



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE XILANASAS DE *ASPERGILLUS
FLAVUS* EN SALVADO DE TRIGO**

TESIS

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

**PRESENTA
CLARA LUZ MARCELÍN LEYVA**

MÉXICO, CDMX

JUNIO, 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
Vocal	Aurora Irma Ortegón Ávila
Secretario	Gloria Díaz Ruiz
1er. Suplente	Norma Angélica Castellanos Chávez
2do. Suplente	Aleida Mina Cetina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología.

Laboratorio 312, Edificio de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA

Dr. Guillermo Aguilar Osorio _____

SUSTENTANTE

Clara Luz Marcelín Leyva _____

A mis papás y hermana,
a los que estuvieron antes
y a los que vienen después

AGRADECIMIENTOS

Mamá, por no dejarme perder nunca, ni siquiera contra mí misma; por ver, recordarme y alimentar mi luz . Papá por la paciencia y el esfuerzo para hacer de mí la mejor en lo que sea que decida, por mi libro de “Los cazadores de microbios” en 2006. A los dos por el apoyo incondicional de siempre.

Fer, por ser mi compañera y amiga desde 1998, por los fines de semana en el laboratorio y ser la mejor ayudante para las soluciones 1M.

Doctor Guillermo por la oportunidad de trabajar, aprender y crecer en el laboratorio. Por la paciencia y la comprensión.

Sergio, que después de un semestre de convivir 24/7 se convirtió en mi mejor amigo, mejor compañero y mejor público de innumerables tonterías. Allan: sin ti nunca hubiera logrado (o tal vez si, pero más lento), gracias por la ayuda y las hamburguesas que compartimos contra tu voluntad. Los quiero a los dos.

Pancho que con sarcasmo y humor me regresó muchas veces al camino de la tesis y la titulación, y me hizo a comprender que la perfección no debe llevarte a la procrastinación.

Dinath, la mejor compañera, amiga y equipo por 6 semestres en la universidad y que con un poco de suerte será para toda la vida. El ejemplo para toda la generación.

Pau, la mejor socia, excelente persona, la muestra de que con las personas menos esperadas se pueden lograr cosas maravillosas y que con amor y dedicación llegas lejos. Gracias por las porras y acompañarme en el camino. De aquí pa'lante.

Mario. Por el tiempo y la dedicación.

Alfonso, my dear shrink, who help me to understand and embrace my own madness.

Emil, mon Petit Prince. Gemeinsam werden wir die Welt essen.

Calú, si se pudo...

La presente investigación fue realizada con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM. Proyecto: "Identificación de enzimas degradadoras de polisacáridos producidas por cepas autóctonas del grupo flavi durante su crecimiento en sustratos complejos", clave IN219813.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) la beca recibida.

ÍNDICE

	Página
Lista de figuras	6
Lista de tablas	8
Lista de abreviaturas	8
1. Introducción	9
2. Antecedentes	
2.1 Hongos filamentosos	11
2.1.1 <i>Aspergillus</i>	12
2.1.1.1 <i>Aspergillus flavus</i>	12
2.2 Componentes de la pared celular de plantas	13
2.2.1 Lignocelulosa	14
2.2.2 Celulosa	14
2.2.3 Hemicelulosa y xilano	15
2.3 Enzimas degradadoras de pared celular	16
2.3.1 Xilanasas	17
2.4 Sustratos complejos	18
2.5 Regulación génica: represión e inducción	19
3. Planteamiento del problema	21
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	21
6. Estrategia experimental	24
7. Metodología	
7.1 Microorganismos	
7.1.1 Acondicionamiento de la cepa de <i>A. flavus</i> (CECT-2687), cosecha y conteo de esporas	25
7.2 Medios de cultivo: Condiciones de cultivo en medio líquido	26
7.2.1 Muestreo	26
7.3 Determinación de proteína: Método de Bradford	27
7.4 Determinación de actividad enzimática: actividad xilanolítica	27

7.5 Liofilización de los filtrados libres de células	28
7.6 Análisis electroforético	
7.6.1 Electroforesis SDS-PAGE	28
7.6.2 Determinación de peso molecular aproximado de las proteínas separadas por electroforesis	29
7.6.3 Zimogramas	29
8. Resultados y discusión	
8.1 Efecto del pH inicial y tipo de sustrato sobre el crecimiento de <i>A. flavus</i> y la producción de xilanasas.	30
8.2 Efecto de los azúcares simples sobre la inducción y/o represión de las xilanasas en cultivos de <i>A. flavus</i> (CECT-2687) con salvado de trigo.	38
9. Conclusiones	50
10. Perspectivas	51
11. Bibliografía	52

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Ciclo de vida y estructura de <i>A. nidulans</i> .	11
2	Representación esquemática comparativa de la morfología entre dos géneros de <i>Aspergillus</i> .	12
3	(A) Fotografía de una colonia de <i>A. flavus</i> en agar Sabouraud a 72 horas de incubación. (B) Crecimiento de <i>A. flavus</i> en maíz (Texas A&M University).	13
4	Estructura y composición de lignocelulosa a partir de residuo de materia orgánica	14
5	Estructura y composición de celulosa a partir de la pared celular vegetal.	15
6	Representación esquemática de xilanopiranosas.	16
7	Acción del complejo enzimático de la degradación de una cadena de xilano.	17
8	Representación esquemática del blanqueamiento de “pasta” de celulosa con xilanasas en la fabricación de papel.	18
9	Estructura de un grano de trigo.	19
10	Variación en la producción-consumo de azúcares (A y C) y producción de xilanansas (B y D) por <i>A. flavus</i> cepa CECT-2687, pH inicial 5, creciendo en sustratos solubles (A y B) y sustratos complejos (C y D).	32
11	Variación en la producción-consumo de azúcares (A y C) y producción de xilanansas (B y D) por <i>A. flavus</i> cepa NRRL-6541, pH inicial 5,	34

- creciendo en sustratos solubles (A y B) y sustratos complejos (C y D).
- 12** Variación en la producción-consumo de azúcares (A y C) y producción de xilanansas (B y D) por *A. flavus* cepa CECT-2687, pH inicial 7.5, creciendo en sustratos solubles (A y B) y sustratos complejos (C y D). 35
- 13** Variación en la producción-consumo de azúcares (A y C) y producción de xilanansas (B y D) por *A. flavus* cepa NRRL-6541, pH inicial 7.5, creciendo en sustratos solubles (A y B) y sustratos complejos (C y D). 36
- 14** Gel SDS-PAGE, perfil protéico de muestras de la cepa 2687, en condiciones de pH 5 (carriles 1 al 6) y pH 7.5 (carriles 7 al 12) con fuentes de carbono simples y complejas: glucosa (carriles 1 y 7), xilosa (carriles 2 y 8), ácido galacturónico (carriles 3 y 9), xilano (carriles 4 y 10), salvado de trigo (carriles 5 y 11), olote de maíz (carriles 6 y 12). 37
- 15** Variación en la concentración de azúcares reductores en la fermentación de matraces con adiciones de glucosa (A) y xilosa (B) durante 96 h. 40
- 16** Variación en la concentración de azúcares reductores en la fermentación de matraces con sacarosa en combinación con un azúcar simple durante 96 h. 42
- 17** Variación en la actividad enzimática específica en fermentaciones con adiciones de glucosa (A) y xilosa (B) durante 96 h. 45
- 18** (A) Gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida para la determinación del peso molecular de proteínas. (B) Zimograma para la determinación de la actividad xilanólítica en los filtrados enzimáticos: carril 1, salvado; carril 2, salvado+glucosa t0; carril 3, salvado+glucosa t24; carril 4, salvado+glucosa t24, 48 y 72; carril 5, sacarosa+glucosa; carril 6, salvado+xilosa t0; carril 7, salvado+xilosa t24; carril 8, salvado+xilosa t24, 48 y 72; carril 9, sacarosa+xilosa. 48

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Composición porcentual de sales en medio mínimo.	26
2	Composición de los matraces.	26
3	Reactivos empleados para medir actividad xilanolítica.	28

Lista de Abreviaturas

°C	Grado Celsius	mL	Mililitros
% m/v	Porcentaje masa/volumen	µL	Microlitros
% v/v	Porcentaje volumen/volumen	mm	Milímetros
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo	MM	Medio mínimo
Cm	Centímetros	mM	Concentración micromolar
DNS	Ácido 3, 5-dinitrosalicílico	mmol	Milimoles
kDa	Kilodaltones	nm	Nanómetros
M	Concentración molar	NRRL	Northern Regional Research Lab
mbar	Milibares	pH	Potencial de hidrógeno
min	Minutos	rpm	Revoluciones por minuto

1. Introducción

El género *Aspergillus* lo conforman más de 300 especies distribuidas en todo el mundo. Algunas de estas especies son patógenos de humanos y animales, otras son mohos saprofiticos que pueden encontrarse en ambientes extremos u oligotrópicos (Frisvad y Larsen, 2016).

Estas especies secretan diversas enzimas degradadoras que les permiten obtener el carbono y la energía necesarios para su ciclo celular a partir de polímeros como xilano, pectinas, poligalacturonanos, entre otros (Bennet, 2010). Así, especies del género *Aspergillus* son ampliamente utilizadas en diversos procesos industriales para elaborar productos como ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos y alimentos fermentados de varios tipos, por ejemplo para la obtención de ácido cítrico, celulosas, penicilina y salsa de soya, respectivamente. Estos últimos productos están clasificados como GRAS (Generally Regarded As Safe, por sus siglas en inglés), por lo que su aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos es posible (Villena y Gutiérrez-Correa, 2003).

El xilano es un polímero muy abundante en la naturaleza y para su degradación se requiere de la acción de un sistema enzimático, compuesto principalmente por xilanasas y los productos de la hidrólisis son azúcares más simples como la xilosa. Algunos ejemplos de estas enzimas producidas por hongos y bacterias son la β -1,4-endoxilanasas y β -xilosidasas. También se consideran en este grupo la α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, acetilxilanoesterasas y feruloilesterasas (Amaike, 2011). Las aplicaciones industriales y comerciales de las xilanasas incluyen el tratamiento de desechos agroindustriales, la clarificación de jugos, la extracción de café, aceites esenciales y almidón, el mejoramiento de productos de la industria panificadora, el pretratamiento de forrajes para ganado, la producción de biocombustibles y blanqueamiento de pulpa para papel (De Alencar et al., 2013).

Sin embargo, algunas cepas de *Aspergillus*, además de generar enzimas de importancia económica, producen metabolitos secundarios tóxicos. Tal es el caso de

Aspergillus flavus, un microorganismo conocido especialmente por su capacidad para producir diversas micotoxinas de tipo aflatoxinas. Este hongo saprófito es capaz de infectar plantas en desarrollo, cultivos de algodón, aguacate, cereales (maíz y trigo), etc., provocando pérdidas económicas importantes (se estima que las pérdidas anuales por contaminación de alimentos con aflatoxinas en los EEUU ascienden a 270 millones de dólares) (Georgianna y Payne, 2009), además de que representa serios problemas de salud debido al carácter carcinogénico y teratogénico de estos metabolitos. Así, más de 100 países en todo el mundo han establecido límites muy rigurosos en el contenido de aflatoxinas en alimentos y materias primas (Amaike, 2011).

El presente trabajo de investigación busca evaluar la producción de enzimas xilanolíticas por la cepa toxigénica del hongo *A. flavus* CECT-2687, con la finalidad de comprender y establecer la forma en la que estas enzimas participan en los procesos de colonización de plantas como el maíz. Así, se determinarán las condiciones más adecuadas de cultivo para cepas de *A. flavus* que permitan la producción de enzimas, además de que se espera que con el uso de sustratos complejos ricos en polímeros de xilano, se observe la actividad enzimática que permita establecer la relación entre la presencia y variedad enzimática con el potencial degradativo y de virulencia de la cepa de estudio.

2. Antecedentes

2.1 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariontes, heterótrofos, aerobios y morfológicamente complejos. La mayoría de estos crece entre 0 y 55 °C, con una temperatura óptima entre 20 y 30 °C (Bonifaz, 2009), y presentan diferentes formas de crecimiento a lo largo de su ciclo de vida, comenzando con una estructura básica vegetativa llamada espora. Por otra parte, la mayoría de los hongos son organismos multicelulares y forman una red de filamentos llamada hifa, compuesta por células tubulares septadas (*Figura 1*). La hifa, que es la parte del hongo en la que se lleva a cabo el intercambio de sustancias con el ambiente, crece y se ramifica formando masas de hifas (micelio). Dependiendo de las condiciones de crecimiento, algunas especies de hongos filamentosos pueden crecer como células independientes o como micelio. A partir de este último, las ramas de hifas pueden alcanzar el aire por encima de la superficie, y después de un periodo vegetativo, el crecimiento continúa con la reproducción que se lleva a cabo por medio de la formación de esporas asexuales, es decir, que su formación no implica la fusión de los gametos o meiosis, en un área llamada conidio (Smith, 1994). A menudo las hifas están pigmentadas de color negro, verde, azul, rojo, amarillo o marrón. Los conidios dan al micelio el aspecto polvoriento y facilitan la dispersión del hongo a nuevos hábitats.

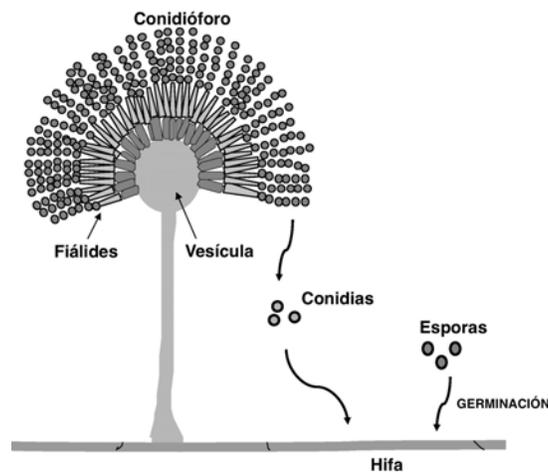


Figura 1. Ciclo de vida y estructura de *Aspergillus nidulans* (Adaptado de google.com, búsqueda “*Aspergillus life cycle*”).

Los hongos se alimentan mediante la secreción de enzimas extracelulares para digerir materiales orgánicos complejos, tales como polisacáridos o proteínas, convirtiéndolos en azúcares, péptidos, aminoácidos, y así sucesivamente, asimilados como fuentes de carbono y energía (Madigan et. al., 2012).

2.1.1 *Aspergillus*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez por P. Micheli en 1729 (Amaike, 2011). Este grupo de saprófitos ascomicetos está compuesto por más de 300 especies que incluyen a las especies *A. niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus* (Figura 2), por mencionar tres de las más importantes. Estos hongos crecen por medio de la extensión de hifas que se ramifican sub-apicalmente para formar el micelio, indispensable para cubrir superficies y maximizar la eficiencia en la obtención de nutrimentos (Culleton et al., 2013).

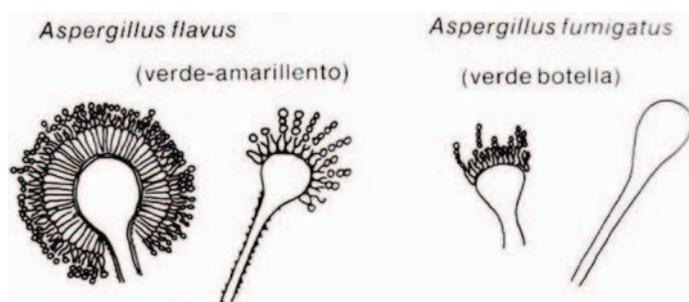


Figura 2. Representación esquemática comparativa de la morfología entre dos géneros de *Aspergillus* (*flavus* y *fumigatus*) (Adaptado de telmeds.org).

Una de las principales características macroscópicas para la identificación de los grupos de *Aspergillus* es el color ya que poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro (Carrillo, 2003). En agricultura, algunas especies de *Aspergillus* son un serio problema debido a su participación en el deterioro de cultivos y granos de almacenamiento, actuando como patógeno oportunista (Bennett, 2010).

