



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la producción de amilasas sobre sustratos complejos por *Aspergillus flavus*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

CAMACHO LARA MICHELLE MONSERRATH

TUTOR PRINCIPAL

AGUILAR OSORIO JOSÉ GUILLERMO

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Peraza Reyes Leonardo

Instituto de Fisiología celular, UNAM

Navarro Ocaña Arturo

Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Agosto, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Bustos Jaimes Ismael
VOCAL	Escalante Lozada José Adelfo
VOCAL	Montiel Pacheco Carmina
VOCAL	Quirasco Baruch Maricarmen
SECRETARIO	Ruíz Terán Francisco

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E Laboratorio 312, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Guillermo Aguilar Osorio _____

SUSTENTANTE:

Michelle Monserrath Camacho Lara _____

Financiamiento

Este proyecto fue apoyado por el programa PAEP para la asistencia al XXI Congreso Nacional de Ingenieros Bioquímicos

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo al proyecto: IN219813

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 El género <i>Aspergillus</i>	3
2.1.1 Grupo <i>Aspergillus flavus</i>	5
2.1.1.1 <i>Aspergillus flavus</i>	6
2.2 Maíz	6
2.3 Almidón	9
2.3.1 Factores que contribuyen a la resistencia relativa del almidón nativo ante la digestión enzimática.	12
2.3.2 Amilasas	14
2.3.2.1 Endoamilasas	15
2.3.2.2 Exoamilasas	17
2.3.2.3 Enzimas desramificantes	18
2.3.2.4 Transferasas	18
2.3.2.5 Clasificación de amilasas en familias	19
2.3.2.6 Degradación de almidón nativo por amilasas; dominios de unión a almidón	20
2.4 Genes y regulación de la expresión de amilasas de <i>Aspergillus</i>	22
2.4.1 Inducción de amilasas	23
2.4.2 Represión catabólica	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	28
5.1 OBJETIVO GENERAL	28
5.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES	28
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS	29

7.1 Preparación de inóculos.....	29
7.1.1 Recuperación de microorganismos.....	30
7.1.2 Cosecha de esporas.....	30
7.1.3 Cuenta de esporas.....	30
7.1.4 Obtención de micelio para inóculo.....	30
7.2 Producción de enzimas en medio líquido de cepas silvestres.....	31
7.2.1 Medios y condiciones de cultivo.....	31
7.3 Crecimiento en granos de maíz.....	31
7.3.1 Extracción de las enzimas secretadas por el hongo en el grano de maíz.....	32
7.4 Medición de actividades enzimáticas.....	32
7.4.1 Medición de actividad amilolítica.....	32
7.4.2 Medición de actividad amilolítica en placa fina.....	33
7.4.3 Medición de actividad amilolítica sobre almidón insoluble (nativo).....	34
7.4.3.1 Determinación de azúcares totales.....	34
7.4.3.2 Determinación de azúcares reductores.....	34
7.4.3.3 Medición de proteína por el método de Bradford.....	34
7.5 Análisis electroforético.....	35
7.5.1 Tratamiento de muestras previo al análisis electroforético.....	35
7.5.2 Geles de electroforesis SDS-PAGE.....	35
7.5.3 Obtención de zimogramas de amilasas.....	35
7.6 Purificación.....	36
7.6.1 Cromatografía de intercambio iónico.....	36
7.5.2 Análisis electroforético de fracciones cromatográficas.....	37
7.5.2.1 Pretratamiento de las fracciones enzimáticas provenientes de una cromatografía para su uso en geles de SDS-PAGE (SDS Polyacrilamide-Gel Electrophoresis).....	37
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
8.1 Perfil amilolítico de <i>A. flavus</i> expresado en presencia de diferentes fuentes de carbono.....	38

8.2 Desarrollo de un modelo de granos de maíz para el estudio del sistema amilolítico de <i>A. flavus</i> durante su colonización.	41
8.2.1 Efecto del tratamiento y zona de punción de los granos de maíz sobre el crecimiento y la producción de enzimas degradadoras de polisacáridos de dos cepas de <i>A. flavus</i>	46
8.3 Perfil amilolítico de dos cepas de <i>A. flavus</i> (aflatoxigénica y no aflatoxigénica) en diferentes tiempos de crecimiento sobre granos de maíz	54
8.3.1 Purificación de amilasas correlacionadas con la degradación de almidón nativo	56
9. CONCLUSIONES	61
10. PERSPECTIVAS	62
11. ANEXO	63
12. REFERENCIAS.....	64

Capítulo 1

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de hongos filamentosos resulta de gran interés por su amplia distribución y presencia recurrente como contaminantes de alimentos, así como por su uso en algunas aplicaciones industriales.

El género *Aspergillus*, particularmente, se encuentra distribuido en todo el mundo y se ha clasificado en diferentes secciones como *Flavi*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nigri*, entre otras (Carrillo, 2003; Samson *et al.*, 2006). Algunos hongos pertenecientes a este género, como *Aspergillus flavus*, han sido reconocidos como productores de aflatoxinas, las cuales están clasificadas como carcinógenas.

A. flavus es de alta distribución en la naturaleza, lo que representa un gran riesgo para la salud pública e impacta de forma directa en la pérdida de cultivos agrícolas; principalmente se le asocia con la contaminación de cultivos de maíz, algodón y cacahuate, aunque su presencia no se encuentra limitada (Bennett, 2009).

El maíz, particularmente, es uno de los granos mayormente cultivados a nivel mundial. En México, este grano es considerado como una de las bases de la alimentación, por lo que su contaminación con este hongo puede representar un problema grave. Sin embargo, además del maíz, otros granos de importancia alimentaria son también infectados comúnmente durante su almacenamiento (Martínez *et al.*, 2013).

La capacidad infectiva de *Aspergillus flavus* sobre tejidos vegetales se ha asociado a las enzimas degradadoras de polisacáridos de pared celular que produce, consideradas así como factores de virulencia. Entre estas enzimas se encuentran: pectinasas, xilanasas y celulasas principalmente. Sin embargo, existen además enzimas que favorecen el crecimiento y

desarrollo de hongos sobre alimentos, tal es el caso de las amilasas. Un gran porcentaje de la semilla de los cereales está conformada por almidón, sustrato que al degradarse provee de glucosa, la cual es una de las fuentes de carbono más fácilmente asimilable por microorganismos, favoreciendo su crecimiento y proliferación en este tipo de sustratos (de Vries *et al.*, 2017).

Pese a lo anterior, el almidón presenta cierta resistencia ante la hidrólisis enzimática de la mayoría de las amilasas, característica que le es conferida por su arreglo espacial en forma de gránulos semicristalinos e insolubles (almidón nativo). No obstante, se ha reportado que la acción enzimática sobre este sustrato puede llevarse a cabo de manera eficiente por amilasas que cuenten con dominios específicos denominados dominios de unión a almidón (SBD: Starch Binding Domain), los cuales permiten la unión de las enzimas al almidón, lo que favorece la catálisis sobre este último. Aproximadamente el 10% de las enzimas amilolíticas cuenta con este tipo de dominio (Machovic *et al.*, 2005).

A. flavus ha mostrado ser capaz de producir amilasas con SBD, especialmente α -amilasas y glucoamilasas, con secuencias de módulos de unión a carbohidratos de la familia 20 (CBM20) (Base de datos CAZy, Nieto, tesis en proceso). La capacidad de *A. flavus* de producir amilasas con SBD, se cree, podría representar una ventaja para su desarrollo al colonizar semillas de maíz, dado que la presencia de este dominio le permitirá, de manera más eficiente, la utilización de los gránulos de almidón presente en el maíz como fuente de carbono para su crecimiento.

Dado lo anterior, el objetivo principal de este trabajo es determinar si *A. flavus* produce amilasas con capacidad de degradar almidón nativo (con posibilidad de tener un SBD en su estructura) cuando coloniza semillas de maíz, empleando para ello dos cepas con diferentes capacidades aflatoxigénicas y la comparación de sus perfiles amilolíticos.

Con este trabajo se pretende poner en perspectiva si la expresión de amilasas con capacidad degradativa de almidón nativo por *A. flavus* podría jugar un papel durante la colonización de semillas de maíz.

Capítulo 2

2. ANTECEDENTES

2.1 El género *Aspergillus*

Aspergillus es un tipo de hongo en el que su estructura filamentosa favorece su crecimiento invasivo sobre superficies vegetales. Además, la presencia de sistemas eficientes de secreción de enzimas le permite crecer sobre estos sustratos y justifican su enorme versatilidad catabólica.

Aspergillus es uno de los microorganismos más comunes en el ambiente. Existen más de 350 especies identificadas, todos agrupados porque forman estructuras reproductivas asexuales similares, siendo el conidióforo la estructura característica de este género (Fig. 1). Los Aspergilli, en su mayoría, se reproducen sólo por esporas asexuales, las cuales, son clonales, por lo que la esporulación de una colonia de este género da como resultado la formación de millones de propágulos genéticamente idénticos (Bennett, 2009).

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar los aspergilos en secciones, por ejemplo, *Circumdati*, *Flavi*, *Fumigati*, *Nigri* y otras, o grupos como: *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, entre otros, como se muestra en el Tabla 1 (Carrillo, 2003; Samson *et al.*, 2006).

Tabla 1. Características de los grupos/secciones de *Aspergilli* (Carrillo, 2003).

SECCIÓN	GRUPO	CONIDIOS	MÉTULA	VESÍCULA	CONIDIÓFORO	OTROS
<i>Aspergilli</i>	<i>A. glaucus</i>	verde, rugoso	no	globosa a espatulada	liso	cleistotecio amarillo o anaranjado, osmófilo
<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>	blanco	si	globosa	liso	esclerocio
<i>Cervini</i>	<i>A. cervinus</i>	anaranjado	no	globosa	liso	-
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	amarillo	si	globosa	liso o rugoso,	esclerocio amarillo
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	verde claro	no	claviforme	liso	-
<i>Cremeri</i>	<i>A. cremeoflavus</i>	verde, pardo	si/no	globosa	liso	cleistotecio crema, osmófilo
<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i>	pálido, canela	si	espatulada	liso, pardo	células de Hülle
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	verde, pardo	si/no	globosa	rugoso	esclerocio
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	verde azulado	no	espatulada	liso	-
<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	verde oscuro	si	espatulada	liso, pardo	ascosporos rojos, células de Hülle
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	negro	si/no	globosa	liso	esclerocio
<i>Ornati</i>	<i>A. ornatulus</i>	aceituna, verde amarillento	no	espatulada	liso	-
<i>Restricti</i>	<i>A. restrictus</i>	verde oscuro, no forma de tonel	no	piriforme	liso	osmófilo
<i>Sparsi</i>	<i>A. sparsus</i>	aceituna, pardo	si	globosa a piriforme	rugoso	-
<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	canela, pardo	si	globosa	liso	-
<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	gris aceituna	si	oval	liso, pardo	-
<i>Versicolores</i>	<i>A. versicolor</i>	verde	si	variable	liso	células de Hülle
<i>Wentii</i>	<i>A. wentii</i>	beige	si	variable	liso a rugoso	-

La principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus* es el color. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Bajo el microscopio se pueden observar cabezas conidiales en cuatro formas básicas: globosa, hemisférica, columnar y claviforme (Fig. 1) (Carrillo, 2003).

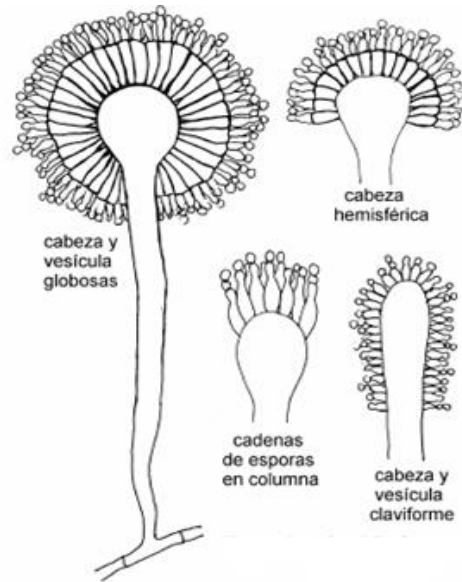


Fig. 1. Representación esquemática de la estructura microscópica de los tipos de conidióforos del género *Aspergillus* (Carrillo, 2003).

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos *Aspergilli* hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte (Carrillo, 2003). La base del conidióforo es en forma de “T” o “L” y se llama célula de pie, a pesar de que no es una célula separada, y es una característica del conidióforo de *Aspergillus* (Bennett, 2009).

Este género contiene varias especies de importancia económica, ya sea positiva o negativa, para la industria, la agricultura y la medicina. Desde tiempos remotos han sido empleados en la fermentación de alimentos. Dentro de este género también se encuentran algunas especies potencialmente patógenas como *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* y otras.

2.1.1 Grupo *Aspergillus flavus*

Aspergillus sección *Flavi*, también referido como el grupo *Aspergillus flavus*, es de interés general por su potencial toxigénico y usos a nivel industrial. La sección *Flavi* está dividida en dos grupos de especies (Rodríguez *et al.*, 2007):

- a) Especies aflatoxigénicas: *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, causan problemas graves en productos agrícolas a nivel mundial porque tienen la capacidad de producir metabolitos altamente tóxicos y carcinógenos llamados aflatoxinas. Pueden producir la sustancia carcinogénica natural más potente conocida, aflatoxina B1, durante la infección de semillas, lo que resulta en la disminución del valor de los

cultivos considerándose además como una gran amenaza para la salud humana y el ganado (Bennett, 2009; Mellon *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2007).

- b) Especies no aflatoxigénicas: *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. tamarii*, empleadas tradicionalmente para la producción de alimentos fermentados (Rodrigues *et al.*, 2007).

2.1.1.1 *Aspergillus flavus*

A. flavus es un hongo saprófito que tiene una amplia distribución mundial y es frecuentemente aislado de cultivos agrícolas. Crece de forma agresiva en todas las etapas de la cadena alimenticia; en el campo, en el almacenamiento y en casa en un vasto número de sustratos (particularmente bajo condiciones de alta humedad ambiental), teniendo la capacidad de crecer en medios simples y complejos. Este hongo puede crecer en un intervalo de temperatura entre 6 y 45 °C a una actividad de agua (A_w) entre 0.78 y 0.99. Sin embargo, la temperatura y A_w óptimos de desarrollo son 36 °C y 0.95, respectivamente.

Por otro lado, *A. flavus* es reconocido como productor de aflatoxinas, particularmente de la aflatoxina B1 (AFB1; carcinógeno natural más potente conocido), y se ha reportado que su producción se ve favorecida por condiciones de estrés, tales como temperaturas entre 27 y 33°C y una A_w de 0.99, por lo que los problemas asociados a la presencia AFB1 en cultivos son más frecuentes en climas tropicales (Carrillo, 2003; Armijo y Calderón, 2009).

A. flavus crece preferentemente en cultivos de maíz, algodón y cacahuate; aunque se ha aislado de otros granos e incluso de especias. Es considerado un patógeno oportunista (Bennett, 2009) que, por definición, ataca a cultivos especialmente en estrés, inmunosupresión o dañados.

2.2 Maíz

El maíz es uno de los granos mayormente cultivados a nivel mundial. Este es un cultivo muy susceptible a la contaminación por *A. flavus*, por lo que es considerado como una de las principales fuentes de exposición a aflatoxinas en humanos (Khlangwiset *et al.*, 2011; Armijo y Calderón, 2009; Chen *et al.*, 2016; Scarpari *et al.*, 2014). La susceptibilidad del maíz a la infección por *A. flavus* se relaciona íntimamente con su composición, dada la capacidad de este organismo de producir y secretar diversas enzimas hidrolíticas para su proliferación.

El grano de maíz maduro se compone de cuatro partes principales (Fig. 2):

- 1) Base del grano (0.8%): es el remanente del pedúnculo que une la semilla a la mazorca. Se compone de elementos fibrosos insolubles, dispuestos en una estructura esponjosa bien adaptado para una rápida absorción de agua. Actúa como la principal vía para la entrada de agua u otros líquidos o gases en el grano (Autio *et al.*, 2009).

- 2) Pericarpio (5.3%); es el revestimiento exterior liso y denso del grano. La capa externa del pericarpio tiene una fina capa de cutina similar a la cera, debajo de la cual hay varias capas de células alargadas comprimidos en un tejido denso. Debajo de esta capa hay un tejido esponjoso conocido como la célula de tubo y una capa de células transversal que actúa como un canal natural para la absorción de agua. Directamente debajo de la capa esponjosa hay una membrana muy delgada conocida como la testa de la semilla. Se cree que esta capa actúa como una membrana semipermeable, lo que limita el paso de moléculas de gran tamaño dentro o fuera del endospermo y el germen. Los líquidos o gases que entran en la región del pedicelo se difunden rápidamente a través de las células transversales y de tubo, de manera que la región entre el pericarpio exterior y la cubierta de la semilla rápidamente se satura con el líquido o gas (Autio *et al.*, 2009).
- 3) Endospermo (82%); inmediatamente debajo de la testa, la aleurona es la primera capa del endospermo, una sola capa de células con paredes celulares gruesas, que además es semipermeable. Esta estructura comprende aproximadamente 3% del peso del grano (Autio *et al.*, 2009).

El endospermo maduro está compuesto por un gran número de células, cada una empaquetada con gránulos de almidón incrustados en una matriz continua de proteína. Esta estructura se compone por dos regiones, el endospermo harinoso: núcleo central del endospermo suave o fluido que se extiende hasta la corona, que se contrae al secarse, causando una "abolladura"; y el endospermo duro. La proporción media de las regiones harinosas y duras es de aproximadamente 1:2, pero varía considerablemente dependiendo del contenido de proteína del grano (Autio *et al.*, 2009).

- 4) Germen (11.9%): se compone de dos partes principales: el escutelo y el eje embrionario. El eje embrionario es la estructura que crece en la plántula durante la germinación y representa sólo 10% del peso del germen. El escutelo funciona como un órgano de almacenamiento, del cual los nutrientes pueden movilizarse rápidamente durante el crecimiento inicial de las plántulas. La superficie del escutelo adyacente al endospermo está cubierta por un epitelio secretor, una capa profundamente surcada por canales o glándulas alineados con células secretoras alargadas. La función de estas células es secretar enzimas que difunden en el endospermo donde digieren el almidón y otros constituyentes para proporcionar alimento al embrión (Autio *et al.*, 2009).

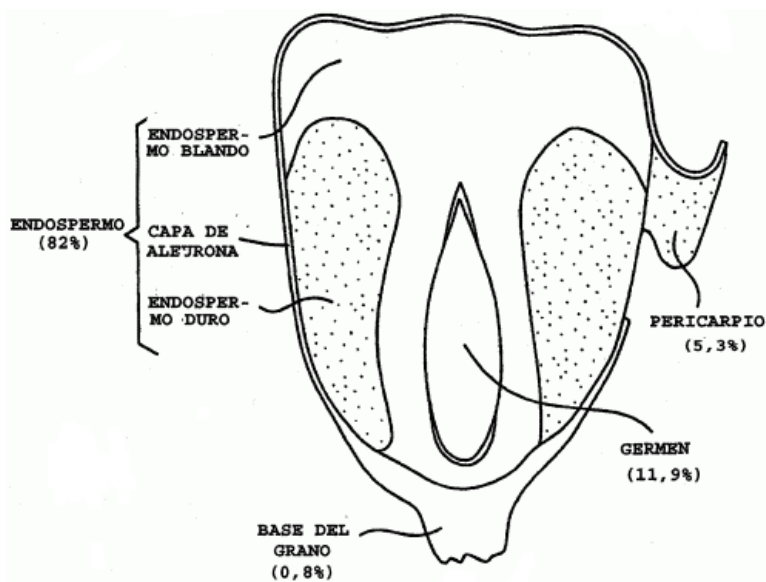


Fig. 2. Representación esquemática de las estructuras principales del grano de (Campos; <http://www.imagui.com/a/partes-del-maiz-i85aGkj5r>)

Los componentes principales de las estructuras del maíz son: almidón, lípidos, proteína, cenizas y azúcares en diferentes proporciones (Tabla 2).

Tabla 2. Composición porcentual química y estructural del grano de maíz (Autio *et al.*, 2009).

		Porcentaje en peso seco del grano total	Composición de las partes del grano (%)				
			Almidón	Lípidos	Proteína	Cenizas	Azúcares
Germen	Intervalo	10.5-13.1	5.1-10.0	31.1-38.9	17.3-20	9.38-11.3	10-12.5
	Media	11.5	8.3	34.4	18.5	10.3	11.0
Endospermo	Intervalo	80.3-83.5	83.9-88.9	0.7-1.1	6.7-11.1	0.22-0.46	0.47-0.82
	Media	82.3	86.6	0.86	8.6	0.31	0.61
Base del grano	Intervalo	0.8-1.1	-	3.7-3.9	9.1-10.7	1.4-2.0	-
	Media	0.8	5.3	3.8	9.7	1.7	1.5
Pericarpio	Intervalo	4.4-6.2	3.5-10.4	0.7-1.2	2.9-3.9	0.29-1.0	0.19-0.52
	Media	5.3	7.3	0.98	3.5	0.67	0.34
Todo el grano	Intervalo	-	67.8-74.0	3.98-5.8	8.1-11.5	1.27-1.52	1.61-2.22
	Media	100	72.4	4.7	9.6	1.43	1.94

Como se puede apreciar, el componente mayoritario en las semillas de maíz es el almidón, polisacárido que puede ser aprovechado por microorganismos para su desarrollo durante la contaminación del maíz.

2.3 Almidón

El almidón, después de la celulosa, es el segundo carbohidrato más abundante en la Tierra; es sintetizado y almacenado como fuente de energía en plantas superiores, constituyendo un polisacárido de reserva que está distribuido tanto en las raíces, tallos y hojas, encontrándose más abundantemente en las semillas de los cereales y tubérculos en forma de gránulos intracelulares compactos. El contenido de almidón en cereales (maíz, arroz, trigo) aproximado es de 30-80%, y en tubérculos (papa, yuca) representa 60-90% de la materia seca (Zeña, 2015). Las plantas sintetizan el almidón como resultado de la fotosíntesis. Se sintetiza en plastidios como un compuesto de almacenamiento para la respiración durante los períodos de oscuridad. También se sintetiza en amiloplastos encontrados en tubérculos, semillas y raíces como un compuesto de almacenamiento a largo plazo (El-Fallal *et al.*, 2012).

El almidón existe en entidades discretas semicristalinas, las cuales reciben el nombre de gránulos. El tamaño, la forma y la estructura de los gránulos difieren entre fuentes botánicas, los diámetros varían en un intervalo de 1 μm a 200 μm ; las formas pueden ser elípticas, esféricas, angulares; simples o compuestas. Existe una amplia diversidad en la estructura y las características del granulo de almidón nativo, incluyendo variación significativa entre gránulos de una misma especie. El almidón está compuesto por dos biopolímeros (Fig. 3), diferentes en su estructura (Sandoval *et al.*, 2005):

- La amilosa; es un polímero esencialmente lineal compuesto enteramente por enlaces α -1-4 D-glucosídico, aunque se presentan algunas ramificaciones en este polímero. A pesar de que generalmente se representa como una estructura de cadenas lineales, usualmente existe en forma de hélice, lo cual le permite formar complejos con ácidos grasos libres, mono y diglicéridos, alcoholes lineales y yodo (Sandoval *et al.*, 2005).
- La amilopectina; es la molécula predominante del almidón y es un polímero ramificado de mayor tamaño que la amilosa, compuesta por segmentos unidos por enlaces α -1-4 glucosídicos, con ramificaciones mediante enlaces α -1-6. La amilopectina es la responsable de la estructura del gránulo de almidón, el cual se compone de áreas cristalinas (cristales, micelas) y no cristalinas (amorfos, fase gel), arregladas en capas concéntricas (Fig. 4a). Las capas cristalinas están conformadas por dobles hélices de las ramificaciones cortas de la amilopectina, mientras que los puntos de ramificación están en las zonas amorfas (Fig. 4) (Sandoval *et al.*, 2005).

