos planteados y generar resultados en cuanto a la producción de amilasas por tres cepas de *Aspergilli* sección Flavi: *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y *Aspergillus parasiticus* NRRL-502.

Sin embargo hay temas en los que se sugiere ahondar:

- Uno de ellos es la relación que existe entre la producción de toxinas y la producción de amilasas, ya que aunque se observa una tendencia, con tan pocos estudios no sería correcto arrojar una conclusión, se necesitan otros ensayos como la determinación y cuantificación de aflatoxinas, así como la medición de la actividad de otras enzimas como proteasas, lipasas y hasta de otras polisacaridasas.
- La purificación de las amilasas producidas por las 3 cepas de estudio, sería una buena acción para conocer las constantes cinéticas (K_m y v_{max}) y así diferenciar entre tipos de amilasas (α -amilasas, β -amilasas, glucoamilasas, pululanasas).

Capítulo 8. Bibliografía

1. Alhassan S; Francis A; Akinyanju A. (1992) Amylase synthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* grown on cassava peel. Department of Biological Sciences, University of Ilorin. Ilorin, Nigeria. *Journal of industrial Microbiology*.
2. Asgher, Javaid, Rahman, Legger. (2006); A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*. p. 950
3. Ashokkumar B, Nagarajan K & Paramasamy G. (2011) Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Proc. Biochem.* 37: 331-338.
4. Barros GG, Chiotta ML, Reynoso MM, Torres AM, Chulze SN. (2007). Molecular characterization of *Aspergillus section Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina using AFLPs. *Journal of Applied Microbiology* 103:900–909.
5. Bhella, R.S. & I. Altosaar. (1987). Translational control of a α - amylase gene expression in *Aspergillus awamori*. *Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry*. 9: pp. 287-293.
6. Bernfeld, P. (1995) "Amylases alpha and beta", pp. 149-158.
7. Bolaños N; Lutz G; Herrera C. (2003). "Química de Alimentos: Manual de Laboratorio" Editorial Universal, Costa Rica. pp. 10-11.
8. Bonifaz Trujillo, J. A. (2009). *Micología médica*. Mac Graw Hill. México,
9. Brandam C., X.M. Meyer, J. Proth, P. Strehaiano, H. Pingaud. (2003) An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. *Biochemical Engineering Journal*. 2; 13, 43–52.
10. Camacho N. & Gil Gómez A. (2008). *Evaluación preliminar de modelos de infección cruzada por Fusarium sp., aislados de procesos patológicos en plantas, animales y humanos*. Tesis, Facultad de ciencias – Pontificia Universidad Javeriana (Colombia).
11. Carrera, J. (2003) Producción y aplicación de las enzimas industriales. *Revista de biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. p 11
12. Carrillo L. (2003) *Microbiología Agrícola*. Universidad Nacional de Salta. ISBN 987-9381-16.
13. Cutler, D. F; K. L. Alvin and C. E. Price. (1982). *The Plant Cuticle*. Linnean Society Symposium Series. No. 10. New York, Academic Press.
14. Cruz Ruíz K. (2012) *Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banana*, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Minas, Escuela de Procesos y Energía Medellín, Colombia
15. De Vries, R., & Visser, J. (2001). *Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp 497-522.
16. Díaz G. (1997). *Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal*. *Veterinaria al día* 28-34.