2.1.1.1 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus es una especie saprófita de colonias color verde oliva con micelio blanco, de textura lanosa y aterciopelada (Figura 3). Esta especie es un patógeno oportunista que infecta diferentes cultivos agrícolas como maíz, algodón,

cacahuete, nuez y jitomate. Como contaminante de granos almacenados, *A. flavus*, produce aflatoxinas que son compuestos naturales tóxicos y hepatocarcinogénicos que disminuyen el valor nutritivo de los cultivos (*Figura 4*) y representan un gran riesgo para la salud humana y del ganado (Mellon y Cotty, 2004).



Figura 3. (A) Fotografía de una colonia de *A. flavus* en agar Sabouraud a 72 horas de incubación. (B) Crecimiento de *A. flavus* en maíz (Texas A&M University, 2016).

El descubrimiento de las aflatoxinas en la década de 1960 generó una conciencia sobre la amenaza que este hongo representaba en la alimentación. Las aflatoxinas son aún reconocidas como las micotoxinas más importantes, afortunadamente son de distribución quimiotaconómica restringida, es decir que, sólo son sintetizadas por algunas especies de *Aspergillus*, siendo *A. flavus* el principal productor (Rodríguez et al., 2007; Bennett, 2010).

2.2 Componentes de la pared celular de plantas

Generalmente, la materia orgánica que sirve como sustrato para el crecimiento de las cepas de *A. flavus* se compone de moléculas complejas. Estas moléculas son degradadas por una mezcla enzimática secretada, además de que la acción de este complejo enzimático también desempeña un papel muy importante en el proceso fitopatogénico del hongo. Los principales polisacáridos estructurales de la pared celular de vegetales son celulosa, hemicelulosa y pectina.

2.2.1 Lignocelulosa

La lignocelulosa es el componente principal de las plantas y del material vegetal en descomposición, además de ser la fuente más abundante de biomasa para la producción de biocombustibles como el etanol (Tuomela et al., 2000). Está compuesta por tres polímeros orgánicos diferentes: hemicelulosa, celulosa y lignina. Como se observa en la *Figura 4*, la lignina protege las fibras de celulosa y hemicelulosa con un arreglo irregular de polímeros de fenilpropano que resiste la degradación química o enzimática. Así, el uso de materiales lignocelulósicos se ve obstaculizado por la lignina, la cual limita la accesibilidad de las enzimas para la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa.

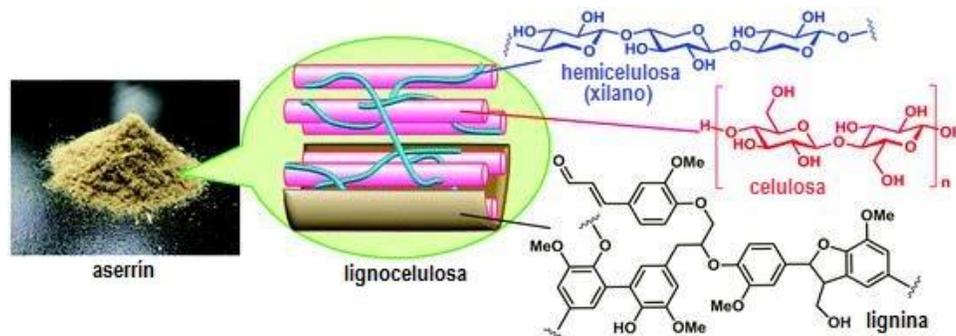


Figura 4. Composición de la lignocelulosa vegetal (Adaptado de Kobayashi y Fukuoka, 2013).

2.2.2 Celulosa

La celulosa es el polisacárido más abundante y principal fuente de azúcares utilizables en la naturaleza. Está constituida generalmente por 300-1700 unidades de glucosa, pero puede llegar hasta las 10,000 en algunos tejidos vegetales. Estas unidades están unidas por enlaces glicosídicos β -1,4 (*Figura 5*). La unión de cientos de unidades de este polímero forma las cadenas llamadas microfibras, las cuales se agrupan para formar las fibras elementales que forman la celulosa. Dependiendo del arreglo de las mismas, las fibras de celulosa presentan regiones denominadas cristalinas (arreglo ordenado de las fibras) y amorfas (arreglo desordenado de las fibras); estas últimas son las regiones más susceptibles a la hidrólisis enzimática (Cullen y Kersten, 1992; Pérez, et al., 2002). La hidrólisis completa de la celulosa nativa requiere la acción conjunta de múltiples enzimas con distintas especificidades de sustrato.

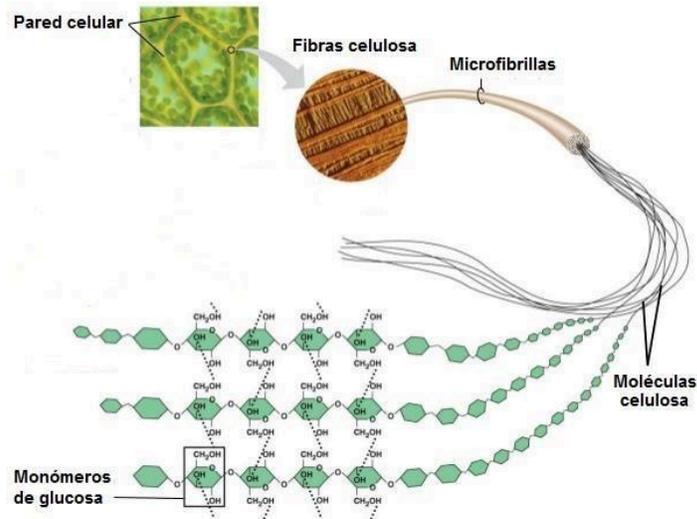


Figura 5. Estructura y composición de la celulosa de la pared celular vegetal.

2.2.3 Hemicelulosa y xilano

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza y que está asociado a las fibras de celulosa y de lignina (Collins et al., 2005). La hemicelulosa puede llegar a representar hasta el 35% del peso seco de las plantas superiores, y su función principal es aglutinar las fibras cristalinas de celulosa, dando consistencia a la pared celular (Paz-Lago y Hernández, 2000). Por lo general, la hemicelulosa se clasifica de acuerdo al azúcar residual más abundante en el polímero, siendo el xilano el principal (Figura 6). El xilano está compuesto por unidades lineales de β -xilopiranosil unidos por enlaces β 1-4 xilosídicos. Las unidades de xilosa (entre 150 y 200) que constituyen el polímero presentan ramificaciones que consisten de unidades de otros azúcares como la manosa, arabinosa, galactosa, glucosa y ácidos glucorónicos (Arce, 2012).

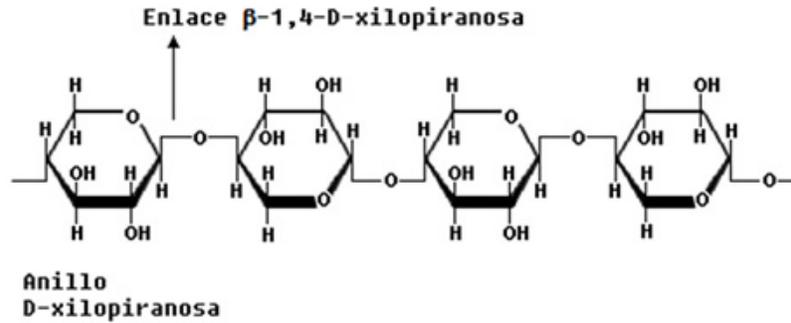


Figura 6. Representación esquemática de xilopiranosas unidas por enlaces β -1,4 para formar una cadena de xilano (Robledo, et. al., 2009).

Aproximadamente una de cada diez moléculas de xilosa en la cadena tiene una sustitución en el carbono 2, en la que se une un residuo de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico por medio de un enlace α -1,2. Cerca del 70% de las xilosas están acetiladas en el C2, C3 o ambos. La presencia de los grupos acetilo favorece la solubilidad parcial del xilano en agua. Además, una proporción de las unidades de arabinosa de las cadenas laterales de los xilanos está esterificada con ácidos *p*-cumárico y ferúlico, y le permite establecer enlaces con las cadenas de lignina (Khandeparkar y Bhosle, 2006).

2.3 Enzimas degradadoras de pared celular (EDPC)

Las cepas de *A. flavus* producen grandes cantidades de enzimas como amilasas, pectinasas, celulasas, proteasas y xilanasas (Figura 7), las cuales le permiten penetrar e invadir fácilmente los cultivos en los que crece. La habilidad para producir esta variedad de enzimas útiles para degradar compuestos orgánicos complejos, hace a la especie *A. flavus* un organismo muy versátil y de posible aplicación biotecnológica en diferentes procesos que involucren la transformación de polímeros vegetales en azúcares fermentables o biocombustibles.

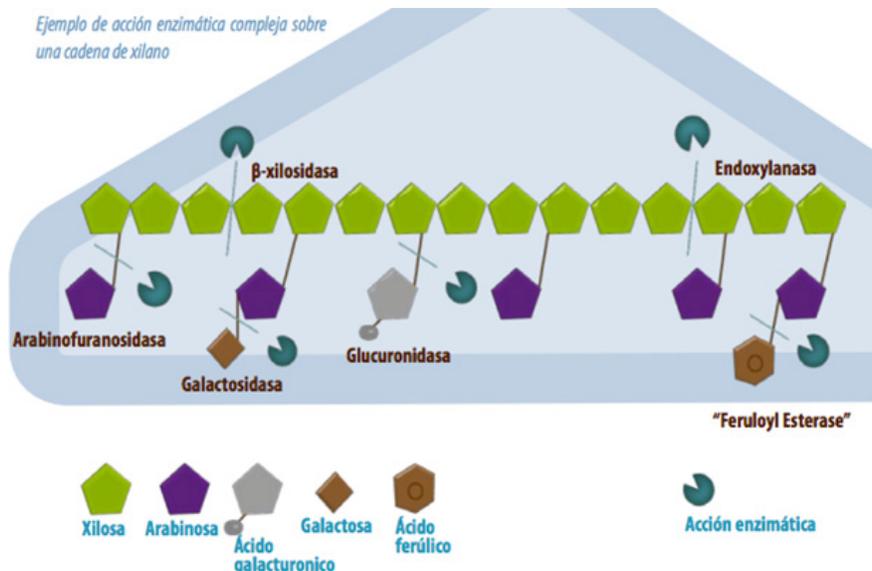


Figura 7. Acción del complejo enzimático en la degradación de una cadena de xilano (Avinews, 2014).

2.3.1 Xilanasas

La biodegradación del esqueleto de xilano depende de diferentes enzimas llamadas xilanasas. Se ha descrito que estas son producidas por hongos, bacterias, levaduras, algas marinas, insectos, semillas, etc. y se pueden clasificar como:

- endo- β -D-xilanasas: hidroliza principalmente cadenas de xilano liberando oligosacáridos más pequeños.
- β -xilosidasas: degrada los fragmentos de xilano a xilosa.
- α -glucuronidasas: remueve cadenas laterales de ácido D-glucurónico.
- Arabinofuranosidasas: remueve cadenas laterales de L-arabinosa.

La acción cooperativa de las endoxilanasas favorece la hidrólisis de los enlaces β -1,4 internos del xilano para generar oligómeros (dímeros y monómeros de xilosa). Cabe destacar que las endoxilanasas no hidrolizan el xilano de forma aleatoria, como sucede durante en la hidrólisis de la celulosa por las endoglucanasas, sino en sitios específicos donde existen ramificaciones ó ciertos azúcares. Los oligómeros ramificados y dímeros generados por la acción de las endoxilanasas son rápidamente hidrolizados a su vez por otras enzimas como las xilosidasas, acetil esterases, glucuronidasas, arabinofuranosidasas, galactosidasas, entre otras, para liberar azúcares como la xilosa, ácido glucurónico, arabinosa y galactosa, respectivamente (Arce, 2012).

Las aplicaciones industriales de las enzimas xilanolíticas son variadas y de gran importancia. Por ejemplo, y como se ilustra en la *Figura 8*, las xilanasas libres de celulasa permiten el bioblanqueamiento del papel y la pulpa, reduciendo la cantidad de químicos blanqueadores como el cloro (Bennett, 2010). Otra importante aplicación la encontramos en la industria de la panificación, ya que estas enzimas solubilizan la fracción de arabinoxilano en la masa, permitiendo el aumento de volumen del pan, mejorando así la calidad de la masa (Bhat, 2000; De Vries y Visser, 2001).

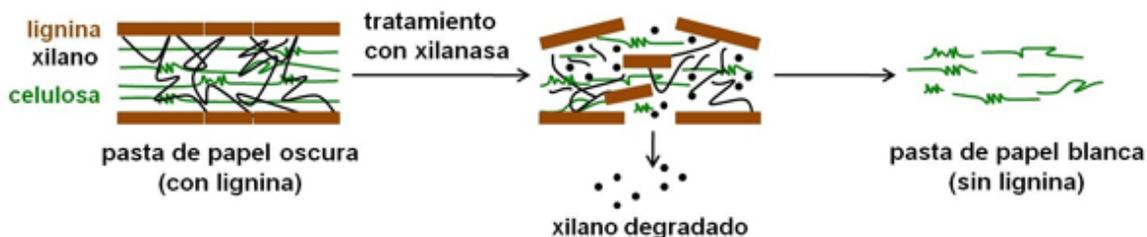


Figura 8. Representación esquemática del bio-blanqueamiento de “pasta” de celulosa con xilanasas en la fabricación de papel. (Luengo y Bañares, 2010).

2.4 Sustratos complejos:

Los residuos orgánicos industriales que no han sufrido modificaciones o alteraciones en su estructura se denominan sustratos complejos. Ejemplos de éstos son la cáscara de diferentes frutas, el salvado de granos como el trigo o el mijo y olote de maíz, entre otros. Los hongos filamentosos, como *A. flavus*, pueden utilizar estos sustratos como nutrientes por lo que la evaluación detallada de la capacidad y el potencial que tienen estos organismos para degradarlos, además conocer el tipo de enzimas que producen, resulta un área de investigación importante (Castañeda, 2013). El salvado es uno de los principales subproductos que se obtiene a partir de la molienda del grano de trigo (*Triticum vulgare*, *Figura 9*). Este subproducto proviene de las cinco capas externas del grano: una primera capa exterior envuelta o cutícula, la segunda o epicarpio, la tercera o endocarpio, la cuarta capa denominada testa y la quinta, denominada aleurona.

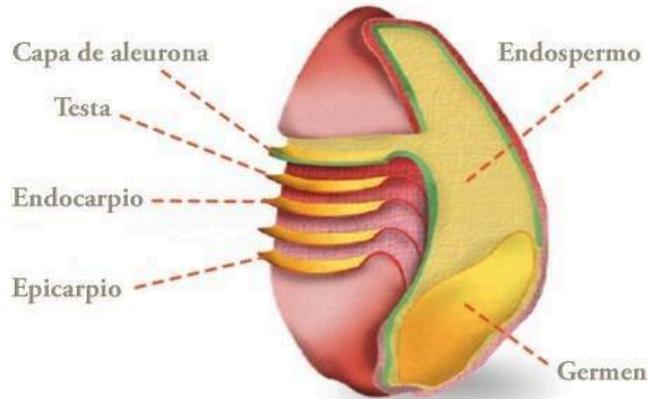


Figura 9. Estructura de un grano de trigo (Asociación Española de Fabricantes de Cereales, 2009, adaptación).

Los principales constituyentes del salvado de trigo son polisacáridos no amiláceos (arabinoxilanos), almidón (10-20%), proteínas (15-22%) y lignina (4 a 8%) (Zhang, 2011). Su producción llega a ser de hasta 11 millones de toneladas por año en Estados Unidos (Perlack, et al, 2005) y de 170 millones de toneladas a nivel mundial (Sánchez, 2009). En México la cantidad anual de esquilmos provenientes del trigo es de alrededor de 4,500,000 toneladas (Muñoz, 2012). Por su alto contenido de nutrientes, así como su estructura física, el salvado de trigo representa un medio de cultivo ideal para el crecimiento de *A. flavus* (López et al, 2004).