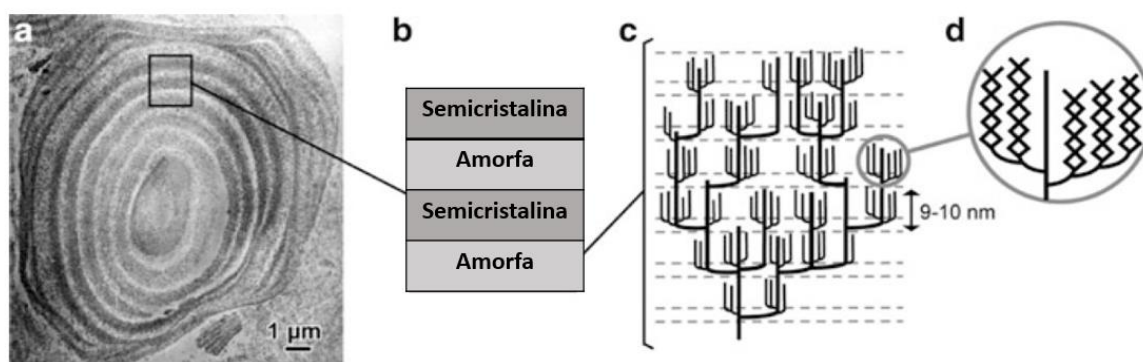
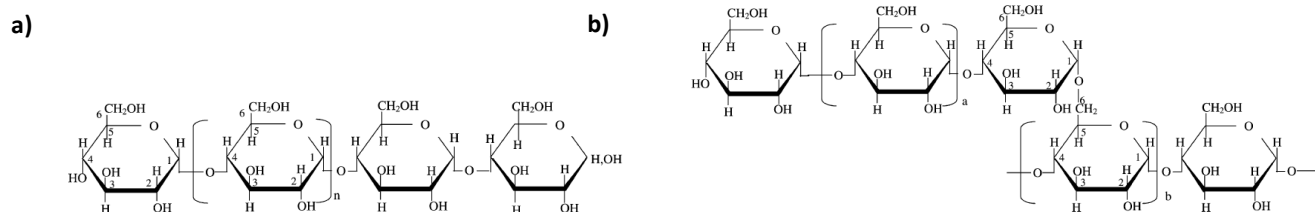


Fig. 4. Representación esquemática de la ultraestructura de los gránulos de almidón desde los anillos de crecimiento hasta amilopectina: **a)** sección ultrafina de un gránulo de almidón de maíz, **b)** anillos alternados de regiones radiales semicristalinas y amorfas, **c)** modelo de la disposición de la amilopectina en las regiones semicristalinas y amorfas, **d)** ampliación de la formación de hélices dobles a partir de las ramificaciones cortas de la amilopectina (modificado de Nakamura *et al.*, 2015).

Las dobles hélices formadas por las cadenas exteriores de la amilopectina forman matrices más o menos ordenadas que dan origen a entidades cristalinas. El arreglo tridimensional de estas dobles hélices, también denominado polimorfismo, refleja un patrón de difracción de rayos X característico, lo que da origen a la clasificación de los diferentes tipos de almidón: tipo A; común en almidones de cereales, tipo B; en tubérculos y tipo C; en ciertas raíces y semillas (Sandoval *et al.*, 2005). El polimorfismo entre los almidones de tipo A y B son claros, sin embargo, se cree que los patrones de difracción del almidón tipo C representan una combinación de los polimorfismos de tipo A y B.

Las dobles hélices dentro de los dos polimorfismos (A y B) son esencialmente idénticas con respecto a la estructura helicoidal. Pese a lo anterior, el arreglo de estas dobles hélices dentro del polimorfismo de tipo A es relativamente compacta y con poco contenido de agua, mientras que el polimorfismo de tipo B tiene una mayor apertura estructural que contiene un núcleo helicoidal hidratado (Fig 5) (Tester *et al.*, 2004).

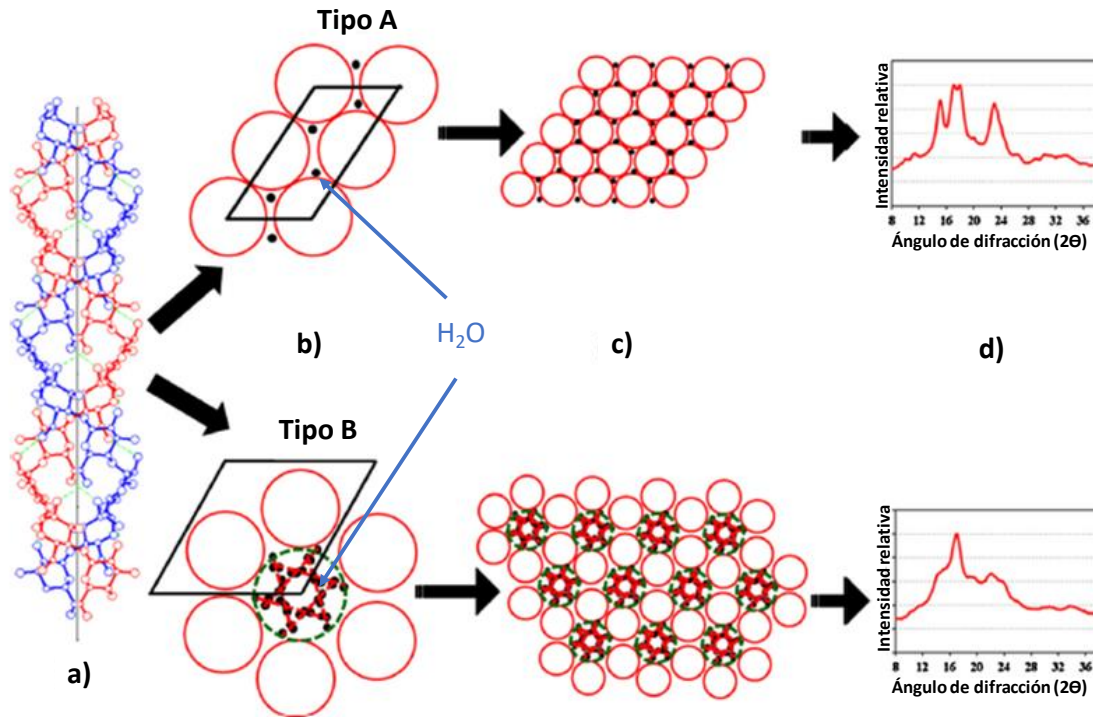


Fig. 5. Representación esquemática del empaquetamiento de las dobles hélices de amilopectina en base al tipo de polimorfismo (A y B) y los patrones de difracción de rayos X correspondientes a) Las dos cadenas en la doble hélice de almidón se mantienen unidas por puentes de hidrógeno intercatenarios. Esta disposición prevalece para ambos polimorfismos, con cambios sutiles en los ángulos de conformación y el paso de hélice. La línea vertical negra representa el eje de la hélice. b) Proyección de la disposición de empaquetamiento vista abajo del eje de la hélice. Cada doble hélice está representada por un círculo. Las esferas negras llenas son moléculas de agua. Las hélices se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno de doble hélice e interacciones mediadas por moléculas de agua. La localización de moléculas de agua en un canal (círculo verde discontinuo) es lo más destacado del empaquetamiento de almidón B, y las líneas discontinuas de color rojo indican enlaces de hidrógeno. entre las moléculas de agua. c) Formación de red de almidón a través de la asociación de varias celdas unitarias. d) Patrones de difracción de rayos X de almidones en el intervalo del ángulo de difracción 8-38°. Las diferencias entre las disposiciones de empaquetamiento dan como resultado el cambio entre los patrones de difracción de almidón A y B, y el almidón A con perfiles más nítidos y bien definidos es comparativamente más cristalino que el almidón B. (Modificado de Janaswamy, 2014).

El gránulo de almidón es considerado como un polímero vítreo, el cual existe en este estado hasta que por calentamiento alcanza la temperatura de transición vítrea (T_g) donde las moléculas pierden su organización y el polímero se vuelve gomoso. Con calentamiento adicional, eventualmente alcanza la temperatura de fusión (T_m), en la cual el granulo pierde su organización completamente (Sandoval *et al.*, 2005).

La gelatinización es el término usado para describir eventos moleculares asociados con el calentamiento de almidón en agua, el cual cambia de una forma semicristalina, a una forma eventualmente amorfa (Sandoval *et al.*, 2005). Este evento resulta de gran relevancia cuando

se habla en términos de digestibilidad. El almidón nativo (semicristalino e insoluble) es relativamente resistente a la digestión, mientras que el almidón gelatinizado es fácilmente digerible por amilasas.

2.3.1 Factores que contribuyen a la resistencia relativa del almidón nativo ante la digestión enzimática.

Como se mencionó previamente, los gránulos nativos de almidón son semicristalinos y resisten la hidrólisis por las amilasas. Los factores que controlan la tasa y perfil de hidrólisis por amilasa *in vitro* e *in vivo* están interconectados y hacen que la investigación en este campo sea complicada (Tester *et al.*, 2006).

A diferencia de los almidones procesados, en los que la estructura se convierte de una semicristalina a otra amorfa, los gránulos de almidón nativo resisten la digestión por la α -amilasa. Las bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos producen α -amilasas (aunque no necesariamente con la misma estructura química) (Tester *et al.*, 2006).

El proceso de digestión nativa de almidón por amilasas es complejo. Hay muchos factores que contribuyen a la resistencia relativa de gránulos de diferentes fuentes para controlar la velocidad y sitio de la digestión. Para comprenderlo se tienen que considerar todas las variables diferentes y cómo inciden en la cinética de asociación entre el almidón y la enzima. Estos efectos pueden ser muy diferentes en términos de significación *in vitro* e *in vivo* (Tester *et al.*, 2006).

Algunas de las variables a considerar son las siguientes:

- *Dimensiones del gránulo:* La forma y el tamaño de los gránulos de almidón varían con la fuente botánica y cuanto más grandes sean los gránulos, menor será la relación superficie / volumen, lo que se relaciona con la superficie potencial para ser unido e hidrolizado por enzimas degradadoras. Algunos estudios han mostrado una mayor influencia del tamaño del gránulo de almidón respecto a la concentración del mismo. La velocidad y la extensión de la hidrólisis por una β -amilasa de almidones de diferentes fuentes botánicas han sido cuantificados por Ring *et al.* (1988) donde se muestra el siguiente comportamiento: trigo > maíz > chícharo > papa, lo que se correlaciona con el tamaño creciente de los gránulos (Tester *et al.*, 2006).

Por otro lado, la extensión de la digestión sobre el almidón también está influenciada por la variedad en términos de distribución química y estructural (Tester *et al.*, 2006).

- *Forma del gránulo:* Aunque los gránulos de almidón son aproximadamente esféricos, la forma varía de "muy" esférica a poliédrica. Esto afecta significativamente la

relación superficie / volumen y, por lo tanto, el potencial de digestión de la amilasa (Tester *et al.*, 2006).

- *Gránulos compuestos*: Estos gránulos compuestos reducen la capacidad de las amilasas para unirse a las superficies de los gránulos (ya que se empaquetan juntos) y potencialmente restringen la hidrólisis (Tester *et al.*, 2006).
- *Contenido de amilosa*: El almidón nativo es parcialmente cristalino. La cristalinidad del almidón nativo varía dependiendo del origen y del pretratamiento. De acuerdo con el concepto actualmente aceptado, la amilopectina forma el componente cristalino mientras que la amilosa existe principalmente en la forma amorfa. La cantidad de hidrólisis del almidón nativo por las amilasas se relaciona inversamente con el contenido de amilosa (Tester *et al.*, 2006; El-Fallal *et al.*, 2012).
- *Contenido de lípidos*: La amilosa puede existir en forma libre o complejada con lípidos en gránulos de almidón nativo. Mientras que el almidón amorfo es hidrolizado fácilmente por la α -amilasa, la presencia de lípido y en particular la amilosa en complejo lipídico proporciona cierta resistencia a la hidrólisis y la digestión (Tester *et al.*, 2006).
- *Cristalinidad y doble hélice en el almidón*: La red cristalina del almidón tipo B contiene más moléculas de agua que las estructuras A, lo que se propone como la razón para una mayor estabilidad de la estructura A (El-Fallal *et al.*, 2012).
- *Arquitectura*: La estructura de los gránulos de almidón modera la forma de digestibilidad de la amilasa. Diferentes tipos de gránulos de almidón se hidrolizan de diferentes maneras con amilasas. Los elementos estructurales como canales y bloqueos pueden influir en la forma en que los gránulos son hidrolizados / digeridos *in vitro* (Tester *et al.*, 2006).

El perfil de erosión de los almidones de maíz ceroso (con alto contenido de amilopectina) y normal por la α -amilasa genera estructuras microscópicas muy enmarañadas, mientras que los gránulos de almidón de maíz y de papa de alto contenido de amilosa exhiben mucha menor endoerosión con una pronunciada porosidad superficial. La α -amilasa que ha penetrado en gránulos de almidón hidroliza preferentemente regiones amorfas antes de cristales ordenados, aunque esto puede no ser evidente en etapas tempranas de hidrólisis (Tester *et al.*, 2006).

Helbert *et al.* (1996) describen el proceso de hidrólisis de gránulos de almidón nativo (maíz) por α -amilasa en una serie de fases interconectadas. En primer lugar, las enzimas se difunden aleatoriamente sobre la superficie de los gránulos. En segundo lugar, la hidrólisis comienza en estos puntos. En tercer lugar, la hidrólisis procede radialmente (centrípeta) y esto da como resultado la formación de un poro y finalmente un canal al núcleo del gránulo. En

cuarto lugar, la enzima está atrapada dentro del gránulo y provoca la hidrólisis local regulada por difusión que se propaga gradualmente (centrífuga) (Tester *et al.*, 2006).

Como se puede observar, las variables antes mencionadas se relacionan principalmente con la naturaleza y estructura del almidón *per se*. Sin embargo, existen además variables involucradas en la degradación de almidón nativo relacionadas directamente con la naturaleza de las enzimas degradadoras de este polisacárido

2.3.2 Amilasas

Las enzimas responsables de la degradación del almidón son llamadas enzimas amilolíticas o amilasas (Horváthová *et al.*, 2000; Sandoval *et al.*, 2005), las cuales, son hidrolasas que escinden moléculas de almidón a otras formas más simples como dextrinas y oligosacáridos progresivamente más pequeños, formados de unidades de glucosa (Gupta *et al.*, 2003). Estas enzimas, además, son capaces de hidrolizar glucanos relacionados, tal es el caso del glucógeno.

Las características y mecanismos de acción de las amilasas dependen de su origen. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos vegetales (juegan un papel importante durante la germinación de semillas), tejidos animales (implicadas en procesos digestivos), y en diversas especies de microorganismos como hongos y bacterias (importantes en mecanismos de invasión y proliferación sobre tejidos vegetales) (Zeña, 2015). Las bacterias y hongos secretan amilasas para llevar a cabo la digestión extracelular (El-Fallal *et al.*, 2012).

En la actualidad, se conocen más de 30 diferentes enzimas amilolíticas. En general, la degradación del almidón es esencialmente llevado a cabo por cuatro grupos de enzimas: endo- y exo-amilasas; actúan principalmente sobre los enlaces α -1,4, enzimas desramificantes; atacan principalmente los enlaces α -1,6, y transferasas; degradan el almidón para catalizar la transferencia de cadenas glucosídicas (El-Fallal *et al.*, 2012; Horváthová *et al.*, 2000). Así, estas enzimas liberan productos como dextrinas, polímeros compuestos progresivamente por unidades de glucosa (Fig. 6), los cuales, a su vez, pueden ser cuantificados y son útiles para estimar la cantidad de enzima presente a partir de la determinación de la velocidad de la reacción (Zeña, 2015).

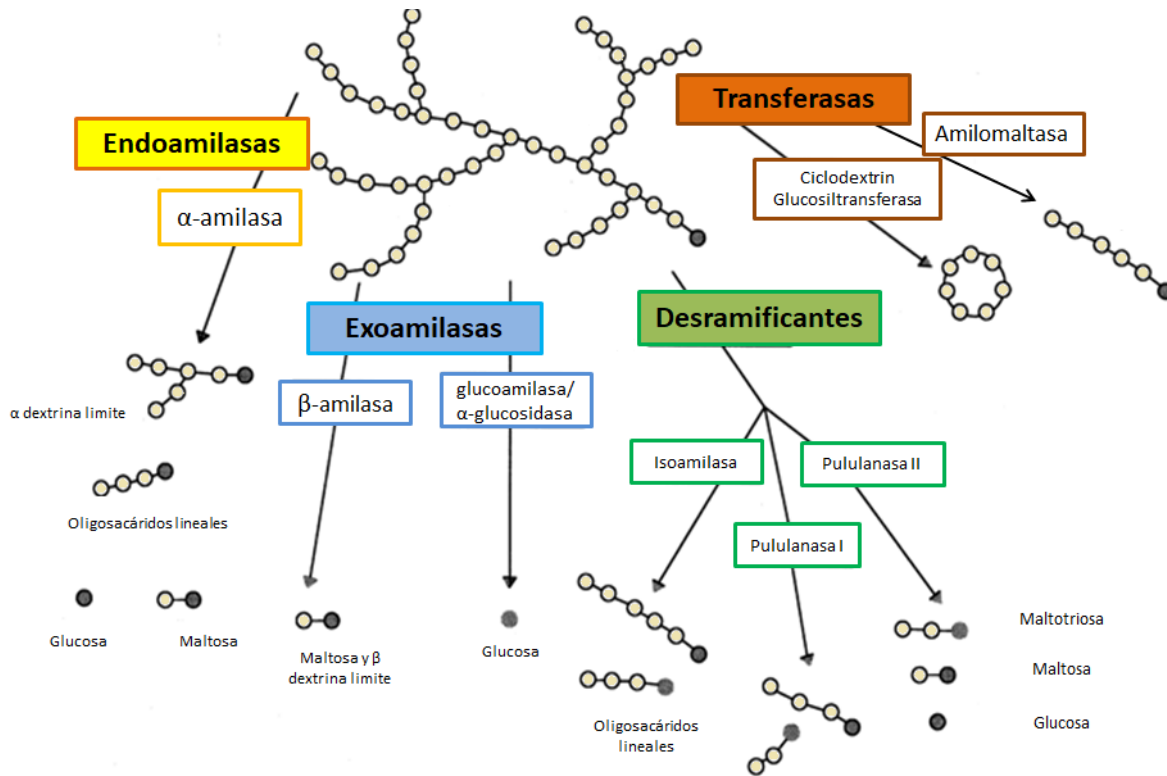


Fig. 6. Representación esquemática de los grupos de enzimas amilolíticas y sus productos de degradación (modificado de Horváthová *et al.*, 2000).

2.3.2.1 Endoamilasas

La α -amilasa o α -1,4-glucosilhidrolasa (EC 3.2.1.1) es la endoamilasa mejor conocida y cataliza la etapa de hidrólisis de los enlaces α -1,4 del almidón y sus oligosacáridos, liberando dextrinas de diferentes longitudes y glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena. Los productos de hidrólisis tienen configuración α en la glucosa del extremo reductor. Los enlaces ramificados α -1,4 también se hidrolizan, pero mucho más lentamente y causa una rápida disminución de viscosidad en soluciones de almidón (Horváthová *et al.*, 2000; Zeña, 2015).

Las estructuras tridimensionales de las α -amilasas han revelado ser enzimas monoméricas con una única cadena polipeptídica plegada en tres dominios (A-C). El dominio más conservado en las enzimas de la familia de las α -amilasas, el dominio A, consiste en un pliegue altamente simétrico de ocho hebras β paralelas dispuestas en un barril rodeado por ocho hélices α (barril TIM). Los residuos de aminoácidos altamente conservados de la familia de α -amilasas implicados en la catálisis y la unión de sustrato se localizan en bucles en los extremos C- de las hebras β en este dominio. Esto es típico de todas las enzimas pertenecientes a la familia de proteínas barril α / β o barril TIM. Las α -amilasas tienen además

un dominio B que sobresale entre la hebra β número 3 y la α -hélice número 3, que consiste de 44-133 residuos de aminoácidos y juega un papel en la unión al sustrato o al Ca^{2+} ; todas las α -amilasas conocidas, con pocas excepciones, contienen un sitio de unión de Ca^{2+} conservado que está situado en la interfase entre los dominios A y B. Se ha observado que este ión estabiliza a la enzima frente a la desnaturalización por calor o álcali. La secuencia de este dominio varía más entre enzimas de esta familia (Fig. 7) (El-Fallal et al., 2012).

Estudios estructurales han confirmado que los sitios activos de glicosilhidrolasas están compuestos de múltiples sitios de unión, o subsitios, para las unidades de azúcares de sustratos poliméricos. La hendidura del sitio activo abierto se forma entre los dominios A y B, de modo que los residuos del dominio B participan en la unión del sustrato. Los sitios de unión del sustrato se cubren habitualmente con residuos aromáticos que hacen interacciones hidrófobas de apilamiento con los anillos de azúcar. Además, los sitios activos contienen muchos residuos que forman puentes de hidrógeno con el sustrato, ya sea directamente o a través de moléculas de agua (El-Fallal *et al.*, 2012).



Fig. 7. Estructura tridimensional de la α -amilasa. El dominio A se muestra en rojo, el dominio B en amarillo y el dominio C, en color morado; el ion Ca^{2+} se muestra en la esfera azul en el centro catalítico (Arguero, 2014).

El dominio A cuenta con cuatro grandes regiones conservadas estrechamente relacionadas con el sitio activo presente en todas las α -amilasas; (i) C-terminal termina en hebra β -3 y un residuo de histidina, el cual interacciona con el residuo de glucosa del sustrato, (ii) hebra β -4 con residuo de ácido aspártico, el cual actúa como nucleófilo durante la catálisis, (iii) hebra β -5 con residuo de ácido glutámico actuando como donador/aceptor de protones, y (iv)

hebra β -7 con un residuo de histidina y un residuo de ácido aspártico que puede formar puentes de hidrógeno con residuos de glucosa del sustrato (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).

Las α -amilasas generalmente son enzimas estables entre pH 5.5 y 8.0 y en presencia de Ca^{2+} alcanzan un óptimo entre 4.8 y 6.5 (Zeña, 2015), aunque de acuerdo con otro autor, pueden actuar en un intervalo de pH desde 2.2 a 10.5, proponiendo que esto es un indicativo de adaptabilidad evolutiva a las diferentes circunstancias ambientales de cada especie que las produce (Arellano y Olmos, 1999).

A pesar de la amplia diferencia de las características entre α -amilasas microbianas, sus masas moleculares están usualmente en el mismo intervalo de 40-70 kDa. Sin embargo, esta masa molecular puede aumentar debido a la glicosilación, como en el caso de la α -amilasa de *Thymus vulgaris* que alcanza 140 kDa. Por el contrario, la proteólisis puede conducir a una disminución de la masa molecular. Por ejemplo, la α -amilasa de *T. vulgaris* 94-2A (AmyTV1) es una proteína de 53 kDa y se han encontrado péptidos más pequeños de 33 y 18 kDa que han demostrado ser productos de una proteólisis limitada de AmyTV1 (El-Fallal *et al.*, 2012). Por lo anterior, se reporta que la masa molecular de estas enzimas puede oscilar entre 10 y 210 kDa (Saranraj and Stella, 2013; Arellano y Olmos, 1999).

2.3.2.2 Exoamilasas

Las exoamilasas también escinden los enlaces α -1,4, por ejemplo, β -amilasa (EC 3.2.1.2), pero algunas de ellas pueden atacar además los enlaces α -1,6, por ejemplo, la glucoamilasa (EC 3.2.1.3) y α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) (Zeña, 2015; El-Fallal *et al.*, 2012). Estas enzimas rompen las cadenas glucosídicas desde el extremo no reductor del almidón y generan solo productos de baja masa molecular, como β -maltosa, β -D-glucosa y α -D-glucosa respectivamente.