17. Di Pietro A, Roncero, (2005). Temas de actualidad. *Fusarium oxysporum: un modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y humanos*. 37: 6-13
18. Dobson, (2011), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2° Edición, Irlanda, Pp. 785–791.
19. Durango Ballesteros E. (2008) *Producción de enzimas amilasa microbiana, mediante fermentación en estado líquido.*, Universidad Pontificia Bolivariana Centro De Investigaciones Montería – Cordoba.
20. Dussel P. E. (2002). *Territorio y competitividad en la agroindustria en México*. Editores Plaza y Valdes. México. Págs. 144.145
21. Fakhoury AM, Woloshuk CP (1999) *Amy1, the α -amylase gene of Aspergillusflavus: involvement in aflatoxin biosynthesis in maize kernels*. *Phytopathology* 89:908–914
22. Fakhoury AM, Woloshuk CP (2001) *Inhibition of growth of Aspergillusflavus and fungal α -amylases by a lectin-like protein from Lablab purpureus*. *Molecular Plant Microbiology Interact* 14:955–961
23. Fang, Qing-Jua. (2002) *Submerged fermentation of higher fungus Ganodermalucidum for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide*. *Biochemical Engineering Journal*. Volume 10, Issue 1, Pages 61–65
24. Facciotti, M.C.R., B.V. Kilikian, W. Schmidell and E.R. Fachini. (1989). *Glucoamylase synthesis in batch process by Aspergillusawamori: influence of pH and initial polysaccharide concentration*. *Rev. Microbiol.* 20: 108-114
25. García Cortéz V. (2004) *Introducción a la microbiología*. 2° Edición, Editorial estatal a distancia, San José, Costa Rica, pp. 85-88.
26. Gil Hernández A. (2010), *Tratado de Nutrición – Tomo II*, 2° Edición, Editorial Médica Panamericana. España. Pp. 185-186.
27. Gil, M. (2010) *Tratado de Nutrición- Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. 2° Edición. Madrid, editorial medicapanamericana.
28. Gupta R; Paresh G; Harapriya M; Vineet KG; Bhavna C. (2003) *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*. Vol 38. pp: 1599–1616.
29. Herrera C. (2003) *Química de alimentos: manual de laboratorio*. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Costa Rica. Pp. 13-15.
30. Hilz H; Williams P; Docob T; Scholsa A; Voragen G.J.. (2006). *Carbohydrate Polymers*. Vol. 65-4 pp. 521-528.
31. H.R. Cherry, (2004). *Extracellular glucoamylase from the isolate AspergillusFumigatus. Department of microbiology, University of Chittagong, Pakistan Journal of Biological Sciences*. Pp. 7-11.
32. Horn B.W. (2009). *The sexual state of Aspergillus parasiticus*. *Micologia*. vol. 101 no. 2 pp. 275-280.
33. Jiujiang Y, Cleveland T.E, Nierman W.C, Bennett J.W. (2005). *Aspergillusflavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases*. Volumen 22, Pp. 194–202.

34. Karbalaei, H. R., Ziaee, A., Schaller, J., & Amoozegar, M. A. (2007). *Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, Salinivibrio sp. strain AF-2004*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(2), 266–272.
35. Kimura A, Robyt J.F. (1995) *Reaction of enzymes with starch granules: kinetics and products of the reaction with glucoamylase*. Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Enzymology, Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State University, Ames.
36. Khoo S.L., A. Amirul, M. Kamaruzaman, N. Nazalan and M.N. Azizan (1994), *Purification and Characterization of α -Amylase from Aspergillus flavus*. School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11800 Minden, Penang Malaysia.
37. Leathers, T.D. (1993). *Substrate regulation and specificity of amylase from Aureobasidium strain NRRL Y-12,974*. *FEMS Microbiology Letters*. 110 pp. 217-222.
38. Lurá de Calafell M.C, González A.M, Basílisco J.C, Sarsotti Falcón P, Gómez R, Freyre L. (1997) *Introducción al estudio de la Micología*. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina. Pp. 13-15.
39. Mateo, J. M. (2005) *Prontuario de agricultura, cultivos agrícolas*. Madrid. Mundi-Prensa.
40. Matrai T, Mayera S, Kokai S & Salamon I (2000) *Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of Aspergillus flavus group and Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 187-191.
41. 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.
42. Moreno Martinez E. & Benavides Ocampo C. (1988). *Manual para la identificación de Hongos en granos y sus derivados*. Editorial de la Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 40-42.
43. Morton F.J. (1987). *Fruits of warm climates*. Editorial Media Incorporated. Miami, USA. Págs. 160-168.
44. Mussato SI, Rodrigues LR & Teixeira JA (2009) *B- fructoduranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized Aspergillus japonicus*. *J. Ind. Microbiology. Biotechnology*. 36: 923-928.
45. Oliveira J.R; Vieira A; Zaczuk B.P; Cordenunsi B; Mainardi A.; Purgatto E; Lajolo F.(2005) *Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening..* *Postharvest Biology and Technology*. p 41
46. Olusanjo A; Ngachi A; Ihuoma O. (2006) *Comparative studies on α -amylases from malted maize (Zea mays), Millet (Eleusinecoracana) and Sorghum*. *Carbohydrates Polymers Magazine*. P 72.
47. Ospina Machado J.E. (2002). *Características físico mecánicas y análisis de calidad de granos*. Unidad de Publicaciones de la facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia, 2002. Pp. 5 -19.
48. Pandey A; Soccol C.R; Larroche C. (2008). *Solid state fermentation for food and feed application*. Editorial Springer, Estados Unidos. Pp. 385-388.

