



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA LIMITACIÓN DE NUTRIENTES EN LA PRODUCCIÓN DE
ENZIMAS AMILOLÍTICAS DE *Aspergillus flavus* EN UN REACTOR ALIMENTADO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

DANIEL CRISANTO LICEA SAUCEDO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Edmundo Castillo Rosales
Instituto de Biotecnología

Dr. Francisco Ruiz Terán
Facultad de Química

Ciudad de México. Diciembre, 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.

PMDCB/1191/2018

Licea Saucedo Daniel Crisanto
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e


Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 11 de junio del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Efecto de la limitación de nutrientes en la producción de enzimas amilolíticas de *Aspergillus flavus* en un reactor alimentado**", dirigida por el/la Dr(a). **Aguilar Osorio José Guillermo de Jesús**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Rodríguez Sotres Rogelio
VOCAL	Montiel Pacheco Carmina
VOCAL	Rodríguez Sanoja Romina María de la Paz
VOCAL	Serrano Carreón Leobardo
SECRETARIO	Trujillo Roldán Mauricio Alberto

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de junio de 2018.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para los estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para asistir al X Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, llevado a cabo en la ciudad de Mérida, Yucatán, los días 21, 22 y 23 de Marzo de 2018.

A mis compañeros de laboratorio, Eileen, Erika, Darío, y en especial a Michelle, por su gran apoyo en la fase final de este viaje.

Al Dr. Guillermo Aguilar Osorio, por su consejo y enseñanzas.

A Perla Estrella Romero Jiménez, que siempre me impulso a seguir haciendo lo que me gusta.

A mis padres, Dora Luz Saucedo Valdez y Crisanto Licea Morfin, por su apoyo incondicional en todos mis proyectos.

CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	1
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. ANTECEDENTES	6
1.1 Maíz (<i>Zea mays</i>)	6
1.2 Almidón	6
1.3 Amilasas	8
1.4 El Género <i>Aspergillus</i>	10
1.4.1 Crecimiento y Alimentación	10
1.4.2 Taxonomía	11
1.5 <i>Aspergillus flavus</i>	12
1.6 Regulación de las Enzimas Hidrolíticas en <i>Aspergillus</i>	14
1.6.1 Regulación de las Amilasas en <i>Aspergillus</i>	16
1.7 Cultivo Microbiano	16
1.7.1 Cultivo en Lote	17
1.7.2 Cultivo Continuo	18
1.7.3 Cultivo Alimentado	18
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo General	24
4.2 Objetivos Específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Microorganismos	25
5.2 Sustratos	25
5.3 Obtención de Inóculo	25
5.3.1 Suspensión de Esporas	25
5.3.2 Micelio	26
5.4 Cultivo en Medio Sólido	26
5.5 Cultivo en Medio Líquido	27
5.5.1 Nivel Matraz	27
5.5.2 Biorreactor de 1 L	27

5.5.3 Biorreactor de 3 L	28
5.6 Métodos Analíticos	28
5.6.1 Determinación de Azúcares Reductores	28
5.6.2 Determinación de Proteína Extracelular	29
5.7 Ensayos de Actividad Enzimática	29
5.7.1 Amilolítica	29
5.7.2 Xilanolítica	30
5.8 Cinética	30
5.8.1 Crecimiento	30
5.8.2 Consumo de Sustrato	31
5.9 Técnicas Eletroforéticas	31
5.9.1 SDS-PAGE	31
5.9.2 Zimograma de Actividad Amilolítica	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1 Preferencias Nutricionales	33
6.2 Efecto del pH	35
6.3 Efecto de la Fuente de Nitrógeno	39
6.4 Cultivo a Diferente Concentración de Sustrato	44
6.4.1 Cultivo con glucosa	45
6.4.2 Cultivo con xilosa	47
6.5 Condiciones de Cultivo en Biorreactor	50
6.6 Efecto del Inóculo sobre la Actividad Específica	54
6.7 Limitación de Nutrientes	60
6.7.1 Limitación de glucosa	60
6.7.2 Limitación de xilosa	66
6.8 Regulación de las Enzimas Amilolíticas	74
7. CONCLUSIÓN	76
8. BIBLIOGRAFÍA	77

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Amilosa: α -(1→4)-glucano.
- Figura 2. Amilopectina. Los enlaces α -(1→6) son los puntos de ramificación.
- Figura 3. Acción de las principales enzimas amilolíticas.
- Figura 4. Conidióforo de *Aspergillus flavus*.
- Figura 5. Colonia de *Aspergillus flavus* creciendo en maíz blanco triturado..
- Figura 6. Biorreactor FP-1L.
- Figura 7. Biorreactor BioFlo III Batch/Continuous.
- Figura 8. Crecimiento en medio sólido con cuatro fuentes de carbono (Glucosa, Sacarosa, Almidón y Maíz).
- Figura 9. Efecto del pH sobre la actividad amilolítica de *Aspergillus flavus* creciendo en diferentes fuentes de carbono.
- Figura 10. Efecto del pH sobre la concentración de proteína extracelular de *Aspergillus flavus* creciendo en diferentes fuentes de carbono.
- Figura 11. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad amilolítica de *Aspergillus flavus*.
- Figura 12. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la utilización de sustrato por *Aspergillus flavus*.
- Figura 13. Zimograma de actividad amilolítica de *Aspergillus flavus* a diferentes concentraciones de glucosa.
- Figura 14. Biomasa obtenida creciendo en diferentes concentraciones de glucosa y xilosa para *Aspergillus flavus*.
- Figura 15. Perfil amilolítico de *Aspergillus flavus* a diferentes concentraciones de xilosa.
- Figura 16. Rendimiento biomasa/sustrato obtenido creciendo en diferentes concentraciones de glucosa y xilosa para *Aspergillus flavus*.
- Figura 17. Condiciones de cultivo en biorreactor de 1 L y su efecto sobre la actividad amilolítica, la proteína, el crecimiento y el consumo de sustrato para la cepa *A. flavus* NRRL 6541.
- Figura 18. Condiciones de cultivo en biorreactor de 1 L y su efecto sobre la actividad amilolítica, la proteína, el crecimiento y el consumo de sustrato para la cepa *A. flavus* CECT 2687.
- Figura 19. Micelio de *Aspergillus flavus* utilizado como inóculo.
- Figura 20. Efecto del inóculo en la respuesta a la limitación de nutrientes para la cepa *A. flavus* NRRL 6541.
- Figura 21. Efecto del inóculo en la actividad amilolítica y la proteína extracelular para la cepa *A. flavus* CECT 2687.
- Figura 22. Zimograma de actividad amilolítica con esporas y micelio como inóculo.
- Figura 23. Efecto de la limitación de fuente de carbono (glucosa) en la cepa *A. flavus* NRRL 6541.
- Figura 24. Efecto de la limitación de fuente de carbono (glucosa) en la cepa *A. flavus* CECT 2687.
- Figura 25. Gel SDS-PAGE y zimograma de actividad amilolítica en condición de limitación de glucosa para *A. flavus*.
- Figura 26. Efecto de la limitación de fuente de carbono (xilosa) en la cepa *A. flavus* NRRL 6541.
- Figura 27. Efecto de la limitación de fuente de carbono (xilosa) en la cepa *A. flavus* CECT 2687.
- Figura 28. Gel SDS-PAGE y zimograma de actividad amilolítica en condición de limitación de xilosa para *A. flavus*.

- Tabla 1. Composición química del grano de Maíz.
- Tabla 2. Taxonomía del género *Aspergillus*.
- Tabla 3. Características de crecimiento de *Aspergillus flavus*.
- Tabla 4. Productos obtenidos por técnicas de cultivo alimentado.
- Tabla 5. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

ABREVIATURAS

A. - *Aspergillus*

AAE - Actividad Amilolítica Específica.

ALM – Almidón.

GLU – Glucosa.

rpm – Revoluciones por minuto.

vvm - 1 L de aire por L de medio por minuto.

SAC – Sacarosa.

RESUMEN

El maíz es un componente fundamental de la alimentación en México y tiene su centro de origen en nuestro país. *Aspergillus flavus* es un hongo saprófito que típicamente amenaza cultivos como algodón, cacahuete y maíz. Consume fuentes de carbono complejas vía degradación enzimática, gracias al amplio arsenal de hidrolasas contenidas en su genoma. Las enzimas amilolíticas son de particular importancia dado que su sustrato, el almidón, es un componente principal del grano de maíz. La regulación de estas enzimas se rige por represión catabólica, que depende de la disponibilidad de fuente de carbono. Para simular un ambiente de baja disponibilidad de carbono como el encontrado en la naturaleza, se implementó un cultivo alimentado. Dos cepas, *A. flavus* NRRL 6541 y *A. flavus* CECT 2687, se crecieron en un reactor con alta (1%) o baja (0.2%) concentración de glucosa o xilosa. La concentración de sustrato y proteína extracelular, así como la actividad amilolítica, se monitorearon a lo largo de la fermentación. Para ambas cepas, se encontró que una limitación de la disponibilidad de glucosa aumenta la producción y actividad de las amilasas comparado con un cultivo en lote con alta concentración de glucosa. En contraste, la xilosa no tuvo un efecto sobre la actividad amilolítica. Estos resultados concurren con la hipótesis de que una baja concentración de glucosa libera de la represión catabólica a genes que están involucrados en la utilización de fuentes de carbono menos comunes, como los carbohidratos complejos. Además, debido a que con xilosa no se observó actividad amilolítica en ninguna condición, se propone que la glucosa o alguno de sus productos ejercen un efecto inductor sobre las enzimas amilolíticas, como se ha encontrado para otras especies de *Aspergillus*.

ABSTRACT

Maize is a staple food in Mexico's diet and has its center of origin in our country. *Aspergillus flavus* is a saprophytic fungus that typically threatens crops such as cotton, peanut and maize. It consumes complex carbon sources via enzymatic degradation, due to the wide arsenal of hydrolases encoded in its genome. Amylolytic enzymes are of particular importance since their substrate, starch, is a major constituent of the maize kernel. Regulation of these enzymes is controlled by catabolic repression that responds to carbon availability. In order to simulate a low carbon source environment such as the one found in nature, a fed-batch culture was implemented. Two strains, *A. flavus* NRRL 6541 and *A. flavus* CECT 2687 were grown in a reactor with high (1%) or low (0.2%) concentration of glucose or xylose. The substrate and extracellular protein concentration, as well as the amylolytic activity, were monitored over the course of the fermentation. For both strains, a limitation in the availability of nutrients was found to increase the activity of amylases compared to a batch culture with high carbon concentration. On the other hand, xylose did not have an effect on amylolytic activity. These results are in agreement with the hypothesis that a low glucose concentration releases from repression genes that are involved in the utilization of less common carbon sources, such as complex carbohydrates. Furthermore, due to the lack of amylolytic activity with xylose as the sole carbon source, it is proposed that glucose or a product thereof exerts an inducing effect on amylolytic enzymes, as it has been found for other *Aspergillus* species.

1. ANTECEDENTES

1.1 Maíz (*Zea mays*)

El maíz es uno de los granos alimenticios más importantes a nivel mundial, además de uno de los más antiguos. Pertenece a la familia de las gramíneas y se clasifica como del *Nuevo Mundo* debido a que su centro de origen se encuentra en el continente Americano (Centro de México); (FAO, 2001). El maíz y el hombre han co-evolucionado desde la antigüedad, convirtiendo a este cultivo en una planta doméstica que depende de los cuidados del hombre. Su producción mundial ocupa uno de los primeros lugares en cantidad e importancia (FAO, 2018). El maíz es el único cereal que se utiliza en diferentes etapas de crecimiento. Las espigas antes de la floración son utilizadas como forraje; las mazorcas tiernas se cocinan de diferentes maneras (asadas, hervidas, entre otras); la mazorca madura es utilizada para la producción de harina. El fruto del maíz es un cariopse y la pared de la semilla está formada por la cubierta de la semilla y el pericarpio. En el interior se encuentra el embrión diploide y el endospermo triploide (FAO, 2001). El maíz es una fuente importante de energía, debido a su alto porcentaje de carbohidratos, siendo el almidón el más abundante (Tabla 1).

1.2 Almidón

El almidón es la molécula de reserva energética de las células vegetales. Es un carbohidrato complejo granular compuesto de α -glucanos helicoidales, la amilosa y la amilopectina (Tester, Karkalas & Qi, 2003). La amilopectina es la más abundante, aunque la proporción de cada una depende del origen botánico. El maíz contiene aproximadamente 28% de amilosa (Jenkins & Donald, 1995).

Tabla 1 Composición química del grano de Maíz.

Nutriente	Porcentaje (%)
Proteínas	8-11
Carbohidratos	73-76
Grasas	3-18
Fibra Total	10.3-22.5
Cenizas	0.86-1.65
Humedad	10.7-16.2

Fuente: (Benítez C, 2006); (Pita M, 2006).

La amilosa es un glucano lineal relativamente largo con 99% de enlaces glucosídicos α -(1-4). Tiene una masa molar aproximada de 1×10^5 - 1×10^6 g/mol. Cada molécula está compuesta de entre 3-11 cadenas, con 200-700 residuos de glucosa por cadena (Tester *et al.*, 2003). La estructura de la amilosa se muestra en la Figura 1.

La amilopectina (Figura 2) es un glucano muy ramificado con 95% de enlaces α -(1→4) y 5% de enlaces α -(1→6). Es una molécula de masa molar aproximada de 1×10^7 - 1×10^9 g/mol en la que los enlaces α -(1→6) permiten la ramificación.

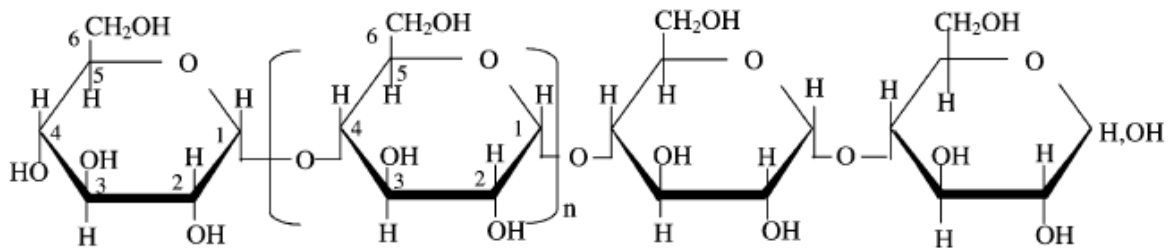


Figura 1. Amilosa: α -(1→4)-glucano (Tester *et al.*, 2003).

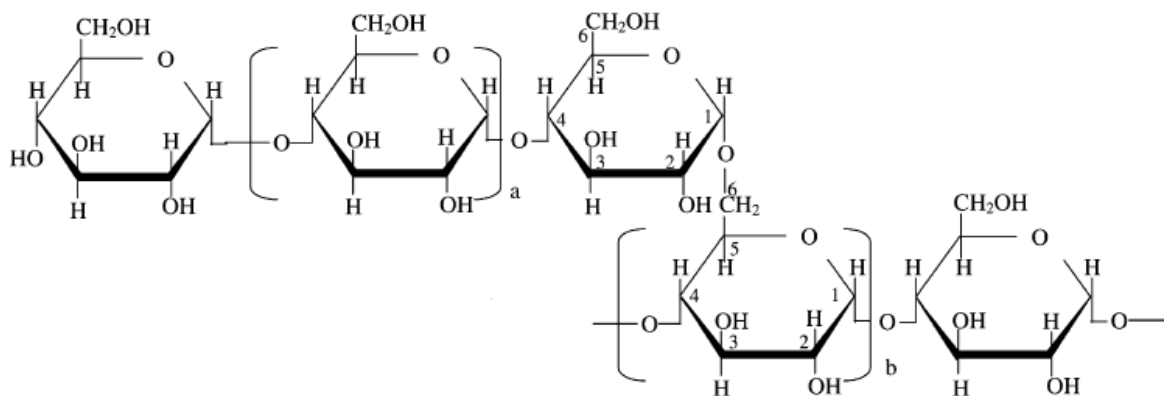


Figura 2 Amilopectina. Los enlaces α -(1 \rightarrow 6) son los puntos de ramificación (Tester *et al.*, 2003).