La β -amilasa hidroliza los enlaces β -1,4-glucosídicos del almidón con inversión en la configuración del carbono anomérico, pasándolo de la configuración α a β . Los grupos sulfhidrilos son esenciales para su actividad, por lo que la enzima se inactiva por oxidación, por los metales pesados y sus sales. Se puede encontrar en grandes cantidades tanto en tejidos de almacenamiento de almidón como en órganos de plantas. Las β amilasas son estables en un intervalo de pH entre 4.8-5.0 e inactivadas en alrededor de 6.0-7.0 (Zeña, 2015).

La glucoamilasa y α -glucosidasa difieren en su preferencia de sustrato: α -glucosidasa actúa mejor en maltooligosacáridos cortos y libera glucosa con configuración α , mientras que la glucoamilasa hidroliza mejor los polisacáridos de cadena larga (El-Fallal *et al.*, 2012; Horváthová *et al.*, 2000; Base de datos CAZy).

La glucoamilasa (GA) es capaz de hidrolizar enlaces α -1,4 glicosídicos en almidones crudos (escasamente solubles), cuando cuentan con dominios de unión a almidón (descrito más adelante), o solubles y oligosacáridos relacionados (Norouzian *et al.*, 2006).

La masa molecular de GA proveniente de diversos hongos está usualmente en el intervalo de 48 a 90 kDa, exceptuando unas pocas producidas por *Aspergillus niger* de 125 kDa. El contenido de carbohidratos en GA de hongos se reporta que por lo general está en el intervalo de 10-20 % de la masa molecular total de la enzima (Norouzian *et al.*, 2006).

Las glucoamilasas fúngicas son generalmente más activas en valores de pH ácidos (entre 4.0 y 5.5), pero las diversas formas pueden tener diferentes valores de pH óptimos. Muchas glucoamilasas funcionan a temperaturas termófilas, generalmente alrededor de 55-65°C (Norouzian *et al.*, 2006; Arellano y Olmos, 1999; Zeña, 2015). Estas enzimas se estabilizan por Ca^{2+} frente a la desnaturalización por el calor o pH y no necesita de un activador para actuar (Arguero, 2014).

2.3.2.3 Enzimas desramificantes

Las pululanastas (EC 3.2.1.41) e isoamilasas (EC 3.2.1.68) son enzimas desramificantes. Ambas son específicas para enlaces α -1,6 en el almidón (principalmente sobre las fracciones de amilopectina). De acuerdo con la inhabilidad o habilidad para degradar además enlaces glucosídicos α -1,4, las pululanastas son clasificadas en dos categorías: pululanasa I y pululanasa II, respectivamente. La pululanasa II es usualmente referida como α -amilasa-pululanasa o amilopululanasa (Horváthová *et al.*, 2000).

Las pululanastas tienen una temperatura óptima alrededor de 45 °C y pH entre 4.0 y 5.0. (Arguero, 2014).

2.3.2.4 Transferasas

El cuarto grupo de enzimas degradadoras de almidón son las transferasas, que escinden un enlace glucosídico α , 1-4 de la molécula donante y transfiere la parte donada a un aceptor glucosídico, formando un nuevo enlace glucosídico. Estas enzimas catalizan reacciones de transferencia de grupos glucosilo intra e intermolecularmente. Las enzimas tales como la amilomaltasa (EC 2.4.1.25) y ciclodextrina glicosiltransferasa (EC 2.4.1.19) forman un nuevo enlace glucosídico α , 1-4 mientras que enzimas ramificantes (EC 2.4.1.18) forman un nuevo enlace glucosídico α , 1-6 (Horváthová *et al.*, 2000; El-Fallal *et al.*, 2012).

Las ciclodextrin glicosiltransferasas tienen una actividad hidrolítica muy baja y producen oligosacáridos cíclicos con 6, 7 u 8 residuos de glucosa y dextrinas de alta masa molecular altamente ramificadas. Las amilomaltasas realizan una reacción de transglicosilación dando como resultado un producto lineal. Estas constituyen sus propias familias independientes sin

similitudes secuenciales con el resto de las amilasas (Horváthová *et al.*, 2000; El-Fallal *et al.*, 2012).

2.3.2.5 Clasificación de amilasas en familias

De acuerdo con la base de datos de CAZy, la clasificación de las glucosilhidrolasas basada en la secuencia, desarrollada hace más de 20 años (Horváthová *et al.*, 2000), las diferentes amilasas constituyen sus propias familias independientes. Las α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas se encuentran en las familias GH (Glucosil hidrolasas) 13, 14 y 15 respectivamente. Sin embargo, las α -amilasas también pueden encontrarse clasificadas en otras familias, debido a diferencias en la secuencia de aminoácidos de algunas enzimas, aunque con una actividad enzimática relacionada, como las 70, 77 y 57. Además, en la familia 13 se encuentran clasificadas también las pululanasas e isoamilasas. Cabe mencionar que no todas las enzimas pertenecientes a la familia 13 corresponden únicamente a hidrolasas (EC 3), sino también se encuentran algunas isomerasas (EC 2) y transferasas (EC 5), por lo que, dentro de esta familia también se encuentran clasificadas las ciclodextrin glucosiltransferasas y amilomaltasas (Base de datos CAZy).

Las amilasas pertenecientes a una misma familia comparten características similares, tales como: 1) regiones de secuencia conservadas, 2) sitio catalítico (residuos involucrados en la catálisis), 3) mecanismo de reacción, y 4) estructura tridimensional.

Debido a lo anterior y de acuerdo con esta base de datos, estructuralmente hablando, las amilasas pertenecientes a las familias 13 (α -amilasas, isoamilasas, pululanasas, amilomaltasas y ciclodextrin glucosiltransferasas) y 14 (β -amilasas) cuentan con dominios conservados del tipo barril TIM (β/α)₈ (Fig. 8a), mientras que las pertenecientes a la familia 15 (glucoamilasas) adoptan estructuras de barril paralelo (α/α)₆ (Fig. 8b) (Horváthová *et al.*, 2000; Base de datos CAZy).

En cuanto al sitio catalítico, las enzimas de la familia 13 cuentan con un residuo de Asp como nucleófilo y un residuo de Glu como donador de protones, mientras que las de las familias 14 y 15 tienen dos residuos de Glu (Horváthová *et al.*, 2000).

Por otro lado, en el caso de las amilasas de las familias 14 y 15 los mecanismos de reacción son de conversión del carbono anomérico de configuración α a β , mientras que para la familia 13 es un mecanismo de retención de la configuración α del carbono anomérico (Fig. 9) (Horváthová *et al.*, 2000).

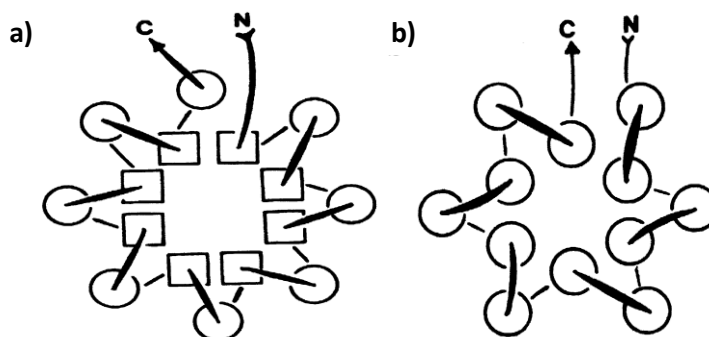
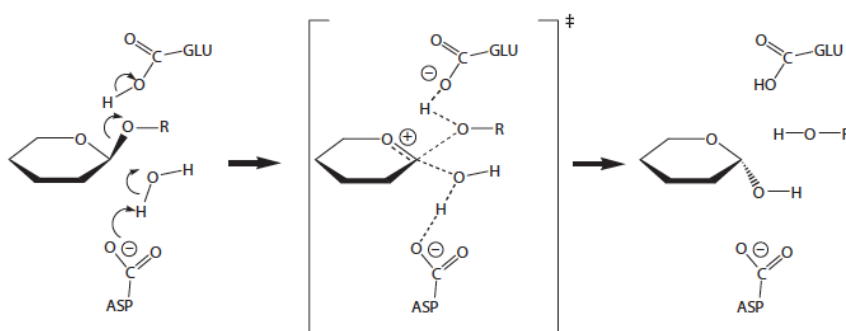


Fig. 8. Representación esquemática de la vista lateral de las estructuras de los dominios **a)** barril TIM (β/α)₈ y **b)** barril paralelo (α/α)₆. Círculos; representan α -hélices, cuadrados; representan hebras β (Horváthová *et al.*, 2000).

Mecanismo de inversión



Mecanismo de retención

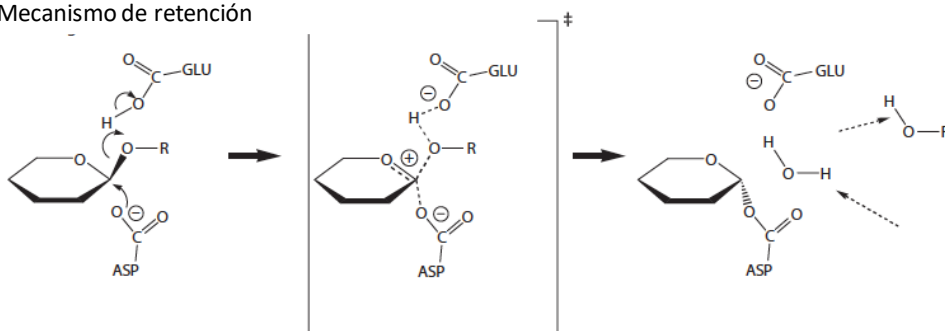


Fig. 9. Representación de los mecanismos de reacción de retención e inversión propuestos para amilasas (Modificado de Sinnott, 1998).

2.3.2.6 Degradación de almidón nativo por amilasas; dominios de unión a almidón

La adsorción de amilasas se considera con frecuencia un requisito previo para la hidrólisis del almidón nativo. Para esta adsorción, algunas amilasas contienen un módulo de unión a carbohidratos (CBM por sus siglas en inglés). Los CBM se definen como una secuencia de aminoácidos contenida dentro de una enzima o proteína con actividad sobre azúcares o capaz de interactuar con ellos, que tiene un plegamiento discreto y actividad de unión a

carbohidratos. Estos módulos tienen como función principal incrementar la eficiencia catalítica de las enzimas con los sustratos solubles y/o insolubles, incrementando la concentración de la misma en la superficie del polisacárido, al anclar la proteína y aproximar el módulo catalítico al sustrato (García *et al.*, 2012).

Los CBM comprenden de 40 a 200 aminoácidos con un pliegue discreto que posee función de unión a carbohidratos y suele ser contiguo a una enzima activa en carbohidratos. El CBM no tiene actividad catalítica; parece permitir la interacción entre el sustrato insoluble y la enzima, llevando el sustrato al sitio activo en el dominio catalítico y consecuentemente mejorando la hidrólisis. Los CBM se han clasificado en 83 familias basándose en sus similitudes de secuencia, según la base de datos CAZy (Base de datos CAZy; Guillén *et al.*, 2007).

Aproximadamente el 10% de las enzimas amilolíticas comúnmente poseen una o varias copias de CBM en el N o C-terminal (Fig. 10a), que facilitan la unión al almidón nativo, denominados dominios de unión al almidón (SBD por sus siglas en inglés), y varios de ellos se encuentran clasificados en las familias: CBM20, 21, 25, 26, 34, 41,48,58, 68, 69,74, 82 y 83. Este dominio independiente se ha identificado en amilasas de varios microorganismos tales como hongos filamentosos, bacterias Gram positivas, proteobacterias, actinomicetos y arqueas. La función de unión al almidón se ha demostrado sólo para algunas glucosil hidrolasas; α -amilasas, ciclodextringlucosiltransferasas y transferasas de la familia GH 13 (Guillén *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2015). Sin embargo, el SBD ha sido identificado en α -amilasas, β -amilasas, maltotetrahidrolasas, maltopetahidrolasas, α -amilasas maltogenicas, ciclodextringlucosiltransferasas, acarvosa transferasa y glucoamilasas (Rodríguez *et al.*, 2005).

Una característica compartida por los SBD es la conformación en barril β distorsionado (β sándwich) (Fig. 10b), formada por dos láminas de un número variable de hebras β paralelas y antiparalelas. El tipo de unión es también una característica conservada en los miembros de las familias de proteínas que unen almidón y depende, principalmente, de la interacción hidrofóbica de residuos aromáticos (particularmente tirosinas y triptófanos) con los anillos piranosa del almidón (Guillén *et al.*, 2007).

Se ha visto que la delección de este dominio reduce e incluso nulifica la actividad de las enzimas sobre sustratos insolubles. De forma contraria la inserción de este dominio ha aumentado la actividad de algunas enzimas (García *et al.*, 2012).

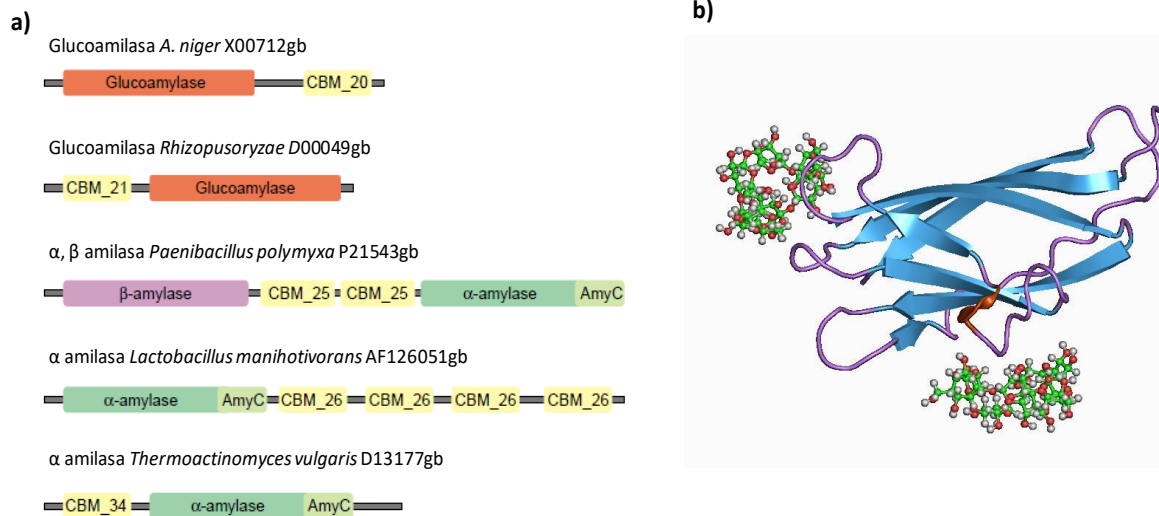


Fig. 10. a) Arquitecturas típicas de amilasas con dominios de unión al almidón (SBD). Los SBD se encuentran en los extremos N o C del dominio catalítico y están representados con cuadros amarillos. Los dominios catalíticos se identifican en diferentes colores: Glucoamilasa; rojo, β -amilasa; púrpura y α -amilasa; verde (Modificado de Rodríguez *et al.*, 2005) **b)** Esquema de la estructura típica de un SBD (β -sandwich) y la ubicación de los sitios de unión a carbohidrato. En la mayoría de los casos, el sitio de unión se localiza hacia la hoja β cóncava, y en menos casos hacia el extremo de la estructura del SBD (Base de datos CAZy).

Los SBD se unen sobre los gránulos de almidón por adsorción directa, no covalente, gracias a las interacciones que son capaces de establecer los residuos de aminoácidos sobre este tipo de superficies (interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno). Los sustratos diferentes al almidón a los que se pueden unir los SBD en su mayoría son productos de degradación del mismo, o bien con estructuras muy semejantes. Se sabe que ninguno de los SBD es capaz de discriminar regiones cristalinas y no cristalinas del almidón, por lo cual la enzima sería capaz de unirse a cualquier región del gránulo de almidón maximizando su potencial de hidrólisis (García *et al.*, 2012). Al poder actuar sobre glucanos altamente ordenados, la unión de CBM *per se* puede incluso resultar en alteraciones estructurales (designadas como interrupción del sustrato) que convierten localmente el carbohidrato en una estructura que favorece la catálisis enzimática posterior (Nakamura *et al.*, 2015).

2.4 Genes y regulación de la expresión de amilasas de *Aspergillus*

Varios *Aspergilli* tienen una larga historia de uso como productores de enzimas que modifican y degradan polisacáridos vegetales. Su amplia capacidad para degradar estos sustratos ayuda a explicar su presencia en muchos hábitats diferentes, lo que significa que ellos no se especializan en ningún componente de planta en particular, y tienen la capacidad de degradar todos los polisacáridos de la biomasa vegetal (de Vries *et al.*, 2017).

Todos los genomas de *Aspergillus* son similares en tamaño (29-36 Mb). El número predicho de los genes en los Aspergilli están en el intervalo de 9113-13,553. Una proporción sustancial (80% en promedio) de los genes identificados en los genomas de *Aspergillaceae* tienen homólogos en otros linajes de hongos, lo que indica que alrededor del 20% son específico para este género (de Vries *et al.*, 2017).

A. flavus cuenta con 37 Mb en su genoma. Un estudio de la comparación de número de genes por familia CAZy involucrados en la degradación de biomasa de la planta, reveló que *A. flavus* cuenta con 16 genes codificantes para celulasas, 18 para xilanasas, 12 para mananasas, 8 para xiloglucanasas, 73 para pectinasas; mayor número reportado en comparación con otras especies del género, 4 para inulinasas y, particularmente, al menos con 25 genes codificantes de diversas isoenzimas de amilasas comprendidas en familias como GH13, GH15, GH31 Y GH 133 (de Vries *et al.*, 2017).

2.4.1 Inducción de amilasas

En términos generales, la expresión y secreción de enzimas degradadoras de polisacáridos requiere de la presencia de niveles constitutivos bajos de enzimas extracelulares o unidas a la pared celular que liberen moléculas de señal como indicativos de la presencia del polisacárido, las cuales son transportadas al interior de la célula donde puede convertirse o funcionar directamente como un inductor, desencadenando así la síntesis de las enzimas correspondientes (Tsukagoshi *et al.*, 2001).

Dentro de los inductores (o moléculas de señal) que han mostrado dicha función en Aspergilli se encuentran algunos azúcares monoméricos o productos de los mismos formados intracelularmente, homo y heterodisacáridos, que pueden formarse como productos de degradación o por transglicosilación (Tsukagoshi *et al.*, 2001). Se ha observado que la inducción del sistema amilolítico en *Aspergillus* es causada por la presencia de almidón, maltosa, isomaltosa (compuesto fuertemente inductor) y D-glucosa (en bajas concentraciones) (vanKuyk *et al.*, 2012).

Estudios genéticos con *A. nidulans* han mostrado la presencia de sistemas reguladores específicos de vía que controlan a un conjunto de genes que deben expresarse para catabolizar sustratos en particular. Esto ha sido descrito para genes implicados en la utilización de fuentes de carbono. Dos genes codificantes de reguladores, *xlnR* y *amyR*, implicados en la activación transcripcional de genes que codifican para enzimas extracelulares, xilanasas y amilasas, respectivamente, se han identificado en *A. niger*, *A. oryzae* y *A. nidulans* (Tsukagoshi *et al.*, 2001).

Particularmente, el activador transcripcional de amilasas de *A. oryzae*, AmyR, comprende 604 aminoácidos con un clúster binuclear de Zn₂Cys₆ con un motivo de unión al ADN en el

N-terminal (Fig. 11). La proteína AmyR se une a dos tipos de secuencias; uno es caracterizado por dos tripletas CGG separadas por ocho nucleótidos, y el otro sólo tiene un triplete CGG seguido de la secuencia AAATTTAA (Tsukagoshi *et al.*, 2001; Culleton *et al.*, 2013).

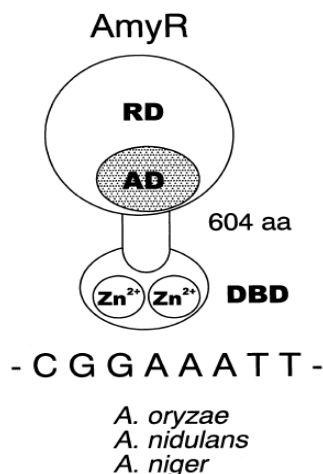


Fig. 11. Representación esquemática del activador transcripcional de amilasas, AmyR, de *Aspergillus* y la secuencia consenso de reconocimiento. El gen *amyR* se ha identificado en *A. oryzae*, *A. nidulans* y *A. niger*. El número de aminoácidos indica el contenido en *A. oryzae*. El dominio de unión al ADN binuclear de zinc (DBD; DNA-binding domains) se representa esquemáticamente. Sin embargo, el modo exacto de su unión a ADN queda por dilucidar. El dominio regulatorio (RD; regulatory domain) y el dominio de activación (AD; Activation domain) aún no se han caracterizado en detalle (Tsukagoshi *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que AmyR activa la expresión de glucoamilasa, α -amilasa y α -glucosidasa en presencia de azúcares inductores (Tsukagoshi *et al.*, 2001).

Se ha demostrado una regulación de AmyR a nivel subcelular en *A. nidulans* y *A. oryzae*, observando que, en presencia de glucosa, maltosa e isomaltosa se induce la expresión de genes de amilasas y se desencadena la localización nuclear de AmyR, mientras que en ausencia de azúcares inductores éste se localiza en el citoplasma. La inducción rápida de la expresión del gen de amilasa y la localización nuclear de AmyR por isomaltosa sugiere que este azúcar es el inductor más potente para la activación de este regulador (Suzuki *et al.*, 2014).

Aunque, como ya se mencionó, la glucosa puede actuar como inductor de la expresión de amilasas, en presencia de este monosacárido, bajo ciertas concentraciones, la expresión de genes amilolíticos está fuertemente reprimida por un factor de transcripción de tipo C₂H₂; CreA (Suzuki *et al.*, 2014).

2.4.2 Represión catabólica

La glucosa es la fuente de carbono preferida para la mayoría de los microorganismos. La selección de la fuente de carbono más energéticamente favorable es una estrategia de

supervivencia para los microorganismos al ser compatible con el rápido crecimiento y desarrollo requerido para colonizar diversos hábitats. Este proceso de selección de fuente de carbono se conoce como represión catabólica por carbono (RCC). En *Aspergillus*, la RCC está mediada por el factor de transcripción CreA, una proteína C_2H_2 de unión a ADN. Los microorganismos asimilan glucosa y azúcares altamente favorables antes de cambiar a fuentes de carbono menos favorecidas. Es por ello que, en detección de glucosa, genes que codifican enzimas requeridas para la degradación de fuentes alternativas de carbono (p. ej., amilasas, xilanasas, celulasas y arabinasas) se reprimen (Ries *et al.*, 2016; Petersen *et al.*, 1999). Se han encontrado en los promotores de genes inducidos por almidón posibles sitios de unión de CreA; por lo tanto, es probable que la represión de esos genes en presencia de un exceso de una buena fuente de carbono se deba a la acción de CreA. Por ejemplo, se ha demostrado que el dominio de unión al ADN de CreA puede unirse al promotor de la α -amilasa de *A. oryzae*.

La regulación de la absorción de glucosa en hongos está mediada por sensores como Rco3, el cual sensa las concentraciones de glucosa en el medio y emite una señal para la inducción de transportadores específicos. Cuando la concentración de glucosa es baja, se inducen transportadores de alta afinidad, por el contrario, cuando hay un exceso de glucosa, se activan transportadores de baja afinidad. Lo anterior está mediado por la cascada de señalización que da pie a la activación/inactivación de PKA. PKA regula la activación o inactivación por fosforilación del factor de transcripción de los diferentes transportadores (Adnan *et al.*, 2018). En el trabajo de Nandakumar *et al.* (1999), se reporta que en *A. nidulans* la producción de actividad de α -amilasa y amiloglucosidasa se ve disminuida al aumentar la concentración de glucosa en el medio a concentraciones de 5 y 10 mg/mL, respectivamente, mientras que en concentraciones por arriba de 50 mg/mL se reprime completamente la producción de ambas enzimas.