2.5 Regulación génica: represión e inducción

Algunas proteínas (enzimas) y moléculas de RNA se necesitan, en las células en general, en concentraciones constantes. Estas moléculas son constitutivas y su expresión es independiente de las condiciones de crecimiento. Por otra parte, numerosas macromoléculas son sintetizadas hasta que las condiciones del medio lo requieran (no constitutivas). Por ejemplo, en algunas bacterias, las enzimas degradadoras de lactosa se sintetizan únicamente si en el medio hay lactosa disponible. Dado que en el genoma de los microorganismos se codifican genes para ambos tipos de moléculas, el proceso de regulación de la expresión de estos genes es crítico en términos de optimización de energía y recursos metabólicos (Madigan et. al., 2012).

A menudo, las enzimas que catalizan la síntesis de un producto específico no se producen si el compuesto se encuentra presente en el medio en una concentración suficiente para la célula. Este proceso se denomina represión enzimática y un ejemplo de este fenómeno es la represión por carbono en el género *Aspergillus*. Los hongos de este género, como muchos otros microorganismos, ajustan su catabolismo del carbono a las condiciones predominantes en que se encuentren; los carbohidratos fácilmente metabolizables reprimen la síntesis de enzimas relacionadas con el catabolismo de fuentes alternativas de carbono (Ruijter y Visser, 1997). Así, esta represión conlleva a dos beneficios fisiológicos: el primero resulta en la utilización más favorable de las fuentes de carbono; el segundo, se limita la síntesis innecesaria de elementos para metabolizar otras fuentes cuando no se requieren. A pesar de que la represión puede ser producida por varias fuentes de carbono, la glucosa es probablemente la más represiva y aquella con la cual se han conducido la mayoría de los experimentos acerca de la represión por carbono; se ha demostrado que en presencia de glucosa los microorganismos suelen reprimir un gran número de genes y por lo tanto la síntesis de múltiples enzimas (Pradal, 2012).

Los genes que pueden ser regulados por represión por carbono en *Aspergillus* se dividen en tres grupos:

- El primer grupo son los genes que codifican para proteínas que metabolizan fuentes de carbono de difícil asimilación, es decir, dichas enzimas permiten la degradación de fuentes poliméricas de carbono para poder entrar a la vía glucolítica, como hexosas fosfato, y ser metabolizadas del mismo modo que la glucosa (la mayoría de estos sistemas enzimáticos están involucrados en la degradación de polisacáridos como la celulosa, la pectina, el xilano y el arabano) (Ruijter y Visser, 1997).
- El segundo grupo corresponde a los genes que codifican para enzimas de los ciclos de la gluconeogénesis y del glioxalato. Los genes *fbp1* y *pck1* codifican para las dos enzimas exclusivas de la gluconeogénesis: la fructosabisfosfatasa (FBP1) y la PEPcarboxicinasa (PCK1). Estas enzimas no participan en la glucólisis y por tanto marcan pasos irreversibles de la gluconeogénesis; la represión de estos genes en

presencia de glucosa evita que la gluconeogénesis y la glucólisis ocurran de forma simultánea.

- El tercer grupo de genes sujetos a represión por carbono se relaciona con el metabolismo secundario. El sistema que mejor lo ejemplifica es la producción de penicilina por *A. nidulans*. A pesar de que la razón fisiológica por la cual la represión por carbono es capaz de influir en la producción del antibiótico aún no es clara, se ha comprobado que la regulación sucede a nivel transcripcional (Ruijter y Visser, 1997).

Por otra parte, en la inducción enzimática se favorece la síntesis de ciertas enzimas por la presencia de un sustrato específico en el medio. Mientras que la represión influye directamente a nivel anabólico, la inducción afecta la producción de enzimas degradativas, es decir, a nivel catabólico. Una enzima inducible es aquella que normalmente se encuentra ausente en la célula o presente sólo en niveles muy bajos, pero es sintetizada en cantidades considerables en respuesta a un inductor, es decir, una enzima no constitutiva (Madigan et. al., 2012).

El catabolismo de los distintos compuestos utilizados como fuente de energía en *Aspergillus*, además de verse regulado por la represión por carbono, es controlado por sistemas específicos de inducción (Dzikowska, et al., 2002). Este fenómeno también puede llevarse a cabo por la acción de proteínas reguladoras de los genes que codifican para enzimas degradadoras, principalmente de la pared celular, o bien de otras fuentes de carbono difícilmente asimilables. Los genes inducibles se encuentran altamente regulados y son capaces de activarse de forma rápida y específica en respuesta a los estímulos y, además, una vez que el estímulo es removido o se agota, regresan rápidamente a su estado basal (Weake y Workman, 2010).

Para el caso específico de las enzimas degradadoras de xilano, se ha reportado que en *A. niger*, el gen regulador del tipo dedos de zinc (zinc fingers) *xlnR* se une al DNA y actúa como el activador de la transcripción requerido para la inducción de genes que codifican para enzimas de la vía xilanólítica (Lockington, et al., 2002; De Vries, 2003).

Trabajos previos sobre algunas especies del género *Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. niger* y *A. tubigensis*) han demostrado la presencia del gen implicado en la regulación de la expresión genética de xilanasas. Finalmente se ha establecido que la regulación genética de xilanasas está conservada en las tres especies antes mencionadas y se intuye que también debe estarlo en el resto de los hongos con funciones xilanolíticas, por ejemplo *A. flavus*. Existe mucha información generada respecto a las fuentes de carbono capaces de inducir estas enzimas. En muchas de las fuentes consultadas se concluye que tanto el xilano como la D-xilosa, son fuertes inductores de la expresión de xilanasas (Hrmová, 1991; Lockington, et al., 2002; De Vries, 2003). En cuanto a otros carbohidratos, se han realizado experimentos para la expresión de xilanasas empleando L-arabinosa y homodisacáridos de xilosa (xilobiosas), encontrando niveles de actividad particularmente altos en aquéllos con uniones β -1,2; y, por supuesto, con fuentes de carbono complejas, como partes de plantas y desechos agroindustriales que en realidad generan diferentes familias de enzimas degradadoras de pared celular (Pradal, 2012).

3. Planteamiento del problema

Diversos estudios han demostrado la relación entre la presencia y la variedad enzimática con el potencial degradativo de sustratos complejos y de virulencia de cepas del género *Aspergillus* (Cleveland y Cotty, 1991). Sin embargo, la forma en que estas enzimas participan en los procesos de colonización de plantas como el maíz, trigo y algodón es todavía ambiguo (Woloshuk et al., 1997). Así, el presente trabajo pretende evaluar la producción de enzimas xilanolíticas por *A. flavus* (cepa CECT-2687) en un medio de fermentación líquido enriquecido con salvado de trigo (sustrato complejo) y la identificación de los perfiles enzimáticos mediante análisis electroforéticos y zimográficos.

4. Hipótesis

El hongo *A. flavus* es capaz de crecer en sustratos complejos y producir enzimas, por ejemplo xilanasas, que degraden los componentes del medio como el xilano.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

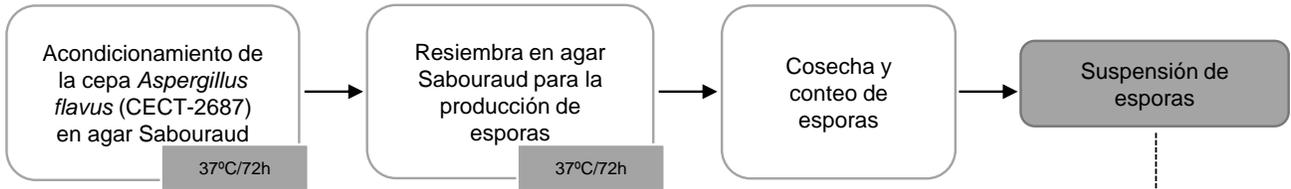
Identificar las enzimas xilanolíticas producidas por *A. flavus* cepa CECT-2687 bajo diferentes condiciones de cultivo.

5.2 Objetivos particulares

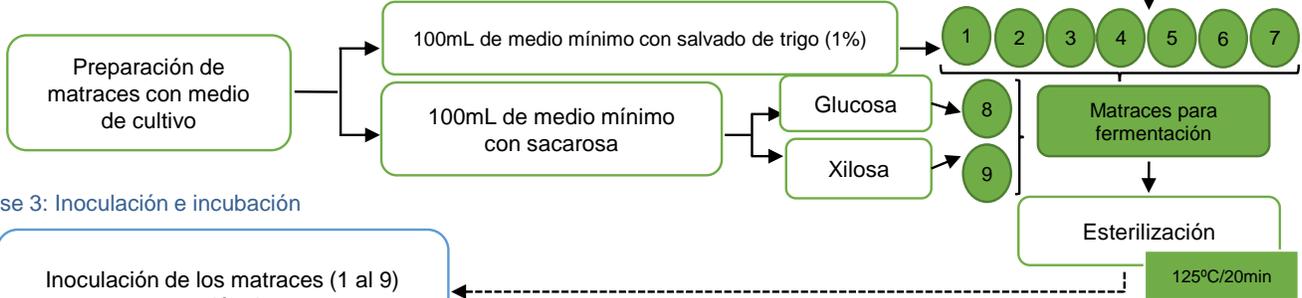
- Evaluar el efecto del salvado de trigo sobre la producción de xilanasas en *A. flavus* cepa CECT-2687.
- Analizar el efecto de la adición de azúcares simples (glucosa y xilosa) sobre la inducción o represión catabólica (enzimas xilanolíticas) a diferentes tiempos de fermentación.

6. Estrategia experimental

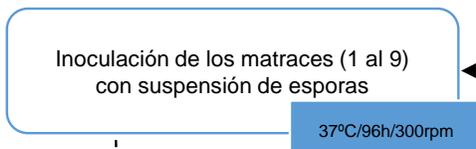
Fase 1: Microorganismos



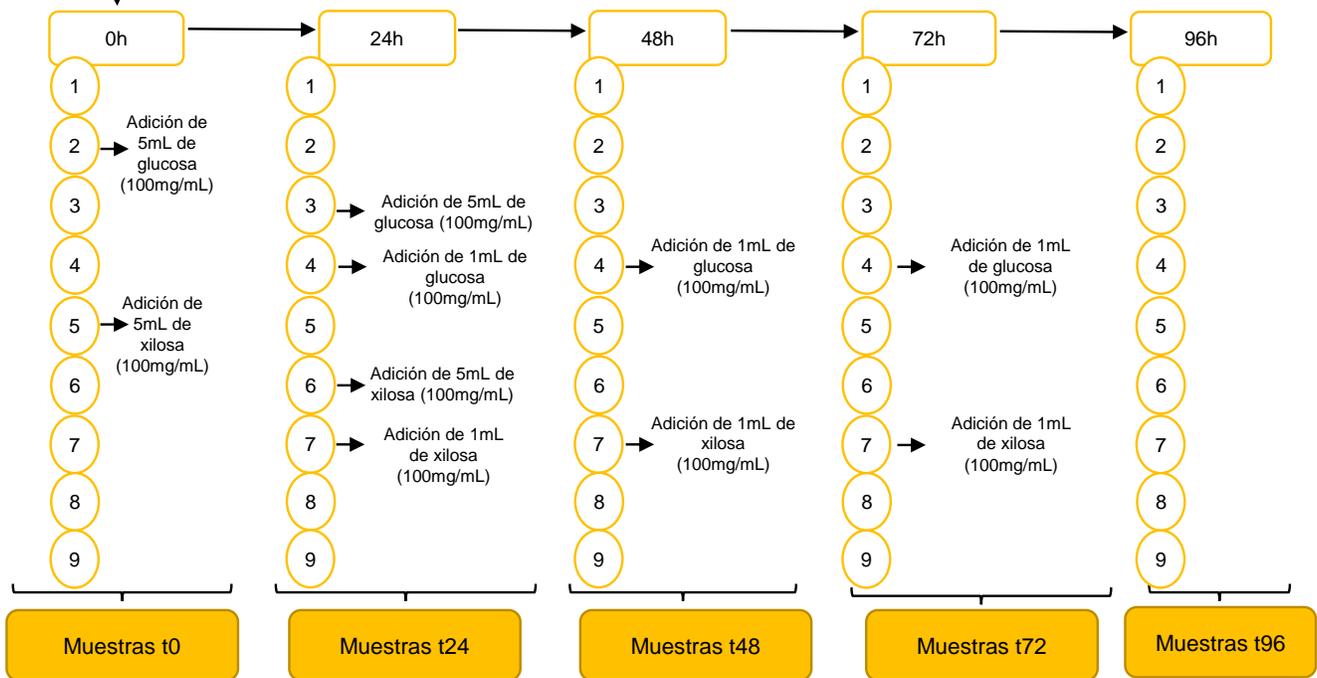
Fase 2: Medios de cultivo



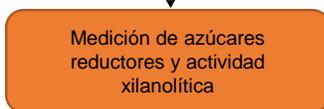
Fase 3: Inoculación e incubación



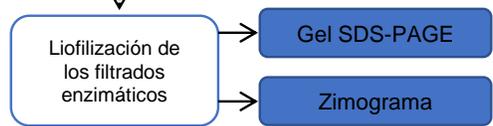
Fase 4: Toma de muestra y adición de azúcares simples



Fase 5: Análisis de muestras



Fase 6: Análisis electroforético



7. Metodología

7.1 Microorganismos

7.1.1 Acondicionamiento de la cepa de *A. flavus* (CECT-2687), cosecha y conteo de esporas

El acondicionamiento del organismo fúngico se realizó a partir perlas de sílice con esporas desecadas las cuales fueron depositadas sobre cajas de Petri con agar Sabouraud, y se incubaron a 37 °C durante 72 horas. Una vez detectado crecimiento, se sembraron por picadura cajas de Petri frescas con agar Sabouraud y se incubaron bajo las mismas condiciones.

La cosecha de las esporas viables se realizó sobre solución salina isotónica (0.9% m/v) con Tween 80 (0.005% m/v). En primer lugar se vertieron 10 mL de la solución salina estéril en cada una de las cajas y se desprendieron las esporas con ayuda de un asa Drigalsky. Posteriormente se transfirió la suspensión en tubos para centrifuga de 15 mL y se realizaron una serie de lavados (seis) en la centrifuga a 1500 rpm durante 6min con solución salina limpia. A continuación se determinó la concentración de esporas en la suspensión final mediante el método de conteo directo en cámara de Neubauer. Para ello se realizó una dilución 1:200 de la suspensión previamente homogenizada y se tomó una alícuota de 20 µL de la dilución la cual fue colocada en el centro de la cámara. Las esporas contenidas en los cuadrantes 1 y 3 de la cámara fueron cuantificadas en el microscopio con el objetivo de 40x. La concentración final de esporas (9.14×10^8 esporas/mL de suspensión) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{no. de esporas}}{\text{mL suspensión}} = (X \text{ esporas contadas})(4)(2500)$$

dónde **X** es el promedio de esporas, **4** es el número de cuadrantes en la cámara y **2500** es el factor de corrección estandarizado de la cámara.

7.2 Medios de cultivo: Condiciones de cultivo en medio líquido

Se prepararon 9 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio mínimo (MM) (*Tabla 1*) y 1% m/v de la fuente de carbono seleccionada. Se inocularon con 110 μL de la suspensión de esporas para tener concentración final de 1×10^6 esporas/mL de medio. Los matraces fueron incubados a 37 °C por 96 horas en un agitador orbital a 300 rpm para favorecer la aireación y homogenización del cultivo. Posteriormente, y como se indica en la *Tabla 2* y en la fase 2 del esquema de la estrategia experimental, se añadieron 5 mL del azúcar de prueba a los matraces de adición única (t0 y t24) o 1 mL a los matraces de triple adición (t24, t48, t72), a los diferentes tiempos de la fermentación.

Tabla 1. Composición del medio mínimo (Pontecorvo, 1953).

<i>Sal</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
<i>NaNO₃</i>	6.0
<i>KH₂PO₄</i>	1.5
<i>KCl</i>	0.5
<i>MgSO₄-7H₂O</i>	0.5
<i>Fuente de carbono</i>	10.0

Tabla 2. Composición de los matraces.