El almidón sintetizado en los amiloplastos de tejidos vegetales toma una forma de gránulos esféricos (con el tamaño variando de acuerdo al origen botánico). En los gránulos, hélices dobles se asocian para formar regiones cristalinas que son resistentes a la hidrólisis por amilasas, por lo que es necesaria la gelatinización para una eficiente hidrólisis *in vitro* (Tester, Qi & Karkalas, 2006). El almidón puede tener dos formas cristalinas, tipo A (cereales) y tipo B (tubérculos).

En el proceso de gelatinización del almidón, los cristales se hidratan progresivamente a la vez que se rompen puentes de hidrógeno. Las regiones cristalinas se convierten en regiones amorfas que aumentan su tamaño hasta perder su forma granular y tender a la formación de geles hidratados (>4% de sólidos) o a la solubilización (\leq 4% sólidos); (Tester *et al.*, 2006).

1.3 Amilasas

Existen esencialmente cuatro grupos de enzimas involucradas en la degradación del almidón (Guzman-Maldonado, Paredes-Lopez & Biliaderis, 1995). El primer grupo corresponde a las endo-amilasas. Estas enzimas cortan el enlace glicosídico α -(1-4) en la amilosa y la amilopectina. Actúan en las regiones internas dando como producto oligosacáridos de diferentes tamaños y disminuyendo drásticamente la viscosidad del

almidón gelatinizado. Existen dos variedades de endo-amilasas, las termoestables (de origen bacteriano) y las termolábiles (de origen bacteriano y fúngico).

El segundo grupo, las exo-amilasas, actúan sobre los mismos sustratos hidrolizando enlaces α -(1-4) en extremos no reductores, dando como resultado productos de bajo peso molecular. Las exo-amilasas principales son las glucogénicas y las maltogénicas. La glucoamilasa glucogénica produce glucosa, mientras que las β -amilasas maltogénicas de producen maltosa (Guzman-Maldonado *et al.*, 1995).

Otro grupo de enzimas son las amilasas α -(1-6) o amilasas desramificantes. Éstas hidrolizan los enlaces de ramificación en la amilopectina. La pululanasa y la isoamilasa son ejemplos de este tipo de amilasas (Guzman-Maldonado *et al.*, 1995).

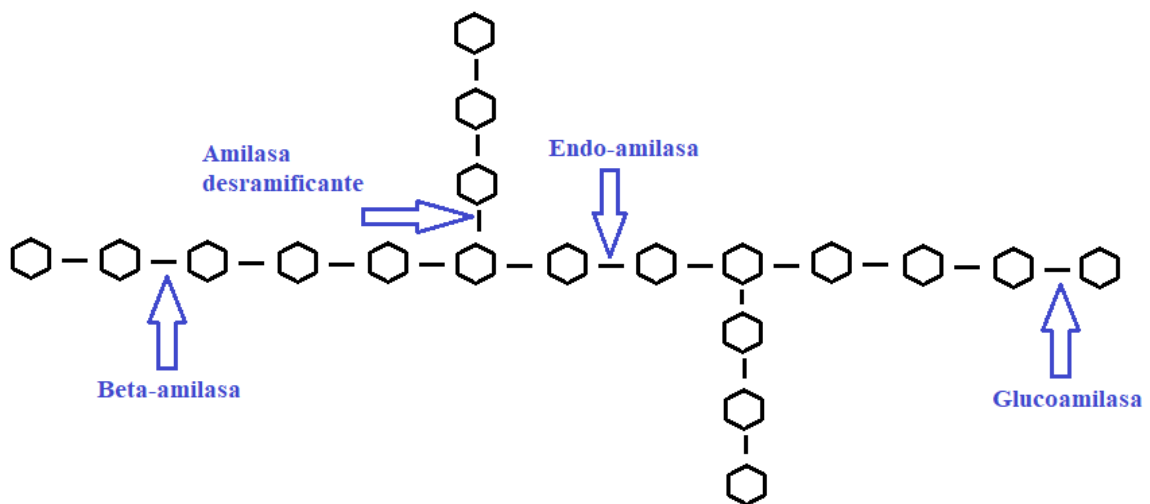


Figura 3. Acción de las principales enzimas amilolíticas.

El cuarto tipo de amilasas son las ciclodextrin glicosiltransferasas, enzimas capaces de hidrolizar el almidón a una serie de maltooligosacáridos no reductores, las ciclodextrinas (Guzman-Maldonado *et al.*, 1995). La Figura 3 muestra un resumen del modo de acción de las principales enzimas amilolíticas sobre el almidón.

1.4 El Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* recibió su nombre en 1729 por Micheli debido a que la visualización al microscopio del conidióforo le recordó al instrumento utilizado para esparcir agua bendita (Figura 3). Los hongos del género *Aspergillus* son saprófitos del suelo de distribución global, cuyas especies están, en su mayoría, adaptadas para la degradación de polímeros vegetales complejos (Bennett, 2010); (Amaiike & Keller, 2011). Se utilizan

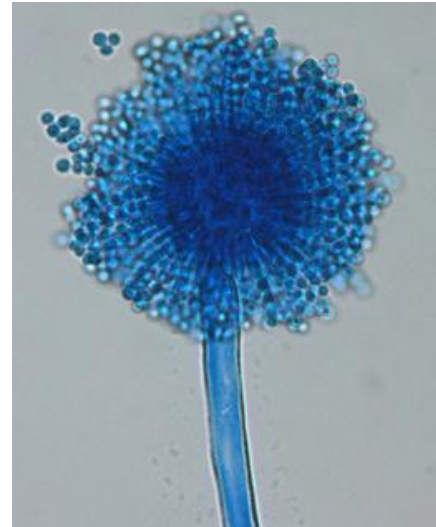


Figura 4. Conidióforo de *Aspergillus flavus* (The University of Adelaide, 2016).

ampliamente en la industria para la producción de enzimas (ej. amilasas), metabolitos (ej. ácido cítrico) y alimentos (ej. salsa de soya). Algunas especies contaminan granos y secretan toxinas que pueden afectar a individuos inmunocomprometidos.

1.4.1 Crecimiento y Alimentación

Las esporas de *Aspergillus* son fácilmente transportadas por corrientes de aire, hasta que encuentran superficies sólidas o líquidas con las condiciones necesarias para su germinación. Su estrategia nutricional es muy distintiva, siendo capaces de secretar ácidos y enzimas que les permiten digerir las moléculas poliméricas complejas hasta monómeros que pueden ser aprovechados por la célula heterotrófica (Bennett, 2010). A diferencia de los animales pluricelulares, primero digieren los alimentos para después consumirlos.

Tabla 2. Taxonomía del género *Aspergillus*.

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>

Fuente: (Sistema de Información de Biodiversidad, 2016; de Vries *et al.*, 2017).

Aspergillus, a la par de otros microorganismos, reciclan polímeros complejos que otros microorganismos no son capaces de aprovechar (Bennett, 2010), como la celulosa, hemicelulosa, almidón, pectina y grasas, entre otros. Estos organismos también colonizan alimentos que son destinados al consumo humano o de animales domésticos y puede ocurrir antes de la cosecha,

durante el almacenamiento o después del procesamiento industrial. Existe evidencia de que pueden proliferar en

alimentos con actividad de agua muy baja (*A. glaucus*) como alimentos deshidratados, mermeladas y nueces, entre otros (Bennett, 2010).

1.4.2 Taxonomía

La principal característica del género *Aspergillus* es su conidióforo. Aquellos hongos que lo presentan son colocadas en este género (Tabla 2). Esta estructura de forma redonda o elíptica contiene en su extremo una capa de células llamadas fiálides que producen conidiosporas, las esporas asexuales (Bennett, 2010). El color de las esporas es importante para la identificación de especies.

Otra estructura morfológica útil en la identificación son los cleistotecios. Son estructuras redondas que pueden ser muy abundantes en los cultivos (Bennett, 2010). Los cleistotecios son el estado de reproducción sexual del hongo que contienen las ascosporas meióticas.

En 1854, deBary descubrió que el micelio de *Aspergillus* podía producir conidiosporas al igual que ascosporas. A partir de entonces los hongos han sido nombrados de diferentes

maneras, dependiendo si se encuentran en su forma sexual o asexual (Bennett, 2010). De este modo, *Aspergillus nidulans* también es llamado *Emericella nidulans*.

1.5 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus (sección Flavi) fue descrito como un hongo imperfecto con reproducción asexual y formación de sclerotia (Link, 1809). Recientemente, se ha reportado su forma sexual (ascosporas), por lo que se ha clasificado como *Petromyces flavus* (Amaike & Keller, 2011). Este organismo se caracteriza por colonias amarillo-verdosas de rápido crecimiento a 25 °C en agar Czapek Dox (Klich,



Figura 5. Colonia de *Aspergillus flavus* creciendo en maíz blanco triturado.

2007). La Figura 4 muestra una colonia de *Aspergillus flavus* creciendo en maíz blanco triturado.

Aspergillus flavus se encuentra en regiones templadas del mundo así como en regiones subtropicales. Es un saprófito del suelo que puede crecer en una gran variedad de sustratos (Bhatnagar, Ehrlich & Moore, 2014). Desde el punto de vista agronómico, es un patógeno de plantas que afecta varios cultivos de importancia agrícola (como el maíz, el cacahuate y el algodón) pre- y post-cosecha. También, causa enfermedades en humanos y animales, ya sea por consumo de alimentos contaminados (causando aflatoxicosis) o por crecimiento invasivo (aspergillosis); (Amaike & Keller, 2011). Estos padecimientos pueden ser mortales para individuos inmunocomprometidos. Además, este microorganismo puede producir aflatoxinas, metabolitos secundarios altamente mutagénicos y carcinogénicos. La Tabla 3 muestra las características del crecimiento de *A. flavus* de acuerdo a la temperatura, el pH y actividad de agua.

Por su naturaleza saprofítica, tiene la capacidad de producir un amplio conjunto de enzimas que actúan en la degradación de sustratos complejos, como proteasas, poligalacturonasas y amilasas, entre otras (Mellon, Cotty & Dowd, 2007). Comparando la utilización de sustrato de *A. flavus* contra patógenos obligados, se ha encontrado que tiene una mayor capacidad de crecimiento en sustratos complejos de proteínas (elastina y mucina) y carbohidratos (celulosa, pectina, xilano).

Recientemente, se ha secuenciado el genoma de *A. flavus* (de tamaño similar al de *A. oryzae*, con 26.8 Mb) encontrando evidencia de proteasas, poligalacturonasas, cutinasas, lipasas, amilasas, entre otras. De Vries y colaboradores (2017) reportan hasta 25 genes relacionados a la degradación del almidón.

Debido a la potencia de las aflatoxinas como carcinógenos, se han buscado estrategias para evitar la contaminación de cultivos por *A. flavus*. La estrategia actual para combatir la contaminación por aflatoxinas en cultivos de algodón es la introducción de un aislado no-aflatoxigénico en el suelo para desplazar los organismos aflatoxigénicos (Bhatnagar *et al.*, 2014). El uso de cepas de *A. flavus* no toxigénicas ha logrado disminuir hasta en un 90% la contaminación, ya que no se ha encontrado una correlación entre la habilidad de producir toxinas con la habilidad de colonizar e infectar algodón.

Tabla 3. Características de crecimiento de *Aspergillus flavus*

Condición	Rango		
	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	10-12	33	43-48
pH	2.1	7.5	11.2
a _w	0.78-0.84	0.95-0.99	/

Fuente: (ANSES, 2012).

1.6 Regulación de las Enzimas Hidrolíticas en *Aspergillus*

Así como muchos otros microorganismos, *Aspergillus* ajusta su metabolismo según las condiciones del medio (Ruitjer & Visser, 1997). Se considera una adaptación a su estilo de vida saprófito (Scazzocchio *et al.*, 1995). Aunque el mecanismo entre microorganismos puede ser diferente, el fenómeno general es el mismo: la utilización de fuentes de carbono alternativas está disminuida cuando existe en el medio una fuente de carbono energéticamente más favorable, como la glucosa.

Los sistemas enzimáticos que se encuentran regulados se pueden clasificar en tres grandes grupos: enzimas encargadas del catabolismo de fuentes de carbono alternativas (principalmente las encargadas de la degradación de polisacáridos), enzimas del ciclo del glioxilato y de la gluconeogénesis y los relacionados con el metabolismo secundario (como el de la penicilina); (Ruitjer & Visser, 1997).

A nivel transcripcional, se reconoce a la proteína CreA como una proteína represora genuina (Dowzer & Kelly, 1991). Esta proteína de 416 aminoácidos contiene dos dominios de unión a ADN tipo dedos de Zinc. Las mutaciones que alteran los dominios de unión a ADN provocan la disminución de la represión; sin embargo, las mutantes nulas son letales (Ruitjer & Visser, 1997; Scazzocchio *et al.*, 1995). La proteína CreA tiene como mecanismo de acción la unión al promotor de los sistemas que regula, evitando así la transcripción de los genes diana. En condiciones de represión (alta concentración de glucosa), CreA se encuentra unido fuertemente al promotor. A medida que la glucosa es consumida, CreA pierde especificidad por la secuencia del promotor y da cabida a la entrada de proteínas activadoras (Ruitjer & Visser, 1997).

Creciendo en alta concentración de azúcares represores incrementa la transcripción de *creA*, hasta llegar a una concentración de CreA tal que se autoregula (Strauss *et al.*, 1999). Se ha reportado que la concentración de CreA en el núcleo no es clave en la represión (Roy, Lockington & Kelly, 2008; Chulkin, Vavilova & Benevolenskij, 2010) y es independiente de la concentración de glucosa. Esto sugiere que CreA existe en una forma activa y una inactiva, aunque no se conoce con certeza qué tipo de modificación sufre.

El mecanismo general explica que en altas concentraciones de fuente de carbono, la proteína represora CreA se encuentra activa permitiendo la utilización de la fuente de carbono energéticamente más favorable. A medida que la fuente de carbono es consumida, se alcanza un estado de transición en el que la función de CreA se ve disminuida. Al liberar los promotores de la represión, la expresión aumenta. La presencia de inductores de las enzimas hidrolíticas tiene un efecto marcado en la síntesis de las hidrolasas.

Existe evidencia de que una cepa de *Aspergillus nidulans* con el gen *crea* deletado es capaz de consumir glucosa y xilosa al mismo tiempo, mientras que la cepa silvestre consume xilosa solamente después de depletar la glucosa (Prathumpa *et al.*, 2004). Además, en *A. flavus*, un medio con almidón y alta concentración de glucosa, sacarosa o maltosa reprimieron la síntesis de enzimas amilolíticas (a diferencia de una cepa con *crea* deletado, que sí expresó amilasas); (Fasoyin *et al.*, 2018).

1.6.1 Regulación de las Amilasas en *Aspergillus*

El activador transcripcional encargado de la regulación de genes amilolíticos fue descrito por primera vez en 1999 por Petersen, Lehmbeck y Christensen en estudios realizados con *Aspergillus oryzae*. Esta proteína de 604 aminoácidos, AmyR, contiene dominios de unión a ADN tipo Zinc (II)₂ Cys₆ (Petersen *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2006). La secuencia

reconocida por este activador se encuentra en el promotor de los genes relacionados al catabolismo del almidón, con una secuencia consenso CGG-N₈-CGG (Petersen *et al.*, 1999). Se ha reportado que el regulador global VeA, a la par del regulador LaeA, son importantes en la producción de una glucoamilasa en *Aspergillus flavus* (Duran *et al.*, 2014), aunque su principal función es la regulación del desarrollo (producción de esclerocios y cleistotecios) y la síntesis de metabolitos secundarios, como las aflatoxinas (Amaiike & Keller, 2009). Sin embargo, estos reguladores no responden a la concentración de fuente de carbono o a la presencia de inductores.