Por otro lado, se ha propuesto una autorregulación de la expresión de CreA, debido a que las secuencias de unión a CreA están presentes dentro de su región promotora. Además, se cree que esta regulación ocurre a través de desubiquitinación y/o fosforilación para controlar la función y la localización de CreA. La RCC en hongos también involucra algunos elementos cruciales como Hexocinasas, cAMP, proteína quinasa (PKA), proteínas Ras, receptor acoplado a proteína G (GPCR), adenilato ciclasa, RcoA y SnfA (Fig.12) (Ries *et al.*, 2016)

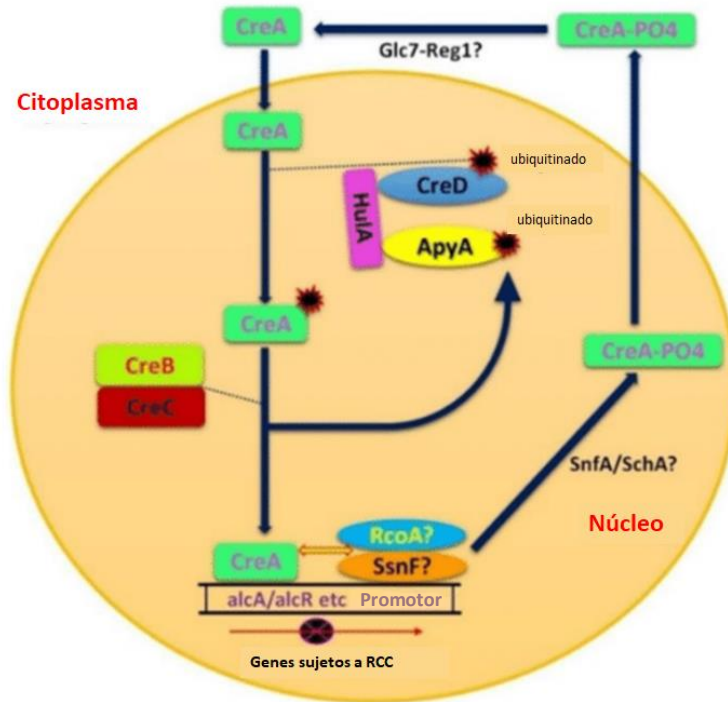


Fig 12. Mecanismo de regulación de RCC propuesto para *A. nidulans*. Modelo que representa la interacción del complejo CreA, CreB, CreC, CreD, Hula, ApyA, RcoA, SsnF, SnfA y Glc7-Reg1 en RCC. CreD junto con Hula / ApyA se requiere para conjugar ubiquitina y CreA. El complejo CreB-CreC se requiere para eliminar la ubiquitina del complejo CreA-Ub de modo que CreA pueda reprimir los genes sometidos a RCC. El papel de RcoA y SsnF en la unión con los promotores de genes junto con CreA aún no está claro. Sin embargo, la eliminación de RcoA y SsnF puede ser letal para *A. nidulans*. SnfA y SchA pueden jugar un papel sinérgico o superpuesto en la regulación de la desregulación de CreA (modificado de Adnan *et al.*, 2018).

Capítulo 3

3. JUSTIFICACIÓN

A. flavus se encuentra asociado de manera importante con la contaminación de cultivos de maíz, lo que representa grandes pérdidas económicas y de alimento, así como un grave riesgo a la salud. Sin embargo, se cuenta con pocos estudios particularmente dirigidos a elucidar los mecanismos de proliferación de *A. flavus* que permitan comprender su desarrollo sobre granos de maíz.

La primera barrera del maíz ante la infección por microorganismos es el pericarpio, estructura que se compone principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectina. *A. flavus* es capaz de penetrar esta estructura mediante la secreción de enzimas degradadoras de estos polisacáridos. Una vez pasada esta barrera, el hongo se establece en el tejido vegetal y se desarrolla sobre el mismo, para lo cual, echa mano de los componentes presentes en el interior del grano. Asimismo, *A. flavus* es clasificado como un patógeno oportunista, por lo cual, en un gran número de casos, este se establece en el tejido vegetal dañado, y en consecuencia, no requiere necesariamente de la degradación previa del pericarpio para su establecimiento ni su desarrollo.

La composición de las semillas de maíz es variable, sin embargo, el componente mayoritario es el almidón ($\approx 70\%$) y se encuentra dispuesto en forma de gránulos semicristalinos e insolubles (nativo), característica que le confiere cierta resistencia ante el ataque enzimático por amilasas. La capacidad de degradar almidón nativo de diversas amilasas se asocia generalmente con la presencia de dominios de unión a almidón (SBD; Starch Binding Domains); estos dominios incrementan la eficiencia catalítica de las enzimas. La degradación de este polisacárido, en general, proporciona una gran cantidad de glucosa que puede ser aprovechada como fuente de carbono, favoreciendo con ello el crecimiento de diversos microorganismos.

Particularmente, *A. flavus* cuenta con al menos 25 genes codificantes de amilasas. En estudios previos dentro del grupo de trabajo se han obtenido evidencias de la capacidad de *A. flavus* de producir amilasas con dominios de unión a almidón. Por otro lado, de acuerdo con la base datos de CAZy, se ha registrado una glucoamilasa con dominio de unión a almidón en la familia CBM20 de esta especie.

Por lo anterior surge un interés particular por estudiar su sistema amilolítico producido durante la infección de granos de maíz, con especial interés por aquellas amilasas con dominios de unión a almidón.

4. HIPÓTESIS

A. flavus es un contaminante recurrente en semillas de maíz, las que se componen principalmente de almidón nativo, por lo que para su colonización *A. flavus* produciría amilasas con capacidad de degradar este tipo de almidón.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar si *A. flavus* produce amilasas con capacidad de degradar almidón nativo cuando crece sobre granos de maíz.

5.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar un modelo de granos de maíz inactivos enzimáticamente, con la menor alteración de las propiedades fisicoquímicas del almidón, para el estudio del sistema amilolítico producido por *A. flavus* al crecer sobre ellos.
- Determinar si el perfil amilolítico de *A. flavus* es dependiente de la fuente de carbono en el medio.
- Comparar el perfil amilolítico de dos cepas de *A. flavus* (toxigénica y no toxigénica) y determinar si existen diferencias significativas entre ellos.
- Identificar la(s) amilasa(s) involucrada(s) en la degradación de almidón nativo.

Capítulo 4

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

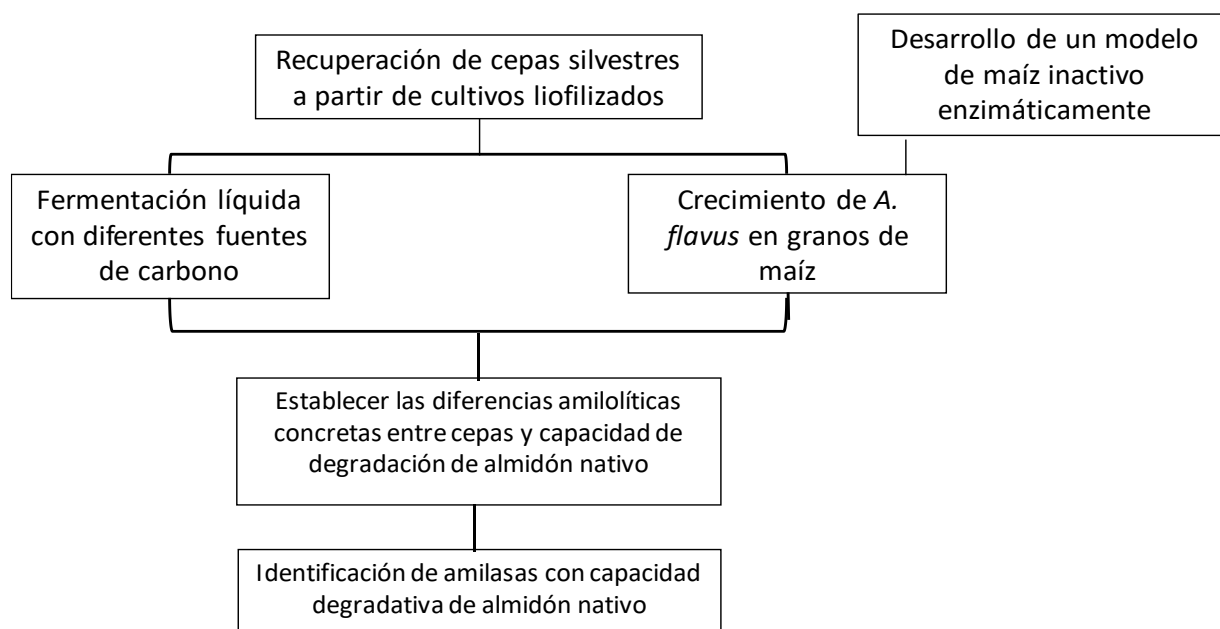


Fig. 13 Esquema general del estudio del sistema amilolítico de dos cepas de *A. flavus* (CECT 2687; toxigénica y NNRL 6541; no toxigénica).

7. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 Preparación de inóculos.

Para cada ensayo de crecimiento, se requirió de la preparación previa del inóculo a emplear, para lo cual se llevó a cabo la recuperación de las cepas silvestres, así como la obtención de suspensión de esporas y, en algunos casos, la obtención de micelio como inóculo.

7.1.1 Recuperación de microorganismos.

Se emplearon dos cepas de *A. flavus*: CECT 2687 (toxigénica) y NRRL 6541 (no toxigénica). Estas se recuperaron de un resguardo de perlas de sílica con esporas liofilizadas, transfiriendo de 3 a 5 perlas a cajas de petri con medio Sabouraud y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Una vez que crecieron ambas cepas, se transfirieron por estría a cajas de medio Sabouraud por duplicado para obtener colonias separadas. Se seleccionaron colonias aisladas de cada cepa y se transfirieron a otras cajas de medio Sabouraud (Bioxon) tomando el inóculo con un asa micológica estéril y extendiéndolo sobre el medio con un asa de Digrafsky. En todos los casos, se incubaron a 37 °C durante 72 h después de ser inoculadas.

Con el fin de mantener las cepas viables, se resembraron cada 15 días en medio Sabouraud (Bioxon) por siembra masiva. Se incubaron a 37 °C por 72 h. Las cajas se sellaron con parafilm y se almacenaron a 4 °C.

7.1.2 Cosecha de esporas.

Ambas cepas se sembraron en medio Sabouraud por siembra masiva y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Al finalizar la incubación, se agregaron 10 mL de solución salina isotónica (NaCl Baker) (0.9 % p/v) con Tween 80 (Aldrich Chemical Company) (0.005 % v/v) estéril (Soln. 1) a cada caja. Se raspó la superficie suavemente con un asa de Digrafsky para extraer las esporas fúngicas. La suspensión obtenida de cada caja se transfirió a un tubo estéril para centrifuga de 15 mL con tapa y se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y las esporas se resuspendieron en 10 mL de la soln. 1, se agitó en un vórtex a máxima velocidad para lavar las esporas (eliminar el micelio residual), y se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y se repitió el procedimiento de lavado dos a tres veces más, hasta observar el sobrenadante incoloro. Al finalizar los lavados, las esporas se resuspendieron en 5 mL de la soln. 1 y se almacenaron a 4 °C.

7.1.3 Cuenta de esporas

La concentración de esporas de cada suspensión se calculó empleando una cámara de Neubauer. Se colocaron 10 µL de la suspensión en la cámara y se contaron las esporas de dos cuadrantes al microscopio al 40x. Cada suspensión se diluyó cuantas veces fue necesario para obtener de 20-50 esporas por cuadro (16 cuadros por cuadrante).

Se calculó la concentración de esporas en base a la siguiente fórmula:

$$[\text{esporas}] (\text{esporas/mL}) = \text{Promedio de esporas por cuadro} \times 4 (\text{cuadrantes}) \times \text{factor de dilución} \times 2500 (\text{factor de la cámara}).$$

7.1.4 Obtención de micelio para inóculo

Se inocularon matraces de 500 mL con 150 mL de medio basal al 2 % (p/v) de fructosa (Sigma) y 0.3% de extracto de levadura (Bioxon) a pH de 7.5 con 1×10^6 esporas/mL en

suspensión de la cepa correspondiente. Se incubaron a 37 °C durante 20 h con agitación constante a 300 rpm para mantener la aireación y homogeneizar el medio.

Transcurridas las 20 h, se filtró el micelio a través de papel Whatman No. 1 estéril en un embudo Buchner al vacío. El micelio se lavó con 250 mL de solución salina isotónica (NaCl Baker) (0.9% p/v) con Tween 80 (Aldrich Chemical Company) (0.005 % v/v) estéril al vacío. Se recuperó el micelio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril, se tomó 1 mL y se filtró al vacío sobre un papel Whatman No. 1, previamente puesto a peso constante. Se dejó secar a 70 °C hasta obtener peso constante y se calculó la concentración en g de micelio/ mL de suspensión.

7.2 Producción de enzimas en medio líquido de cepas silvestres

Con la finalidad de obtener filtrados enzimáticos con diferentes fuentes de carbono, inductores y no inductores de amilasas y hacer una comparación con respecto al obtenido al crecer en granos de maíz, se crecieron ambas cepas silvestres en medio líquido.

7.2.1 Medios y condiciones de cultivo

Para la producción de las enzimas, se inocularon matraces de 500 mL, con 100 mL de medio, con una concentración de 0.15 g/L de micelio de *A. flavus* CECT 2687 o *A. flavus* NRRL 6541 en el total de volumen. Los medios de cultivo contenían medio basal (KH_2PO_4 0.01 M, K_2HPO_4 0.01 M y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.04 M) y 1 % p/v de fuente de carbono (glucosa, amilopectina, maltosa, almidón de maíz, harina de maíz nixtamalizado, maíz triturado u olote). Se prepararon dos soluciones y se esterilizaron por separado. La solución de fosfatos se preparó al 2X y se justó a pH de 8.5. Por otro lado, se prepararon 50 mL con la fuente de carbono y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 2x en lo matraces de 500 mL, y fueron ajustados a pH de 6.5. Se esterilizaron a 121 °C y 15 psi por 20 min. Una vez estériles ambas soluciones, se adicionaron 50 mL de la solución de fosfatos a cada matraz con el fin de obtener un pH aproximado de 8 y un medio con una concentración de KH_2PO_4 0.01 M, K_2HPO_4 0.01 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.04 M y 1 % p/v de fuente de carbono. Los matraces fueron incubados a 37 °C por 72 h en una incubadora con movimiento recíproco a 300 rpm, para favorecer la aireación y homogenización del medio, y muestreados cada 20 h.

Al finalizar la fermentación, se filtró usando papel filtro Whatman 1 para retener la biomasa y sustrato residual. Los filtrados libres de células y sustrato se almacenaron en refrigeración a 4 °C, hasta su análisis.

7.3 Crecimiento en granos de maíz

Se prepararon lotes de 100 g de maíz VC-152 para ser sometidos a esterilización e inactivación enzimática por irradiación con Co-60 a una dosis de 18 kGy o por autoclave. Posteriormente fueron punzados, en el endospermo o el germen (según se requirió) con un

estilete estéril a una profundidad de 1 mm. Cada lote de cultivo fue comprendido por 20 granos inoculados con 1 μL de una suspensión de esporas de concentración conocida (5000 esporas / μL). Cada grano de maíz inoculado se depositó en una tapa de vial de plástico estéril (20 mm de diámetro y 6 mm de altura) y se introdujeron 8 tapas en una caja petri estéril.

Las cajas de petri con los granos inoculados se introdujeron en un recipiente hermético que contenía una cama de papel filtro Whatman No.1 humedecido con 30 mL de agua estéril.

Los granos se incubaron durante 24 h a 37 °C. Pasadas las 24 h, se incubaron a 31 °C durante 9 días como máximo o durante el tiempo establecido para cada ensayo de crecimiento en particular. La humedad se mantuvo adicionando 30 mL de agua destilada estéril al papel filtro cada tercer día.

7.3.1 Extracción de las enzimas secretadas por el hongo en el grano de maíz

Después del tiempo de incubación, a los granos se les retiró el hongo mediante 2 a 3 lavados con de solución salina isotónica (NaCl Baker) (0.9 % p/v) con Tween 80 (Aldrich Chemical Company) (0.005 % v/v) y sanitizadas con un lavado adicional con etanol al 70 %, agitando manualmente durante 1 min en cada lavado. Los granos se envolvieron en papel aluminio y se sumergieron 1 min en nitrógeno líquido. Posteriormente el lote de granos se trituró en un molino de granos de café con un ciclo de 40 s. Se pesaron muestras de 2 g y se agregaron 10 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM y EDTA (Sigma) 1 mM (pH=6.0), se agitaron 1 min en el vórtex a máxima velocidad y se centrifugaron durante 10 min a 4500 rpm. Los extractos se filtraron en papel Whatman No.1 para eliminar el micelio y los residuos del grano triturado. Los filtrados enzimáticos se sumergieron en nitrógeno líquido inmediatamente para conservarlos en congelación hasta su análisis.

7.4 Medición de actividades enzimáticas

A lo largo de todos los ensayos de crecimiento, se requirió de la medición de algunas actividades enzimáticas de interés, para lo cual se emplearon técnicas establecidas.

7.4.1 Medición de actividad amilolítica

Se empleó un medio de reacción que consistió en 1 mL de solución de almidón (Merck) al 1 % (p/v) en amortiguador de acetatos (100 mM) a pH de 5 en tubos de ensayo. Se agregaron 100 μL de filtrado enzimático. Se incubaron en baño maría a 40 °C durante 30 min, deteniendo la reacción con 100 μL de HCl (Baker) 1 M. El ensayo se realizó por duplicado junto con un blanco que consiste en el medio de reacción incubado sin filtrado enzimático, el cual se le agregó después de la adición del HCl.

Posteriormente, se transfirieron 100 μL de cada muestra a tubos con 2.4 mL de solución de lugol (I_2 (Merck) 0.3 % p/v / KI (Baker) 3 % p/v) diluida al 4 %. La medición de la actividad se

basó en la cuantificación de almidón residual mediante la formación del complejo yodo-almidón a través de su absorbancia. Cada muestra se leyó a 620 nm y se analizó mediante la interpolación de los datos en una curva estándar de almidón

Cada unidad de actividad amilolítica (U) la definimos como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 mg de almidón en las condiciones de ensayo.

7.4.2 Medición de actividad amilolítica en placa fina

Se prepararon 30 mL de una solución de agar (Bioxon) al 1.25 % en amortiguador de acetatos 100 mM pH=5.5 y 0.1 % de almidón (Merck) previamente gelatinizado. Se calentó la solución hasta disolver el agar y obtener una mezcla homogénea. La solución se vertió sobre un vidrio de 10x15 cm homogéneamente y se dejó enfriar hasta gelificar. En la película de agar se marcaron 42 pozos distribuidos simétricamente, los cuales se extrajeron con vacío para dejar los orificios libres de agar como se muestra en la Fig. 14.



Fig. 14. Ejemplificación de una placa fina de agar para la medición de actividad amilolítica mediante la formación de halos de degradación. Esta placa corresponde a la medición de actividad de las fracciones obtenidas mediante una corrida de purificación de amilasas por cromatografía de intercambio aniónico a partir de un extracto enzimático de *A. flavus* CECT 2687 cuando crece en granos de maíz. Los números indican el número de fracción medido y Bco es un blanco de actividad correspondiente a agua destilada.

En cada pozo se agregaron 15 μ L de muestra y se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 h. Al finalizar el tiempo de incubación se revelaron las placas con Lugol (I_2 (Merck) 0.3 % p/v / KI (Baker) 3 % p/v) diluida al 4 % y se midieron los halos de degradación alrededor de cada pozo. La actividad se definió como el diámetro del halo de degradación alrededor del pozo bajo las condiciones de ensayo.

Cada unidad de actividad amilolítica (U) las definimos como la cantidad de enzima necesaria para generar un halo de degradación de 1 cm en las condiciones de ensayo.

7.4.3 Medición de actividad amilolítica sobre almidón insoluble (nativo).

Se empleó un medio de reacción que consiste en 0.05 g de almidón (Merck) o 0.05 g de amilopectina de maíz (Sigma) sin gelatinizar en 5 mL de amortiguador de acetatos (100 mM) a pH 5 en tubos de ensayo de 22x175 mm con taparroca. Se agregan 500 µL de muestra. Se incubaron tapados a 40 °C en una incubadora de agitación orbital durante 72 h a 200 rpm, deteniendo la reacción con 500 µL de HCl (Baker) 1 M. El ensayo se realizó por duplicado junto con un blanco que consiste en el medio de reacción incubado sin muestra enzimática, la cual se le agrega después de la adición del HCl.

Posteriormente, al sobrenadante se le midieron azúcares reductores y/o azúcares totales por los métodos de DNS y fenol-sulfúrico, respectivamente.

Cada unidad de actividad amilolítica (U) las definimos como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 mg de glucosa en las condiciones de ensayo.

7.4.3.1 Determinación de azúcares totales

Los azúcares totales se determinaron por el método de fenol-ácido sulfúrico. En tubos de vidrio de 12x75 mm se agregaron 0.1 mL de la solución problema, 0.1 mL de agua destilada y 5 µL de fenol (Baker) al 80 % (p/v) Posteriormente se adicionaron 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Baker) con una pipeta de vidrio de un solo golpe para lograr una mezcla homogénea, esta reacción es completamente exergónica por lo que los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se agitaron en vórtex. Se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 490 nm. Se determinó la concentración de azúcares por medio de una curva patrón de glucosa.

7.4.3.2 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron por el método de DNS. En tubos de ensayo de 16x150 mm se adicionan 0.05 mL del filtrado libre de células y se diluyó con 0.45 mL de agua destilada y se agregó 0.5 mL de DNS (Sigma). El tubo con la mezcla se colocó en baño maría a ebullición durante 5 min. Posteriormente el tubo se enfrió adicionando 2.5 mL de agua destilada a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm. La concentración de los azúcares se calculó utilizando una curva estándar de glucosa.

7.4.3.3 Medición de proteína por el método de Bradford

Se preparó una solución stock de albúmina sérica bovina (Sigma) (0.1 mg/mL) para hacer una curva estándar en una microplaca de policarbonato.

Las muestras a las que se les midió la concentración de proteína se diluyeron, agregando 50 μL de muestra y 50 μL de agua en cada pozo. Finalmente, se agregaron 200 μL del reactivo de Bradford (Baker) a todos los pozos de reacción, incluyendo a la curva estándar. Se dejó reaccionar durante 5 min medidos a partir de agregado el reactivo al último pozo y se leyó a 595 nm.

7.5 Análisis electroforético

Para cada ensayo de crecimiento o fermentación, se corrieron geles de electroforesis SDS-PAGE y zimogramas de amilasas, con la finalidad observar el perfil de proteínas y, en particular, el perfil amilolítico de cada condición probada y cepa.

7.5.1 Tratamiento de muestras previo al análisis electroforético

A cada filtrado enzimático se le añadió 1 % de SDS (BIO-RAD) en solución, se dejó reposar durante 3 h a 4 °C, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, cada muestra se colocó en un tubo de diálisis Spectra/Por, se dializó una vez contra agua destilada por 1 h con agitación constante; se dializó dos veces más contra amortiguador de renaturalización (Tris-HCl 10 mM pH 7.5) durante 1 h en cada ocasión, con agitación constante. Finalmente, cada muestra se concentró para ser corrida en un gel de electroforesis, para lo cual se liofilizaron 3 mL de cada muestra a 5×10^{-3} mbar. Los sólidos obtenidos se resuspendieron en 30 μL de amortiguador de tanque 1x (0.025 M Trizma-base (Sigma), 0.192 M glicina (Merck), 0.1 % SDS (BIO-RAD), pH 8.3). Cada muestra fue centrifugada a 14000 rpm durante 5 min para eliminar los componentes del medio no solubilizados. El sobrenadante fue transferido a tubos eppendorff de 200 μL para su corrimiento en gel SDS-PAGE.