<i>Matraz</i>	<i>Fuente de carbono (1% m/v)</i>	<i>Carbohidrato</i>	<i>Tiempo de adición (h)</i>
1		-	-
2	MM + salvado de trigo	glucosa	0
3			24
4			24, 48, 72
5			0
6		xilosa	24
7			24, 48, 72
8			0
9	MM	sacarosa y glucosa	0
	MM	sacarosa y xilosa	0

7.2.1 Muestreo

Para cada matraz, se tomaron alícuotas de 6 mL del medio de fermentación cada 24 horas bajo condiciones de esterilidad. Posteriormente, se determinó el pH de

cada muestra, se filtraron en equipo Millipore con algodón y las soluciones resultantes se almacenaron a 4 °C. En el caso de los matraces enriquecidos con los carbohidratos, se tomaron muestras antes y después de la adición. Al término de la fermentación (96 horas) se almacenaron a 4 °C los 50 mL restantes de cada matraz, también filtrados en equipo Millipore con algodón para utilizarlos en el análisis electroforético posteriormente.

7.3 Determinación de proteína: método de Bradford

Se preparó una solución stock de albúmina (0.1 mg/mL) para realizar la curva de calibración con un rango de concentración de 0 a 0.7 mg de proteína/mL. Para determinar la concentración de proteína en las muestras problema, se añadieron 0.1 mL de muestra en cada pozo y se adicionaron 0.2 mL de reactivo de Bradford en microplacas de 96 pozos. Después de 5 min de reacción, se midió absorbancia en un lector de microplacas a 595 nm.

7.4 Determinación de actividad enzimática: actividad xilanolítica

La actividad xilanolítica de las enzimas producidas por *A. flavus* bajo las diferentes condiciones de estudio, se determinó a partir de las muestras colectadas en el inciso 7.2.1. Para ello, en primer lugar se realizó la cuantificación de grupos reductores liberados por la acción de las enzimas en un sustrato complejo (xilano de abedul) y empleando una curva de calibración de xilosa. Para cada muestra problema (100 µL), se añadieron en tubos de ensayo de 16×150 mm los reactivos indicados en la Tabla 3. Una vez adicionado el filtrado al medio de reacción, se incubaron inmediatamente los tubos durante 20 min a 50 °C. La reacción se detuvo al agregar 1.0 mL de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS). Posteriormente, los tubos de reacción se sometieron a ebullición en baño María durante 5min y se agregaron 5.0 mL de agua destilada. El blanco de reacción se trató bajo las mismas condiciones de análisis con la adición del filtrado después de detener la reacción con DNS. La absorbancia de las reacciones se determinó en un lector de microplacas a una longitud de onda de 575 nm.

Tabla 3. Reactivos empleados para medir actividad xilanolítica.

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración</i>	<i>Cantidad</i>
<i>xilano de abedul</i>	1%	0.5mL
<i>buffer de acetatos (pH 5.0)</i>	100mM	0.4mL
<i>filtrado enzimático</i>	variable	0.1mL

La actividad exoxilanolítica se expresó en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima (xilanasas) que produce un μmol de xilosa en las condiciones del ensayo.

7.5 Liofilización de los filtrados libres de células

Los 50 mL restantes de filtrados libres de células se congelaron por 96 horas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización a 110×10^{-3} mbar y $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 1 mL de buffer de corrida compuesto por 0.025 M de trizma base, 0.192 M glicina y 0.1% SDS, ajustado a pH 8.3.

7.6 Análisis electroforético

7.6.1 Electroforesis SDS-PAGE

Las pruebas electroforéticas se realizaron sobre geles de poliacrilamida de 8×8 cm con SDS, en condiciones desnaturizantes con un marcador de peso molecular de alto rango (6.5 – 200 kDa) en el primer carril. El volumen de las muestras analizadas fue variable ya que dependió de la concentración de proteína previamente cuantificada. El buffer de tratamiento desnaturizante (SDS 4%, glicerol 20%, 2- β -mercaptoetanol 10%, buffer Tris-HCl 125 mM ajustado a pH 6.8 y azul de bromofenol 0.005%) utilizado fue equivalente a la tercera parte de muestra. El gel separador se preparó al 12% de acrilamida y la electroforesis se realizó con un voltaje constante (30 voltios/gel), por 1 hora y a través de una unidad de geles verticales de 1.0 mm Mini-PROTEAN Tetra Cell. Por cada gel para determinar proteína se corrió un gel análogo para generar el zimograma correspondiente.

7.6.2 Determinación de peso molecular aproximado de las proteínas separadas por electroforesis

Los geles obtenidos fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R-250 (0.025%), metanol (40% v/v) y ácido acético (7% v/v), durante una hora con agitación suave (40 rpm). Posteriormente fueron lavados con una solución de ácido acético (10% v/v) y se capturó la imagen con un sistema de documentación de geles Gel Doc XR. Una vez revelados los geles, tomando como referencia el marcador de peso molecular, se determinó el peso de las proteínas separadas en la electroforesis de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

7.6.3 Zimogramas

Para la elaboración de los zimogramas, en primer lugar, se incubaron los geles de poliacrilamida después de la electroforesis en buffer de renaturalización (Tris-HCl 10 mM ajustado a pH 7.5) a 37 °C durante una hora, y a continuación se incubaron en buffer de acetatos (100 mM ajustado a pH 5.0) a 37 °C durante 30 minutos. Bajo las mismas condiciones de temperatura y pH, se realizó el cambio de solución a buffer de acetatos con xilano de abedul al 1% durante 30 minutos. Posteriormente los geles se lavaron con agua destilada para retirar residuos de sustrato y se incubaron en 40 mL de etanol (96%) durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación de 70 rpm. Para rehidratar los geles se retiró el exceso de etanol y se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación pero en agua destilada durante 15 minutos. Finalmente, para revelar la actividad xilanolítica, los geles se tiñeron con una solución de rojo Congo al 0.1% durante 15 minutos en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Para visualizar las bandas donde se llevó a cabo la hidrólisis enzimática, se realizaron lavados con NaCl (1 M) y se capturaron las imágenes con un escáner de cama plana.

8. Resultados y discusión

8.1 Efecto del pH inicial y tipo de sustrato sobre el crecimiento de *A. flavus* y la producción de xilanasas.

Las cepas de *A. flavus* CECT-2687 (toxigénica) y NRRL-6541 (no toxigénica) fueron fermentadas bajo condiciones de pH inicial de 5 y 7.5. La elección de estos valores se fundamentó en el estudio realizado por Bhatt y colaboradores (2012) en donde demostraron que a pH 5 se induce la producción de enzimas, y a 7.5 se favorece la colonización e infección de los cultivos de importancia económica.

En todos los cultivos de ambas cepas y bajo todas las condiciones experimentales, se observó una variación en el valor de pH después de 96 h de fermentación. Se ha establecido que cuando el microorganismo metaboliza los diferentes sustratos, se liberan compuestos como azúcares reductores, ácidos orgánicos y CO₂ al medio, provocando un descenso del pH; por otra parte, cuando el valor del pH se incrementa, se ha asociado al efecto de las proteasas excretadas por el hongo una vez que los carbohidratos del medio han sido agotados, y a la lisis de las células en la que también se liberan ese tipo de enzimas.

Para la cepa CECT-2687 fermentada a pH inicial de 5 y con sustratos solubles (glucosa, xilosa y ácido galacturónico), el agotamiento de los nutrientes, observado como una disminución en la concentración de los azúcares reductores, se debe a la alta biodisponibilidad del azúcar como fuente de carbono para ser metabolizada (*Figura 10-A*); por esta razón, en ninguno de los casos se registró actividad xilanólítica, ya que la presencia de azúcares simples ejerce un efecto represor sobre la expresión de los genes que codifican estas enzimas (*Figura 10-B*).

Los resultados obtenidos para las fermentaciones de la misma cepa pero en los medios enriquecidos con los sustratos complejos (xilano, salvado de trigo y olote de maíz) se ilustran en las *Figuras 10-C y 10-D*. En todos los casos, la concentración de azúcares

reductores en los cultivos cuya fuente de carbono fue xilano o salvado de trigo, incrementó drásticamente en las primeras 24 h de la fermentación, y posteriormente disminuyó; en el caso de los cultivos adicionados con olote de maíz, la concentración de estos azúcares no presentó variaciones significativas. Por otra parte, la actividad xilanólica se mantuvo elevada durante prácticamente todo el periodo de fermentación (*Figura 10-D*). Este conjunto de resultados coinciden con los reportados por Gnanasoundari y colaboradores (2007), quienes determinaron el efecto sobre la producción de xilanasas por *A. flavus* a partir de diferentes desechos agroindustriales como bagazo de caña, fibra de piña y salvado de trigo, siendo este último sustrato el adecuado para la producción de enzimas xilanólicas, ya que contiene una mayor concentración de xilano y celulosa en comparación con los otros (Gnanasoundari et al., 2007). Cabe mencionar que el incremento en la concentración de los azúcares reductores se debe principalmente a la acción de la endo- β -1,4-D-xilanasas y la β -xilosidasa, enzimas que degradan los sustratos a su unidad fundamental, xilosa.

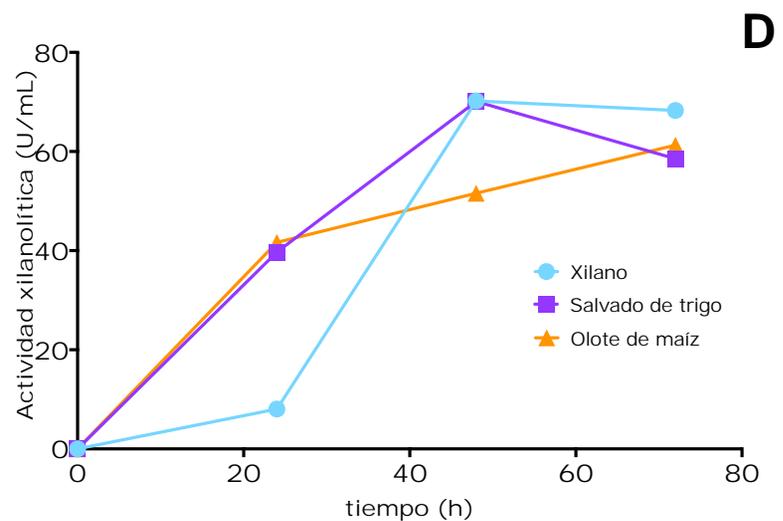
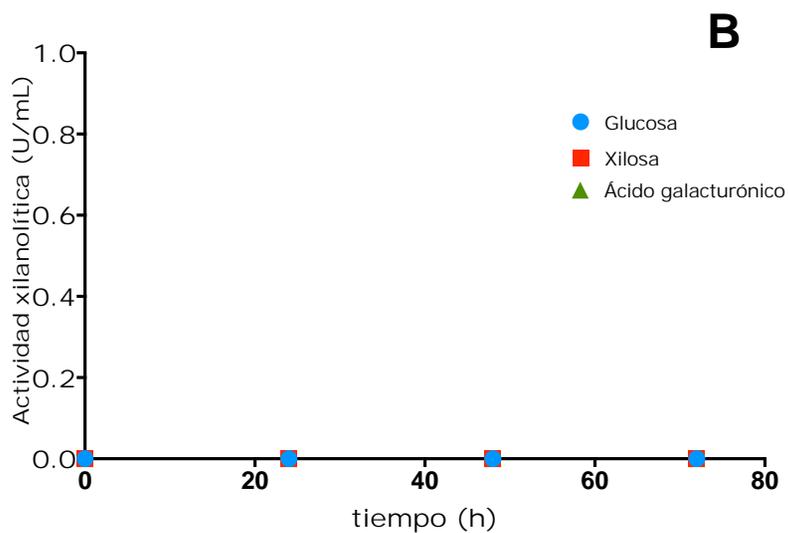
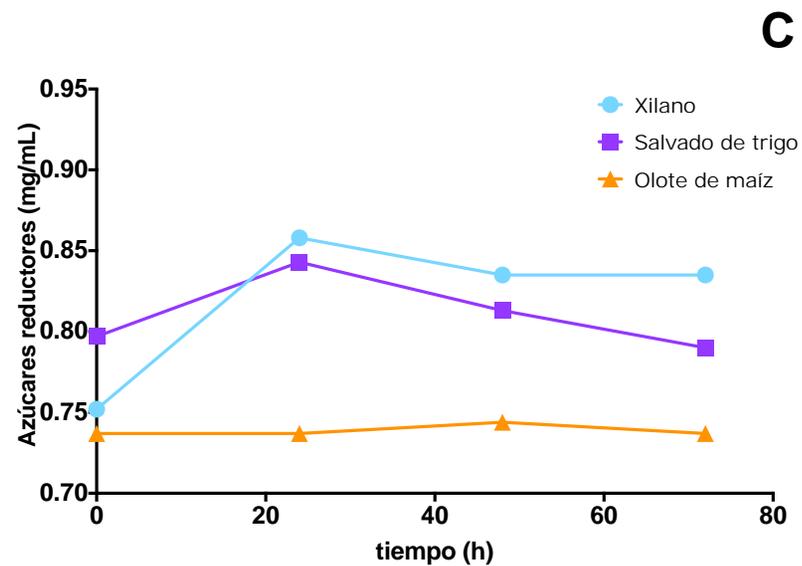
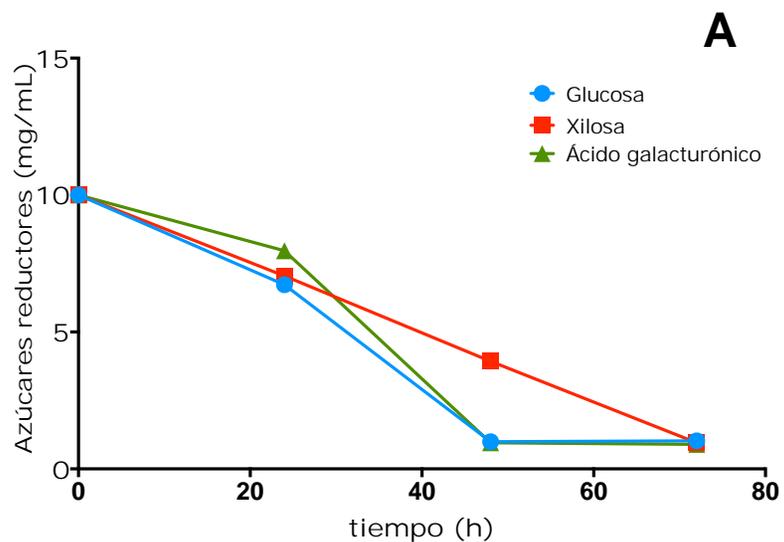


Figura 10. Variación en la producción-consumo de azúcares (A y C) y producción de xilanansas (B y D) por *A. flavus* cepa CECT-2687, pH inicial 5, creciendo en sustratos solubles (A y B) y sustratos complejos (C y D).

En el caso de los cultivos de la cepa 2687 fermentada bajo condiciones de pH inicial 7.5, y la cepa 6541 a pH inicial de 5 y 7.5, todos adicionados con sustratos solubles, se observó el mismo comportamiento en la concentración de los azúcares reductores y actividad xilanólica (*Figuras 11-A y B, 12-A y B y 13-A y B*). Con base en estos resultados preliminares, se concluye que en las condiciones probadas, las xilanasas no son enzimas constitutivas de *A. flavus* CECT-2687.

Por otra parte, cuando la cepa 6541 fue fermentada bajo condiciones de pH inicial de 5, y ambas cepas a pH inicial de 7.5, la concentración de azúcares reductores en los medios adicionados con salvado de trigo y olote de maíz se mantuvo constante, mientras que los adicionados con xilano disminuyó a pesar de que se registró un aumento en la actividad enzimática (*Figura 11-C, 12-C y 13-C*). Estos resultados están en armonía con el trabajo realizado por Pradal en 2012, en donde se evaluó la producción exo-pectinasas y xilanasas usando como sustratos polímeros puros (pectina cítrica y xilano de abedul) y sustratos complejos (olote de maíz, salvado de trigo y cáscara de limón). En este trabajo se demostró que la actividad enzimática, y por tanto la expresión de los genes implicados en ello, es altamente dependiente del valor de pH inicial de la fermentación, y se encontró que a pH 8.0 se favorece dicha expresión.