En condiciones de represión, una pequeña cantidad de AmyR se acumula en el núcleo y solo es capaz de activar sus genes diana cuando la concentración de glucosa decae y CreA se disocia del ADN (Murakoshi, Makita, Kato & Kobayashi, 2012). Makita *et al.* (2009) proponen que los inductores provocan ya sea un cambio conformacional o una liberación del dominio de unión a ADN que permite la activación. A través de experimentos con proteínas de fusión GFP:AmyR, se encontró que la isomaltosa, maltosa y análogos no metabolizables de glucosa (desoxyglucosas) provocaban la localización nuclear de AmyR (Murakoshi *et al.*, 2012). Además, en los *Aspergillus nidulans* (Murakoshi *et al.*, 2012), *oryzae* (Carlsen & Nielsen, 2001) y *niger* (vanKuyk, Benen, Wösten, Visser & de Vries, 2012), se ha reportado que la glucosa parece tener un efecto inductor sobre las enzimas amilolíticas.

1.7 Cultivo Microbiano

Una célula microbiana, vegetal o animal, es en esencia un reactor bioquímico con un gran número de reacciones enzimáticas ocurriendo. Los cultivos pueden ser operados, como en el caso de las reacciones químicas, en tres modos operacionales clásicos: cultivo por lotes,

cultivo continuo y cultivo de lote alimentado (Fed-Batch); (Lim & Shin, 2013). En los últimos 30 años, ha aumentado el uso del cultivo alimentado en las industrias de la fermentación, biotecnológicas, químicas y de tratamiento de desechos, gracias a la alta demanda de los productos de fermentaciones y a las ventajas que confiere este tipo de operación.

1.7.1 Cultivo en lote

El cultivo en lote o “batch” es un modo de operación en el que no existe adición ni retiro de biomasa, medio nutritivo fresco o cualquier otro componente (con la excepción de la fase gaseosa); (Cinar, Parulekar & Undey, 2003). Todos los componentes necesarios del medio son adicionados al principio de la fermentación (Lim & Shin, 2013). La operación por lote se inicia con la adición de una pequeña cantidad del cultivo celular, es decir, el inóculo. Típicamente, ciertas condiciones no son controladas, como el pH o el oxígeno disuelto (Cinar *et al.*, 2003).

Este cultivo se caracteriza por tener una fase lag o de retardo, en la cual las células se ajustan a las condiciones del medio y aceleran la producción de enzimas necesarias para utilizar los nutrientes del medio de cultivo. La composición química del medio, así como la edad, concentración, viabilidad y morfología del cultivo, determinan el tiempo que durará la fase lag (Cinar *et al.*, 2003). Una vez que las células se han adaptado al medio de cultivo se entra en la fase de aceleración o exponencial. La división celular ocurre hasta que se alcanza la tasa máxima de crecimiento (Waites, Morgan, Rockey & Highton, 2001).

Es en la fase de crecimiento donde comienza la síntesis de metabolitos de interés (como ácidos orgánicos o enzimas de interés industrial), siendo máxima en la fase de estacionaria

caracterizada por la completa ausencia de alguno de los nutrientes necesarios para el crecimiento (Cinar *et al.*, 2003).

1.7.2 Cultivo Continuo

En la operación continua, una o más corrientes son alimentadas con los nutrientes necesarios de manera continua, a la vez que los productos, biomasa y agentes residuales son removidos hasta alcanzar el estado estacionario (Lim & Shin, 2013). Este tipo de operación permite mantener a las células en fase exponencial durante un periodo más prolongado (Waites *et al.*, 2001).

Si el medio de cultivo fresco entra a velocidad constante, las células del medio se adaptarán a esa tasa y se duplicarán de tal manera que la concentración celular se mantenga constante (Waites *et al.*, 2001). Con la excepción de cierto tipo de producción de cerveza y tratamiento de desechos, los reactores continuos no han sido tan utilizados en la industria, en parte debido a la dificultad en mantener estéril el medio y porque en general se han obtenido rendimientos pobres en comparación con las otras dos operaciones (Lim & Shin, 2013).

1.7.3 Cultivo Alimentado

El alimentado es una modificación del cultivo en lote en el que los nutrientes son adicionados intermitentemente al cultivo en lote. Fue desarrollado cultivando levadura en malta, donde se notó que una concentración alta de malta favorecía el crecimiento excesivo de la levadura y, por tanto, propiciaba la conversión anaerobia de malta a etanol (Okafor, 2007; Lim & Shin, 2013).

El cultivo es cosechado al final del proceso, ya sea total o parcialmente (en caso de que se utilice como inóculo para operaciones posteriores). Las fuentes de carbono, nitrógeno, fosfatos, precursores o inductores son alimentadas al cultivo, lo que implica un aumento progresivo del volumen hasta el máximo. Una vez llegado al volumen máximo la operación continúa como un cultivo en lote convencional (Lim & Shin, 2013). Al poder manipular la alimentación de nutrientes limitantes, se puede mantener constante la concentración o dejarla seguir un perfil óptimo conocido para obtener los rendimientos maximizados (lo que confiere una ventaja importante sobre los otros procesos).

El balance de materia típico para un reactor alimentado es el siguiente (Lim & Shin, 2013):

$$\textit{Entrada} + \textit{Generación} - \textit{Consumo} = \textit{Acumulación}$$

El balance general de un sistema acuoso se simplifica a que el cambio de volumen V es igual a la velocidad de alimentación F :

$$F = \frac{dV}{dt}$$

El balance para un componente limitante j (sustrato) es:

$$FC_{jF} - r_sV = \frac{d(C_jV)}{dt}$$

Donde F es el flujo volumétrico, C_{jF} la concentración de j , r_s la tasa de consumo de j y V el volumen (Lim & Shin, 2013).

Algunos de los metabolitos mas importantes que fueron producidos por lote alimentado fue la penicilina. La fuente de carbono (glucosa) y el precursor (ácido fenil acético) eran

adicionados en concentraciones cada vez mayores para mejorar la producción de penicilina (Lim & Shin, 2013).

Una de las aplicaciones importantes del cultivo alimentado es la producción de enzimas hidrolíticas. Una gran cantidad de hidrolasas de hongos están reguladas por represión catabólica, por lo que los cultivos en lote convencionales no permiten obtener buenos rendimientos. El uso del cultivo alimentado puede ser utilizado para mantener una baja concentración de fuente de carbono en el medio, evitando así la represión. La célula adecua su metabolismo para aprovechar al máximo los nutrientes, obteniendo mejores rendimiento de enzima contra la fuente de carbono consumida.

Se ha reportado que el cultivo alimentado permite controlar la represión catabólica de hongos filamentosos. Con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* se logró optimizar la producción de celulasas (Szabó, Johansson & Göran, 1996). En un cultivo alimentado por pulsos (Bhargava, Wenger & Marten, 2003) se logró aumentar en un 75% la productividad de una glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. En una cepa de *A. niger* con una sola copia del gen de la glucoamilasa se obtuvieron hasta 6.5 g/L de la enzima (Pedersen, Beyer & Nielsen, 2000). También, en *Aspergillus sp* la actividad pectinolítica se incrementa con el uso de cultivos alimentados (Aguilar & Huitrón, 1986). Otros productos que se han producido por fed-batch se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Productos obtenidos por técnicas de cultivo alimentado.

Producto	
Lisina	α -amilasa
Triptófano	β -amilasa
Cefalosporina C	Acetona
Estreptomicina	Glicerol
Tetraciclina	Riboflavina
Celulasa	Ácido acético
Proteasa	Ácido cítrico

Fuente: Tabla modificada (Lim & Shin, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

En la naturaleza, los microorganismos están en su mayoría expuestos a condiciones de limitación de nutrientes donde la fuente de carbono es el principal sustrato limitante para la proliferación microbiana. Muchos hongos saprófitos son capaces de secretar enzimas que pueden hidrolizar las fuentes de carbono complejas encontradas en los nichos ecológicos, para poder desarrollarse. Los azúcares sencillos son liberados poco a poco y consumidos por el microorganismo. En los cultivos en lote tradicionales no es posible simular estos microambientes, ya que los azúcares simples se encuentran en abundancia, desencadenando represión catabólica. El uso de cultivo alimentado es una alternativa al cultivo en lote que permite controlar la concentración de azúcares, evitando la alta concentración de sustrato.

Los hongos del género *Aspergillus* son productores de amilasas, enzimas que están reguladas a nivel transcripcional, de manera negativa por represión catabólica y de manera positiva por la presencia de inductores. Se conoce que la concentración de azúcares simples es clave en la represión catabólica, pudiendo evitarse con baja concentración de azúcares. Además, en *Aspergillus nidulans*, *oryzae* y *niger*, se ha reportado que la glucosa tiene un efecto inductor sobre las enzimas amilolíticas.

Aspergillus flavus es un hongo saprófito capaz de colonizar el maíz, gracias a las enzimas amilolíticas que le permiten utilizar el almidón contenido en el grano para obtener energía. Es un organismo de importancia sanitaria, debido a que produce los carcinogénicos naturales más potentes, las aflatoxinas. Es por ello que es importante conocer sobre los mecanismos que le permiten colonizar el grano de maíz. En el grano, existe una baja concentración de azúcares fácilmente asimilables y los inductores de las amilasas, lo que estimula su producción. Teniendo como objetivo el simular la condición de limitación de

nutrientes, el cultivo alimentado es una alternativa apropiada que permite evaluar el efecto que tiene la limitación de fuente de carbono sobre la actividad amilolítica. Además, es posible elucidar el papel que juega la glucosa en la regulación de las amilasas de *Aspergillus flavus*, comparado con lo que se conoce en otras especies de *Aspergillus*.

3. HIPÓTESIS

Las enzimas hidrolíticas de *Aspergillus* están controladas por represión catabólica. Si las amilasas de *Aspergillus flavus* están reguladas de la misma manera, entonces la condición de limitación de fuente de carbono aumentará la síntesis de dichas enzimas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de la limitación de fuente de carbono en la producción de enzimas amilolíticas de *Aspergillus flavus* en cultivo alimentado.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el crecimiento en medio sólido de *A. flavus* NRRL 6541 y CECT 2687 en sustratos complejos y simples.
- Determinar las condiciones de pH y fuente de nitrógeno para la producción de amilasas de *A. flavus* NRRL 6541 y CECT 2687 a nivel matraz.
- Analizar el perfil amilolítico de *A. flavus* NRRL 6541 y CECT en diferentes concentraciones de glucosa y xilosa.
- Realizar experimentos en reactor de 4 L para cultivos en lote y alimentados con glucosa y xilosa como fuentes de carbono.
- Evaluar el efecto de la limitación de glucosa y xilosa sobre la actividad amilolítica en cultivo alimentado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismos

Se utilizaron dos cepas de *Aspergillus flavus* disponibles en el Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos, la cepa no toxigénica 6541 proveniente de la Northern Regional Research Lab (NRRL) y la cepa toxigénica 2687 proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Se mantuvieron en cajas de Petri con medio Dextrosa-Sabouraud a 4 °C y fueron resembradas continuamente.

5.2 Sustratos

Para los diferentes experimentos en placa, matraz y biorreactor, se utilizaron como fuente de carbono glucosa, xilosa, sacarosa, almidón y maíz blanco triturado.

5.3 Obtención de Inóculo

5.3.1 Suspensión de Esporas

Se sembraron los microorganismos en condiciones estériles en cajas de Petri con agar Sabouraud. Se agregó 10 mL de solución salina Tween a la caja Petri. Se raspó suavemente homogeneizando la solución sobre la placa. La solución de la caja se recuperó en tubos de 10 mL que se centrifugaron 5 min a 4,500 rpm (Centrífuga Z 326 K, Hermle, Alemania). Se desechó el sobrenadante para resuspender las esporas en 10 mL de solución salina. Se repitió la centrifugación y resuspensión hasta obtener un sobrenadante transparente. Al finalizar se suspendieron los conidios en 10 mL de solución salina, agitando con el vórtex para homogeneizar.

Para la determinación de la concentración de esporas se diluyó la suspensión original, se tomaron 10 µL y se colocaron en la cámara de Neubauer. Se observó con el objetivo de 40x, obteniendo el promedio de esporas de dos cuadrantes.

$$\frac{\text{conidios}}{\text{mL}} = (\# \text{ de conidios})(4 \text{ cuadrantes})(2500)(\text{Factor de dilución})$$

La concentración final de esporas en el medio de cultivo se ajustó por dilución a 1×10^6 esporas/mL.

5.3.2 Micelio

Se inocularon esporas a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL en un medio con 2% de fructosa y 0.3% de extracto de levadura en medio basal (0.2% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 y 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) en matraces de 500 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL. Se cultivó a 37 °C y 300 rpm durante 20 horas. Se recuperó el micelio utilizando papel filtro estéril y se lavó el micelio con abundante solución salina estéril para eliminar el medio de cultivo. El micelio recuperado se suspendió en poco volumen con solución salina y se estimó su peso seco utilizando papel filtro (Millipore, USA). Se ajustó la concentración final de biomasa en el medio a 0.3 g/L.

5.4 Cultivo en Medio Sólido

Aspergillus flavus NRRL 6541 y CECT 2687 se crecieron en medio basal (0.2% K_2HPO_4 , 0.2% KH_2PO_4 y 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) con 1.5% de agar bacteriológico y 1% de fuente de carbono, ajustado a pH 7. Las fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa, sacarosa, almidón y maíz triturado. Se inoculó cada caja con 100,000 esporas en el centro y se incubó a 37 °C, por 72 horas, tomando medida del radio de crecimiento de la colonia cada 24 horas.

5.5 Cultivo en Medio Líquido

5.5.1 Nivel Matraz

Para los cultivos en matraz de las cepas *Aspergillus flavus* NRRL 6541 y CECT 2687 se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo. El medio consistió de 0.2% K_2HPO_4 y 0.2% KH_2PO_4 ajustado a pH 5 u 8. Para el cultivo a pH 8, la fuente de nitrógeno fue esterilizada de manera independiente y adicionada al momento de inocular los matraces, para evitar pérdida de amonio por volatilización. Los matraces se esterilizaron a 121 °C y 15 psi durante 15 min. Se inocularon los matraces a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL o 0.3 g/L de micelio seco, a 37 °C, con agitación de 300 rpm, en una incubadora Innove 4000 (New Brunswick Scientific, USA) durante 72 horas.

Para los experimentos del efecto del pH sobre la actividad amilolítica se utilizó 0.5% de $(NH_4)_2SO_4$, 1% de fuente de carbono (glucosa, sacarosa, almidón y maiz) y pH de 5 u 8 con esporas como inóculo. Para los experimentos del efecto de la fuente de nitrógeno (Sulfato de amonio y nitrato de sodio), se utilizó 1% de fuente de carbono (glucosa y almidón) y 37.8 mM de nitrógeno ajustado a pH 8 con esporas como inóculo. En los experimentos de diferentes concentraciones de sustrato, se utilizó 0.5% de $(NH_4)_2SO_4$ con tres concentraciones de fuente de carbono (0.5%, 1% y 2%). Se utilizó como fuente de carbono glucosa y xilosa ajustado a pH 8 con micelio como inóculo a una concentración final de 0.3 g/L (base seca)..

5.5.2 Biorreactor de 1 L

Aspergillus Flavus NRRL 6541 y CECT 2687 fueron cultivados en un biorreactor de 1 L FP-1L (Figura 6). El medio de cultivo consistió en medio basal más la fuente de carbono.

El pH inicial fue ajustado a 8 como se indicó anteriormente. Las condiciones de cultivo fueron 37 °C y 1 vvm de aireación (1 L de aire por 1 L de medio por minuto). La agitación empleada fue de 300 y 400 rpm. El medio de cultivo y el biorreactor se esterilizaron de manera independiente y se inoculó a una concentración final de esporas de 1×10^6 esporas/mL. Se adicionó antiespumante 1-10 cuando fue necesario.