49. Pasqualotto A.C. (2010) *Aspergillosis: From diagnosis to prevention*. Springer. Brasil. Pp. 346 - 354.
50. Peberdy JF (1993) *Protein secretion in Aspergillus: invertase as a model system*. J. Chem. Technol. Biotechnol. B- Biotechnol. 56: 216-217.
51. Petracek P.D., *Peel Morphology and fruit blemishes*. (1996). Citrus research education center, Florida department of Citrus. Estados Unidos .
52. Pradal, M. (2012). *Estudio y optimización de factores que afectan la producción de los sistemas pectinolítico y xilanolítico de Aspergillus flavus*. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
53. Pontón, J; Moragues, M; Gené, J; Guarro, J; Quindóz, G. (2002), *Revista Iberoamericana de Micología*. "El reino de los hongos" Bial-Aristegui Pp. 1 - 4.
54. Schuster R; Wenzig E.; Mersmann A. (1993). *Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation*. Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 39, Issue 2, pp 155-158
55. Sangeeta N; Banerjee R. (2009). *Characterization of amylase and protease produced by Aspergillus awamori in a single bioreactor*. Biotechnology Section, Applied Mechanics Department, Motilal Nehru National Institute of Technology, India. Agriculture and Food Engineering Department.
56. Reddy PP, Reddy GSN & Sulochana MB, (2010). *Highly thermostable β -fructofuranosidase from Aspergillus niger PSSF21 and its application in the synthesis of fructo-oligosaccharides from agroindustrial residue*. Asian Journal of Biotechnology 2(2): 86-98.
57. Rezende ST & Felix CR (1999) *Production and characterization of raffinose-hydrolysing and invertase activities of Aspergillus fumigatus*. Folia Microbiol. 44:191-195.
58. Salas M, Rodríguez M, Pérez N, Pérez R. (2005), *Amylase production by Aspergillus niger in submerged cultivation on two wastes from food industries*. Journal of Food Engineering 73 (2006) 93–100.
59. Schmidell, W., M.C.R. Facciotti, B.V. Kilikian, H. Aboutboul and J.M.Z. Aguero. (1988). *Influence of pH oscillations in amyloglucosidase production by Aspergillus awamori*. Rev. Microbiology. 19: 71-77.
60. Sinclair, B. Walton, Crandall. (1949). *Carbohydrate Fractions of Lemon Peel*. Plant Physiology. Pp. 681-705
61. Slaughter, S.L., Ellis, P.R., Butterworth, P.J., (2001). *An investigation of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and gelatinised starches*. Biochemistry. Biophysics. Acta 1525, 29–36.
62. Smith L. (1972) *Organic Chemistry*. Reinhold publishing corporation. Estados Unidos. Pp. 742-745.
63. Tanaka A, Yamaguchi J. (1972) *Dry matter production, yield components and grain yield of the maize plant*. Laboratory of plant Nutrition, Faculty of agriculture, Hokkaido Japón.
64. Taylor S. *Advances in Food and Nutrition Research*. (2004) Elsevier Inc. California, Estados Unidos. Volumen 48. Pp. 152-154.

65. Tripathi P; Leggio L; Mansfeld, J; Ulbrich-Hofmann, R; Kayastha, A. (2007) *Apha- amylase of mung bean (vignaradiata) correlation of biochemical properties and terciary structure by homology modelling..* Phytochemistry. p. 1623.
66. Woloshuk CP, Cavaletto JR, Cleveland TE (1997) *Inducers of aflatoxin biosynthesis from colonized maize kernels are generated by an amylase activity from Aspergillus flavus.* Phytopathology 87:164–169.
67. Ywassaki, L. A., & Canniatti-Brazaca, S. G. (2011). *Ascorbic acid and pectin in different sizes and parts of citric fruits.* Ciencia y Tecnología de Alimentos, 31(2), 319–326

Referencias electrónicas:

a) Biblioteca Digital de la Universidad de Chile, *Aplicación De Preparados Enzimáticos En Las Diferentes Industrias Alimentarias* [En línea] Disponible en:

http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/parte07/01.html
[Último acceso: 19-mayo-2013].

b) CADRE-GENOMES, *Genome of Aspergillus flavus*, 2013 [En línea]. Disponible en :http://www.cadre-genomes.org.uk/Aspergillus_flavus/UniSearch/Summary?species=Aspergillus%20flavus;idx=:q=amylase:genomic_unit=fungi [Último acceso: 27-mayo-2013]

c) Departamento de micología y parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Generalidades de micología-Urribarret.al. 2011
[En línea] disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>
[Último acceso: 02-octubre 2013]

d) Food and Agriculture Organization of the United Nations [En línea].
<http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s02.htm> [Último acceso: 20-diciembre-2013]