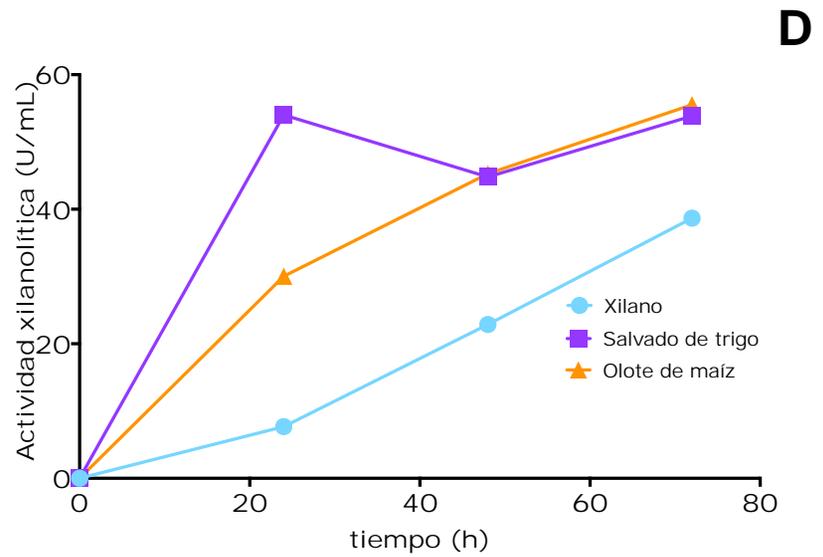
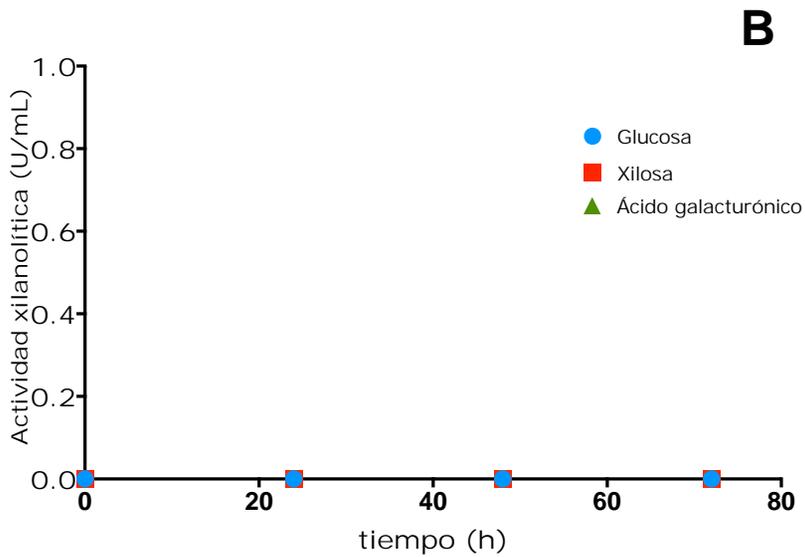
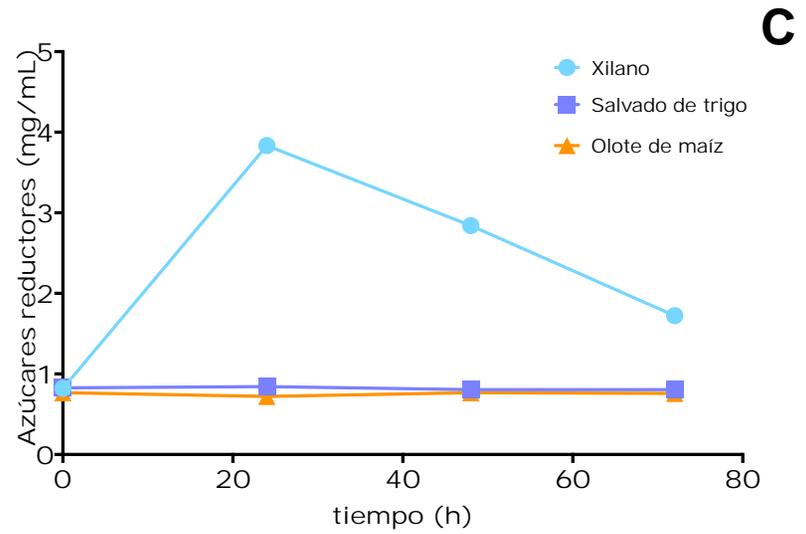
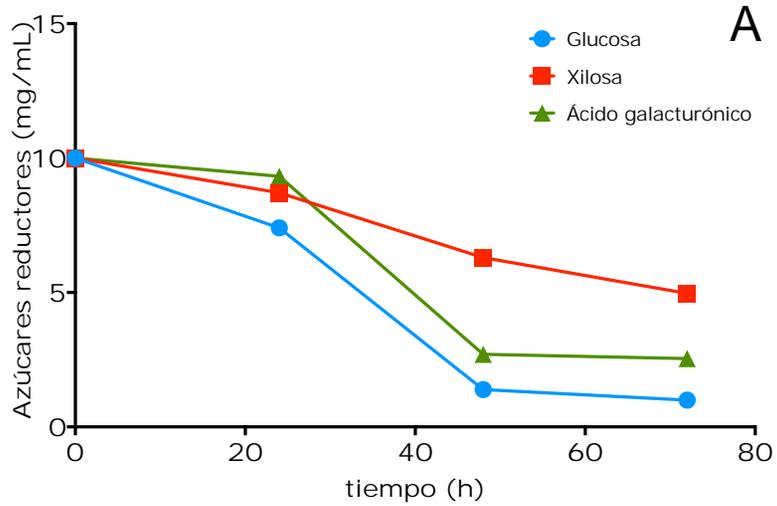


Figura 11. Variación en la producción-consumo de azúcares (A y C) y producción de xilanansas (B y D) por *A. flavus* cepa NRRL-6541, pH inicial 5, creciendo en sustratos solubles (A y B) y sustratos complejos (C y D).

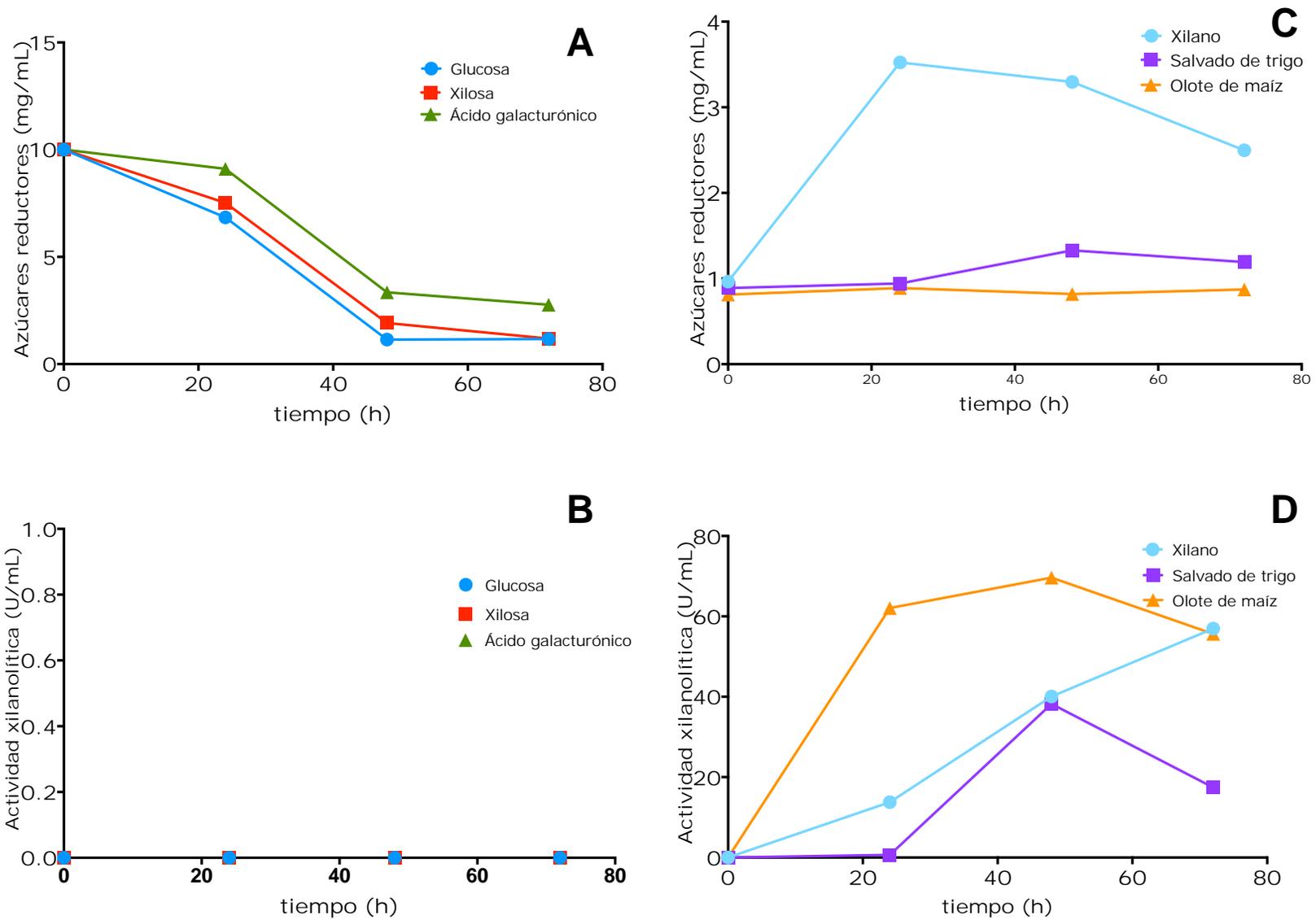


Figura 12. Variación en la producción-consumo de azúcares (A y C) y producción de xilanansas (B y D) por *A. flavus* cepa CECT-2687, pH inicial 7.5, creciendo en sustratos solubles (A y B) y sustratos complejos (C y D).

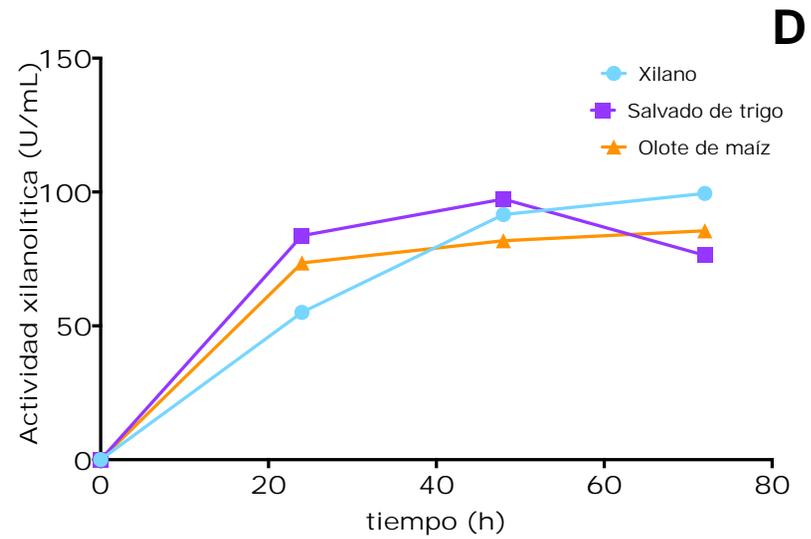
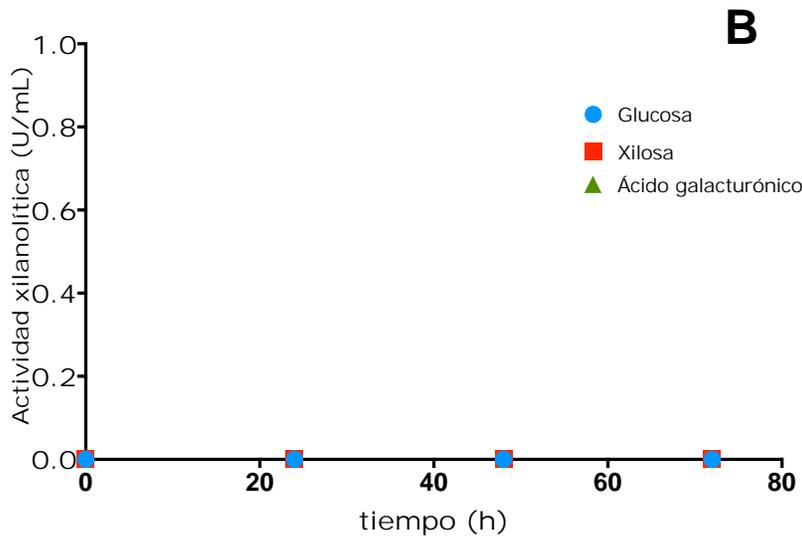
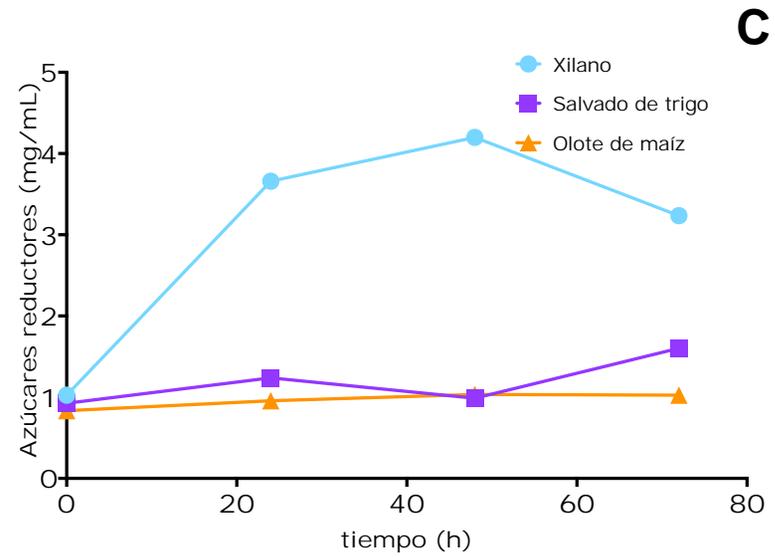
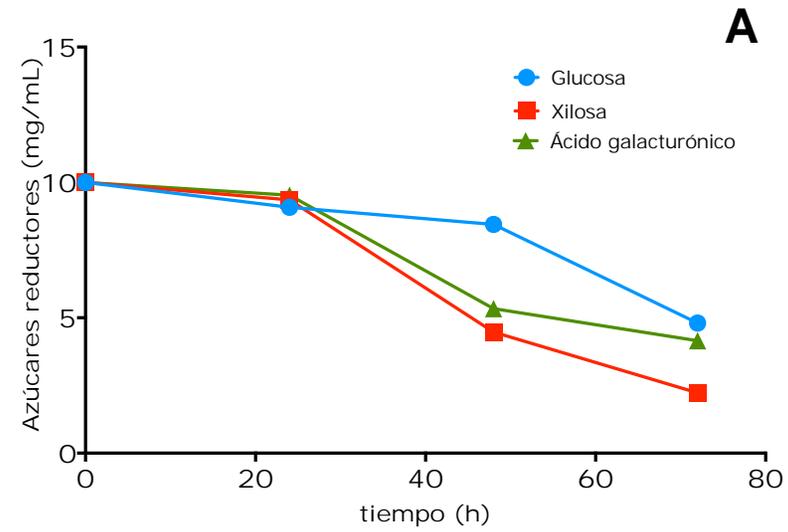


Figura 13. Variación en la producción-consumo de azúcares (A y C) y producción de xilananas (B y D) por *A. flavus* cepa NRRL-6541, pH inicial 7.5, creciendo en sustratos solubles (A y B) y sustratos complejos (C y D).