5.5.3 Biorreactor de 4 L

Aspergillus Flavus NRRL 6541 y CECT 2687 fueron cultivados en un reactor de 4 L BioFlo III Fermentor, (New Brunswick Scientific, USA); (Figura 7). El medio de cultivo consistió en medio basal más la fuente de carbono. El pH inicial fue ajustado a 8 como se indicó anteriormente (Apartado 5.5.1). Las condiciones de cultivo fueron 37 °C, 1 vvm de aireación y 400 rpm de agitación. El inóculo fue esporas a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL o micelio a una concentración final de 0.3 g/L (base seca). En los cultivos alimentados, se utilizó una bomba peristáltica Masterflex C/L (Cole Parmer, USA) con un flujo estimado de alimentación de 14-16 mL/h.

5.6 Métodos Analíticos

5.6.1 Determinación de Azúcares Reductores

La determinación de azúcares reductores se llevó a cabo por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS); (Miller, 1959). A tubos con 0.45 mL de agua destilada se les



Figura 6. Biorreactor FP-1L.



Figura 7. Biorreactor BioFlo III

agregó 0.05 mL de filtrado. Después se agregó 0.5 mL de DNS. Los tubos se colocaron en baño maría a ebullición durante 5 min. El tubo se enfrió añadiendo 2.5 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia a 575 nm. La concentración de azúcares se calculó con una curva de calibración de glucosa o xilosa.

5.6.2 Determinación de Proteína Extracelular

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se preparó una solución stock de seroalbúmina bovina 0.1 mg/mL para la curva estándar. Las diluciones de la curva estándar se hicieron directamente en la microplaca. Las muestras se diluyeron apropiadamente a 100 μ L para que la lectura se encontrara dentro de la curva. Se agregaron 200 μ L del reactivo de Bradford y se dejó reaccionar por 5 minutos a partir del último pozo y se leyó a 595 nm.

5.7 Ensayos de Actividad Enzimática

5.7.1 Amilolítica

La actividad amilolítica se determinó por hidrólisis del almidón, utilizando lugol para observar las diferencias. A tubos de ensayo se les agregó 1 mL de solución de almidón 1% (con solución amortiguadora de acetatos 100 mM pH 5), 0.1 mL de filtrado enzimático y se incubó a 40 °C por media hora. Se detuvo la reacción con 0.1 mL de HCl 1 M. Se transfirieron 0.05 mL de estos tubos a otros con 1.2 mL de Lugol de trabajo (0.06% KI/0.006% I₂). Se determinó la absorbancia a 620 nm. Se calculó la concentración de almidón con ayuda de una curva de calibración de almidón. Una unidad U de actividad amilolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de un mg de almidón hidrolizado a 40 °C, en 30 minutos.

5.7.2 Xilanólítica

La actividad xilanólítica se determinó por la cuantificación de los azúcares reductores liberados por el xilano por el método de DNS usando una curva de xilosa como patrón, obtenidos después de la incubación de 0.25 mL de xilano de abedul al 1% + 0.2 mL de buffer de acetatos 100 mM pH 5 y 0.05 mL de filtrado enzimático, a 50 °C, durante 20 min. Al término del tiempo, se le adicionó 0.5 mL de DNS y se calentó la mezcla a ebullición por 5 min; luego se le añadieron 2.5 mL de agua destilada y se leyó a 575 nm. Una unidad U de actividad xilanólítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 mmol de xilosa a 50 °C, en 20 minutos.

5.8 Cinética

5.8.1 Crecimiento

La tasa de crecimiento celular (μ) se calculó por el método clásico (Monod, 1949), en el que X es la concentración de biomasa y t es el tiempo en la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Por separación de variables y delimitando su integración:

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \mu \int_0^t dt$$

$$\ln X = \mu t + \ln X_0$$

La ecuación resultante es análoga a la ecuación de una recta en el gráfico Ln X vs t, permitiendo encontrar la velocidad específica μ como la pendiente de la recta resultante.

5.8.2 Consumo de Sustrato

La velocidad de consumo de sustrato (ε) se encontró haciendo una analogía de la constante de velocidad de primer orden de las reacciones químicas, donde la velocidad de la reacción depende de una constante multiplicada por la concentración del sustrato:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \varepsilon [S]$$

Por separación de variables y delimitando su integración:

$$\int_{[S]_0}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]} = -\varepsilon \int_0^t dt$$

$$\ln [S] = -\varepsilon t + \ln [S]_0$$

La ecuación resultante es análoga a la ecuación de una recta en el gráfico $\ln S$ vs t , permitiendo encontrar la velocidad ε como la pendiente de la recta resultante.

5.9 Técnicas Electroforéticas

Las muestras para geles de electroforesis fueron concentradas por liofilización. Las muestras dializadas se colocaron en la liofilizadora por 30 h a 130×10^{-3} mBar de presión y -50 °C de temperatura. Posteriormente, se resuspendieron en un volumen 100 veces menor al original.

5.9.1 SDS-PAGE

La separación electroforética de proteínas se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes. Se tomaron 5 μ L de muestra, a la cual se le adicionaron 5 μ L de buffer desnaturalizante (SDS 4%, glicerol 20%, 2- β -mercaptoetanol 10%, buffer Tris-HCl 125 mM a pH 6.8 y azul de bromofenol 0.005%). El gel separador se preparó al 8% de acrilamida y 0.2% de

almidón (para zimograma). La electroforesis se corrió a corriente constante de 100 mA por alrededor de una hora, a través de unidades verticales de 1 mm Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratorios, Inc.). Las bandas de proteínas fueron visualizadas con azul de coomasie, utilizando el marcador de peso molecular Broad Range 6.5-210 kD (Bio-Rad Laboratorios, Inc.) para estimar el peso molecular de las bandas.

5.9.2 Zimograma de Actividad Amilolítica

Los geles provenientes de la cámara electroforética fueron incubados por 1 hora en buffer renaturalizante para eliminar el SDS y el β -mercapto-etanol. Pasada la hora se incubó nuevamente, ahora con buffer de acetatos 100 mM pH 5 por un lapso de media hora. Pasada la hora se enjuagó con agua destilada por 5 min con agitación. Luego, se sumergió en etanol al 96% durante 15 min con agitación constante para después enjuagar nuevamente con agua destilada por 15 min. Finalmente, se tiñó el gel con Lugol.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Preferencias Nutricionales

Los hongos del género *Aspergillus* están adaptados a proliferar sustentados por materia orgánica en descomposición, que contiene en su mayoría fuentes de carbono complejas (Amaike & Keller, 2011); (Bennett, 2010). Con el objetivo de determinar las preferencias nutricionales de las cepas de *Aspergillus flavus* NRRL 6541 y CECT 2687, se creció a cada microorganismo en placas con medio basal sólido con cuatro diferentes sustratos al 1%: dos azúcares sencillos (glucosa GLU y sacarosa SUC) y dos sustratos complejos (almidón ALM y maíz MAIZ). Estos sustratos fueron elegidos debido a que comparten la molécula que, finalmente, es capaz de entrar a la célula y ser aprovechada para obtención de energía: la glucosa. La glucosa es la fuente de carbono por excelencia y juega un papel importante en el metabolismo celular, además de ser el producto final de la hidrólisis del almidón (sustrato de las enzimas de estudio). El maíz es un sustrato complejo de importancia para los hongos, ya que no sólo contiene una alta cantidad de almidón, sino que también es blanco frecuente de infección por hongos del género *Aspergillus*, tales como *A. flavus*.

La figura 8 resume los resultados de los experimentos con los diferentes sustratos para ambas cepas. La Figura 8 A presenta el crecimiento radial de *A. flavus* NRRL 6541, donde se aprecia que la condición con maíz triturado es la que tiene un crecimiento mas abundante, seguida por la de almidón. Las imágenes de las placas al final del cultivo se muestran en la Figura 8 C, observándose también una clara preferencia por los carbohidratos complejos sobre los azúcares sencillos. De manera similar, para la cepa *A. flavus* CECT 2687 se observa que el crecimiento radial es mayor para las condiciones con sustratos complejos (Figuras 8 B y C).

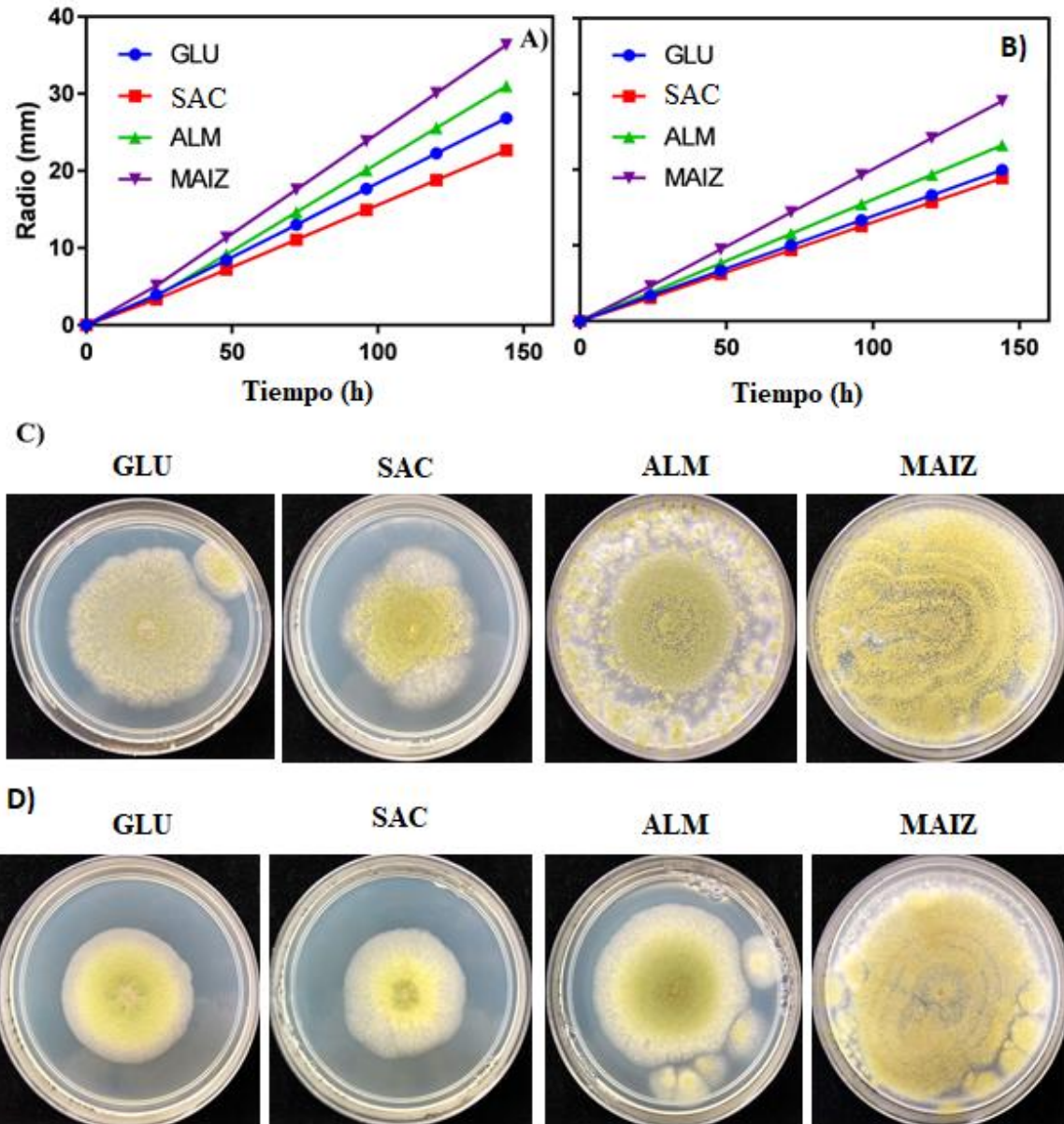


Figura 8. Crecimiento en medio sólido con cuatro fuentes de carbono (Glucosa, Sacarosa, Almidón y Maíz). A) y C) muestran el crecimiento radial en mm e imágenes de las placas al tiempo final del cultivo (167 horas) para *Aspergillus flavus* NRRL 6541, respectivamente. B) y D) muestran el crecimiento radial en mm e imágenes de las placas al tiempo final del cultivo (167 horas) para *Aspergillus flavus* CECT 2687, respectivamente.

Estos resultados coinciden con lo reportado en trabajos anteriores del grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos de la Facultad de Química de la UNAM, un mejor crecimiento en sustratos complejos (Palomares R, 2007; Saldaña D, 2009). Se describió que una de las razones de este fenómeno es el porcentaje de germinación que se obtiene al crecer los

microorganismos en diferentes sustratos (Saldaña D, 2009). En general, el porcentaje de germinación de los conidios es mayor en sustratos complejos (como lo son el maíz, la pectina, el almidón) o cuando los carbohidratos simples son suplementados con extracto de levadura. De esta manera, se propuso una relación entre la germinación conidial y la biomasa producida.

Es importante destacar que existe una diferencia en el crecimiento de las cepas de *Aspergillus*. En promedio, la cepa NRRL 6541 tiene un radio 1.28 ± 0.067 veces mayor al de la cepa CECT 2687, registrado a las 144 horas de incubación (Figuras 10 A y B).

Estos resultados revelan que las dos cepas de *Aspergillus flavus* tienen una clara preferencia de los sustratos complejos sobre los carbohidratos sencillos. Los organismos saprófitos están adaptados a proliferar en materia orgánica que no es fácilmente asimilable para otros organismos, gracias al gran conjunto de enzimas hidrolíticas que poseen (Bennett, 2010). Esta ventaja evolutiva convierte a los granos amiláceos (como el maíz) un sustrato susceptible a la infección y colonización por hongos (Amaike & Keller, 2011; Mazzani, Borges, Luzón, Barrientos & Quijada, 1999; Robledo, Marín & Ramos, 2001).

6.2 Efecto del pH

Con el propósito de elegir el pH inicial indicado para los cultivos alimentados en biorreactor, se probaron dos condiciones, una ácida (pH inicial de 5) y una alcalina (pH inicial de 8) con cuatro fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, almidón y maíz). Se eligió pH 5 debido a que muchas de las enzimas de *Aspergillus* son producidas en condiciones ácidas (Ghosh, P. & Ghosh, U., 2017; Hemansi, Gupta, Kuhad & Saini, 2018; Wolf-Márquez, García-García, Aguilar-Osorio, Martínez-Trujillo, 2015). No obstante, se optó

por también experimentar con una condición ligeramente básica para evaluar su efecto, ya que se ha reportado producción de amilasas en estas condiciones (Alva, S. *et al.*, 2007). Estos experimentos se realizaron a nivel matraz, monitoreando la concentración de proteína extracelular y actividad amilolítica durante el curso de la fermentación.

Fue evidente que para todas las fuentes de carbono, la actividad amilolítica se ve favorecida en condiciones alcalinas (Figura 9). En presencia de glucosa y sacarosa (Figuras 9 A y B, respectivamente), la concentración inicial desencadena represión catabólica (Roy, Lockington & Kelly, 2008), por ello, los valores bajos de actividad (comparados con los sustratos complejos). En dos casos (*A. flavus* NRRL 6541 en glucosa a pH 8 y CECT 2687 en sacarosa a pH 8) los valores de actividad disminuyen a las 72 horas. Los valores de pH al final del cultivo son cercanos a 6, por lo que esto no debe ser la causa. Probablemente, podría deberse a la acción de proteasas. Medina, Haynes, Brexi & Wilson (2005) analizaron las proteínas secretadas de una cepa de *Aspergillus flavus*, donde encontraron que había presencia importante de proteasas, pero una vez pasados entre 10 y 14 días de cultivo. A los tres días, tiempo utilizado en nuestras fermentaciones, la cantidad de proteasas es menor. Esta disminución de la actividad ya se ha observado en trabajos anteriores de este grupo, aunque no se ha profundizado en su causa.