7.5.2 Geles de electroforesis SDS-PAGE

La preparación de los geles de poli(acrilamida) de 8x8 cm se realizó en condiciones desnaturalizantes. Se tomaron 10 μL de muestra concentrada a la cual se adicionó un volumen equivalente de amortiguador de tratamiento desnaturalizante (SDS (BIO-RAD) 8 %, glicerol (Baker) 40 %, 2- β -mercaptoetanol (Sigma) 20 %, amortiguador Tris-HCl 250 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol (BIO-RAD) 0.010 %) 4X. El gel separador se preparó al 8 % de acrilamida (BIO-RAD) y 0.2 % de almidón (Merck) soluble. La electroforesis se corrió a corriente constante (15 mA/gel), por alrededor de 1 h, a través de una unidad de geles verticales de 1.0 mm Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD Laboratories, Inc.). Los geles para determinar masa molecular se tiñeron con azul Coomassie (BIO-RAD).

7.5.3 Obtención de zimogramas de amilasas

Cada vez que se corrió un gel para determinar proteína, uno análogo se corrió para generar su zimograma. Los geles fueron preparados al 8 % de acrilamida (BIO-RAD) y 0.2 % de almidón (Merck) soluble, por separado, se incubaron en amortiguador de renaturalización (Tris-HCl

10 mM pH 7.5) a 37 °C por 1 h; se decantaron e incubaron en amortiguador de acetatos 100 mM (pH 5.0) a 37 °C durante 30 min. Se decantaron y se tiñeron con una solución de lugol (I₂ (Merck) 5 % p/v / KI (Baker) 10 % p/v) diluido 1:20 durante 10 min con agitación suave, y se lavó con agua destilada para remover el exceso de lugol.

7.6 Purificación

Con la finalidad de obtener enzimas separadas y más concentradas para su caracterización e identificación por masas, y poder así definir las diferencias aparentemente más relevantes entre las amilasas producidas por ambas cepas, se empleó un método de purificación; cromatografía de intercambio iónico.

Los filtrados enzimáticos obtenidos a partir del cultivo sobre granos de maíz fueron pretratados con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de polisacáridos presentes que pudieran interferir en la cromatografía, para lo cual se les agregaron 0.2 mL de SDS (BIO-RAD) 10 % p/v por cada mililitro de muestra, obteniendo así, soluciones lechosas. Posteriormente fueron centrifugados a 14000 rpm durante 10 min en tubos eppendorf. Las muestras resultantes fueron dializadas para su posterior análisis.

7.6.1 Cromatografía de intercambio iónico

Se inyectaron 10 mL de filtrado enzimático crudo, previamente tratado con SDS y filtrado a través de una membrana de 0.5 µm, al cromatógrafo de líquidos de baja presión.

Se utilizó una columna de intercambio iónico: High Q Cartridge (BIO RAD), y el equipo Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), Pharmacia Biotech.

Columna de intercambio iónico Econo-Pac High Q Cartridge. BIORAD.

Tipo: fuerte intercambio iónico.

Grupo Funcional: -N⁺(CH₃)₃

Volumen: 5 mL

Capacidad de unión de proteína: ≥75 mg ferritina

Capacidad iónica de la matriz: 190 ± 40 µeq

Diámetro de partícula 50 µm

Tamaño de poro: 1000 Å

Intervalo de pH: 2-12

Para la elución de proteína de la columna de intercambio iónico Econo-Pac High Q Cartridge BIORAD, se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 6 o Tris.HCL 100 mM pH 8, ambas con 1 M de NaCl. Todas las soluciones empleadas para la cromatografía se desaerearon durante 20 min.

Se emplearon diversos métodos

- 1) Con un flujo de 1 mL/min, se eluyó empleando un gradiente de NaCl (Baker) de 0 a 1 M a partir de la fracción 10 hasta la 40, colectando un total de 45 fracciones de 3 mL cada una, de las cuales se midió la actividad amilolítica en placa fina.
- 2) Con un flujo de 1 mL/min, se eluyó empleando un gradiente de NaCl (Baker) de 0.2 a 0.7 M a partir de la fracción 10 hasta la 40, colectando un total de 45 fracciones de 3 mL cada una, de las cuales se midió la actividad amilolítica en placa fina.
- 3) Con un flujo de 1 mL/min, se eluyó empleando un gradiente de NaCl (Baker) de 0 a 1 M a partir de la fracción 20 hasta la 70, colectando un total de 80 fracciones de 1 mL cada una, de las cuales se midió la actividad amilolítica en placa fina.

7.5.2 Análisis electroforético de fracciones cromatográficas

7.5.2.1 Pretratamiento de las fracciones enzimáticas provenientes de una cromatografía para su uso en geles de SDS-PAGE (SDS Polyacrilamide-Gel Electrophoresis)

Se midió la actividad amilolítica por gel de placa fina de cada fracción obtenida de la cromatografía de intercambio iónico y se seleccionaron las fracciones que presentaron la mayor actividad.

Cada fracción seleccionada se colocó en un tubo de diálisis Spectra/Por, se dializó una vez contra agua del grifo por 1 h con agitación constante; se dializó una vez más contra agua destilada durante 3 h, con agitación constante.

Cada fracción se colocó en un tubo de ensayo de 12x75 mm, fueron congelados a -70°C , y liofilizados a 5×10^{-3} mbar. Los sólidos obtenidos se resuspendieron en 50 μL de amortiguador de tanque 1x (0.025 M Trizma-base (Sigma), 0.192 M glicina (Merck), 0.1 % SDS (BIO-RAD), pH 8.3).

Las muestras resultantes se corrieron en geles SDS-PAGE y su respectivo zimograma de actividad amilolítica.

Capítulo 5

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Perfil amilolítico de *A. flavus* expresado en presencia de diferentes fuentes de carbono

Con el objetivo de determinar si el perfil amilolítico de *A. flavus* es dependiente de la fuente de carbono durante su desarrollo, se cultivaron a las cepas de *A. flavus* (CECT 2687 y NRRL 6541) en una fermentación sumergida en lote con medio basal a pH 8 inicial y empleando diversos sustratos, en su mayoría, amiláceos.

Como fuentes de carbono, se emplearon sustratos complejos como almidón, amilopectina, harina comercial de maíz nixtamalizado, maíz triturado y olote de maíz. Además, se probaron dos sustratos simples que se han reportado como inductores de la producción de amilasas; glucosa y maltosa (vanKuyk *et al.*, 2012). Para todas las condiciones probadas se elaboraron las curvas de producción de amilasas sobre almidón gelatinizado, mostradas en la Fig. 15.

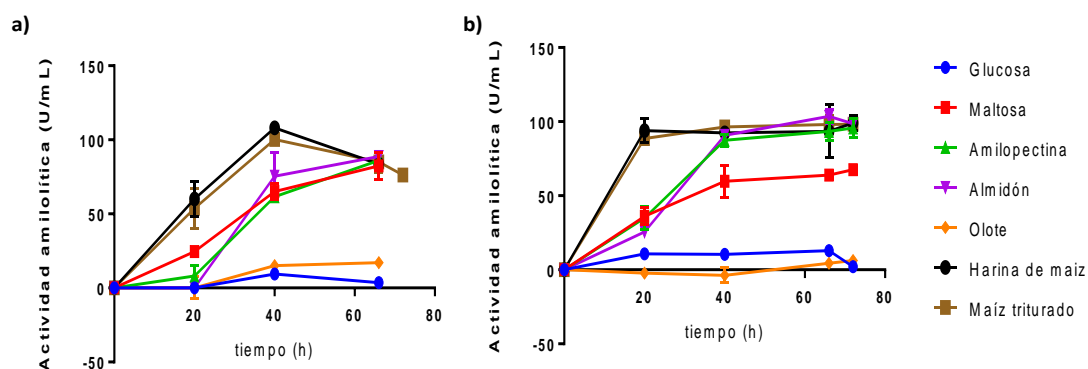


Fig. 15. Perfil de producción de amilasas por *A. flavus* a) NRRL 6541 y b) CECT 2687, en una fermentación en lote; medio basal líquido a pH 8, empleando diversas fuentes de carbono. n=2

De acuerdo con estos resultados, se observa que, bajo todas las condiciones probadas, ambas cepas produjeron actividad amilolítica, aunque, en algunos casos, se produce a niveles muy bajos que pueden considerarse basales. Este último comportamiento se observa al emplear glucosa y olote de maíz como fuentes de carbono. Por su parte, el olote es una fuente no amilácea; compuesto principalmente por hemicelulosa, celulosa y lignina (Córdoba *et al.*, 2013), por lo que se espera que no se induzca el sistema amilolítico, en concordancia con lo observado.

Por otro lado, aunque la glucosa es un inductor débil de la actividad amilolítica, este también puede actuar como un represor por efecto de RCC. De acuerdo con resultados de Nandakumar *et al.* (1999), a una concentración de glucosa en el medio de 10mg/mL (condición empleada en este trabajo) se observa la disminución de la actividad amilolítica producida por *A. niger* en medio líquido, aunque no desaparece por completo, lo que podría ser una posible explicación a los resultados obtenidos en este caso.

En cuanto al resto de los sustratos empleados, se observa que todos inducen la producción de amilasas. A este respecto, se observa que la inducción de la actividad amilolítica se correlaciona con la naturaleza del sustrato; la producción de dichas enzimas se ve favorecida con el aumento de la complejidad del sustrato, obteniendo la máxima actividad al emplear harina de maíz nixtamalizado y maíz triturado, resultados que coinciden con lo reportado por Solís (2013).

Con la finalidad de comparar los perfiles amilolíticos presentados en cada condición de fuente de carbono y el perfil enzimático producido en granos de maíz directamente por cada cepa (10 días), se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 16).

Al comparar los perfiles de proteína en los diferentes sustratos, se observan diferencias claras respecto a la cantidad de proteínas presentes. En general, la cantidad de proteínas se ve incrementada en relación con el aumento de la complejidad del sustrato, es decir, el número de bandas de proteína en el gel es notablemente mayor cuando se emplean sustratos provenientes del maíz (olote, harina de maíz, maíz triturado y maíz entero) respecto al uso de sustratos más simples (glucosa, maltosa, amilopectina y almidón). Estas diferencias en los perfiles de bandas están intrínsecamente relacionadas con la composición de dichos sustratos y se pueden deber a la producción de otras enzimas que permitan la utilización de los diferentes componentes presentes y, a la presencia de proteínas propias del sustrato.

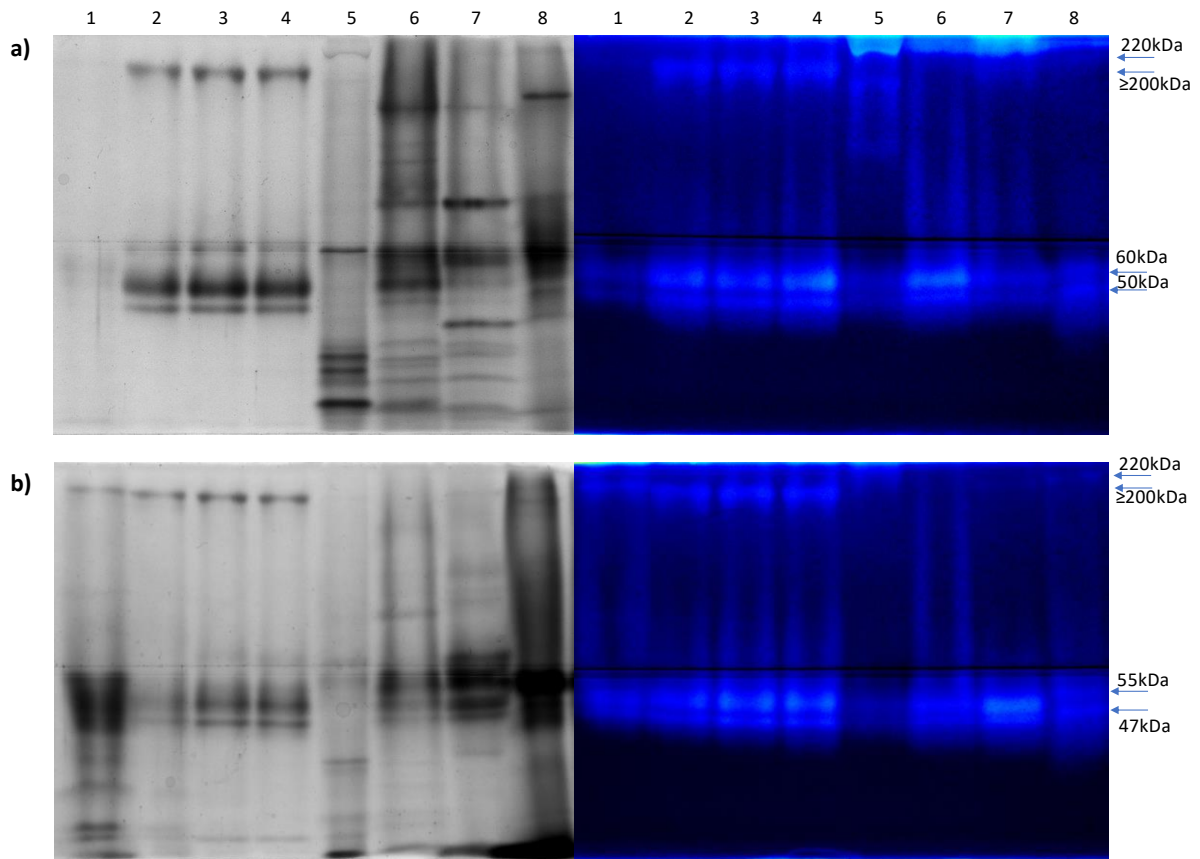


Fig. 16. Geles de electroforesis (8 %). SDS-PAGE y zimograma de actividad amilolítica de los filtrados enzimáticos de *A. flavus* **a)** NRRL 6541 y **b)** CECT 2687 a las 72 h de fermentación en lote con diferentes fuentes de carbono (1 % p/v) y el extracto enzimático a los 10 días de incubación sobre granos maíz directamente. Carriles: **1)** glucosa, **2)** maltosa, **3)** amilopectina, **4)** almidón de maíz, **5)** olote de maíz **6)** harina de maíz nixtamalizado, **7)** maíz triturado y **8)** granos de maíz. n=2

En cuanto al perfil amilolítico, se observan similitudes al emplear glucosa, maltosa, amilopectina y almidón como fuentes de carbono, aunque en diferentes niveles de actividad entre ellos de las enzimas observadas. Contrariamente, el perfil amilolítico observado en dichas fuentes resulta ser diferente al perfil expresado en presencia de sustratos complejos, sobre todo en aquellas amilasas de alta masa molecular. En concordancia con lo reportado para especies del género *Aspergillus* (Nakamura *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2014), la expresión de amilasas parece ser dependiente de la fuente amilácea inductora, observando que, en particular, las amilasas diferenciales entre las fuentes más simples, respecto a las observadas en maíz triturado y granos de maíz entero, parece tener una relación respecto a la disponibilidad del inductor, relacionado directamente con su solubilidad y tamaño de partícula.

Por otro lado, al emplear olote de maíz, en los zimogramas se observa la presencia de bandas de actividad amilolítica, contrario a lo esperado por tratarse de un sustrato no amiláceo ni

inductor de amilasas. Este hecho, se cree, podría deberse a la presencia de almidón residual, ya que este es un desecho agroindustrial proveniente del desgrane de la mazorca de maíz, donde cabe la posibilidad de encontrar componentes de los granos.

De acuerdo con estos resultados, y el interés de estudiar del sistema amilolítico producido por *A. flavus* durante la infección de maíz, particularmente, resulta evidente que la mejor manera de abordar este estudio es realizándolo directamente sobre granos de maíz.

Para el estudio del sistema amilolítico de *A. flavus* únicamente, y la disminución de interferencias para simplificar su estudio, se propone el empleo de un modelo de maíz inactivo enzimáticamente, haciendo el intento por mantener la integridad de sus componentes, principalmente del almidón nativo.

8.2 Desarrollo de un modelo de granos de maíz para el estudio del sistema amilolítico de *A. flavus* durante su colonización.

Como se mencionó previamente, se planteó desarrollar un modelo de maíz adecuado para el crecimiento de *A. flavus* y monitoreo de la producción de sus amilasas, para lo cual se estableció como objetivo obtener granos de maíz inactivos enzimáticamente para eliminar o disminuir las interferencias que esto implica para nuestros estudios, haciendo además un intento por minimizar las modificaciones a sus componentes debidas al tratamiento dado, particularmente enfocado hacia conservar las características fisicoquímicas del almidón nativo.

Para tales estudios y con la finalidad de establecer un modelo biológico estándar, se determinó emplear una variedad de maíz tipificada, registrada y puesta a nuestra disposición por el INIFAP-Oaxaca de la variedad VC-152.

Los granos de maíz fueron tratados bajo diversas condiciones e identificados como se enlista en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos dados a diversos lotes de granos de maíz para su inactivación enzimática y sus respectivas claves de identificación (empleadas a lo largo de este trabajo).

ID	Tratamiento
ST	Sin tratamiento
H ₂ O	Lavado con agua destilada estéril durante 4 min.
EtOH	Lavado con Etanol 70 % durante 4 min.
AC	Esterilizado en autoclave durante 20 min
3kGy	Irradiación gamma con Co-60 a una dosis de 3kGy
5kGy	Irradiación gamma con Co-60 a una dosis de 5kGy
10kGy	Irradiación gamma con Co-60 a una dosis de 10kGy
18kGy	Irradiación gamma con Co-60 a una dosis de 18kGy

En el trabajo previo, se habían empleado granos de maíz esterilizados por calor húmedo en autoclave. Sin embargo, dadas las condiciones similares a la cocción de este método que, además de favorecer la gelatinización del almidón (principal componente de interés) por emplear altas temperaturas en un medio saturado de humedad, propicia reacciones como las de Maillard que disminuyen su digestibilidad, como lo menciona el grupo de estudios de Rombo *et al.* (2001). Es por ello, que se determinó emplear una metodología alterna basada en la irradiación gamma de los granos, debido a que este es un tratamiento en seco y a temperatura ambiente (condiciones que no favorecen la gelatinización del almidón). Asimismo, se ha observado que el tratamiento con irradiación gamma no tiene un efecto significativo sobre la digestibilidad, tamaño de granulo, ni tiempo de sedimentación en suspensiones de almidón de maíz nativo a diferentes dosis de irradiación, incluida la dosis más alta que se propone en este trabajo (Kume and Tamura, 1987).

Por otro lado, también se desea obtener granos de maíz estériles, evitando con ello la interferencia que pudiera presentarse por el desarrollo de la microbiota inherente a los granos.

Sabiendo lo anterior, se prosiguió a evaluar los niveles de inactivación enzimática y contaminación de granos de maíz empleando cuatro diferentes dosis de irradiación gamma (3, 5, 10 y 18 kGy), a una intensidad de 8.92 kGy/h, comparándolo con respecto al efecto del tratamiento térmico y usando como controles granos lavados con agua destilada estéril, granos sanitizados con etanol y granos sin tratamiento previo. La dosis máxima de irradiación (18 kGy), se estableció de acuerdo con lo reportado por el grupo de trabajo de Cuero *et al.*

(1986), donde se menciona que a dicha dosis el grano de maíz pierde su capacidad de germinación.

El parámetro establecido para determinar el nivel de inactivación enzimática de los granos tratados fue su capacidad o incapacidad de germinación, evidenciados por el tamaño de la radícula al incubarlos bajo condiciones de alta humedad, empleando para cada tratamiento lotes de 10 granos que fueron colocados en cajas Petri sobre medio Sabouraud ajustado al 1 % de agar. El nivel de germinación se expresa como el promedio del tamaño de radícula de los granos que germinaron en cada caso, que, en general, a las 72 h fue igual o mayor al 80 % del total de granos, excepto en cuyos casos no se observó germinación. Los resultados se muestran en la Fig. 17.

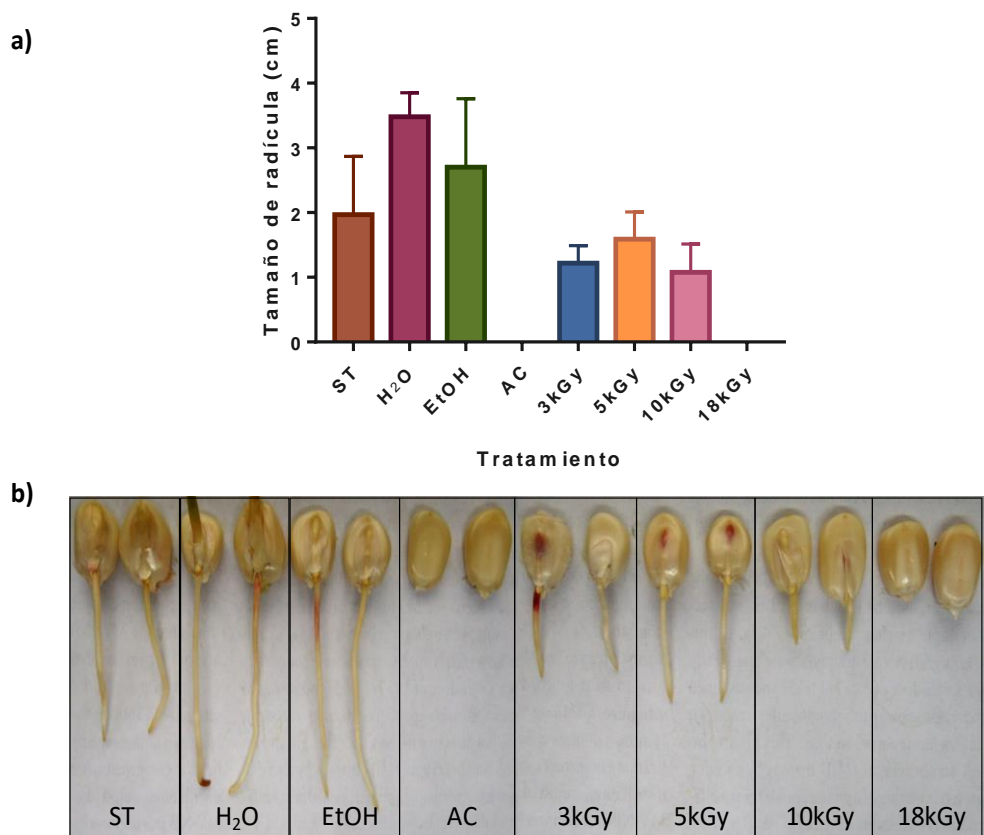


Fig. 17. Nivel de germinación de granos de maíz blanco VC-152 tratados bajo diferentes condiciones (Tabla 3), criterio empleado como indicativo de su nivel de inactivación enzimática; **a)** Comparación del tamaño de radícula de los lotes de granos maíz sometidos a los diferentes tratamientos y **b)** comparación fotográfica de los granos de maíz incubados a 37 °C en medio Sabouraud durante 72 h después de ser tratados. n=10 (número de semillas).

Como se puede observar, las únicas dos condiciones que inhibieron la germinación completamente fueron el tratamiento térmico por autoclave y la irradiación gamma en una dosis de 18 kGy, en concordancia con lo reportado por Cuero, *et al.* (1986). Además, se puede observar que los tratamientos con agua destilada estéril y con etanol, favorecieron la germinación, teniendo como resultado un tamaño de radícula superior a los granos sin tratamiento, lo que se atribuye al aumento en la humedad del grano debido a los tratamientos *per se*.

Al observar el comportamiento de la germinación de los granos de maíz tratados únicamente con irradiación gamma, se ve que hay una disminución considerable del tamaño de radícula al utilizar una dosis de 3 kGy respecto al control sin tratamiento, por lo que se esperaría que el aumento de la dosis conllevara a una disminución gradual de la germinación. En contraposición a esto, se observa que el tamaño de radícula aumenta ligeramente cuando se irradia con 5 kGy respecto a la dosis más baja. Previamente se ha reportado que, bajo ciertas dosis de irradiación, la germinación se ve estimulada y a dosis aún mayores se logra inhibir (Woodstock and Combs, 1965), lo que podría generar una explicación a lo observado. Sin embargo, no se cuenta con estudios que expliquen este comportamiento a nivel fisiológico ni molecular.

Con la metodología descrita para la determinación del nivel de germinación de los granos tratados, además se pudo establecer el nivel de contaminación, empleando como criterio el crecimiento de microbiota a partir de cada grano, expresándolo como porcentaje de los granos a partir de los cuales hubo un crecimiento sobre el medio en el que fueron incubados durante 72 h (Fig.18).