Por otro lado, con la finalidad de establecer la diferencia entre los perfiles proteicos de los cultivos anteriores, se realizaron los geles SDS-PAGE de cada uno de los medios siguiendo la metodología descrita en el inciso 7.6.1. Como se observa en la *Figura 14*, la cepa 2687 produjo una mayor cantidad de proteínas bajo las condiciones de fermentación con el pH inicial de 5 (carriles 1 al 6) en comparación con los fermentados a pH inicial de 7.5 (carriles 7 al 12). De todas estas, las fermentaciones adicionadas con salvado de trigo (carril 5) y xilano (carril 10) fueron las que presentaron en mayor número y concentración de bandas proteicas.

El comportamiento general de las dos cepas [(toxigénica y no toxigénica (datos no mostrados)] respecto al sustrato añadido fue similar: (1) el consumo de fuentes de carbono solubles sin actividad xilanolítica y (2) la degradación de fuentes complejas con incremento de actividad xilanolítica durante el tiempo de fermentación. Con base en lo anterior, se decidió utilizar únicamente a la cepa CECT-2687 para los siguientes experimentos, además las condiciones de fermentación de pH inicial de 5 y la adición de salvado de trigo como fuente de carbono.

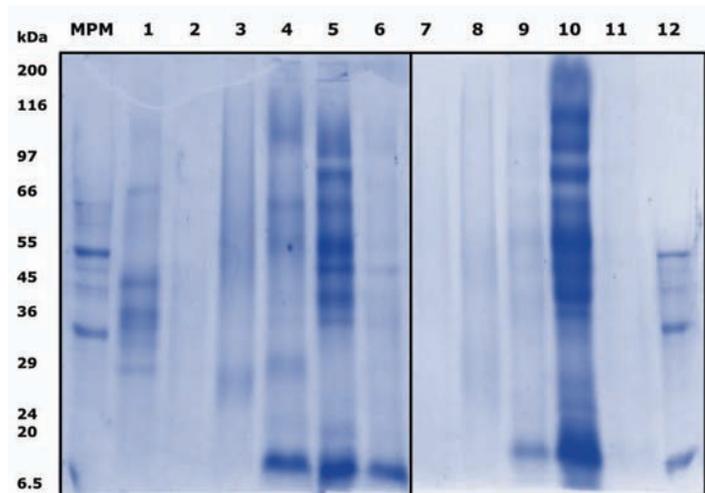


Figura 14. Gel SDS-PAGE, perfil proteico de los cultivos de la cepa 2687 en condiciones de pH inicial de 5 (carriles 1 al 6) y 7.5 (carriles 7 al 12), con fuentes de carbono simples [glucosa (carriles 1 y 7), xilosa (carriles 2 y 8) y ácido galacturónico (carriles 3 y 9)] y complejas [xilano (carriles 4 y 10), salvado de trigo (carriles 5 y 11) y olote de maíz (carriles 6 y 12)].

Para determinar el efecto de los azúcares simples sobre la represión o inducción en la producción de enzimas xilanolíticas en la cepa *A. flavus* (CECT-2687), se diseñaron una serie de experimentos en donde se adicionó glucosa y/o xilosa a diferentes tiempos durante la fermentación del microorganismos en medio sumergido con salvado de trigo. Como se puede observar en la *Figura 15*, el hongo fue capaz de metabolizar eficientemente, independiente del tiempo de adición, a la glucosa (hexosa) y la xilosa (pentosa), además de que el consumo de estos azúcares es inmediato y no interfiere con la utilización de la fuente de carbono presente en el medio.

En el caso de la fermentación que contenía únicamente salvado, la concentración de azúcares reductores se mantuvo constante (alrededor de 1.0 mg/mL) durante las 96 h de análisis. Por otra parte, la concentración de estos azúcares en los matraces con adición única de glucosa al tiempo “t0”, aumentó al momento de la adición (*Figura 15-A, línea roja*), luego se consumió la cantidad añadida en las primeras 24 h de fermentación, y finalmente se mantuvo constante (aproximadamente 1.0 mg/mL) durante el resto de la fermentación. En el caso de la adición de xilosa (*Figura 15-B, línea roja*), a t0 se consumió la cantidad añadida en las primeras 48 horas y luego se mantuvo constante por el resto de la fermentación.

En los experimentos con adición única al tiempo t24, se observó la activación del metabolismo del microorganismo mediante la producción de azúcares reductores a partir de la degradación del salvado en las primeras 24 h de fermentación, mismos que son necesarios para el crecimiento del hongo (*Figuras 15 A y B, línea verde*). Cuando se realizó la adición, se consumió la cantidad añadida de los azúcares (glucosa o xilosa) entre las 24 y 48 h de fermentación y posteriormente la concentración se mantuvo constante (aproximadamente 1.0 mg/mL) durante resto de la fermentación.

En el último experimento se realizaron tres adiciones del azúcar (glucosa o xilosa) durante la incubación a los t24, 48 y 72 (*Figuras 15 A y B, línea morada*). Las primeras 24 h de fermentación fueron similares a las de la adición única al t24, en donde se produjo una cantidad mínima de azucares reductores. Después de la primera adición al

t24, el azúcar añadido se consumió durante las siguientes 24 h hasta llegar a la concentración de 1.0 mg/mL. De igual forma, tras realizar la segunda y tercera adición a los t48 y t72, respectivamente, se consumió la cantidad agregada de los azúcares en las siguientes 24 h hasta llegar a la concentración de 1.0 mg/mL. La única diferencia entre las adiciones de los azúcares glucosa y xilosa se presentó entre las 24 y 48 h de fermentación, en donde en el caso de la glucosa, se observó una producción continua de azúcares a partir del medio (salvado de trigo) en una proporción parecida a la de las primeras 24 h de fermentación. Este comportamiento ha sido descrito también para las pectinasas de *Aspergillus flavipes* (Aguilar y Huitrón, 1987).

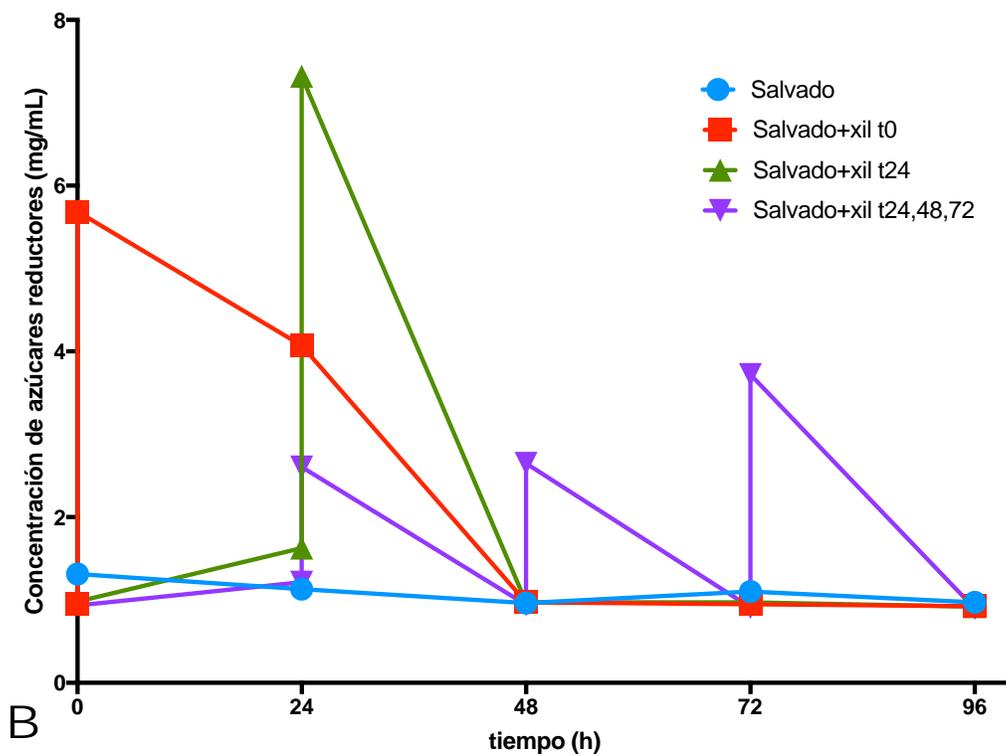
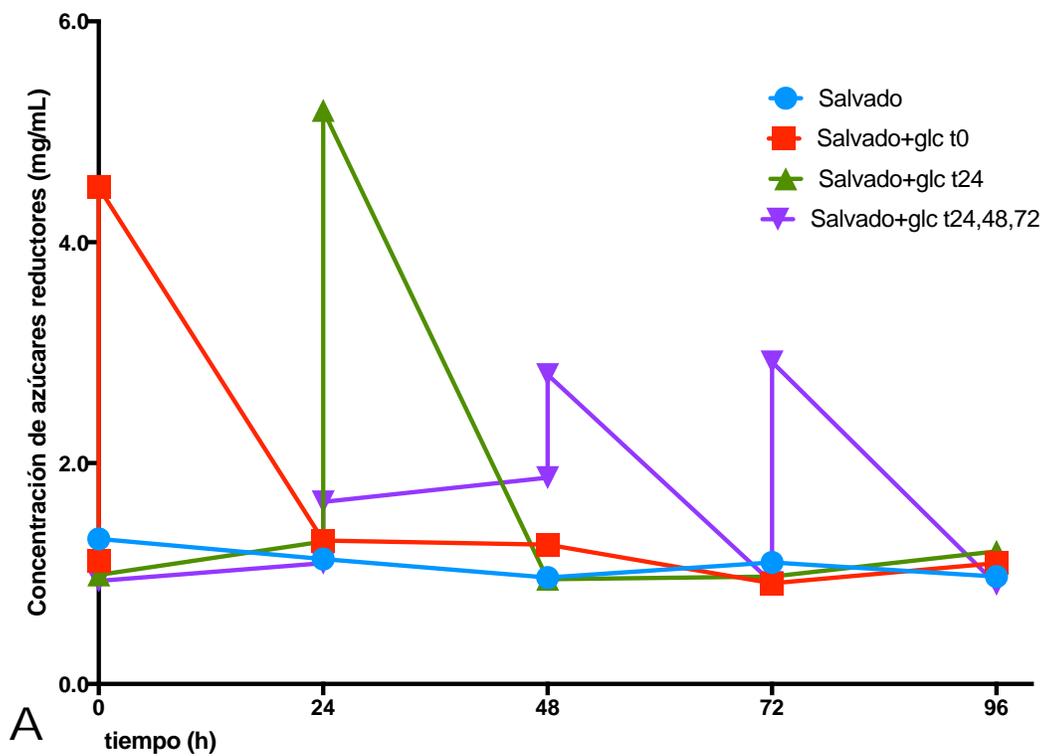


Figura 15. Variación en la concentración de azúcares reductores durante las 96h de fermentación en los ensayos de adición de glucosa (A) y xilosa (B).

En el experimento de adición de sacarosa, que tenía como objetivo evaluar la posible producción de una invertasa para sacarosa, se observa que en las primeras 24 h de fermentación hay un incremento significativo en la concentración de azúcares reductores (*Figura 16*), el cual se atribuye a que el microorganismos comienza a degradar la sacarosa del medio por efecto de la producción de la enzima invertasa de hidrólisis extracelular de sacarosa (Guimaraes et al., 2009). Cuando se adiciona sacarosa+glucosa (*Figura 16, línea roja*) y sacarosa+xilosa (*Figura 16, línea verde*), se observa también un incremento de los azuceres reductores en las primeras 24 h y posteriormente disminuye la concentración éstos hasta un nivel ligeramente más bajo que el inicial. Cabe mencionar que para esos análisis no se realizó una medición cuantitativa de la biomasa generada en cada uno de los matraces debido a la presencia de salvado de trigo en los medios de fermentación. Sin embargo, no se observó la aparición significativa de biomasa en los cultivos.

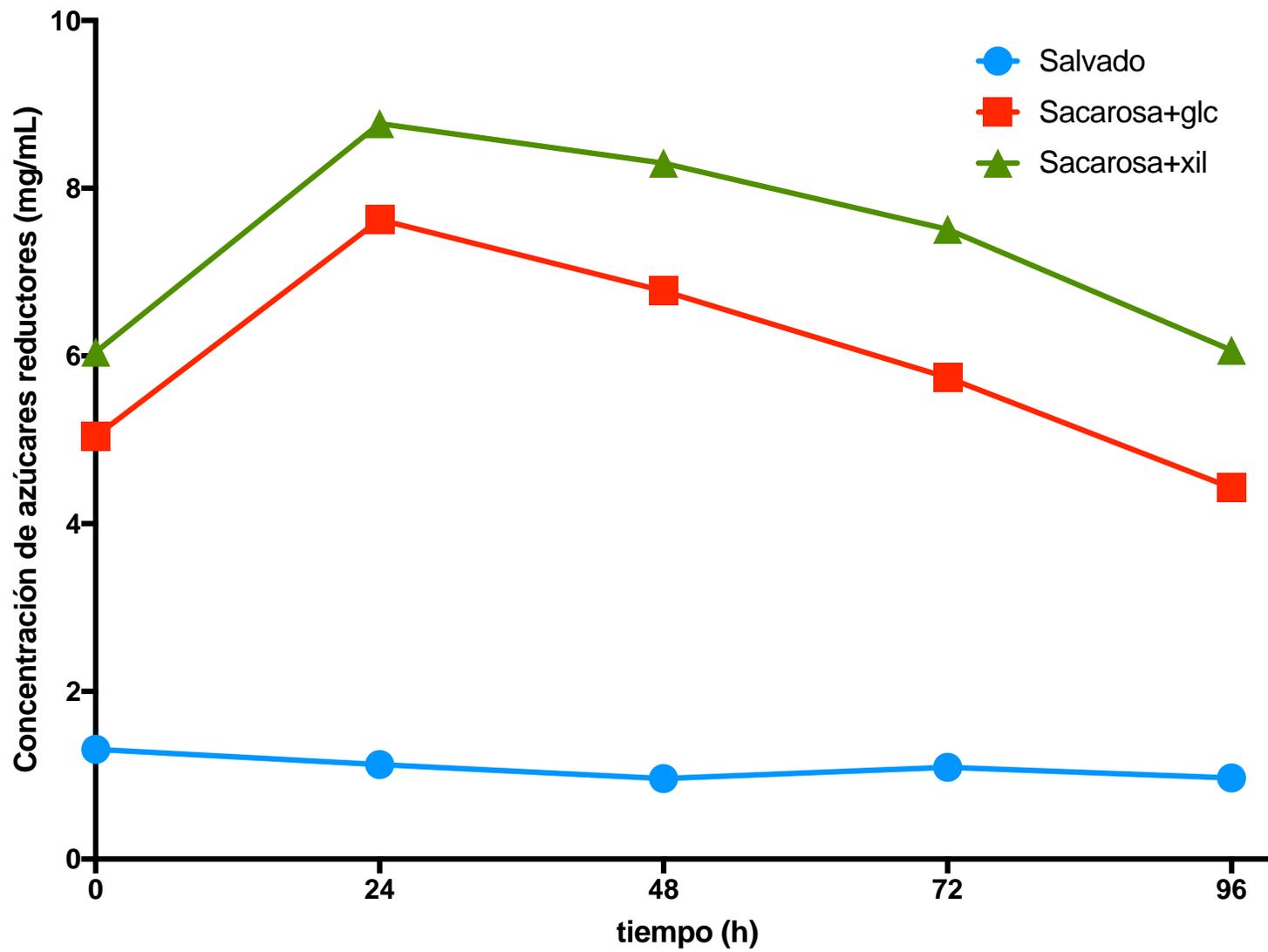


Figura 16. Variación en la concentración de los azúcares reductores en los fermentados con sacarosa en combinación con azúcares simples durante 96h

Los resultados de la actividad xilanolítica de los distintos fermentados ensayados se ilustran en la *Figura 17*. De manera general, se logró cuantificar dicha actividad en 7 de los 9 experimentos, siendo los matraces con sacarosa en combinación con el azúcar simple (glucosa o xilosa), los únicos que no mostraron actividad enzimática.

En la *Figura 17-A*, se presentan los resultados de las fermentaciones con adiciones de glucosa comparados contra la fermentación que contenía únicamente el medio mínimo con salvado de trigo.