En los experimentos con maíz triturado y almidón (Figura 9 C y D, respectivamente), la actividad amilolítica debe ser mayor debido a que el microorganismo se encuentra en condiciones de inducción (Carlsen & Nielsen, 2001). Sin embargo, solamente en la condición alcalina se presenta un aumento significativo de la actividad amilolítica; a pH ácido los valores de actividad amilolítica fueron parecidos a condiciones de represión aun en presencia de almidón y maíz.

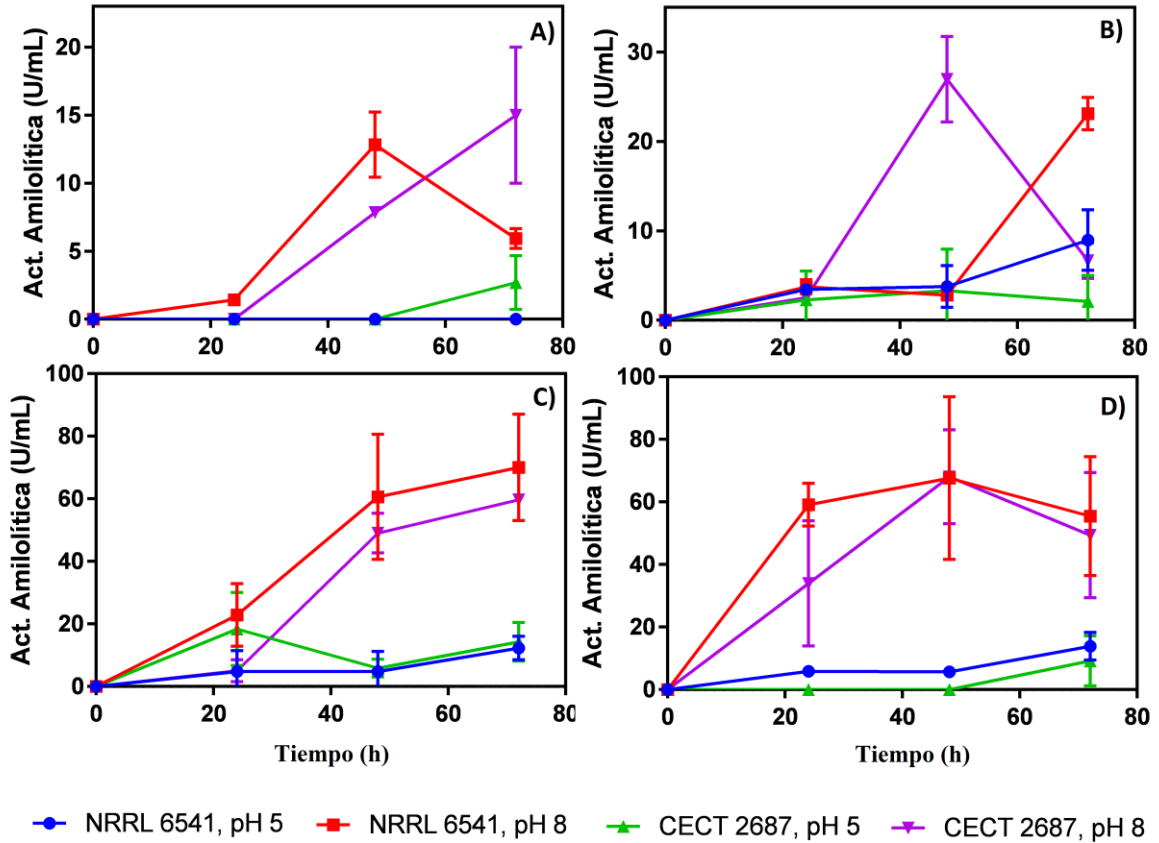


Figura 9. Efecto del pH sobre la actividad amilolítica de *Aspergillus flavus* creciendo en diferentes fuentes de carbono. Cultivo a 37 °C y 300 rpm en matraz con 100 mL de volumen a pH 5 y 8, inoculando esporas a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL. A) Glucosa. B) Sacarosa. C) Almidón. D) Maíz triturado.

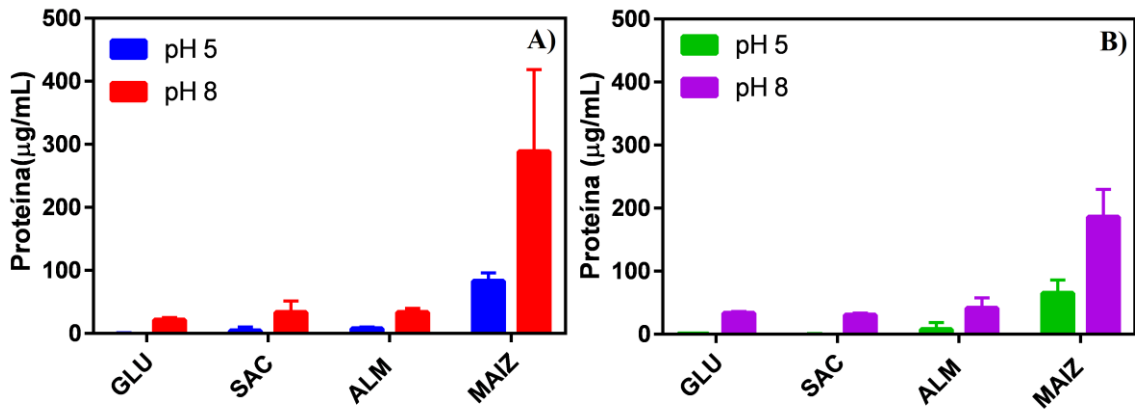


Figura 10. Efecto del pH sobre la concentración de proteína extracelular de *Aspergillus flavus* creciendo en diferentes fuentes de carbono. Cultivo con cuatro fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, almidón y maíz triturado) a 37 °C y 300 rpm en matraz con 100 mL de volumen a pH 5 y 8, inoculando esporas a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL. Concentración de proteína extracelular cuantificada a las 72 horas de cultivo. A) *A. flavus* NRRL 6541. B) *A. flavus* CECT 2687.

La diferencia en la actividad amilolítica para las condiciones de pH se puede correlacionar con la proteína que es secretada al medio en cada condición. La Figura 10 muestra la concentración de proteína extracelular al finalizar el cultivo. Para todas las fuentes de carbono, la concentración proteica es mayor a pH alcalino. El experimento con maíz muestra una gran cantidad de proteína extracelular, aunque no es posible discriminar entre la propia del maíz y la secretada por el microorganismo. No obstante, comparando ambos cultivos con maíz a los dos pH, es claro que la concentración proteica es mayor en condiciones alcalinas.

Es necesario considerar que en los cultivos con pH inicial de 5, el pH disminuye hasta valores de 2.93 ± 0.28 al final del cultivo para todas las fuentes de carbono, mientras que para la condición alcalina, el pH solo disminuye a 6.94 ± 0.27 para todas las fuentes de carbono. Esto podría haber afectado la estructura de las enzimas y por ende su actividad (Nelson & Cox, 2009). Alva *et al.* (2007) reportó que la producción de amilasas es nula en valores de pH menores a 5, lo que concuerda con lo observado en los experimentos a esta condición. Debido a que el pH no fue controlado, disminuyó a un valor tal que no favorece la producción.

Se ha reportado que el pH afecta la regulación de la expresión génica a través del factor de transcripción PacC en *Aspergillus* (Denison, 2000; Tilburn *et al.*, 1995). El producto génico de *pacC* controla la expresión de genes en condiciones alcalinas. Los resultados mostraron que a pH 5 la actividad amilolítica es muy baja, lo que podría significar que la producción de amilasas de *Aspergillus flavus* se ve afectada por PacC, aunque son necesarios más estudios para confirmar.

Para todas las fuentes de carbono a pH 8 fue evidente cierto nivel de actividad amilolítica. En almidón y maíz, consideradas fuentes inductoras para las amilasas, los niveles de actividad fueron los esperados. Sin embargo, las dos cepas de *A. flavus* fueron capaces de mostrar una baja actividad amilolítica incluso creciendo en glucosa y sacarosa, a pesar de encontrarse en alta concentración (1%). En altas concentraciones de azúcares, la represión catabólica evita la producción de muchas enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran las amilasas (Chulkin *et al.*, 2010; Ruijter & Visser, 1997; Scazzocchio, C. *et al.*, 1995). Estos resultados sugieren que las enzimas de estudio podrían ser constitutivas. Sin embargo, los cuatro sustratos tienen en común a la glucosa, que se ha reportado tiene un efecto positivo en la síntesis de amilasas en *A. oryzae* (Carlsen & Nielsen, 2001), por lo que es necesaria más información para aseverar que las enzimas son de expresión basal.

6.3 Efecto de la Fuente de Nitrógeno

Con la finalidad de elegir la fuente de nitrógeno que sería utilizada en los experimentos de limitación de nutrientes, se hicieron fermentaciones con dos fuentes de nitrógeno: sulfato de amonio y nitrato de sodio. Ambas fuentes de nitrógeno son ampliamente utilizadas en cultivos microbianos, con la diferencia de que el sulfato de amonio provee al medio con azufre (un nutriente), mientras que el sodio puede provocar estrés a la célula (Haro, Garcíadeblas & Rodríguez-Navarro, 1991). Los experimentos se realizaron a nivel matraz, manteniendo la concentración de nitrógeno equimolar para cada condición. Se utilizó medio basal con glucosa o almidón al 1% como fuentes de carbono a un pH inicial de 8.

Los resultados de la actividad amilolítica mostraron que ésta se ve favorecida al utilizar el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Figura 11). En condiciones represoras (glucosa como fuente de carbono); (Roy, Lockington & Kelly, 2008), la actividad fue

ligeramente mayor para las cepas NRRL 6541 y CECT 2687 en la condición con sulfato de amonio. Similar a lo observado anteriormente, con glucosa se tiene un máximo de actividad a las 48 horas, disminuyendo hacia las 72 horas de cultivo. Esto solo se apreció con la cepa NRRL 6541, que podría deberse a la actividad de proteasas, aunque no se ha investigado a fondo, como se mencionó en el apartado anterior.

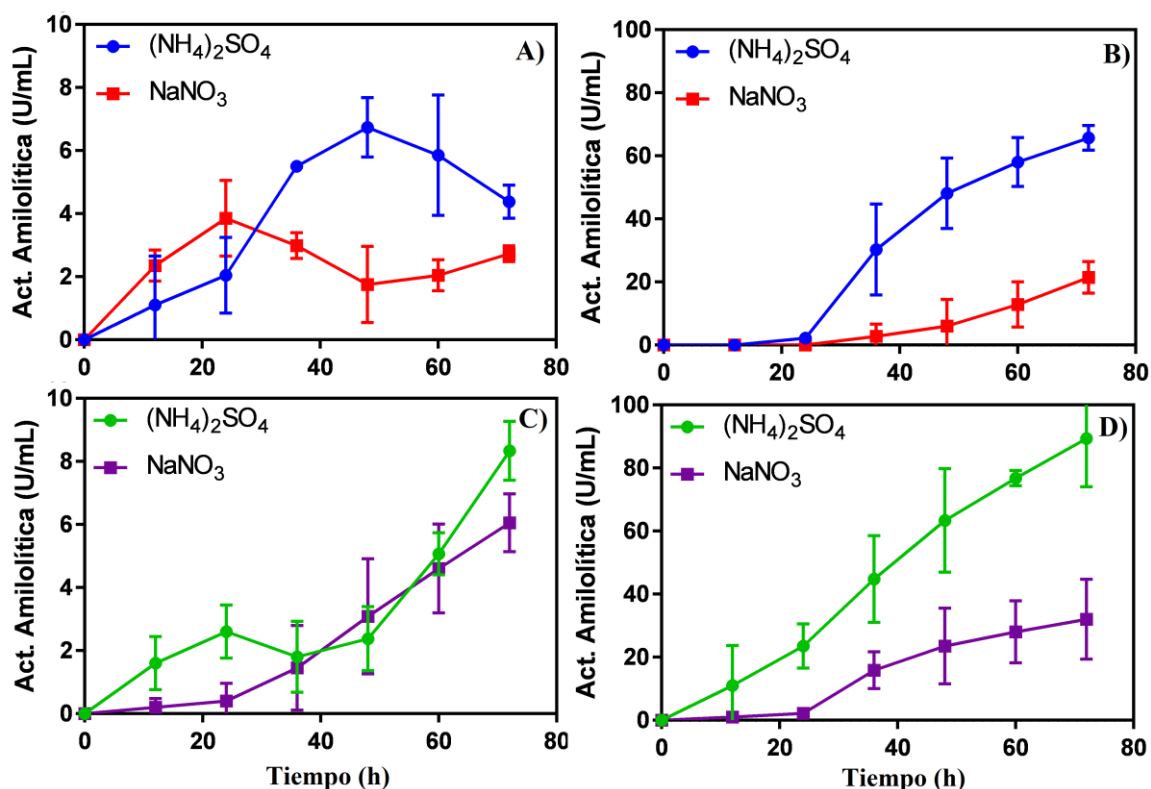


Figura 11. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad amilolítica de *Aspergillus flavus*. Cultivo a pH 8, 37 °C y 300 rpm en matraz con 100 mL de volumen, inoculando esporas a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL. A) *A. flavus* NRRL 6541 creciendo en glucosa. B) *A. flavus* NRRL 6541 creciendo en almidón. C) *A. flavus* CECT 2687 creciendo en glucosa. D) *A. flavus* CECT 2687 creciendo en almidón.

Tabla 5. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

	NRRL 6541		CECT 2687	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaNO_3
Glucosa	1.3	0.69	0.69	0.33
Almidón	2.1	0.55	2.8	1.2

Crecimiento obtenido por peso seco al final del cultivo, expresado en g/L.

El efecto sobre la actividad es más notorio en condiciones de inducción (almidón como fuente de carbono); (Carlsen & Nielsen, 2001), siendo la actividad amilolítica mayor en la condición con sulfato de amonio desde las 30 horas y manteniéndose hasta el final de la fermentación, donde la actividad es tres veces mayor a la condición con nitrato de sodio. El que la actividad amilolítica sea mayor para ambas cepas con sulfato de amonio puede deberse al hecho de que en estas condiciones, el crecimiento también fue mayor, aproximadamente el doble (Tabla 5). Aunado a esto, también se observó una mayor utilización de la fuente de carbono cuando había amonio como fuente de nitrógeno en el medio, como se observa en la figura 12.