En esta prueba, se observó el crecimiento de *A. flavus* (colonias verde oliváceo) y *Fusarium sp.* (colonias rosadas) como cepas potencialmente toxigénicas, coincidiendo con lo observado previamente en el grupo de trabajo por Solís (tesis en revisión).

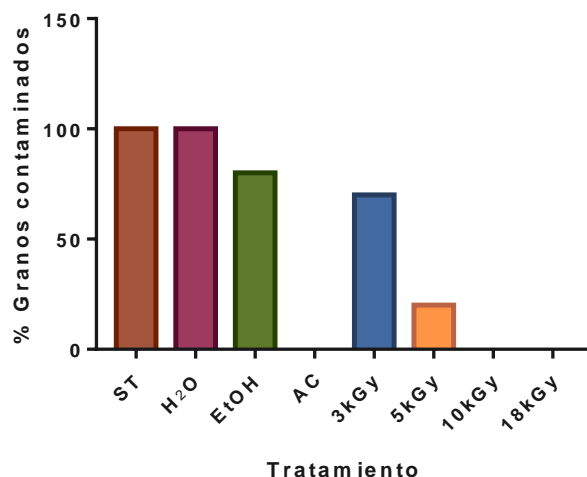


Fig. 18. Nivel de contaminación de granos de maíz blanco variedad VC-152 por efecto de diferentes tratamientos al incubarlos sobre medio Sabouraud durante 72 h a 37 °C, expresándolo como el porcentaje de granos que presentaron un crecimiento de microorganismos a partir de ellos sobre el medio. Los granos sin tratamiento, lavados con agua destilada estéril y sanitizados con etanol fueron utilizados como controles. n=1 (lotes de 10 semillas).

Por otro lado, se observa una disminución gradual en la contaminación de granos por efecto del aumento en la dosis de irradiación gamma, obteniendo una esterilización total aparente a partir de 10 kGy, que coincide con la dosis máxima aceptada y reconocida como segura por la OMS y la FDA para el tratamiento de alimentos (SERNAC, 2004). También, y de acuerdo con los mismos datos, es de notar que los tratamientos que dan una efectividad de esterilización del 100 % son aquellos en los que se emplearon autoclave y las dos dosis más altas de irradiación probadas (10 y 18 kGy). Cabe mencionar, que la menor dosis utilizada, se estableció de acuerdo con el estudio de Aziz *et al.* (2002) , donde reportan que la dosis mínima en la esterilización de granos de maíz previo al almacenamiento es de 3kGy para tener un efecto negativo sobre la contaminación por aflatoxinas, lo que se traduce a que esta dosis es suficiente para evitar el crecimiento de *A. flavus*, coincidiendo con nuestros estudios, dado que, bajo todas las dosis de irradiación gamma probadas, no se detectó el crecimiento de *A. flavus*, aun cuando en los granos sin tratamiento, su presencia sí fue detectada.

Por otra parte, con la finalidad de hacer una comparación del nivel de degradación de proteínas e inactivación enzimática por efecto de los tratamientos donde se observa que la germinación se encuentra totalmente inhibida (autoclave e irradiación gamma con una dosis de 18 kGy) respecto a los granos sin tratamiento, se corrieron geles de SDS-PAGE y zimogramas de amilasas de los extractos enzimáticos a partir de estos granos. Los resultados se muestran en la Fig. 19.

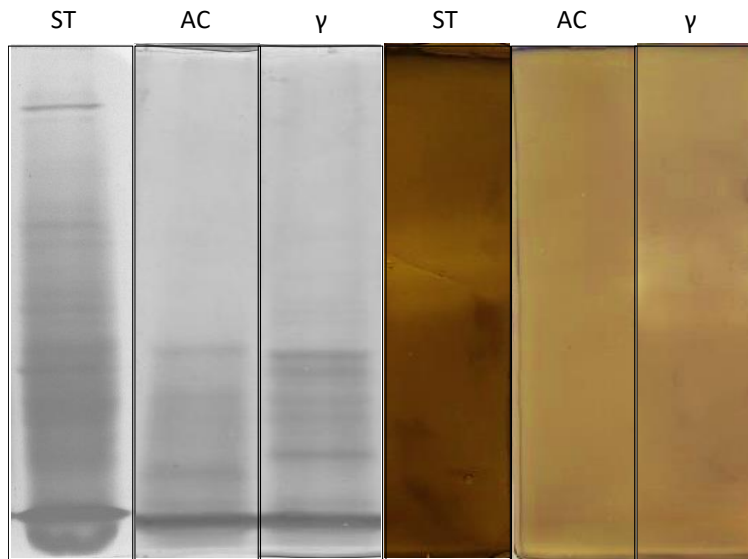


Fig. 19. Geles SDS-PAGE al 10 % de acrilamida y zimograma de amilasas para la comparación del nivel de proteínas y actividad amilolítica contenidas en granos de maíz tratados térmicamente (AC) y por irradiación gamma a 18 kGy (γ) vs. granos sin tratamiento (ST). n=2 (lotes de 20 semillas).

Como es de apreciarse, los niveles de proteína y de amilasas contenidas en los granos sometidos a los dos tratamientos vs. los granos sin tratamiento, se redujeron considerablemente, especialmente en las proteínas de mayor tamaño, siendo comparable el efecto que tienen ambos tratamientos para la inactivación de los granos.

Dados los resultados obtenidos y de acuerdo a reportes sobre los efectos que tiene la irradiación gamma sobre el almidón de maíz respecto a la poca modificación de su solubilidad, cristalinidad y temperatura de gelatinización a dosis semejantes a la mayor empleada en este trabajo (Chung and Liu, 2009; Liu *et al.*, 2012), y considerando los efectos que tiene el calor húmedo sobre el mismo componente, se ha determinado que el tratamiento de granos maíz más adecuado para nuestro estudio referente al perfil amilolítico de *A. flavus*, es la irradiación gamma a una dosis de 18 kGy, obteniendo con ello granos inactivos enzimáticamente (germinación nula) y libres de contaminación microbiana.

8.2.1 Efecto del tratamiento y zona de punción de los granos de maíz sobre el crecimiento y la producción de enzimas degradadoras de polisacáridos de dos cepas de *A. flavus*.

Con el propósito de observar las diferencias que podría representar el cambio de metodología de pretratamiento de los granos de maíz sobre el crecimiento y perfil amilolítico de *A. flavus*, se determinó inocular granos de maíz pretratados por autoclave y por irradiación gamma a una dosis de 18 kGy, y hacer un análisis del perfil enzimático presentado en cada caso.

Además, de acuerdo con los objetivos de nuestro estudio, se requiere determinar la condición más favorable para la expresión y producción de amilasas, haciendo un intento por aproximarnos lo mejor posible a lo que ocurre en la naturaleza.

Dado que *A. flavus* es catalogado como un patógeno oportunista, se decidió realizar punciones al grano en diferentes zonas; germen, endospermo y/o ambas, donde fueron inoculados con esporas de la cepa correspondiente de *A. flavus*. Como controles se emplearon granos de maíz sin inocular y sometidos a las mismas condiciones de incubación, extracción de proteínas y preparación para corrimiento de geles SDS-PAGE y zimogramas.

A lo largo de este ensayo, no se observaron cambios en cuanto al nivel de crecimiento de ambas cepas en ninguno de los diferentes tratamientos y zonas de punción, por lo que se puede considerar que el mayor efecto observado sobre la producción de enzimas se debe a los cambios producidos en los granos de maíz por el tratamiento dado y/o la zona de punción.

En la figura 20 se muestran los perfiles de proteína y amilolíticos de las dos cepas de estudio creciendo en las condiciones antes descritas.

En este análisis, se observa que el perfil de proteína de las cepas empleadas, comparando las dos condiciones de tratamiento y las zonas de punción, no conlleva cambios apreciables en cuanto al tipo de amilasas, e incluso proteínas, expresadas. Sin embargo, comparando los niveles de producción amilolítica, punzando en diferentes zonas del grano, es notable la diferencia de expresión entre zonas, aunque no resulta ser clara la relación entre la respuesta dada por ambas cepas y una zona de punción específica.

Por otra parte, las masas moleculares de las dos amilasas con la mayor actividad observada para ambas cepas de *A. flavus* (toxigénica y no toxigénica), de acuerdo con el programa Image Lab, se calculan en valores de ≈ 47 y 55 kDa y ≈ 50 y 60 kDa, respectivamente.

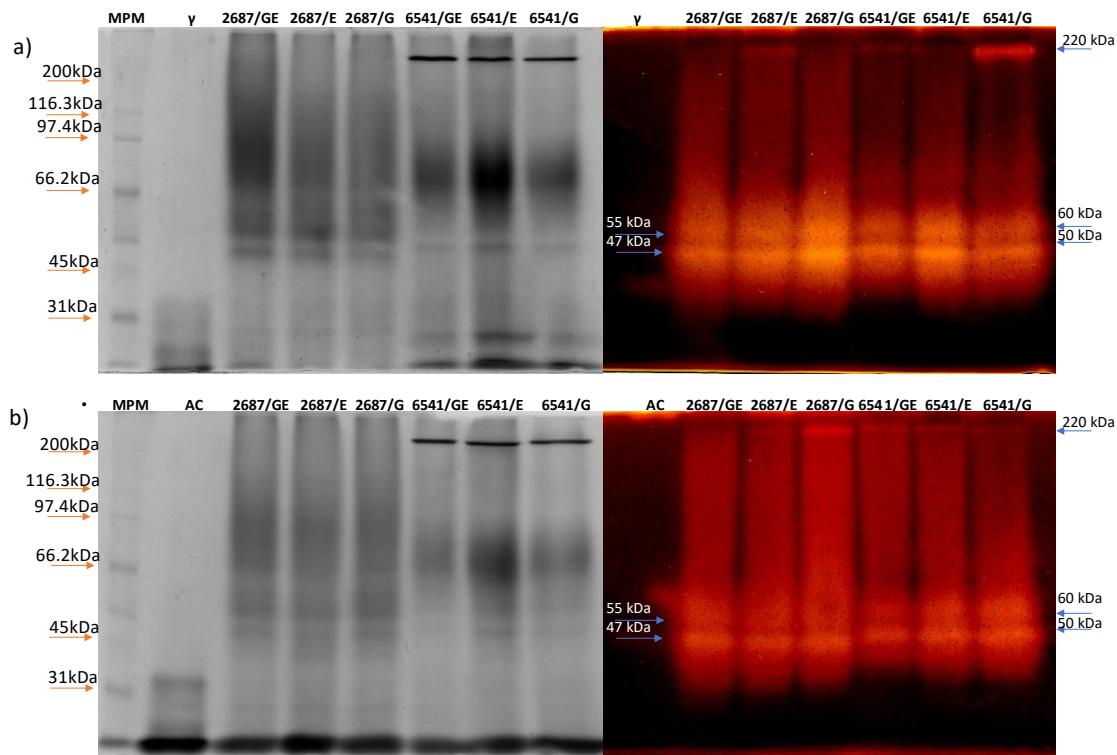


Fig.20. Geles de electroforesis (8 % de acrilamida). SDS-PAGE y zimograma de amilasas producidas por cepas toxigénica (CECT 2687) y no toxigénica (NRRL 6541) de *A. flavus* creciendo en granos de maíz pretratados con **a)** radiación gamma a una dosis de 18 kGy y/o **b)** calor húmedo mediante autoclave, inoculados en diferentes zonas de punción; **G:** Germen, **E:** Endospermo, **GE:** Germen y endospermo. Los carriles denotados como **AC** y **γ**, corresponden a los blancos tratados por autoclave o radiación gamma, respectivamente. n=2 (lotes de 8 semillas).

Para hacer una comparación más detallada de los niveles de producción de amilasas se midieron las actividades amilolíticas específica y volumétrica sobre almidón gelatinizado e insoluble.

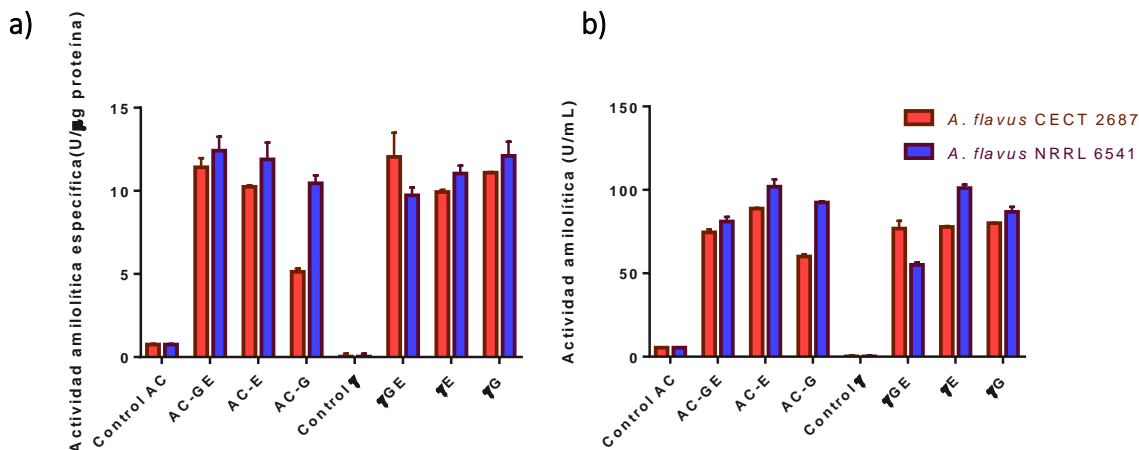


Fig 21. a) Actividad amilolítica específica y **b)** volumétrica sobre almidón gelatinizado producida por dos cepas de *A. flavus* (CECT 2687: aflatoxigénica y NRRL 6541: no aflatoxigénica), al crecer sobre granos de maíz pretratados bajo distintas condiciones; AC: autoclave, γ: radiación gamma, e inoculados en zonas de punción diferentes: G: Germen, E: Endospermo, GE: Germen y endospermo. Los controles corresponden a granos tratados e incubados bajo las mismas condiciones al resto de los granos, pero sin inóculo. n=2 (lote de 20 semillas).

De acuerdo con la Fig. 21, la producción de amilasas entre ambas cepas resulta no ser muy diferente e incluso, en contraposición a lo reportado por Brown *et al.* (2001), la producción resulta ser mayor en el caso de la cepa no toxigénica. También se puede observar que los tratamientos no conllevan a diferencias significativas en la producción de amilasas, aunque, en el caso de la punción en el germen, la actividad se ve disminuida con el tratamiento térmico, que, de acuerdo a la composición del grano de maíz, es la zona de mayor contenido de proteína (Autio *et al.*, 2009), lo que podría favorecer el entrecruzamiento del almidón presente en esta zona por reacciones de Maillard y, por tanto, estar menos disponible para su degradación por amilasas.

Por otro lado, en cuanto a la zona de punción, no se observan cambios considerables en la producción de amilasas totales (enzimas extraídas; ver material y métodos), sin embargo, en términos generales, se observa la tendencia de un ligero aumento en su producción cuando se involucra la punción e inoculación en el endospermo (punción en GE y E).

Además, se midió la actividad amilolítica sobre almidón insoluble (representada por la actividad sobre amilopectina insoluble; Fig. 22), considerando a esta una de las características más relevantes para la elección de la metodología a emplear posteriormente, dado que se desea obtener la mayor cantidad de enzimas degradadoras de almidón nativo, por ser esta la forma en que se encuentra este polisacárido naturalmente.

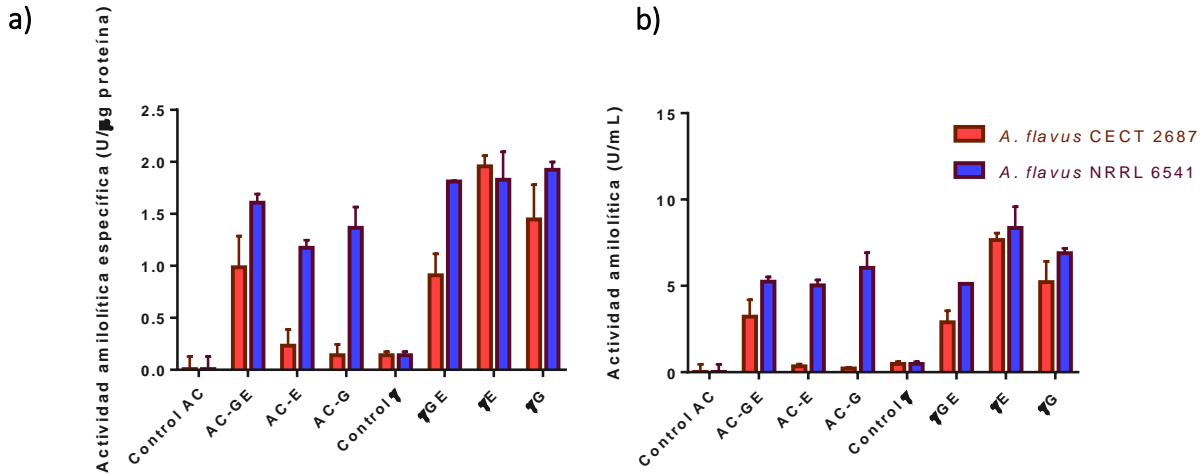


Fig 22. a) Actividad amilolítica específica y b) volumétrica sobre amilopectina insoluble producida por dos cepas de *A. flavus* (CECT 2687: aflatoxigénica y NRRL 6541: no aflatoxigénica) al crecer sobre granos de maíz pretratados bajo distintas condiciones; AC: autoclave, γ : radiación gamma, e inoculados en zonas de punción diferentes: G: Germen, E: Endospermo, GE: Germen y endospermo. Los controles corresponden a granos tratados e incubados bajo las mismas condiciones al resto de los granos, pero sin inóculo. n=2 (lotes de 20 semillas).

En la figura 22, a diferencia de la Fig. 21, se puede observar que la producción de amilasas, en particular, las que actúan sobre almidón insoluble sí se ve afectada de forma considerable por el tratamiento y zona de punción empleados.

La mejor producción de este tipo de enzimas se ve favorecida por el uso del tratamiento a temperatura ambiente por radiación gamma, evidenciando de forma indirecta que con este tratamiento se tiene una menor modificación sobre la solubilidad y digestibilidad del almidón. En cuanto a la zona de punción, en el endospermo, en general, se observa una mayor actividad amilolítica degradadora de almidón nativo o insoluble, en concordancia con su composición.

Respecto a estos resultados, también cabe destacar que ambas cepas tienen la capacidad de producir amilasas degradadoras de almidón nativo en niveles más o menos similares, de lo cual se hipotetiza que estas enzimas podrían conferir a ambas cepas la capacidad de colonización de los granos de maíz con mayor eficacia, ya que el almidón se encuentra de forma insoluble o nativa naturalmente en estas semillas. Como se mencionó previamente (antecedentes), la actividad sobre almidón nativo se ha asociado fuertemente a la presencia de dominios de unión a almidón en la estructura de las amilasas. Se ha reportado al menos una amilasa de *A. flavus* con dominio de unión a almidón, clasificada como una glucoamilasa en la familia CBM20 de la base datos de CAZy de la cepa NSH9 (Base de datos CAZy) que, además, de acuerdo con su secuencia, se encuentra también en el genoma de la cepa AF70.

Sin embargo, de acuerdo con el genoma de este hongo, se han podido identificar al menos otra amilasa con un CBM20 en su secuencia, denominada glucan 1,4- α -glucosidasa putativa de la cepa NRRL3357 (Base de datos NCBI), indicativo de la posibilidad de encontrar más de una amilasa con capacidad de degradación de almidón nativo.

Por otra parte, para enriquecer el trabajo previo, y obtener información relevante acerca del tipo de enzimas expresadas por ambas cepas bajo todas las condiciones antes descritas, se hizo la medición de las actividades de enzimas degradadoras de polisacáridos, tales como: xilanólica, exopectinolítica y celulolítica, enzimas que se consideran como factores de virulencia durante la contaminación de diversos cultivos.

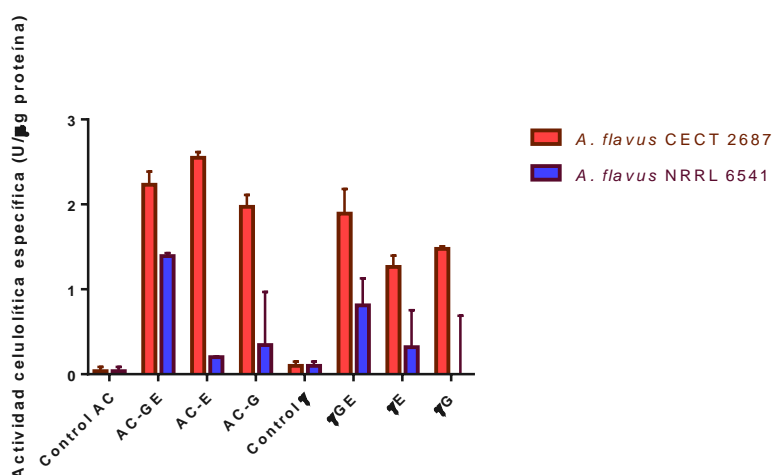


Fig. 23. Actividad celulolítica específica producida por dos cepas de *A. flavus* (CECT 2687: aflatoxigénica y NRRL 6541: no aflatoxigénica) al crecer sobre granos de maíz pretratados bajo distintas condiciones; **AC**: autoclave, **γ** : radiación gamma, e inoculados en zonas de punción diferentes: **G**: Germen, **E**: Endospermo, **GE**: Germen y endospermo. Los controles corresponden a granos tratados e incubados bajo las mismas condiciones al resto de los granos, pero sin inóculo. n=2 (lotes de 20 semillas).

De acuerdo con las Figuras 23 y 24, es apreciable que ambas actividades medidas son mayores cuando los granos son tratados térmicamente, respecto al tratamiento con radiación gamma. Se sabe que, en tratamientos térmicos, donde el agua es el único producto químico añadido, se puede llevar a cabo la autohidrólisis de la hemicelulosa, generando xilo-oligosacáridos producidos a partir de biomasa vegetal. Este proceso aprovecha la presencia de grupos acetilo en la biomasa, los cuales, a una cierta temperatura, liberan ácido acético al medio de reacción, y esta acidez liberada cataliza la hidrólisis parcial de xilanos para producir xilo-oligosacáridos. Por lo tanto, el proceso causa la solubilización de la mayoría de las hemicelulosas, dejando los contenidos de celulosa y lignina apenas alterados (Ligero *et al.*, 2011). Lo anterior, podría ser una explicación al comportamiento observado de las actividades xilanólica y celulolítica en relación con tratamiento dado a los granos. El

tratamiento térmico empleado (autoclave) proporciona condiciones favorables para la autohidrólisis de la hemicelulosa, generando productos susceptibles a la degradación enzimática, lo que favorece la inducción y expresión de enzimas xilanolíticas. Además, la hidrólisis de la hemicelulosa expone relativamente a la celulosa, por lo que su susceptibilidad ante la degradación enzimática se incrementa, observando con ello un comportamiento similar a las xilanasas; en cuanto a nivel de actividad entre tratamientos, de aumento de actividad celulolítica producida en granos tratados térmicamente. Sin embargo, al conservar la celulosa su estructura intacta a pesar del tratamiento térmico húmedo, el incremento de la actividad celulolítica respecto al tratamiento con radiación gamma no resulta ser tan significativo como en el caso de la actividad xilanolítica.

Por otro lado, este efecto también puede deberse a la expansión de la celulosa y hemicelulosa a causa del cambio de presión por el tratamiento con autoclave, así como la hidratación parcial de estos polisacáridos (Guarnizo *et al.*, 2009).