Se observa que la fermentación en el medio sin la adición del azúcar (*Figura 17-A, línea azul*), el valor máximo de actividad, en el tiempo t24, tiene un valor aproximado de 1600 U/mg proteína; posteriormente, entre las 24 y 72 h, la actividad disminuye ligeramente (200 unidades) y mantiene en un valor constante; finalmente, en las últimas 24 h de incubación, la actividad desciende hasta los 500 U/mg proteína.

En el caso de la fermentación en el medio de salvado de trigo con la adición única de glucosa al t0 (*Figura 17-A, línea roja*), se observa que la actividad de xilanasas es menor a 250 U/mg proteína durante las primeras 24 horas de la fermentación. Cuando comparamos este resultado con el obtenido en experimento de azúcares reductores (*Figura 15-A, línea roja*), podemos deducir que este valor tan bajo de actividad se debió a la adición de glucosa que, como se menciona en los antecedentes, funciona como represor sobre la producción de enzimas degradadoras de carbohidratos complejos. Posteriormente, entre las 24 y 48 h de fermentación, se observó un incremento en la actividad hasta 1500 U/mg proteína. Luego, en las 48 h restantes de fermentación, la actividad enzimática disminuye aproximadamente 500 unidades. Cabe destacar que estos resultados están en armonía con los observados en la *Figura 15*, en donde se correlaciona la disminución de actividad específica con el valor constante en la concentración de azúcares reductores de las 48 a las 96 h de fermentación.

Para la fermentación con adición única al t24, *Figura 17-A línea verde*, se observa un máximo en la actividad xilanolítica en las 24 horas, las restantes 72 horas de fermentación la actividad disminuye como en el caso de la fermentación con adición

única de glucosa al t0. Este comportamiento se puede atribuir a dos fenómenos: los cambios en el pH influyen en la baja estabilidad de las enzimas y por lo tanto se disminuye su actividad, o a la presencia de proteasas que hidrolizan las enzimas xilanolíticas.

La fermentación con adiciones sucesivas de glucosa (*Figura 17-A, línea morada*) presenta un comportamiento similar al de la fermentación sin adiciones, con valores de actividad más bajos de las 0 a las 72 horas, en donde se iguala la actividad enzimática, y disminuye las últimas 24 horas a un valor cerca de 1000 U/mg proteína.

El efecto de represión e inducción se aprecia con mayor claridad en las fermentaciones con adición de xilosa donde, en comparación con el caso de salvado sin adiciones, la adición única al t0 y las sucesivas en t24, 48 y 72 horas, reprimen la actividad xilanolítica, mientras que la adición al t24 la induce.

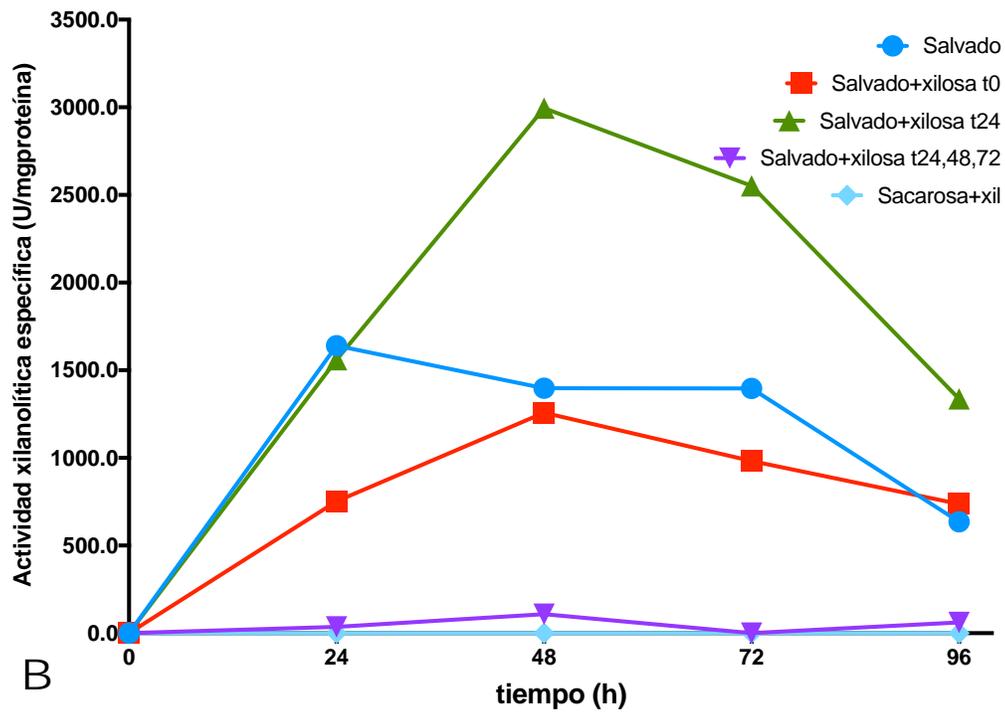
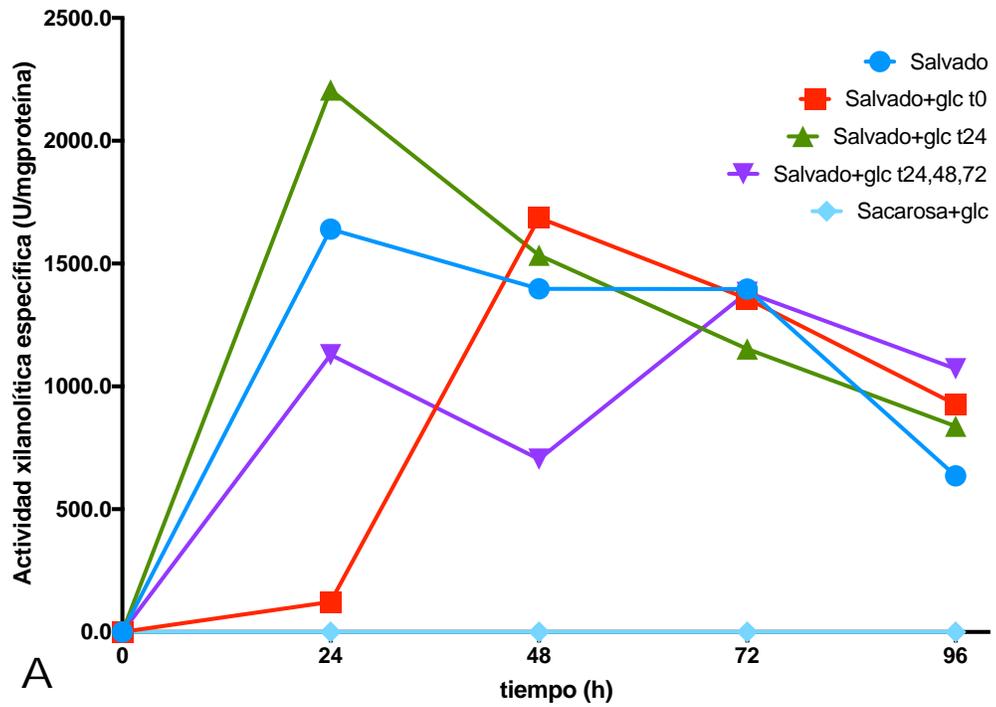


Figura 17. Variación en la actividad enzimática específica en las fermentaciones con adiciones de glucosa (A) y xilosa (B) durante 96 h.

En la *Figura 18-A* se ilustra mediante el gel SDS-PAGE presencia de las proteínas contenidas en las muestras de filtrados enzimáticos. Exceptuando a los carriles 5 y 9 que corresponden a las muestras con sacarosa, condición en la que se produjo una cantidad muy baja de proteína no detectable por los métodos empleados, los demás carriles presentaron múltiples bandas con diferentes pesos moleculares, además de algunas bandas que están presentes en todas las muestras, como la bandas con peso molecular entre 20 y 24 kDa. Es importante mencionar que para la elaboración de este análisis electroforético, se midió la cantidad de proteína presente en los filtrados enzimáticos para eliminar el efecto del crecimiento del microorganismo, e incubar la misma cantidad de proteína en cada uno de los pozos y evaluar la producción de xilanasas.

De manera complementaria, en el zimograma de la *Figura 18-B* se observa la actividad xilanólítica pero solo por algunas de las proteínas producidas en los fermentados. De forma similar a lo observado en el gel SDS-PAGE, en todos los carriles excepto el 5 y el 9, se observó actividad xilanólítica, sobre todo en las bandas proteicas entre los 20 y 24 kDa (carriles 1-4 y 6-8), 200 kDa (carriles 1, 6 y 7) y 6.5 kDa (carriles 3 y 8). Por otra parte, la actividad del carril 3 (salvado + glucosa t24), fue equivalente al de la fermentación control (carril 1), con la principal diferencia de que la enzima de aproximadamente 6.5 kDa se produjo en mayor cantidad. En este sentido, podemos deducir que la glucosa no tuvo efecto sobre la expresión enzimática y esto pudo deberse a que probablemente para el tiempo en el que se realizó la adición del azúcar, el microorganismo ya había producido el complejo enzimático necesario para el metabolismo del salvado de trigo. Por otra parte, los carriles 2 (salvado + glucosa t0) y 4 (salvado + glucosa t24,48,72) presentaron el mismo perfil de actividad enzimática. Este perfil también presentó similitudes con el carril 1 (salvado), en donde se observó la represión de las enzimas de peso molecular mayor a 20 kDa. La producción de enzima con actividad xilanólítica con peso molecular de aproximadamente 6.5 kDa nos permite deducir que la adición inicial y las adiciones sucesivas de glucosa reprimen parcialmente la expresión del sistema xilanólítico de *A. flavus*. En el caso de los carriles 6 y 7 (salvado + xilosa t0 y salvado + xilosa t24) también presentaron similitud con en

carril 1 en cuanto a la producción de enzimas entre 20 y 24 y 200 kDa. En el caso específico del carril 6, este fenómeno se puede atribuir a la adición de xilosa al tiempo inicial de fermentación. Finalmente, el carril 8 (salvado + xilosa t24,48,72) mostró actividad enzimática en las bandas proteicas de entre 6.5, 20 y 24 kDa. Cabe mencionar que las enzimas que fueron menos sensibles al efecto de represión por los azúcares simples fueron las que se encuentran entre los 20 y 24 kDa, mientras que las enzimas que fueron más susceptibles (inducibles) fueron las de un peso molecular de aproximadamente 130 kDa. Es probable que estas enzimas sean las β -xilosidasa, ya que se han reportado que tienen un peso molecular en el mismo rango.

Con la finalidad de poder hacer una comparación mas ilustrativa del gel SDS-PAGE y el zimograma, se realizó la superposición de ambas figuras (*Figura 19*).

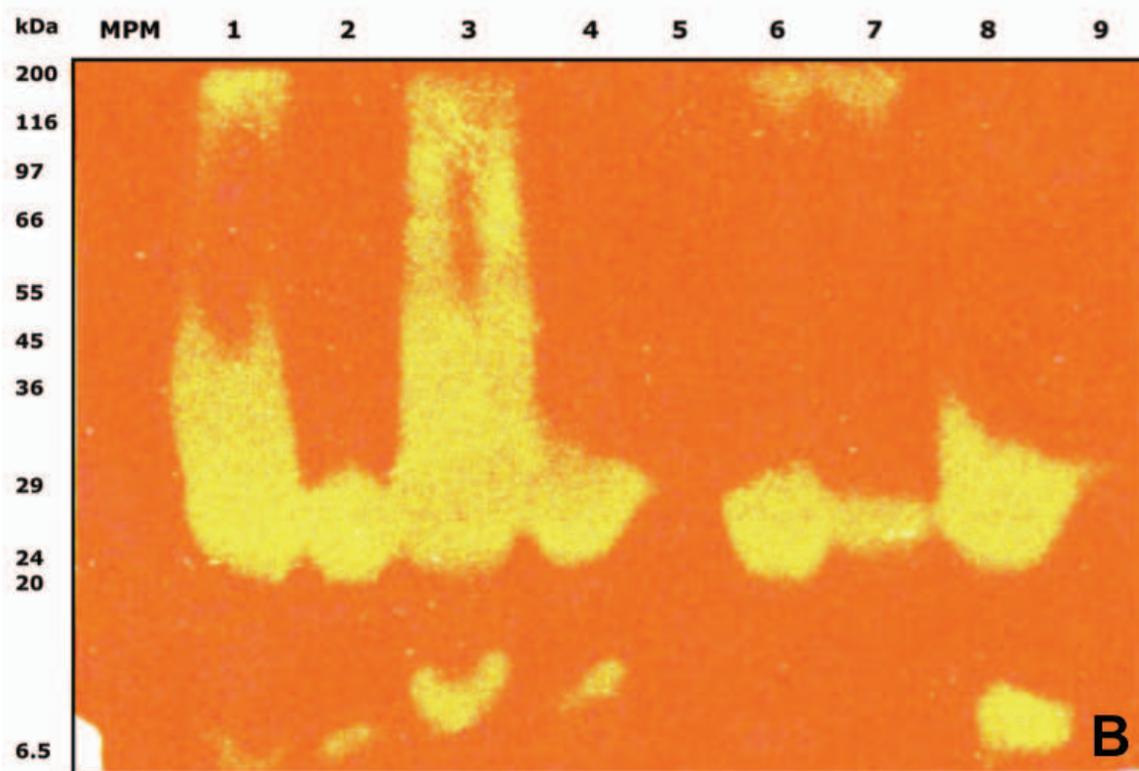
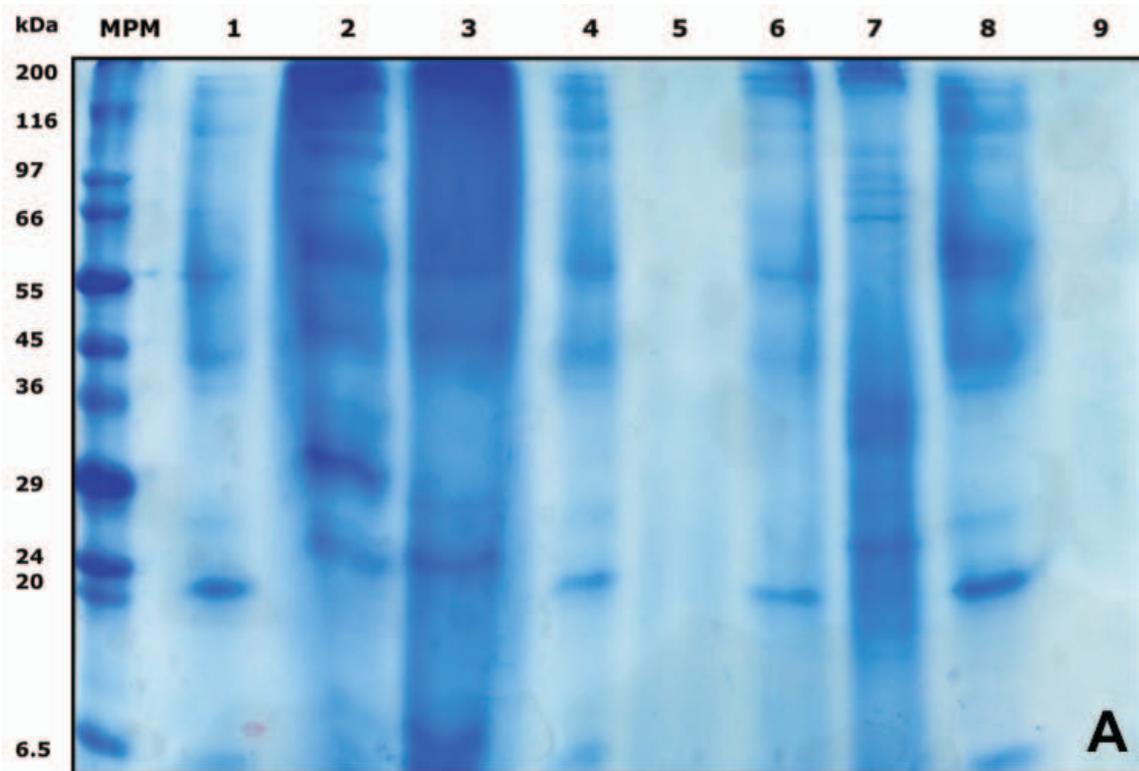