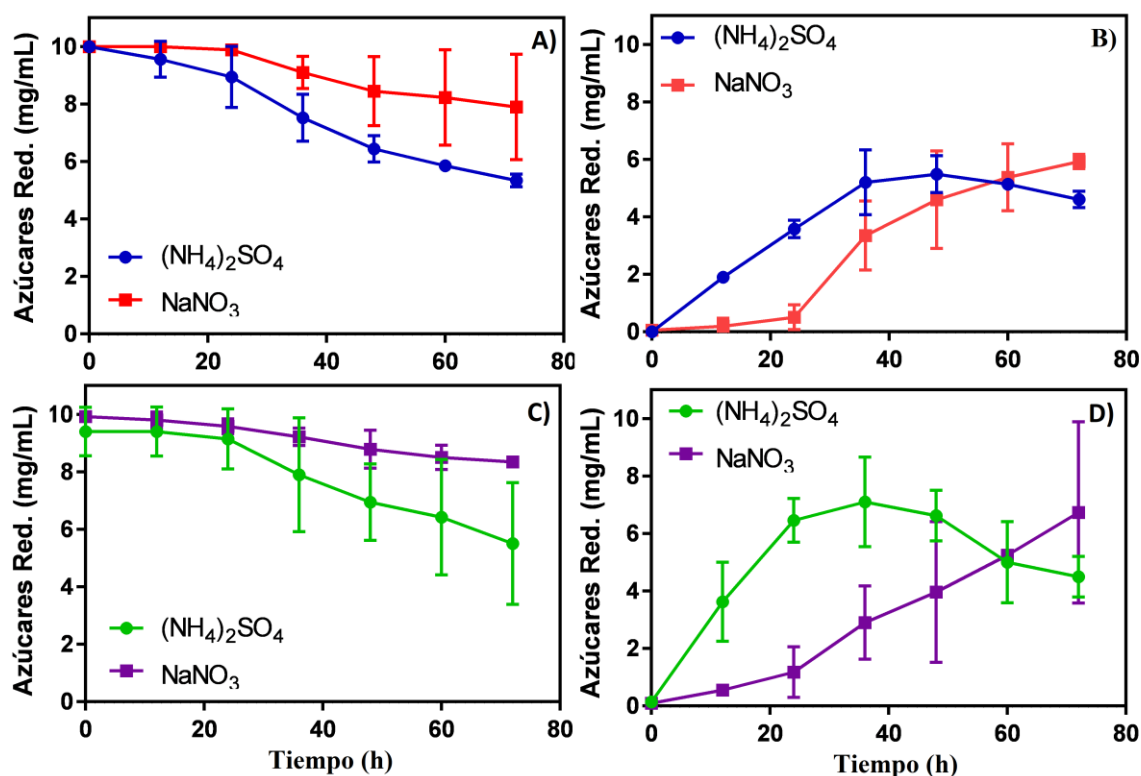


Figura 12. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la utilización de sustrato por *Aspergillus flavus*. Cultivo a pH 8, 37 °C y 300 rpm en matraz con 100 mL de volumen, inoculando esporas a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL. A) *A. flavus* NRRL 6541 creciendo en glucosa. B) *A. flavus* NRRL 6541 creciendo en almidón. C) *A. flavus* CECT 2687 creciendo en glucosa. D) *A. flavus* CECT 2687 creciendo en almidón.

Para ambas cepas, el consumo de glucosa es mayor en presencia de amonio como fuente de nitrógeno (Figura 12 A y C). Esto coincide con el mayor crecimiento (Tabla 5) y actividad (Figura 11) observados para esta condición. Creciendo en almidón (Figura 12 B y D), la concentración de azúcares reductores con sulfato de amonio aumenta y llega a su concentración máxima a las 48 y 36 horas para las cepas NRRL 6541 y CECT 2687, respectivamente. Pasado ese máximo la concentración disminuye, lo que no sucede en presencia de nitrato de sodio, con el que la concentración de azúcares reductores aumenta hasta el final del cultivo.

Para poder utilizar el almidón como fuente de carbono, primero debe ser hidrolizado en el medio por el conjunto de amilasas (Tester *et al.*, 2006) que producen glucosa, maltosa y dextrinas, ya que el almidón es muy grande para lograr entrar a la célula (Goto *et al.*, 1998). Esto implica que, en un principio, las amilasas comienzan a generar azúcares reductores que provocan el aumento en la concentración (Guzman-Maldonado *et al.*, 1995). A medida que el hongo supera la fase de adaptación, la velocidad de consumo de glucosa por el hongo iguala a la velocidad de generación de glucosa por digestión del sustrato, que se traduce como una meseta en la cinética de sustrato residual (Figura 12 B y D). Cuando la velocidad de consumo de la glucosa supera la velocidad a la cual se degrada el almidón, entonces la concentración de reductores comienza a disminuir. Este fenómeno se presenta claramente en presencia de amonio como fuente de carbono. Para la condición con nitrato, se observa durante todo el cultivo un aumento en la concentración de azúcares reductores, implicando que la velocidad de consumo de glucosa es menor a la tasa de generación.

En la condición con almidón como fuente de carbono, para ambas cepas, la concentración de azúcares reductores alcanza valores cercanos a 5 mg/mL. Sin embargo, esto parece no

provocar represión catabólica, ya que el aumento en la actividad continúa. Esto se debe a que los carbohidratos liberados y cuantificados como azúcares reductores no son solamente glucosa, también hay presencia de maltosa o maltotriosa (considerados azúcares represores débiles); (Gupta *et al.*, 2002; Guzman-Maldonado *et al.*, 1995). La glucosa es consumida a medida que es generada por la hidrólisis de carbohidratos más complejos. La concentración real de glucosa parece ser menor a la necesaria para provocar represión catabólica. Además, como se mencionó anteriormente, después de las 48 horas la concentración de azúcares reductores comienza a disminuir, cuando el requerimiento de carbono del micelio en crecimiento excede la capacidad de las enzimas en proveerlo.

Se conoce que el amonio sigue una vía sencilla para su asimilación metabólica. En bajas concentraciones puede ser asimilado gracias a la glutamina sintetasa, enzima que toma el ion amonio del medio y lo enlaza a un glutamato para formar la glutamina (Margelis, S. *et al.*, 2001). En altas concentraciones de amonio, la enzima glutamato deshidrogenasa (que normalmente favorece la desaminación) es capaz de adicionar el grupo amino al α -cetoglutarato, asimilando así el nitrógeno (Nelson & Cox, 2009). Estas vías son más directas que la del nitrato, que debe sufrir primero reducción a nitrito y, posteriormente, a amonio para ser asimilado (Campbell, W., 1999). Además, el poder reductor generado por el metabolismo (NADH) es utilizado para la reducción del nitrato a amonio, en lugar de destinarse a la obtención de energía por fosforilación oxidativa (Nelson & Cox, 2009).

Otro aspecto por considerar es la naturaleza de cada fuente de nitrógeno. El sulfato de amonio proporciona azufre, componente importante de algunos aminoácidos. El nitrato de sodio no provee azufre, sino que aporta sodio, lo que podría afectar negativamente al crecimiento en esta condición. Las enzimas encargadas de la asimilación de fuentes

secundarias de nitrógeno (como lo es el nitrato de sodio) están sujetas a represión por glutamina (Margelis, S. *et al.*, 2001), lo que indica que su síntesis implica un gasto energético mayor que cuando se asimila amonio. Pedersen and Nielsen (2000) reportan que el amonio es una mejor fuente de nitrógeno para producir α -amilasa en *Aspergillus oryzae*, con una mejor productividad y mayor rendimiento de biomasa.

Es importante volver a mencionar que, a pesar de encontrarse en condiciones de represión catabólica (Roy, Lockington & Kelly, 2008), los experimentos con alta concentración de glucosa mostraron niveles bajos de actividad amilolítica, similares a los obtenidos en los experimentos anteriores con las glucosa a pH 8. Los experimentos a nivel matraz permitieron elegir al sulfato de amonio como la fuente de nitrógeno a utilizar en los cultivos en biorreactor para ambas cepas de *Aspergillus flavus*, la no toxigénica NRRL 6541 y la toxigénica CECT 2687.

6.4 Cultivo a Diferente Concentración de Sustrato

Se hicieron experimentos a nivel matraz a diferentes concentraciones de glucosa y xilosa (0.5, 1 y 2%) con micelio como inóculo (0.3 g/L en base seca). El uso de micelio permite estandarizar la cantidad de inóculo, ya que las esporas no germinan en su totalidad a menos de que haya en el medio un suplemento, como el extracto de levadura (Saldaña, 2009). Se utilizaron matraces de 500 mL con un volumen de trabajo de 100 mL, incubados a 37 °C, 300 rpm, por 72 horas. Se diseñó este experimento con la finalidad de comparar los perfiles amilolíticos que se obtienen al crecer el microorganismo en diferentes concentraciones de sustrato. En resultados anteriores de este trabajo, se observó producción de amilasas con cuatro diferentes fuentes de carbono (que tenían en común a la glucosa). Para tener más información acerca de la expresión de las amilasas, se optó por la xilosa, una pentosa que

sigue una ruta metabólica distinta (Nelson & Cox, 2009). La xilosa es el inductor de las enzimas xilanolíticas, encargadas de la degradación del xilano, que también están sujetas a represión catabólica y reguladas por el activador transcripcional XlnR (Hasper, van der Veen, van Ooyen, de Graaff, 2004). Al utilizar esta fuente de carbono, es posible elucidar el papel de la concentración y la naturaleza de la fuente de carbono en la producción de las amilasas.

6.4.1 Cultivo con glucosa

Los valores de actividad amilolítica *in vitro* son muy bajos debido a que el organismo se encuentra en condiciones de represión (Roy, Lockington & Kelly, 2008). Sin embargo, fue posible comparar el perfil amilolítico de las cepas NRRL 6541 y CECT 2687 creciendo en glucosa al 0.5, 1 y 2% por medio de zimografía.

La figura 13 muestra los resultados obtenidos. Para ambas cepas es apreciable una zona de degradación que corresponde a las dos bandas características (que están entre los 45-55 kDa), siendo más intensa la de la cepa no toxigénica (*A. flavus* NRRL 6541). Se observa un aumento en la banda de degradación al aumentar la concentración inicial de glucosa. Como las muestras fueron tratadas de la misma manera (concentradas 100 veces), se concluye que con una mayor concentración de glucosa inicial hay una mayor acumulación de amilasas activas. Sin embargo, las bandas de degradación no son tan intensas debido a que en estas condiciones el sistema está regulado por represión catabólica (Fasoyin *et al.*, 2018). Estos resultados de mayor actividad a mayor concentración inicial de glucosa se pueden correlacionar con el crecimiento.

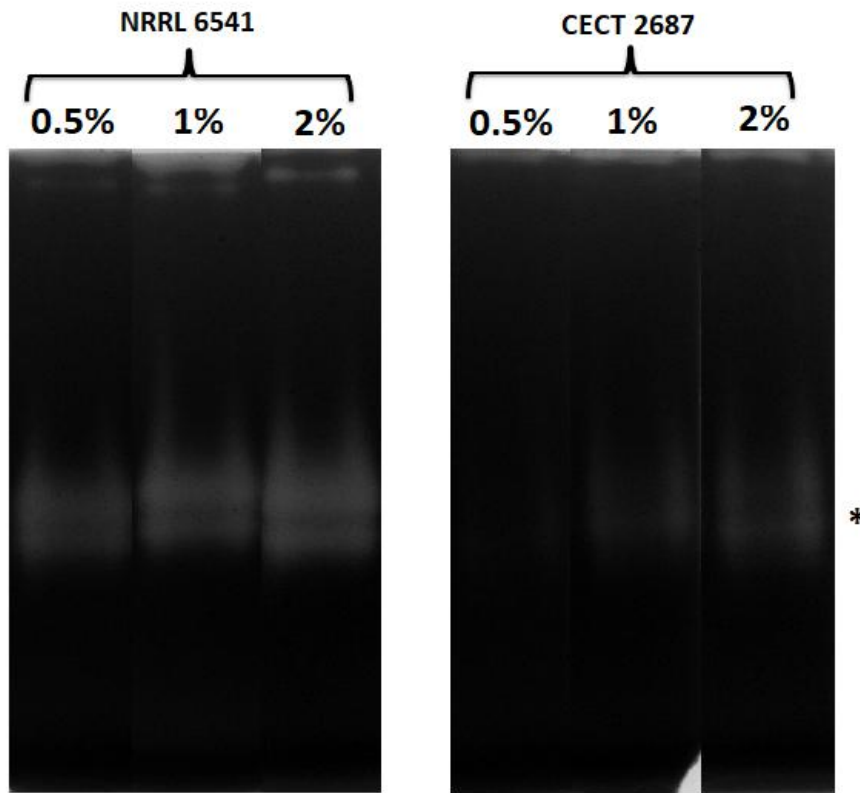


Figura 13. Zimograma de actividad amilolítica de *Aspergillus flavus* a diferentes concentraciones de glucosa. Cultivo a pH 8, 37 °C y 300 rpm en matraz con 100 mL de volumen con glucosa al 0.5, 1 y 2%, inoculando micelio a una concentración final de 0.3 g/L. Los geles SDS-PAGE con almidón fueron teñidos con lugol para revelar la actividad. *45-55 kDa.

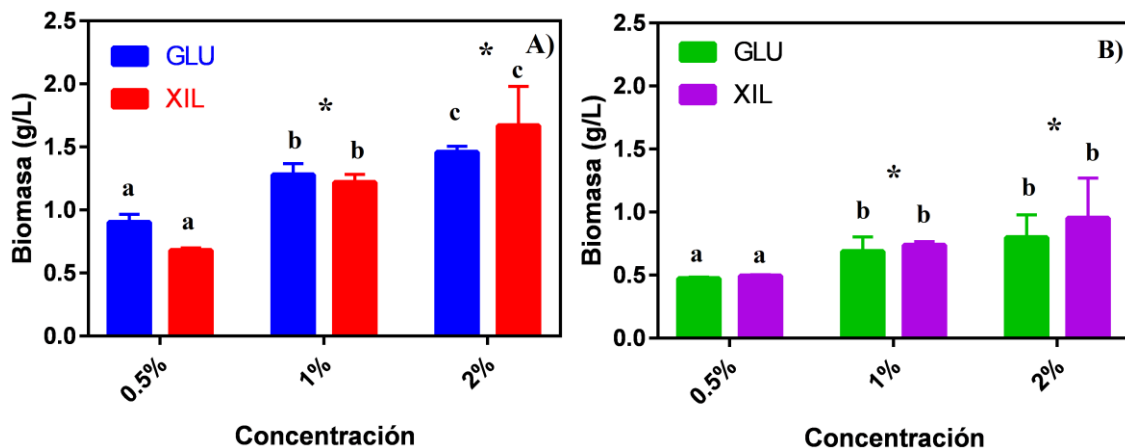


Figura 14. Biomasa obtenida creciendo en diferentes concentraciones de glucosa y xilosa para *Aspergillus flavus*. Cultivo a pH 8, 37 °C y 300 rpm en matraz con 100 mL de volumen con glucosa y xilosa al 0.5, 1 y 2%, inoculando micelio a una concentración final de 0.3 g/L. A) NRRL 6541. B) CECT 2687. La letra indica igualdad con la misma fuente de carbono; el asterisco entre las dos fuentes de carbono.

La figura 14 muestra que a mayor concentración de glucosa inicial, mayor biomasa producida. Este comportamiento de la biomasa es el característico de los cultivos, el crecimiento es mayor cuando hay mayor disponibilidad de azúcares (Trinci, 1969), hasta que se llega a la saturación. La cepa NRRL 6541 presenta un mayor crecimiento comparado a la 2687, lo que también se correlaciona con lo encontrado en los zimogramas de actividad amilolítica (Figura 13). La actividad es baja debido a la condición de represión (alta concentración de glucosa), pero al haber más crecimiento esa misma producción mínima parece traducirse en una mayor cantidad de amilasas secretada al medio.

6.4.2 Cultivo con xilosa

Los cultivos con xilosa revelan información importante acerca de las amilasas. Si se tratase de enzimas constitutivas, debería encontrarse actividad amilolítica en estas condiciones. Sin embargo, en los experimentos a diferentes concentraciones de xilosa, no se detectó actividad amilolítica *in vitro* ni en el zimograma (Figura 15). En ambas cepas, ninguna condición mostró una zona de degradación de almidón, indicando que en estas condiciones no hay producción de amilasas. El crecimiento siguió el mismo patrón que el obtenido con glucosa, a mayor concentración de xilosa mayor concentración de biomasa (Figura 14). A pesar de que el crecimiento en ambas fuentes de carbono es similar, solamente con glucosa es posible detectar actividad amilolítica.

El rendimiento de biomasa por cantidad de sustrato consumido que se muestra en la figura 16 revela que hay una tendencia a disminuir el rendimiento a medida que la concentración es mayor, cuando la fuente de carbono es glucosa. En ambas cepas con glucosa se observa una disminución en el rendimiento cuando se tiene una concentración de 2%. Esto puede sugerir que cuando se tiene menor disponibilidad de sustrato, los organismos tienden a

economizar la fuente de carbono y utilizarla de manera eficiente (Harder & Dijkhuizen, 1983), además de que existen transportadores de glucosa con diferente afinidad (Torres, Riol-Cimas, Wolschek & Kubicek, 1996). En contraste, con xilosa se tienen rendimientos estadísticamente iguales.