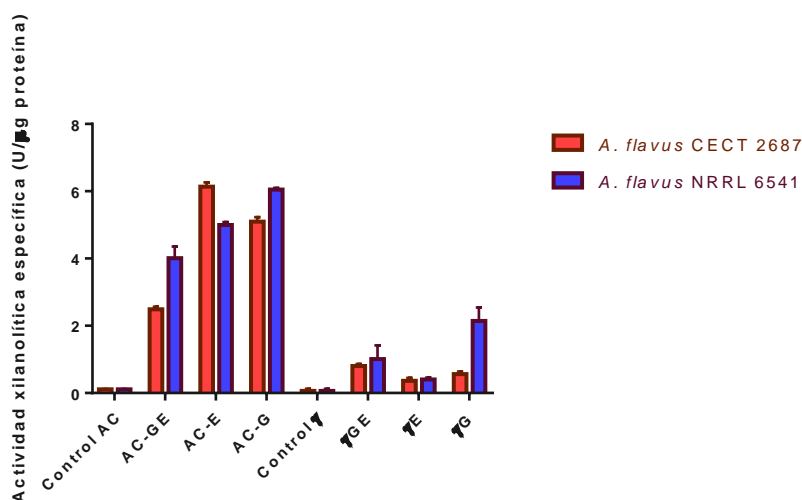


Fig. 24. Actividad xilanolítica específica producida por dos cepas de *A. flavus* (CECT 2687: aflatoxigénica y NRRL 6541: no aflatoxigénica) al crecer sobre granos de maíz pretratados bajo distintas condiciones; **AC:** autoclave, **γ :** radiación gamma, e inoculados en zonas de punción diferentes: **G:** Germen, **E:** Endospermo, **GE:** Germen y endospermo. Los controles corresponden a granos tratados e incubados bajo las mismas condiciones al resto de los granos, pero sin inóculo. n=2 (lotes de 20 semillas).

Por otro lado, los niveles de xilanasas producidas por ambas cepas no resultan ser tan diferentes, lo que concuerda con los datos reportados por el grupo de Brown *et al.*, 2001, mientras que la expresión de celulasas se ve aumentada en el caso de la cepa toxigénica. A pesar de ello, en trabajos previos no se ha estudiado esta diferencia entre cepas con diferentes capacidades de virulencia o de toxigenicidad, por lo que podría abrirse una nueva línea de investigación hacia este tipo de enzimas.

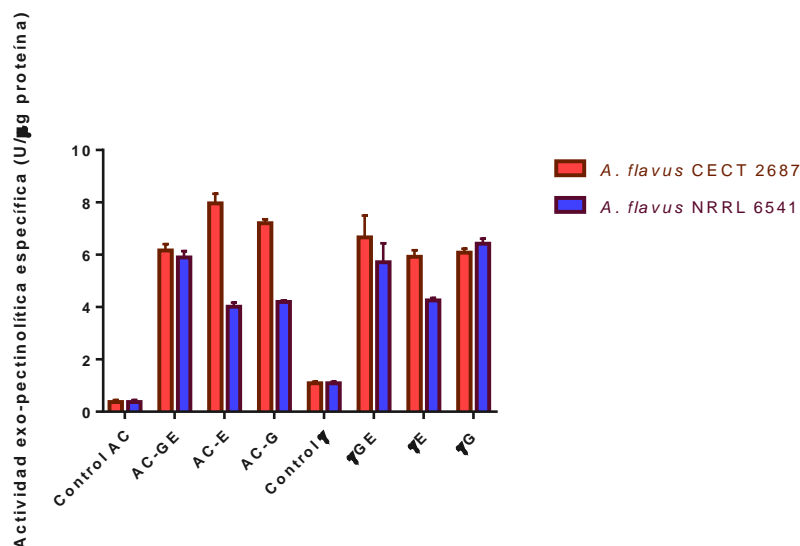


Fig. 25. Actividad exo-pectinolítica específica producida por dos cepas de *A. flavus* (CECT 2687: aflatoxigénica y NRRL 6541: no aflatoxigénica) al crecer sobre granos de maíz pretratados bajo distintas condiciones; **AC**: autoclave, **γ** : radiación gamma, e inoculados en zonas de punción diferentes: **G**: Germen, **E**: Endospermo, **GE**: Germen y endospermo. Los controles corresponden a granos tratados e incubados bajo las mismas condiciones al resto de los granos, pero sin inóculo. n=2 (lotes de 20 semillas).

La cantidad de pectina en el total del grano de maíz es de alrededor del 15 % de los azúcares presentes (Carpita, 1989), contenido que, de acuerdo con la Fig. 25, es suficiente para la producción de exo-pectinasas por *A. flavus*. El tratamiento térmico parece estimular la producción de pectinasas, posiblemente por la desestructuración que sufre este polisacárido a causa del tratamiento mismo (Monsalves *et al.*, 2009).

Respecto a la zona de punción, es difícil hacer un análisis con los datos con los que se cuenta respecto a la composición de cada una de las estructuras, sin embargo, aparentemente no hay una diferencia de producción de exo-pectinasas que indique un efecto causado por la zona del grano punzada e inoculada.

También es apreciable, que en ambas condiciones, aunque con mayor claridad en el tratamiento térmico, *A. flavus* CECT 2687 produce una mayor cantidad de exo-pectinasas que *A. flavus* NRRL 6541, concordando con los datos reportados en la revisión hecha por Cleveland *et al.* (2004), donde se menciona que las evidencias apuntan a que las cepas de esta especie clasificadas como más virulentas tienen una mayor capacidad de producción de diferentes pectinasas y cuentan con un mayor número de genes codificantes para ello.

De acuerdo con los datos obtenidos, se puede concluir que la estructura y composición del grano de maíz se encuentran menos alterada por efecto del tratamiento con radiación gamma, conllevando, además, una menor inducción de la producción de pectinasas,

celulasas y xilanasas. También, se determinó que la mejor condición para la mayor obtención de amilasas degradadoras de almidón nativo es punzando e inoculando en el endospermo. En consecuencia, se ha decidido emplear granos de maíz tratados por radiación gamma a una dosis de 18 kGy y punzados en el endospermo para los estudios posteriores.

8.3 Perfil amilolítico de dos cepas de *A. flavus* (aflatoxigénica y no aflatoxigénica) en diferentes tiempos de crecimiento sobre granos de maíz

Para obtener información adicional sobre cuál o cuáles de las amilasas producidas por *A. flavus* se producen en diferentes tiempos durante su crecimiento y desarrollo sobre granos de maíz, se hizo un seguimiento durante 7 días, comenzando el monitoreo a partir del día 3 y terminándolo el día 10, sabiendo con antelación que la expresión de proteínas del hongo puede ser monitoreada a partir de este punto, puesto que en días previos únicamente se pueden identificar proteínas propias del maíz dado el nivel de abundancia (Solís; tesis en revisión).

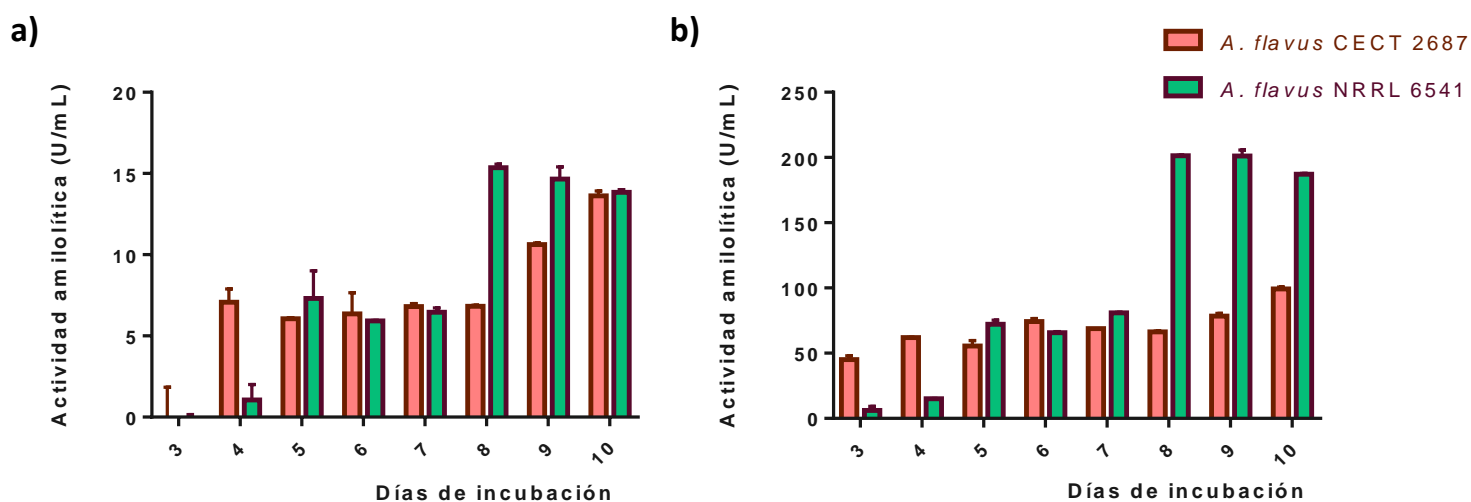


Fig. 26. Monitoreo de la actividad amilolítica sobre almidón a) insoluble y b) soluble o gelatinizado producida por dos cepas de *A. flavus* con diferentes capacidades aflatoxigénicas a lo largo de 10 días de crecimiento sobre granos de maíz. n=2 (lote de 8 semillas cada uno).

De acuerdo con los resultados obtenidos (Fig. 26), se puede observar que la producción de amilasas, totales y degradadoras de almidón insoluble es superior en el caso de *A. flavus* CECT 2687 en los primeros días respecto a la otra cepa, manteniéndose en un nivel más o menos estable a lo largo de su crecimiento e incrementando gradualmente en los últimos días de incubación. Por el contrario, la cepa no toxigénica, al llegar el octavo día tiene un incremento abrupto en la producción de amilasas, lo que se correlaciona con lo observado visualmente en cuanto a su abundante propagación en el grano de maíz (anexo) en este mismo tiempo de crecimiento.

Con la finalidad de determinar, si existe alguna correlación entre el comportamiento de la actividad amilolítica presentada y el perfil amilolítico, se corrieron geles de electroforesis SDS-PAGE y zimogramas de amilasas de cada uno de los días de monitoreo. Los resultados se muestran en la figura 27.

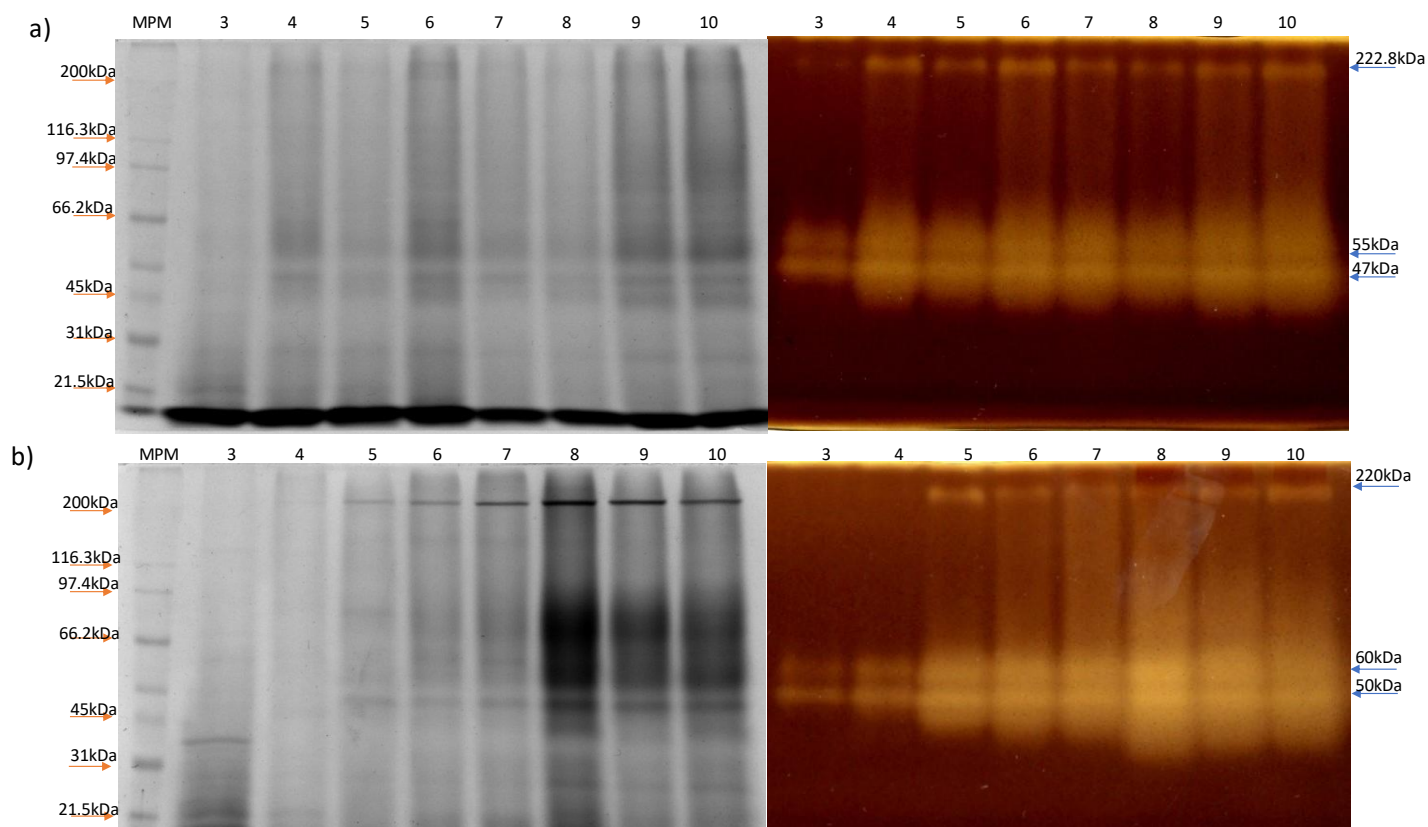


Fig. 27. Perfil de proteína y amilolítico en geles SDS-PAGE y zimogramas de amilasas (8 % acrilamida) durante el monitoreo enzimático a lo largo del crecimiento de dos cepas de *A. flavus* **a)** CECT 2687 y **b)** NRRL 6541 sobre granos de maíz durante 10 días, a partir del día 3 de incubación. Los días de incubación de cada carril se muestran en la parte superior de la imagen; 3-10 días. **MPM:** Marcador de masa molecular. n=2 (lotes de 20 semillas).

En la figura anterior, se puede apreciar la aparición de una banda de alta masa molecular (≈ 220 kDa) en diferentes tiempos para ambas cepas, observando que el aumento en la intensidad de esta banda parece tener una correlación con el aumento de la actividad sobre almidón insoluble en ambos casos, generando con ello evidencia que señala a esta enzima como la posible responsable de este tipo de actividad y, por tanto, con probabilidad de contar con un dominio de unión a almidón.

En cuanto a las amilasas observadas entre 50 y 60 kDa; intervalo de masas moleculares en el que se encuentran la mayoría de las amilasas de *A. flavus* (Base de datos NCBI), parecen estar

involucradas únicamente en la degradación de almidón soluble, observando una correlación entre su aparición en los zimogramas de actividad y la actividad amilolítica sobre almidón gelatinizado desde el primer día de monitoreo.

8.3.1 Purificación de amilasas correlacionadas con la degradación de almidón nativo

Con la finalidad de separar a la amilasa de alta masa molecular (probable amilasa con capacidad de degradar almidón nativo) del resto de las amilasas producidas, y con ello determinar si tiene o no esta capacidad amilolítica, se desarrolló una metodología de purificación basado en cromatografía de intercambio iónico por FPLC.

Los extractos enzimáticos de las dos cepas de *A. flavus* a partir de granos de maíz, fueron tratadas con SDS al 2 % (ver material y métodos), con el propósito de eliminar la mayor cantidad de polisacárido presente, ya que, en base a resultados de purificación previos (no mostrados), su presencia parece interferir en la separación de las enzimas, obteniendo un único pico de elusión de proteína y actividad bajo cualquier condición probada.

Para la purificación se empleó una columna de intercambio aniónico fuerte (Q), probando dos condiciones de pH (6 y 8), para ambos extractos enzimáticos. Estos valores de pH se fijaron en base al punto isoeléctrico reportado para diversas amilasas de especies de *Aspergillus*, los cuales se encuentran entre 3 y 5 (Amirul *et al.*, 1996; Ali & Hossain, 1991; Bhella and Altosaar, 1984; Khoo *et al.*, 1994), promoviendo, mediante el aumento del pH, la obtención de amilasas mayormente cargadas negativamente, lo que favorece su interacción con la columna de purificación empleada.

En la figura 28a, al observar el perfil de elusión de proteína, se puede apreciar la interacción de una gran cantidad de proteínas con la columna en diferentes niveles entre ellas, resultando en la obtención de varios picos de elusión en el cromatograma, lo que nos da un indicio de una mejor separación empleando el tratamiento de las muestras con SDS antes mencionado. Además, aparentemente también se eluyeron 3 picos de máxima actividad a lo largo de la cromatografía (A1, 2 y 3). El pico de actividad amilolítica A1, eluido antes del inicio del gradiente de NaCl, corresponde a aquella(s) amilasa(s) que no interaccionaron con la columna a este pH de trabajo, posiblemente por estar débilmente cargadas, no cargadas o cargadas positivamente lo que podría indicar que ésta(s) proteína(s) tiene(n) un punto isoeléctrico muy cercano o muy distinto al pH de elusión.

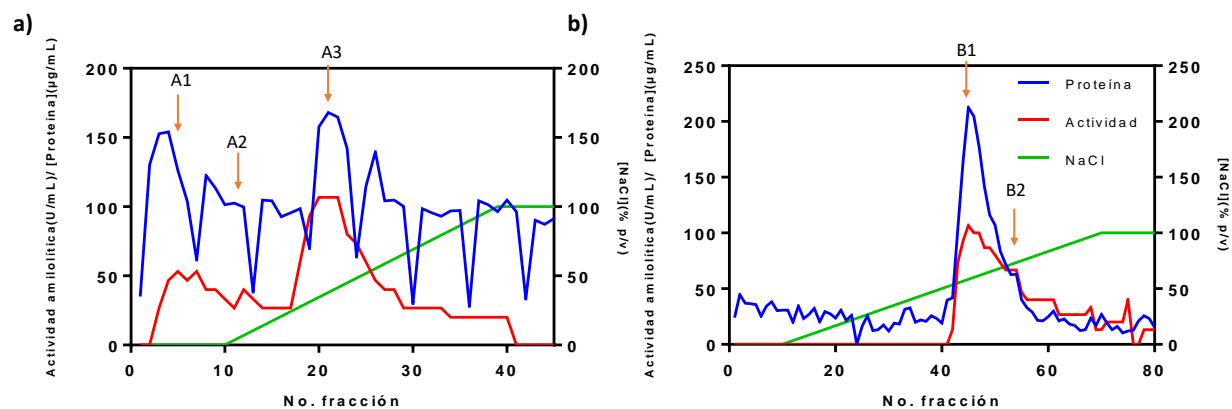


Fig. 28. Cromatogramas de purificación; amilasas producidas por *A. flavus* CECT 2687 en granos de maíz, empleando una columna de intercambio aniónico fuerte a pH **a)** 6 y **b)** 8 de corrimiento y un gradiente de elusión de NaCl de 0 a 1 M, colectando 45 y 80 fracciones de 3 y 1 mL, respectivamente. La actividad medida corresponde a la actividad amilolítica en geles de placa fina. Se encuentran señalados con flechas a los picos de máxima actividad en cada cromatograma y sus respectivas claves de identificación; A1, A2, A3, B1 y B2.

Por otro lado, dados los datos obtenidos en la primera cromatografía (Fig. 28a) se decidió coleccionar más fracciones de menor volumen en la cromatografía a pH 8 (Fig. 28b; 80 fracciones de 1 mL), con la finalidad de resolver mejor los picos de elusión. Sin embargo, se puede observar que, empleando este pH, todas o pocas de las proteínas interactúan con la columna, generando un solo pico de máxima actividad y proteína eluidos. Cabe resaltar que se observa un corrimiento hacia valores superiores en la concentración de NaCl a la cual eluye el pico de mayor abundancia respecto al uso de pH 6, esto atribuido al aumento de cargas negativas por efecto del pH, y con ello, la fuerza de unión de las proteínas a la columna, en concordancia con el perfil de elusión antes descrito. Para evaluar con mayor claridad el nivel de purificación de las amilasas, se hizo un análisis electroforético haciendo mezclas de las fracciones de los picos indicados en cada cromatograma bajo las notaciones A1 a 3 y B1 a 2 (Fig. 29).

El análisis electroforético y zimográfico confirman los bajos niveles de purificación mediante el empleo de pH 8 respecto a pH 6, observando que, con esta última condición, se logró purificar parcialmente la enzima $\alpha 1$, una de las proteínas de interés antes mencionadas de *A. flavus* CECT 2687.

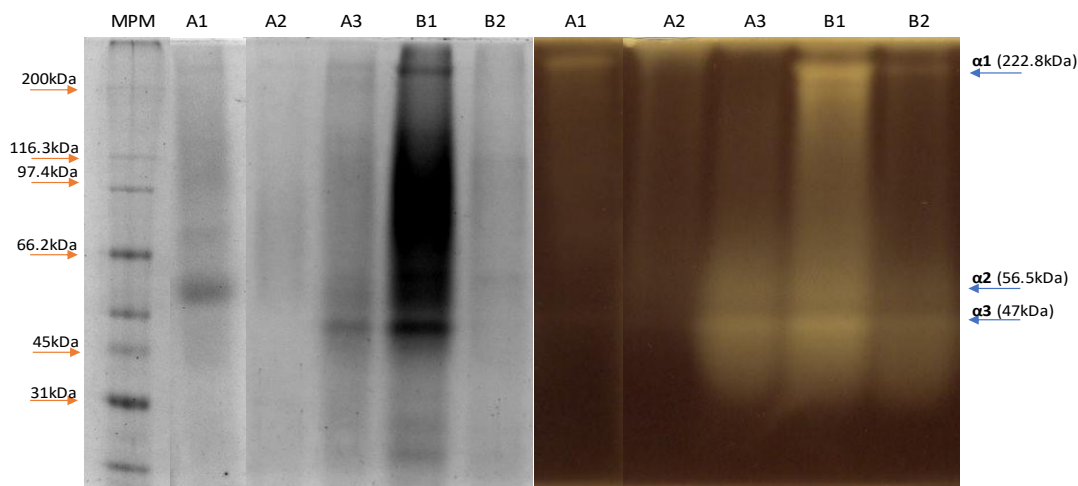


Fig. 29. Geles de electroforesis (8 %). SDS-PAGE y zimograma de las mezclas de fracciones colectadas de las dos cromatografías de intercambio catiónico fuerte utilizando dos diferentes valores de pH (6 y 8) y volumen de cada fracción colectada (3 y 1mL, respectivamente) empleando un filtrado enzimático de *A. flavus* CECT 2687 creciendo en granos de maíz. Del lado izquierdo de la figura se señalan las diferentes amilasas denotadas como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y sus respectivas masas moleculares.

Una vez obtenida dicha amilasa separada del resto ($\alpha 1$ en la mezcla A1), se midió su actividad sobre amilopectina insoluble para determinar si realmente cuenta con la capacidad de degradar almidón nativo.

La enzima de interés a partir de *A. flavus* CECT 2687, al ser separada del resto de las amilasas, muestra capacidad de degradar almidón nativo (53.36 U/ mg proteína), lo que deja abierta la posibilidad de contar con un dominio de unión a almidón que le confiera esta capacidad.

Tabla 4. Purificación de amilasa obtenida a partir de granos de maíz inoculados con *A. flavus* CECT 2687.

	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg)	Rendimiento	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación
Extracto crudo	0.57	5.70	100.00	87.90	15.42	1.00
A1 CII*	0.13	1.61	97.74	85.92	53.36	3.46

* A1 de la cromatografía de intercambio iónico

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en la purificación de la amilasa de interés. Se observa que, con el método de purificación empleado, la actividad específica aumentó considerablemente respecto a la inicial, resultando en un factor de purificación de 3.46.

Por otra parte, también el extracto enzimático de *A. flavus* NRRL 6541 fue sometido a condiciones semejantes de purificación antes descritas, con la única variante en la colección de 80 muestras de 1 mL al purificar a pH 6. Los resultados se muestran en la Fig. 30.