Figura 18. (A) Gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida para la determinación del peso molecular de proteínas. (B) Zimograma para la determinación de la actividad xilanolítica en los filtrados enzimáticos: carril 1, salvado; carril 2, salvado+glucosa t0; carril 3, salvado+glucosa t24; carril 4, salvado+glucosa t24, 48 y 72; carril 5, sacarosa+glucosa; carril 6, salvado+xilosa t0; carril 7, salvado+xilosa t24; carril 8, salvado+xilosa t24, 48 y 72; carril 9, sacarosa+xilosa. □

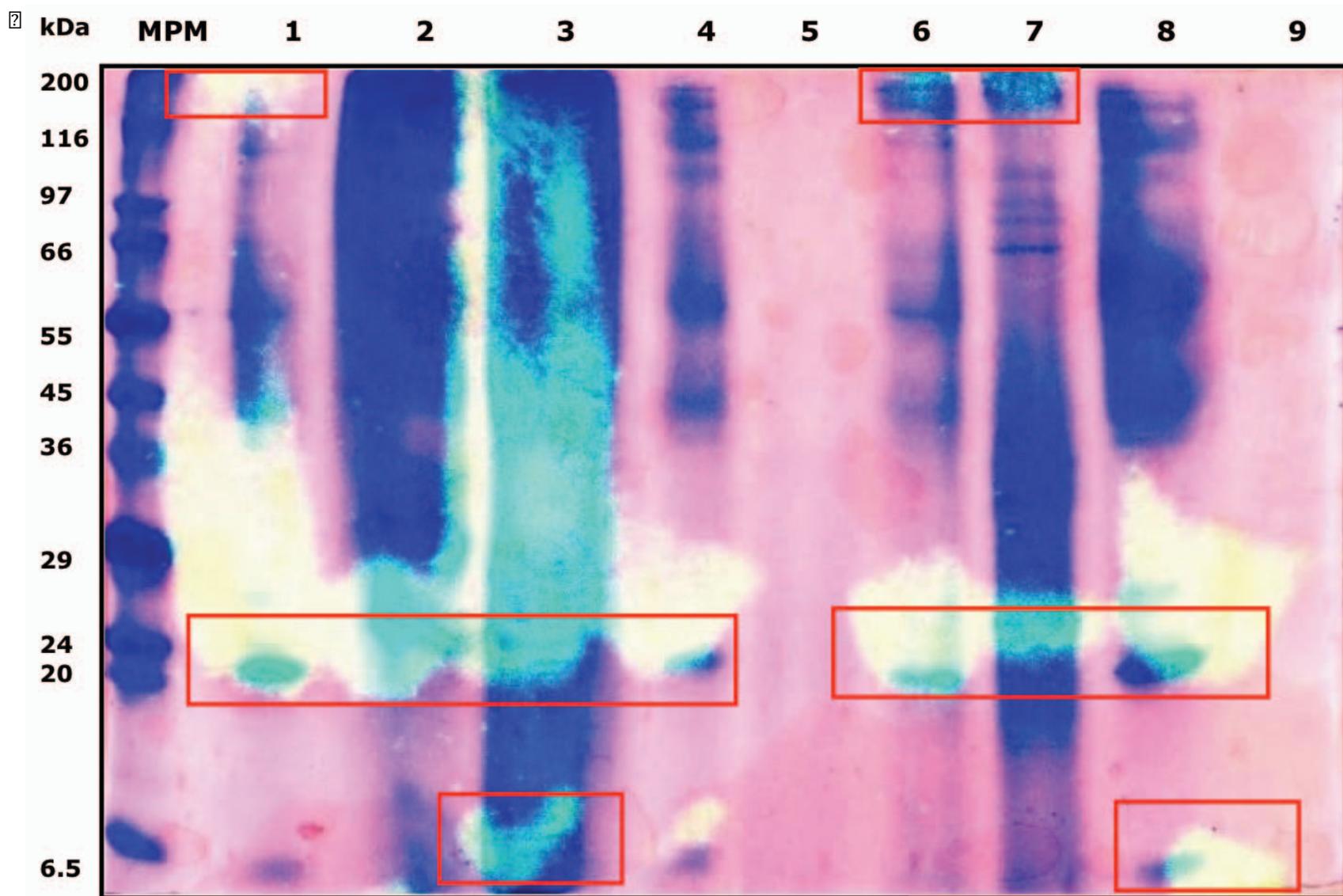


Figura 19. Superposición digital del gel SDS-PAGE y el zimograma

9. Conclusiones

- Se demostró que la cepa CECT-2687 de *A. flavus* tiene la capacidad de utilizar todas las fuentes de carbono empleadas en este trabajo.
- La producción de los sistemas enzimáticos varía de acuerdo con las condiciones iniciales de la fermentación y está estrechamente relacionada con el pH inicial y la naturaleza y concentración de la fuente de carbono.
- Utilizando el método de fermentación sumergida y bajo las condiciones de temperatura, pH, agitación y tiempo de fermentación probadas, la cepa CECT-2687 de *A. flavus* fue capaz de producir enzimas xilanólíticas a partir de salvado de trigo, olote de maíz y xilano de abedul.
- Los resultados del SDS-PAGE y zimografía permitieron identificar tres grupos de enzimas con actividad xilanólítica con pesos moleculares aproximados de 6.5, 20-24 y 130 kDa.
- Bajo las condiciones experimentales de este trabajo no fue posible identificar xilanasas constitutivas producidas por la cepa CECT-2687 de *A. flavus*, debido a que en las fuentes de carbono como la sacarosa y otros azúcares simples, el microorganismo no produjo enzimas con actividad xilanólítica.

10. Perspectivas

- Realizar los mismos experimentos bajo la modalidad de fermentación en estado sólido, con la finalidad de determinar la eficiencia en la producción de las enzimas con actividad xilanolítica, además de evaluar el comportamiento del microorganismo en condiciones más cercanas a su hábitat natural (limitada disponibilidad de agua).
- Realizar los cultivos en bioreactores para evaluar factores como el efecto del flujo de aire y agitación con sustratos complejo.
- Utilizar otros medio de cultivo complejos para las fermentaciones como los salvados de mijo y avena.
- Evaluar el efecto de la sacarosa o fructosa en combinación con salvado de trigo, sobre la inducción o represión de la actividad enzimática.
- Realizar los experimentos con la cepa no toxigénica, *A. flavus* NRRL-6541.

11. Bibliografía

1. Aguilar, G., Huitrón, C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. By galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microbiology. Technol.* 9:690-696.
2. De Alencar Guimaraes, N. C., Sorgatto, M., Peixoto-Nogueira, S. de C., Betini, J. H. A., Zanoelo, F. F., Marques, M. R., ... Giannesi, G. C. (2013). *Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from Aspergillus niger and Aspergillus flavus on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate*. SpringerPlus, 2, 380.
3. Amaike, S., Keller, N. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology.* 49:107–33.
4. Arce, O. (2012). *Producción de extractos enzimáticos a partir de Fomes sp. EUM1 y su evaluación en condiciones ruminales*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
5. Bennett, J. W., (2010). *An Overview of the Genus Aspergillus*. En: Machida, M. y Gomi, K. (eds). *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Norfolk: Caister Academic Press. pp. 1-17.
6. Bhat, M. K. (2000). *Cellulases and related enzymes in biotechnology*. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-83.
7. Bhatt, N., Adhyaru, D., Thakor, P. (2012). *Production of Xylanase by Aspergillus flavus FPDN1 on Pearl millet bran: Optimization of Culture Conditions and Application in Bioethanol Production*. *International Journal of Research in Chemistry and Environment* Vol. 2 Issue 3, 204-210.
8. Bonifaz, A. (2009). *Micología médica*. Mac Graw Hill. México.
9. Carlsen, M., Nielsen, J. (2001). *Influence of carbon source on α -amylase production by Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 346-349.
10. Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes. Capítulo 4: Aspergillus*. Universidad de Salta, P.p. 44-58.
11. Cleveland, T., Cotty, P. (1991). *Invasiveness of Aspergillus flavus isolates in wounded cotton balls is associated with production of a specific fungal polygalacturonase*.
12. Collins, T.; Gerday, C., Feller, G. (2005). *Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases*. *FEMS Microbiology Reviews.* 29 (1): 3-23.
13. Cullen, D., Kersten, P. (1992). *Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In Applied Molecular Genetics of filamentous fungi*. Edited by Kinghorn, J.R., Turner, G. New York, Chapman and Hall. Capítulo 4: 100 -131.
14. Culleton, H., McKie, V., de Vries, R. (2013). *Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from Aspergillus?*. *Biotechnology Journal*, 8.

15. De Vries, Ronald P. (2003). *Regulation of Aspergillus genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production*. Applied microbiology and biotechnology, 61(1), 10-20.
16. De Vries, Ronald P., J. Visser. (2001). *Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(4), 497- 522.
17. Dzikowska, A., Kacprzak, M., Tomecki, R., Koper, M., Scazzocchio, C., & Weglenski, P. (2003). *Specific induction and carbon/nitrogen repression of arginine catabolism gene of Aspergillus nidulans—functional in vivo analysis of the otaA promoter*. Fungal Genetics and Biology, 38(2), 175-186.
18. Frisvad, J. C., Larsen, T. O. (2016). *Extrolites of Aspergillus fumigatus and Other Pathogenic Species in Aspergillus Section Fumigati*. Front. Microbiol., 6, 1485.
19. Georgianna, D. R., & Payne, G. A. (2009). *Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome*. Fungal genetics and biology : FG & B, 46(2), 113-25.
20. Guimarães, L., Somera, A., Terenzi, H., Teixeira de Moraes Polizeli, M., Jorge, J. (2009). *Production of b-fructofuranosidases by Aspergillus niveus using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose*. Process Biochemistry, 44, 237–241.
21. Gnanasoundari, S., Sashi, V., Malathy, N., Vasantha, S. (2007). *Xylanase production from Aspergillus flavus*. Plant archives, Vol. 7 No. 1, 213-214.
22. Harris, A., Ramalingam, C. (2010). *Xylanases and its Application in Food Industry: A Review*. Journal of Experimental Sciences Vol. 1, Issue 7, 01-11.
23. Hrmová, M, Petráková, E., & Biely, P. (1991). *Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in Aspergillus terreus by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose*. Journal of general microbiology, 137(3), 541-7.
24. Khandeparkar, R.D.S., Bhosle, N.B. (2006). *Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by Arthrobacter sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation*. Enzyme and Microbial Technology. 39: 732-742.
25. Kobayashi, H., Fukuoka, A. (2013). *Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass*. Green Chemistry Journal, 15, 1740-1763.
26. Lockington, R. A, Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C. J., & Kelly, J. M. (2002). *Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in Aspergillus nidulans*. Fungal genetics and biology : FG & B, 37(2), 190-6.
27. López Munguía, A., García Garibay, M., Quintero Ramirez, R. (2004). *Biología Alimentaria*. Ediciones Limusa Noriega. México. Pág. 585.
28. Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. (2012). *Biology of microorganisms*. Editorial Pearson, 13a edición, San Francisco, EUA. P.p. 210-213, 601-603

29. Mellon, J., Cotty, P. (2004). *Expression of pectinase activity among Aspergillus flavus isolates from southwestern and southeastern United States*. Mycopathologia, 157: 333-338.
30. Muñoz, S. S. (20 de Agosto de 2012). SAGARPA. Obtenido de SAGARPA: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamiento%20de%20esquilmos.pdf>
31. Nigam, P.S. (2009). *Production of bioactive secondary metabolites*, In: Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization, Nigam, P.S., & Pandey, A. (Eds.) pp. 129-145, Springer, Netherlands.
32. Paz-Lago, D., Hernández, M. (2000). *Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasa a partir del preparado comercial Novoban 240*. Cultivos Tropicales, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba, Vol. 21, Núm. 2, P.p. 27-31
33. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, R.T., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. International Microbiology, 5: 53 -63.
34. Perlack, Robert; Wright, Lynn; Turhollow, Anthony; Graham, Robin; Stokes, Bryce; Erbah, Donald. (2005). *Bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply*. US Department of Energy and U.S Department of agriculture. Oak Ridge, Tennessee
35. Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, I. M., McDonald, K. D., Bufton, A. W. J. (1953). *The genetics of Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5: 141-238
36. 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.
37. Rodríguez, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2007). *Identification and characterization of Aspergillus flavus and aflatoxins*. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 527-534.
38. Ruijter, G. J. G., & Visser, J. (1997). *Carbon repression in Aspergilli*. FEMS Microbiology Letters, 151, 103-114.
39. Smith, J. (1994). *The structure and development of filamentous fungi*. Aspergillus. Plenum Fresh, 01-15.
40. Sunna, A., Antranikian, G. (1997). *Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria*. Critical Reviews in Biotechnology 17(1), 39-67.
41. Topakas, E., Katapodis, P., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P. (2003). *Production and partial characterization of xylanase by Sporotrichum thermophile under solid-state fermentation*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 19: 195-198.
42. Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. (2000). *Biodegradation of lignin in a compost environment: a review*. Bioresource Technology 72 169- 183.
43. Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2003). *Biopelículas de Aspergillus niger*

para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Revista peruana de biología, 78-87.

44. Weake, V. M., & Workman, J. L. (2010). *Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms*. Nature reviews. Genetics, 11(6), 426-37. Nature Publishing Group.

45. Woloshuk, C., Cavaletto, J., Cleveland, T. (1997). *Inducers of Aflatoxin Biosynthesis from Colonized Maize Kernels Are Generated by an Amylase Activity from Aspergillus flavus*. Phytopatology, Biochemistry and Cell Biology, 87(2):164-169.

46. Yu, J., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., & Bennett, J. W. (2005). *Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases*. Revista iberoamericana de micología: órgano de la Asociación Española de Especialistas en Micología, 22, 194-202.

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

Fuentes electrónicas para imágenes y esquemas.

- Club de Informática Médica y Telemedicina (Universidad de Panamá). *Aspergillus*. Telmeds.org [publicada en línea]. 2009(09). [citado 28 de Oct de 2016]. Disponible en: <http://www.telmeds.org/atlas/micologia/hongos-contaminantes/aspergillus-2/> Consultado el 28 de octubre de 2016.

- Texas A&M University, Department of Soil and Crop Sciences. Maize Breeding and Genetics Program: Aflatoxin, inoculation of *Aspergillus Flavus*. Disponible en: <http://maizeandgenetics.tamu.edu/aflatoxin.htm> Consultado el 28 de octubre de 2016.

- Royal Society of Chemistry “Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass”. **Green Chemistry.**, 2013, **15**, 1740-1763 Hirokazu Kobayashi y Atsushi Fukuoka. <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2013/GC/c3gc00060e/c3gc00060e-f1.gif> Consultado el 28 de octubre de 2016.

- Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas. AQM 2009 Revista de Divulgación Científica. Armando Robledo Olivo, Cristóbal Noé Aguilar, Julio Cesar Montañez Sáenz. Publicación de la Coordinación de Estudios de Postgrado e Investigación y la Facultad de Ciencias Químicas, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA, 2011 <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/7.html> Consultado el 28 de octubre de 2016.

- Revista electrónica Avinews, Febrero de 2014. <http://avicultura.info/combatiir->

[factores-antinutricionales-con-enzimas-en-rationes-de-broiler/](#) Consultado el 28 de octubre de 2016.

- Unidad de Información Científica de la Unversidad Complutense de Madrid. “Blanqueando el papel con una proteína”. Gloria López Luengo y Ángeles Bañares Hidalgo. 2010.

https://pendientedemigracion.ucm.es/info/otri/cult_cient/infocientifica/201102_01not.htm
Consultado el 28 de octubre de 2016.

- Página de la Asociación Española de Fabricantes de Cereales, 2009. <http://www.asociacioncereales.es/cereales-de-desayuno/historia-y-elaboracion/produccion/> Consultado el 28 de octubre de 2016.

- http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/salvado-de-trigo-20-almidón-actualizado-nov-2011 Consultado el 7 de noviembre de 2016.