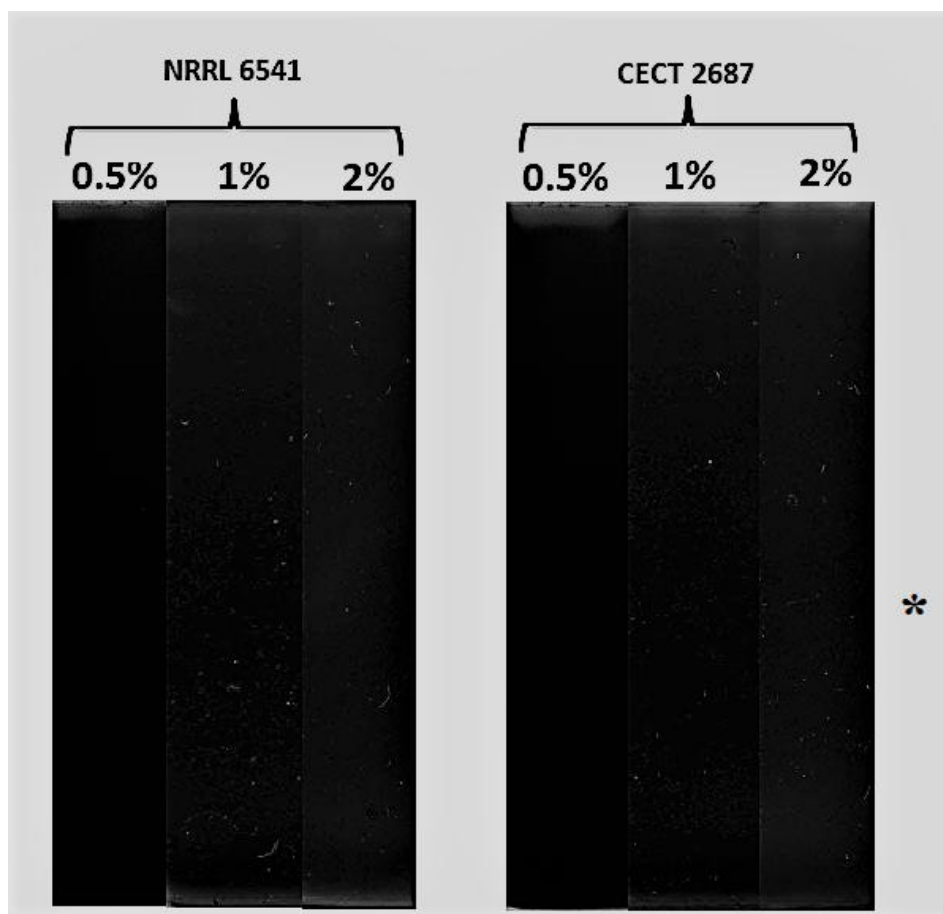


Figura 15. Perfil amilolítico de *Aspergillus flavus* a diferentes concentraciones de xilosa. Cultivo a pH 8, 37 °C y 300 rpm en matraz con 100 mL de volumen con xilosa al 0.5, 1 y 2%, inoculando micelio a una concentración final de 0.3 g/L. Geles SDS-PAGE con almidón, teñidos con lugol para revelar la actividad. *45-55 kDa.

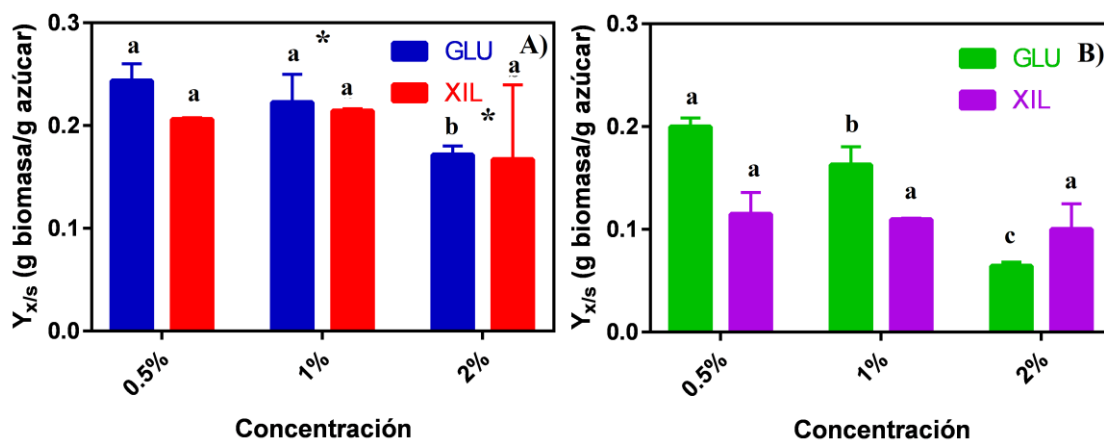


Figura 16. Rendimiento biomasa/sustrato obtenido creciendo en diferentes concentraciones de glucosa y xilosa para *Aspergillus flavus*. Cultivo a pH 8, 37 °C y 300 rpm en matraz con 100 mL de volumen con glucosa y xilosa al 0.5, 1 y 2%, inoculando micelio a una concentración final de 0.3 g/L. A) NRRL 6541. B) CECT 2687. La letra indica igualdad con la misma fuente de carbono; el asterisco entre las dos fuentes de carbono.

Los resultados de actividad revelan que con xilosa como fuente de carbono no hay producción de enzimas amilolíticas. Esto coincide con lo reportado, ya que la xilosa también desencadena represión catabólica (Mach-Aigner, Pucher & Mach, 2010; Prathumpai, McIntyre & Nielsen, 2004). Comparando los resultados obtenidos con glucosa y xilosa a diferentes concentraciones y con los variantes niveles de actividad en diferentes fuentes de carbono, existe evidencia para sugerir que la expresión de las amilasas de estudio no es constitutiva (Tani *et al.*, 2001). En *Aspergillus*, la proteína activadora AmyR (Makita *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 1999) está encargada de activar la transcripción de los genes de las enzimas amilolíticas. Estas enzimas no son esenciales en el metabolismo celular, por lo que se espera que no sean expresadas en todas las condiciones, solamente cuando exista en el medio su sustrato (presencia de inductores); (Makita *et al.*, 2009). El almidón tiene una masa molecular alta y no puede atravesar la membrana celular, por lo que son necesarias señales desde el exterior (inductores); (Goto *et al.*, 1998). El hecho de que con glucosa (pero no con xilosa) haya presencia de amilasas en el medio, a pesar de

encontrarse en condiciones de represión, puede significar que la glucosa tiene un papel más específico en la regulación de las enzimas amilolíticas además de la represión catabólica, como se ha reportado para otras especies de *Aspergillus*. La glucosa es el producto final de la degradación del almidón, por lo que es posible que esta molécula (o algún producto) pueda tener cierto efecto inductor sobre las enzimas amilolíticas, como se ha propuesto en la literatura (Carlsen & Nielsen, 2001; Murakoshi *et al.*, 2012; Pedersen *et al.*, 2000).

6.5 Condiciones de Cultivo en Biorreactor

Una vez determinados los efectos del pH y la fuente de nitrógeno indicadas, en los experimentos posteriores, se continuó con el estudio de diferentes condiciones de cultivo en biorreactor. El reactor utilizado fue un reactor de 1 L con agitación magnética. Se probaron tres condiciones de cultivo: una con glucosa al 1% y agitación de 300 rpm (**GLU/300**); glucosa al 0.5% y 400 rpm (**GLU/400**); y glucosa al 0.5%, extracto de levadura al 0.2% y 400 rpm (**GLU/YE/400**), con esporas como inóculo a una concentración de 1×10^6 esporas/mL. Se monitoreó la fermentación cuantificando azúcares reductores, proteína extracelular, concentración de biomasa y actividad amilolítica. Estos experimentos se realizaron sólo una vez, ya que se utilizó como experimento piloto para el reactor de 4 L y porque se presentaron problemas técnicos con el biorreactor.

Dos de las condiciones (GLU/YE/400 y GLU/400) tenían glucosa a una concentración de 0.5%. Se planeó de esta manera debido a que en los cultivos alimentados es necesario mantener baja la concentración de fuente de carbono, para de esta manera mantener al microorganismo en un estado de no represión catabólica (Strauss *et al.*, 1999; Szabó *et al.*, 1996). Al utilizar glucosa al 0.5%, son necesarias 40 horas para llegar a una concentración adecuada para iniciar la alimentación (aproximadamente 2 mg/mL de glucosa). De las

cinéticas de consumo de sustrato se aprecia que de utilizar glucosa al 1%, se necesitarían más de 100 horas de fermentación para lograr una baja concentración de carbono, tiempo demasiado largo para iniciar la alimentación (el micelio pasa de pellets a aglomerados de tamaño variable). Se optó por una agitación de 400 rpm ya que evita en mayor medida la adhesión de micelio a las paredes del reactor, lo que, por otro lado, dificulta la medición precisa del crecimiento.

La actividad amilolítica que se encontró para la cepa NRRL 6541 en las diferentes condiciones de cultivo utilizadas se muestran en la figura 17 A. Es fácilmente apreciable que la suplementación con extracto de levadura tiene un efecto positivo sobre la actividad amilolítica. Mientras que las condiciones sin extracto de levadura solo logran como máximo 4 U/mL, la condición GLU/YE/400 tiene un valor cercano a 20 U/mL alrededor de las 44 horas. Estos resultados correlacionan con la proteína extracelular cuantificada para cada condición (Fig. 17 B); la concentración de proteína es también mayor en la condición suplementada. Se sabe que el extracto de levadura promueve la germinación de las esporas (Palomares R, 2007; Saldaña D, 2009), lo que tiene un efecto directo sobre la biomasa que se produce a lo largo de la fermentación. Es por ello, que para la condición suplementada con el extracto de levadura, la velocidad específica de crecimiento (μ) y la velocidad de consumo de sustrato (ϵ) son mayores (Fig. 17 C y D, respectivamente) que las no suplementadas. Una mayor germinación, conlleva a un mayor crecimiento y consumo de sustrato, lo que puede explicar el aumento en la concentración de proteína y actividad amilolítica observados para la condición suplementada con extracto de levadura.

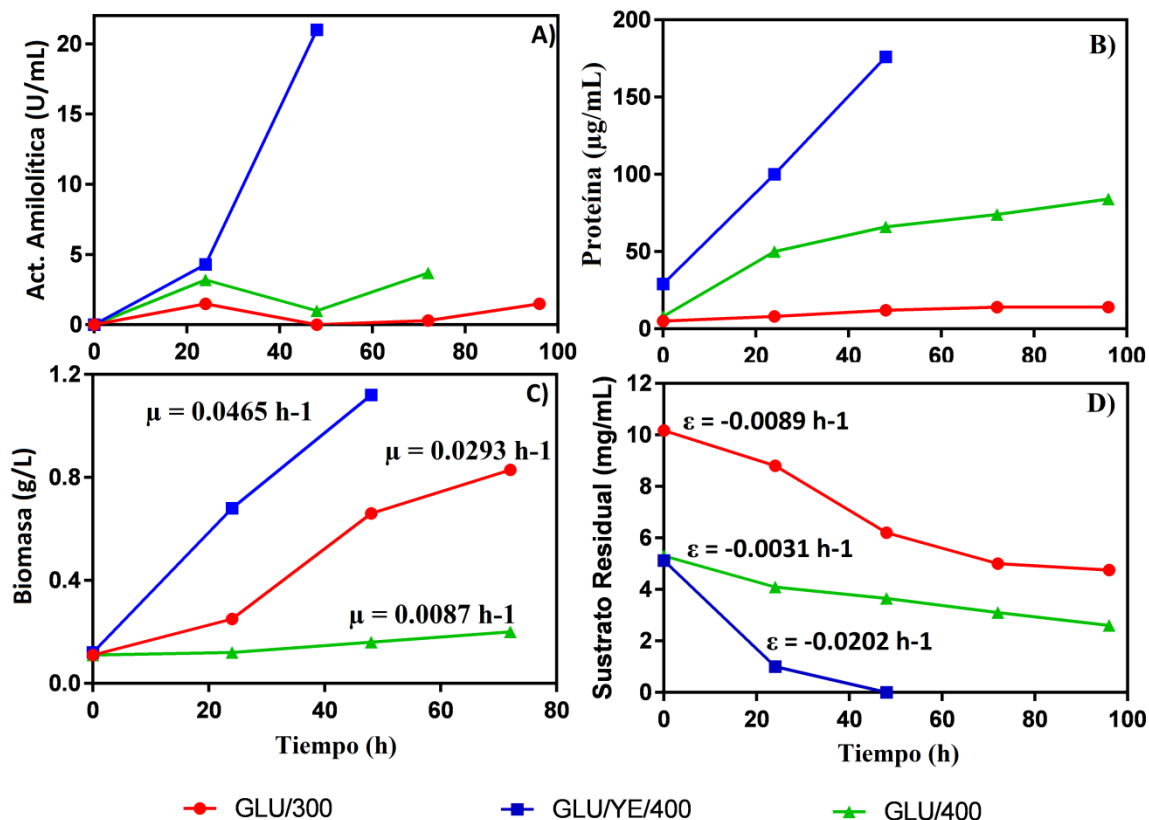


Figura 17. Condiciones en biorreactor de 1 L y su efecto sobre la actividad amilolítica, la proteína, el crecimiento y el consumo de sustrato para *A. flavus* NRRL 6541. Cultivo con tres condiciones: GLU/300 (Glucosa al 1% y 300 rpm), GLU/YE/400 (Glucosa al 0.5%, Extracto de levadura al 0.2% y 400 rpm) y GLU/400 (Glucosa al 0.5% y 400 rpm). Medio inoculado con esporas a una concentración final de 1×10^6 . A) Actividad Amilolítica. B) Proteína. C) Biomasa. D) Sustrato residual (expresado como azúcares reductores).

De manera similar, este comportamiento fue observado para la cepa toxigénica CECT 2687 (Fig. 18). La actividad amilolítica y la proteína extracelular fueron mayores en la condición GLU/YE/400, aunque menores a las obtenidas con la cepa no toxigénica. Gracias a una mejor germinación, el crecimiento del microorganismo se vio favorecido en esta condición. Los valores ϵ para las condiciones GLU/300 y GLU/YE/400 son similares entre sí y mayores a la GLU/400 (Fig. 20 D).

Los transportadores de azúcares se caracterizan por su K_m , la constante de Michaelis-Menten (Marangoni, 2003). Esto indica que a mayor concentración, mayor es el transporte de azúcares, lo que significa que la condición suplementada (que tiene una concentración

de 0.5% glucosa) es capaz de igualar la velocidad de consumo de glucosa de la condición con 1% de glucosa. Una explicación puede ser el mayor crecimiento que se observó en la condición suplementado con el extracto de levadura. Como se mencionó antes, se tiene evidencia que el extracto de levadura favorecen la germinación conidial (Saldaña D, 2009). Este efecto fue claro en los experimentos con el biorreactor de 1 L. Ambas cepas tuvieron un mayor crecimiento correlacionado a una tasa mayor de consumo de sustrato. Al haber más micelio activo en el medio de cultivo, la producción de proteínas y la actividad amilolítica aumentaron también.