La separación de amilasas de *A. flavus* NRRL 6541 tiene un comportamiento más o menos similar de elución del pico de máxima actividad amilolítica y proteína que la presentada por la CECT 2687 bajo las dos condiciones, observando que la purificación resulta ser menor empleando pH 8, lo que se confirma además por el análisis electroforético y zimográfico (Fig. 31).

Es apreciable que, en este caso, no se logró purificar ninguna de las amilasas presentes, por lo que no se tiene evidencia de si la denominada $\beta 1$ tiene la misma capacidad de degradar almidón nativo que $\alpha 1$.

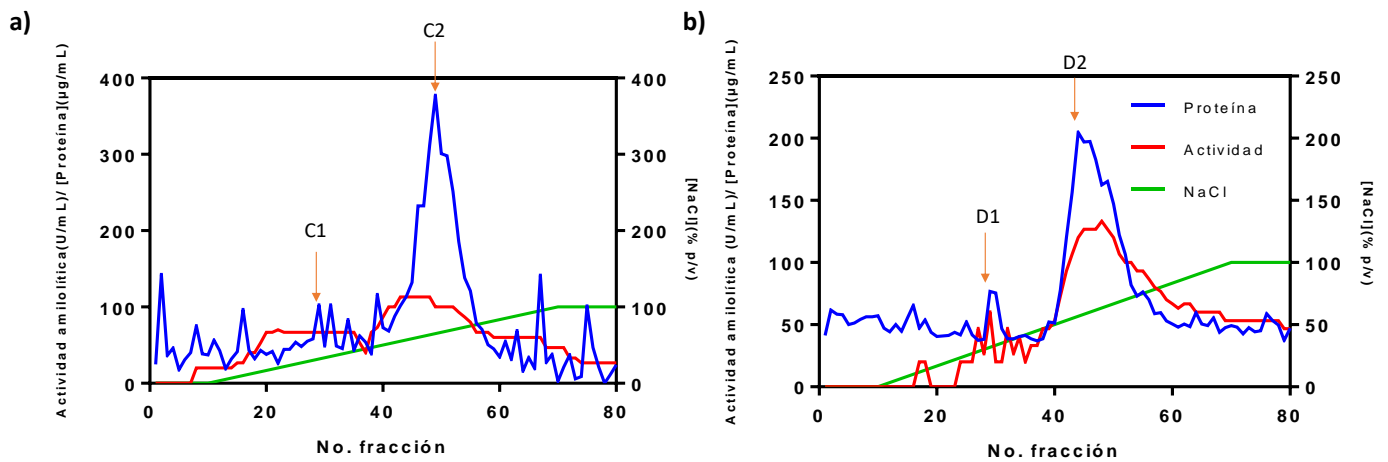


Fig. 30. Cromatogramas de purificación; amilasas producidas por *A. flavus* NRRL 6541 en granos de maíz, empleando una columna de intercambio aniónico fuerte a pH **a)** 6 y **b)** 8 de corrimiento y un gradiente de elución de NaCl de 0 a 1 M, colectando 80 fracciones de 1mL. La actividad medida corresponde a la actividad amilolítica en geles de placa fina. Se encuentran señalados con flechas a los picos de máxima actividad en cada cromatograma y sus respectivas claves de identificación; C1, C2, D1 y D2.

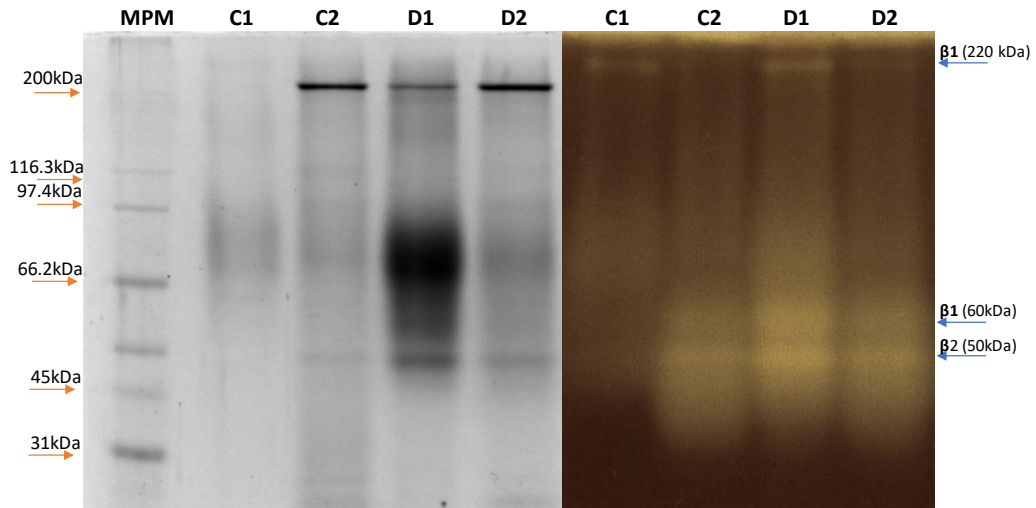


Fig. 31 Geles de electroforesis (8 %). SDS-PAGE y zimograma de las mezclas de fracciones colectadas de las dos cromatografías de intercambio catiónico fuerte utilizando dos diferentes valores de pH (6 y 8) empleando un filtrado enzimático de *A. flavus* NRRL 6541 creciendo en granos de maíz. Del lado izquierdo de la figura se señalan las diferentes amilasas denotadas como $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ y sus respectivas masas moleculares.

CAPÍTULO 6

9. CONCLUSIONES

Se determinó que el perfil amilolítico expresado por *A. flavus* es dependiente de la complejidad de la fuente de carbono empleada durante su crecimiento, por lo que, el sistema amilolítico expresado en semillas de maíz por *A. flavus* es característico. En este sentido se demostró que tanto la cepa toxigénica como la no-toxigénica tienen capacidad para producir amilasas con actividad degradativa de almidón nativo cuando crece sobre semillas de maíz.

Por otro lado, se obtuvieron semillas de maíz inactivas enzimáticamente y estériles mediante el empleo de la irradiación gamma de granos de maíz (dosis de 18 kGy) y tratamiento por calor húmedo (autoclave). De lo anterior, se estableció como el modelo biológico más adecuado el maíz VC-152 irradiado por irradiación gamma a una dosis de 18 kGy punzando en el endospermo, por obtenerse la mayor actividad amilolítica degradadora de almidón insoluble producida por *A. flavus* respecto a los otros tratamientos, así como por considerarlo un modelo con una menor modificación del almidón de acuerdo a lo reportado en la literatura.

En cuanto al perfil amilolítico de ambas cepas (toxigénica y no toxigénica), al crecer sobre semillas de maíz, no se observaron diferencias concretas entre ellas mediante la metodología empleada, observando dos amilasas de masas moleculares cercanos a 50 y 60 kDa, y otra de masa molecular superior a 200 kDa (≈ 220 kDa) de acuerdo con el programa Image Lab.

La amilasa de alta masa molecular antes mencionada, se expresa en diferentes tiempos de crecimiento entre ambas cepas, observando una expresión temprana de dicha enzima en el caso de la cepa toxigénica en relación con la no toxigénica cuando crecen sobre granos de maíz.

Por otro lado, la aparición de esta enzima en zimogramas de actividad amilolítica se correlaciona con la aparición de la actividad sobre almidón nativo en ambos casos. Además, el aumento de esta actividad se correlaciona con el aumento en el crecimiento de *A. flavus* NRRL 6541.

Mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico fuerte, se logró purificar parcialmente a dicha amilasa a partir de *A. flavus* CECT 2687 (toxigénica) con un factor de purificación de 3.46, lo que, de manera indirecta, permitió obtener evidencia de que esta amilasa presenta actividad sobre almidón nativo, lo que representa la posibilidad de que cuente con un dominio de unión a almidón.

10. PERSPECTIVAS

Con el actual trabajo se logró determinar la capacidad de *A. flavus* de producir al menos una amilasa con actividad sobre almidón nativo, o insoluble, cuando coloniza semillas de maíz. Lo anterior fue planteado con el objetivo de abrir camino para elucidar si la expresión de amilasas por este microorganismo con este tipo de actividad juega un rol en la contaminación de maíz.

Inicialmente se requiere de la identificación de la amilasa, para lo que se propone el empleo de un análisis por espectrometría de masas. Con lo anterior, también se puede determinar si esta enzima cuenta con un dominio de unión a almidón.

Con esta información, se podrán establecer estrategias que permitan determinar el papel de esta enzima y/o del dominio de unión a almidón durante el desarrollo del microorganismo sobre granos de maíz.

Por otro lado, también se ha planteado estudiar la respuesta de *A. flavus* ante la modificación de genes codificantes para enzimas degradadoras de almidón, en particular, estudiar los posibles cambios en el perfil enzimático causado por la modificación de la enzima con dominio de unión al almidón.

Además, en lo que respecta a la enzima por sí misma, se desea determinar si la ausencia del dominio de unión a almidón modifica su actividad sobre almidón nativo o sus características cinéticas y de estabilidad, por lo que se propone la caracterización de la(s) amilasa(s) silvestre(s) y sin SBD con la finalidad de hacer una comparación detallada entre ambas.

11. ANEXO

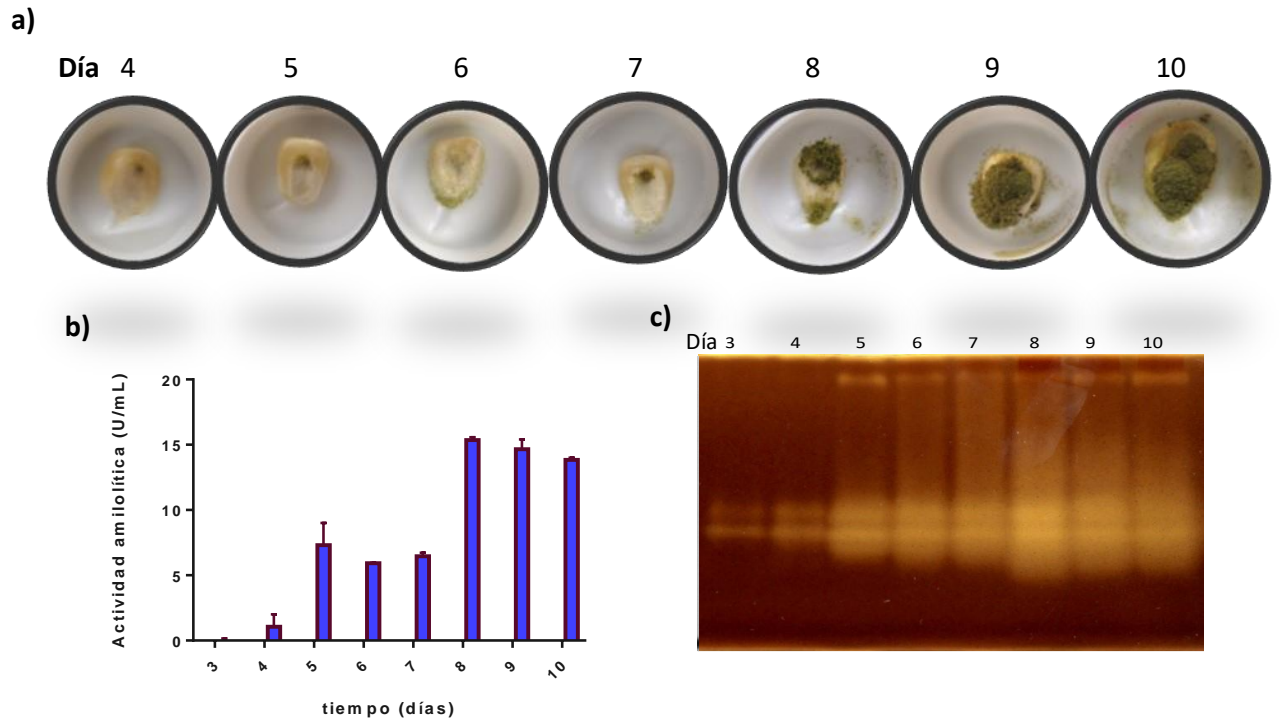


Fig. 32. Comparación del a) crecimiento de *A. flavus* NRRL 6541 sobre granos de maíz respecto a su b) actividad y c) perfil amilolítico a lo largo de 10 días de incubación.

Capítulo 7

12. REFERENCIAS

- Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y., Wang, Z., and Lu, G. (2018). Carbon catabolite repression in filamentous fungi. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(48); 1-23.
- Ali, S. and Hossain, Z. (1991). Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terreus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 71(1); 144-146.
- Amirul, A., Khoo, S., Nazalan, M., Razip, M. and Azizan, M. (1996). Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiology*. 41(2);165-174.
- Arellano, F., y Olmos, J. (1999). Enzimas amilolíticas microbianas. *Biotecnología*. 4(3); 115-121.
- Arguero, A. (2014). Estudio de la producción de enzima amilasa mediante *A. niger* por fermentación sólida, con el uso de residuos agroindustriales. Tesis. Escuela Politécnica Nacional, Quito.
- Armijo, J., y Calderón, J. (2009). Esquema de acciones para evitar, controlar y desinfectar productos de hongos y aflatoxinas. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 12(2); 15-24.
- Autio, K., *et al.* (2009). *Starch: chemistry and technology*, 3ra. Edición. Cap. 5,6 y 9.
- Aziz, N., El-Zeany, Z., and Moussa, L. (2002). Influence of γ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus*. *Nahrung/Food* 46(1); 5; 327-331.
- Bennett, J. (2009). *Aspergillus: a primer for the novice*. *Medical Mycology*. 47(1), S5-S12.

- Bhella, R. and Altosaar, I. (1984). Purification and some properties of the extracellular α -amylase from *Aspergillus awamori*. Canadian Journal of Microbiology. 31(1); 149-153.
- Brown, R., Chen, Z., Cleveland, T. Cotty, P, and Car, J. (2001). Variation in vitro α -amylase and protease activity is related to the virulence of *Aspergillus flavus* isolates. Journal of Food Protection. 64(3); 401-414
- Campos, M., Partes del maíz; maíz. <http://www.imagui.com/a/partes-del-maiz-i85aGkj5r>. Última revisión: noviembre 2017.
- Carpita, N. (1989). Pectic polysaccharides of maize coleoptiles and proso millet cells in liquid culture. Phytochemistry, 28(1);121-125.
- Carrillo, L. (2003). Los Hongos de los alimentos y forrajes. *Aspergillus*. Cap. 4.
- Base de datos CAZy (Carbohydrate active enzymes). <http://www.cazy.org>- Última revisión: marzo 2018.
- Chen, Z., Warburton, M., Hawkins, L. Wei, Q., Raruang, Y., Brown, R., Zhang, L., and Bhatnagar, D. (2016). Production of the 14 kDa trypsin inhibitor protein is important for maize resistance against *Aspergillus flavus* infection/aflatoxin accumulation. World Mycotoxin Journal. 9(2); 215-228.
- Chung, H., and Liu, Q. (2009). Effect of gamma irradiation on molecular structure and physicochemical properties of corn starch. Journal of Food Science. 74(5); 353-361.
- Cleveland, T., Yu, J., Bhatnagar, D., Chen, Z., Brown, L., Chang, P, and Cary, J. (2004). Progress in elucidating the molecular basis of the host plant-*Aspergillus flavus* interaction, a basis for devising strategies to reduce aflatoxin contamination in crops. Journal of Toxicology. Toxin Reviews. 23(2 & 3); 345-380.
- Córdoba, J., Salcedo, E., Rodríguez, R., Zamora, J., Manríquez, R., Contreras, H., Robledo, J., Y Delgado, E. (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. Revista Latinoamericana de Química. 41(3); 171-184.
- Cuero, R., Smith, J. and Lacey, J. (1986) The influence of gamma irradiation and sodium hypochlorite sterilization on maize seed microflora and germination. Food Microbiology. 1(3); 107-113.
- Culleton, H., McKie, V., and de Vries, R. (2013). Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from *Aspergillus*?. Review. Biotechnology Journal. 8(1); 1-11.
- de Vries, R., *et al.* (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. Genome Biology. 18(28); 1-45.

- El-Fallal, A., Abou, M., El-Sayed, A., and Omar, N. (2012). Carbohydrates - comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology; starch and microbial α -Amylases: from concepts to biotechnological applications. Cap. 21.
- García, B., Aguilera, P., Castro, R., y Rodríguez, R. (2012). Estructura y función de los dominios de fijación al almidón. *BioTecnología*. 16(4); 11-23.
- Guarnizo, A., Martínez, P. and Valencia, H. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia et Technica*. 10(42); 284-289.
- Guillén, D., Santiago, M., Linares, L., Pérez, R., Morlon, J., Ruiz, B., Sánchez, S., and Rodríguez, R. (2007). Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(12); 3833–3837.
- Gupta, P., Paresh, G., Harapriya, M., Vineet, K., and Bhavna, C. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 38(1); 1599-1616.
- Horváthová, V., Janecek, S., and Studík, E. (2000). Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties. *Biología, Bratislava*. 55(6); 605-615.
- Janaswamy, S. (2014). Encapsulation altered starch digestion: Toward developing starch-based delivery systems. *Carbohydrate Polymers*. 101(1); 600– 605.
- Khlangwiset, P., Shephard, G., and Wu, F. (2011). Aflatoxins and growth impairment: a review. *Critical Reviews in Toxicology*. 41(9); 740-755.
- Khoo, S., Amirul, A., Kamaruzaman, M, Nazalan, N., and Azizan, M. (1994). Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiology*. 39 (5); 392-398
- Kume, T. and Tamura, N. (1987). Change in digestibility of raw starch by gamma-irradiation. *Starch/stirke*. 3(1); 71-74.
- Liu, T., Ma, T., Xue, S. and Shi, J. (2012). Modifications of structure and physicochemical properties of maize starch by γ -irradiation treatments. *Food Science and Technology*. 46(1); 156-163.
- Ligeró, P., van der Kolk, J, de Vega, A., and van Dam, J. (2011) Production of xylo-oligosaccharides from *Miscanthus giganteus* by autohydrolysis. *BioResources*. 6(4); 4417-4429.
- Machovic, M., Svensson, B., MacGregor, E., and Janecek, S. (2005). A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch-binding domains from families CBM20 and CBM21. *The FEBS Journal*. 272(1); 5497–5513
- Martínez, H. y Hernández, S., Reyes, C., y Vázquez, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31(2); 126:146.
- Martínez, M., Vargas del Río, L., y Gómez, V. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*. 12(2); 89-109.

- Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L., y Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista mexicana de ingeniería química*. 11(3); 415-429.
- Mellon, J., Dowd, M., and Cotty, P. (2002). Time course study of substrate utilization by *aspergillus flavus* in medium simulating corn (*Zea mays*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(1); 648-652.
- Monsalves, C., Loyola, N., y Muñoz, J. (2009). Extracción de pectinas de *Vitis labrusca* CV. Concord para producir jaleas. *IDESIA*. 27(3); 9-14.
- Montes, G., Reyes, M., Montes, R., and Cantú, A. (2009). Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays L.*) grain used as food and animal feed. *Journal of Food*. 7(1);119-125.
- Moreno, L., *et al.* (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata L.*) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* *Polibotánica*. 32(1);193-205.
- Nakamura, Y., *et al.* (2015). *Starch: metabolism and structure*. Springer.
- Nakamura, T., Maeda, Y., Tanoue, N., Makita, T., Kato, M. and Kobayashi, T. (2006). Expression profile of amyolytic genes in *Aspergillus nidulans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 70(10); 2363–2370.
- Nandakumar, M., Thakur, M., Raghavarao K., and Ghildyal, N. (1999). Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases.
- Nguyena, Q., Rezessy-Szabó, J., Claeysens, M., Stals, I., and Hoschke, A. (2002). Purification and characterisation of amyolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*. 31(1); 345–352.
- Base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Última revisión: abril de 2018
- Nieto, S. (tesis en proceso). Identificación de enzimas amilolíticas producidas diferencialmente entre cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Aspergillus flavus* y su relación con la producción de aflatoxinas. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html>
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Schare, J., and Young, M. (2006). Fungal glucoamylases. *Biotechnology Advances*. 24(1); 80-85.

- Petersen, K., Lehmbeck, J., and Christensen, T. (1999). A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*. *Molecular & General Genetics*. 262(1); 668-676.
- Ries, L., Beattie, S., Espeso, E., Cramer, R., and Goldman, G., (2016). Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 203(1); 335-352.
- Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R., Lima, N., and Venâncio, A. (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 1(1); 527-534.
- Rodríguez, R., N. Oviedo, L. Escalante, B. Ruiz, and S. Sánchez (2009). A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* α -amylase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 36(1); 341-346.
- Rodríguez, R., Oviedo, N., and Sánchez S. (2005). Microbial starch binding domain. *Ecology and Industrial Microbiology*. 8(1); 260-267.
- Rombo, G., Taylor, J., and Minnaar, A. (2001). Effect of irradiation, with and without cooking of maize and kidney bean flours, on porridge viscosity and in vitro starch digestibility. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 81(1); 497-502.
- Roy, P., Lockington, R., and Kelly, J. (2008). CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localisation or degradation of CreA. *Fungal Genetics*. 45(1); 67-70.
- Samson, R., Hang, S., and Frisvad, J. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. 44(1); 5133-5148.
- Sandoval, A., Rodríguez, E., y Fernández, A. (2005). Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (dsc) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *Dyna*. 146(1);45-53.
- Saranraj, P. and Stella, D. (2013). Fungal amylase: a review. *International Journal of Microbiological Research* 4 (2): 203-211.
- Scarpari, M., Punelli, M., Scala, V., Zaccaria, M., Nobili, C., Ludovici, M., Camera, E., Fabbri, A., Reverberi, M., and Fanelli, C., (2014). Lipids in *Aspergillus flavus*- maize interaction. *Frontiers in Microbiology*. 5(74);1-9.
- Servicio Nacional del Consumidor(SERNAC) (2004). Irradiación de Alimentos. Información al consumidor sobre el significado del tratamiento con energía ionizante.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2014). Estadísticas de Producción para el Año Agrícola 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería,

Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.siap.gob.mx/index. Última consulta: enero de 2017.

- Sinnott, M. (1998). *Comprehensive biological catalysis. A mechanistic reference*. Academic Press. Vol. 1.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Madhavan, K., Soccol, C., and Pandey, A. (2006). α -Amylases from microbial sources – an overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*. 44 (2);173-184.
- Solís, A. (tesis en revisión). Análisis del secretoma de *Aspergillus flavus* CECT 2687 y *Aspergillus flavus* NRRL 6541 utilizando como sustrato granos de maíz mexicano. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Solís-Ares, M., P. (2014). 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. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Soriano, J., *et al.* (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz Santos.
- Suzuki, K., Tanaka, M., Konno, Y., Ichikawa, T., Ichinose, S., Hasegawa-Shiro, S., Shintani, T., and Gomi, K. (2014). Distinct mechanism of activation of two transcription factors, AmyR and MalR, involved in amylolytic enzyme production in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*.99(4); 1805–1815.
- Tester, R., Qi, X., and Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*. 130(1); 39–54.
- Tester, R., Karkalas, J., and Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 39(1);151–165.
- Tsukagoshi, N., Kobayashi, T., and Kato, M. (2001). Regulation of the amylolytic and (hemi-)cellulolytic genes in *Aspergilli*. *Journal of General Applied Microbiology*., 47(1); 1-19.
- vanKuyk, P., Benen, J., Wösten, H., Visser, J., de Vries, R. (2012). A broader role for AmyR in *Aspergillus niger*: regulation of the utilisation of D-glucose or D-galactose containing oligo- and polysaccharides. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 93(1);285–293.
- Vega, V. (2012). Hongos micotoxigénicos y aflatoxinas en granos de maíz de diferentes orígenes geográficos de la República Mexicana. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Woodstock, L. and Combs, M. (1965). Effects of gamma-irradiation of corn seed on the respiration and growth of the seedling. *American Journal of Botany*. 52(6); 563-569.
- Zeña, L. (2015). Efecto del almidón comercial de *Zea mays* sobre las cinéticas de producción de amilasas en *Bacillus licheniformis*. Tesis. Universidad de Perú.