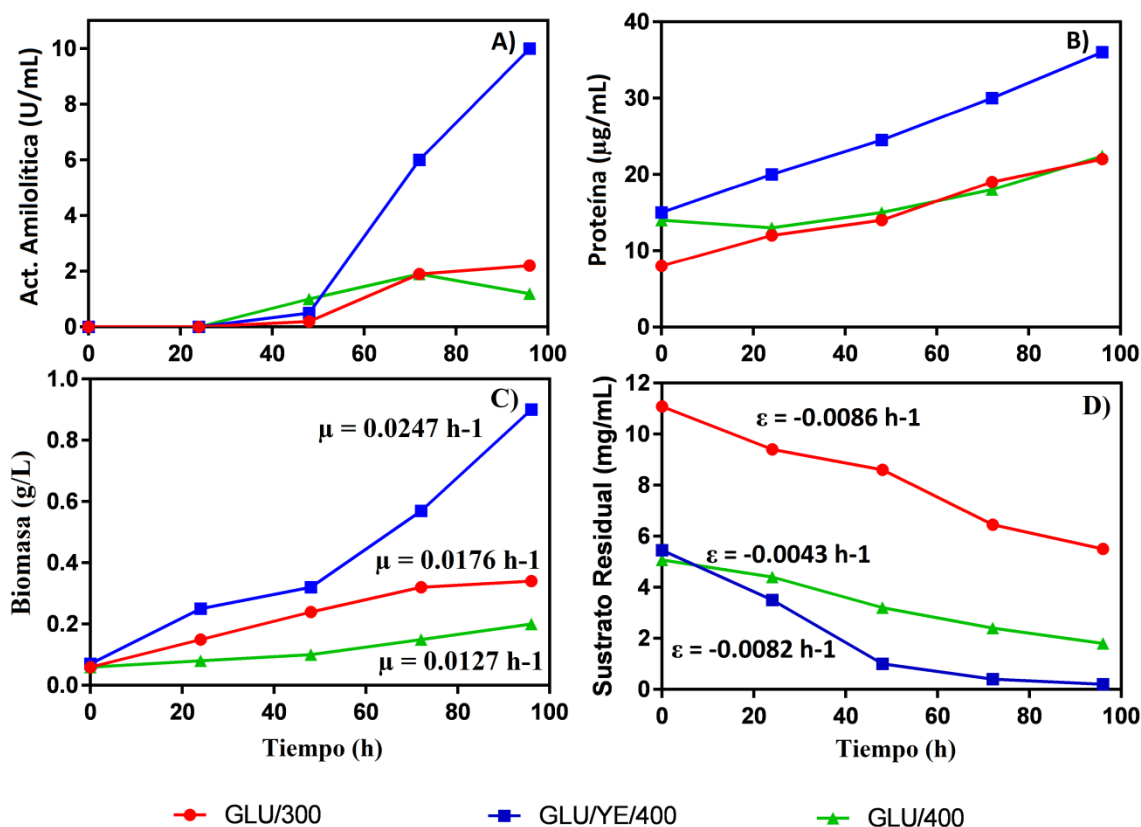


Figura 18. Condiciones en biorreactor de 1 L y su efecto sobre la actividad amilolítica, la proteína, el crecimiento y el consumo de sustrato para *A. flavus* CECT 2687. Cultivo con tres condiciones: GLU/300 (Glucosa al 1% y 300 rpm), GLU/YE/400 (Glucosa al 0.5%, Extracto de levadura al 0.2% y 400 rpm) y GLU/400 (Glucosa al 0.5% y 400 rpm). Medio inoculado con esporas a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL. A) Actividad Amilolítica. B) Proteína Extracelular. C) Crecimiento. D) Consumo de Sustrato (expresado como azúcares reductores).

La condición con glucosa al 0.5% y extracto de levadura al 0.2%, con una agitación de 400 rpm, se eligió como la indicada para realizar los experimentos de limitación de nutrientes. Sin embargo, no había certeza de que el aumento de la actividad amilolítica se pudiera explicar por el aumento en el crecimiento gracias al mayor porcentaje de germinación o si los carbohidratos que se encuentran en bajas concentraciones en el extracto de levadura (Aranda, Cabrera & Chairez, 2008) podrían inducir la síntesis de las enzimas amilolíticas.

6.6 Efecto del Inóculo sobre la Actividad Específica

La mejor condición al inocular con esporas el medio fue la suplementada con extracto de levadura (GLU/YE/400). Teniendo en cuenta el efecto que podría tener algún componente del extracto de levadura como inductor, se buscó una alternativa para evitar tener este sustrato en el medio (además de que el fabricante recomienda no utilizarlo en fermentaciones por su contenido de carbohidratos). Inocular directamente el micelio podría ser una alternativa, evitando la dependencia de la germinación de las conidias hacia el extracto de levadura (Saldaña D, 2009).

Se diseñaron una serie de experimentos para el reactor de 4 L, con un volumen de de 3 L. Se empleó una condición con 0.2% de glucosa en el medio, micelio como inóculo a una concentración final de 0.3 g de biomasa seca/L y un flujo de alimentación de glucosa al 1% (15 mL/h) iniciado en el tiempo cero. La figura 19 muestra las características macro y microscópicas del micelio, obtenido de matraces con 2% de fructosa y 0.3% de extracto de levadura en medio basal. Esto se comparó con un experimento que empleaba la condición GLU/YE/400 que se encontró en los experimentos previos, con un flujo de alimentación de glucosa al 1% (15 mL/h) iniciado alrededor de las 36-40 horas.

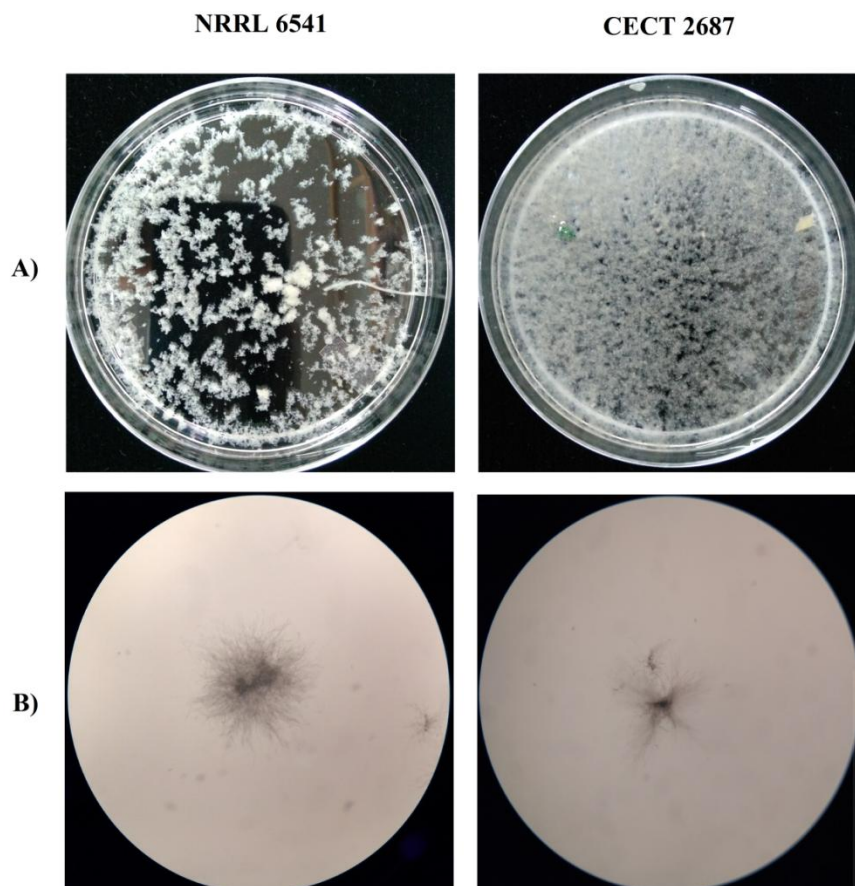


Figura 19. Micelio de *Aspergillus flavus* utilizado como inóculo. El micelio fue obtenido en un medio con fructosa al 2% y extracto de levadura al 0.3% a pH 8 por 20 horas. Se lavó abundantemente con solución salina y se recuperó, estimando su concentración por peso seco. A) Suspensión de micelio en placa. B) Pellet de *A. flavus* observado en microscopio con un aumento de 100x.

Al realizar las fermentaciones en condiciones de limitación de nutrientes, se pudo tener un primer indicio en cuanto a cuál es el comportamiento de ambos microorganismos en esta condición de baja concentración de carbono. Los experimentos se llevaron a cabo sólo una vez, ya que se observó una marcada diferencia entre las dos estrategias de cultivo. Los resultados obtenidos para la cepa NRRL 6541 se muestran en la figura 20. Se observa una clara diferencia entre la actividad amilolítica obtenida para cada condición. Ambos cultivos se encuentran en un régimen de limitación de nutrientes, pero la condición con micelio permanece con baja concentración de carbono durante todo el tiempo de fermentación,

mientras que la condición con esporas inicia como un lote (0.5% glucosa) y deben pasar 36 horas para que se inicie la alimentación. Esto implica que el microorganismo que crece a partir de esporas está sometido primero a un ambiente de abundancia necesario para la germinación y el crecimiento (D'énfert, 1997; Osherov & May, 2000), para después cambiar a una condición de limitación de nutrientes; a diferencia del otro que está en condiciones de limitación las 72 horas de cultivo.

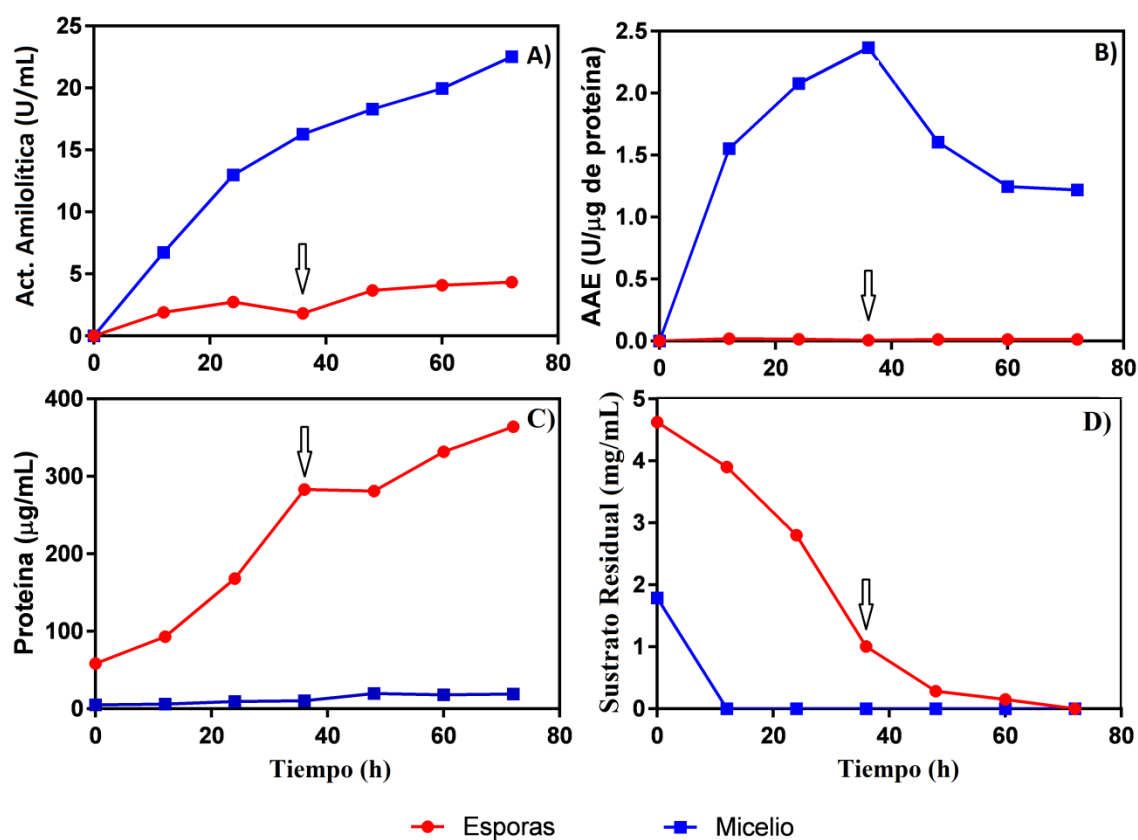


Figura 20. Efecto del inóculo en la respuesta a la limitación de nutrientes para la cepa *A. flavus* NRRL 6541. Cultivo alimentado en el reactor con un volumen de 3 L a 37 °C, 1 vvm y pH 8 con inoculación de esporas (1×10^6 esporas/mL) o micelio (0.3 g/L). Alimentación de glucosa al 1% con un flujo de 15 mL/h, desde el tiempo cero para la condición con micelio y a las 40 horas para la condición con esporas (flecha). A) Actividad amilolítica volumétrica. B) Actividad amilolítica específica. C) Proteína. D) Sustrato residual.

El efecto que tiene el inóculo es más pronunciado si se analiza la actividad amilolítica específica (Figura 20 B). Las unidades de actividad específica para la condición con micelio son claramente mayores; a las 36 horas, la actividad específica es poco más de 300 veces mayor que la condición con esporas. Esta diferencia tan marcada es debida la cantidad de proteína extracelular que es secretada para cada condición, mostrada en la Figura 20 C. La concentración de proteína en la condición con esporas es tan alta que afecta de manera negativa a la actividad específica, caso contrario a la condición con micelio donde la proteína es baja y tiene un efecto positivo sobre los valores de actividad específica.

En la figura 20 D se observa el consumo de sustrato en ambas condiciones. Con micelio, la concentración de azúcares reductores se mantiene baja desde las 12 horas, en una condición de limitación de glucosa, que se ha reportado como necesaria para aumentar la producción de enzimas amilolíticas en cultivos sumergidos (Goto *et al.*, 1998; Shoji *et al.*, 2007). En contraste, al usar esporas como inóculo se llega a esa condición hasta las 60 horas, lo que puede explicar los bajos niveles de actividad obtenidos (sabiendo que la glucosa provoca represión catabólica); (Rajoka & Yasmeen, 2005).

La cepa CECT 2687 presenta resultados similares a los encontrados con la cepa no toxigénica. A pesar de que ambas condiciones están en un régimen de limitación de nutrientes, el cultivo con micelio sobresale por sus niveles de actividad amilolítica (Figura 21 A). Nuevamente, la actividad específica permite observar de manera contundente el efecto del micelio; aproximadamente 80 veces mayor la actividad específica comparada a la condición con esporas a las 24 horas de cultivo (Figura 21 B). La proteína contribuye en forma importante a esta amplia diferencia (Figura 21 C); el cultivo con esporas

suplementado con extracto de levadura parece favorecer el incremento en la concentración de proteínas en el medio.

En la figura 21 D se observa la evolución de la fuente de carbono, revelando que en la inoculación de esporas no se llega a los niveles tan bajos de glucosa como con micelio. Al igual que con la cepa no toxigénica, esto puede haber repercutido en la producción de amilasas vía represión catabólica (Strauss *et al.*, 1999). Se propone que la germinación tiene un rol significativo en la alta concentración de proteína. D'énfert (1997) reporta que durante la germinación de las esporas hay un incremento en la síntesis de maquinaria ribosomal y en la localización de vesículas secretorias, aumentando así la producción y secreción de proteínas. Sin embargo, en estos experimentos una mayor secreción proteínica no necesariamente significó mayor secreción de amilasas.

Al analizar la actividad volumétrica para ambas cepas es posible identificar que a pesar de producir menor cantidad de proteínas extracelulares en la condición con micelio, la cantidad de enzimas amilolíticas que son secretadas es mayor a la condición con esporas como inóculo, lo que es claro en los zimogramas de actividad amilolítica (Figura 22). Se observan las dos bandas características para las cepas de *A. flavus* NRRL 6541 y CECT 2687 alrededor de los 45-55 kDa. La intensidad de la zona de degradación es marcadamente mayor al utilizar micelio como inóculo, lo que concuerda con los resultados de actividad *in vitro*. Además, se observa una banda de alrededor 28 kDa que solo se presenta en la cepa toxigénica con micelio como inóculo.

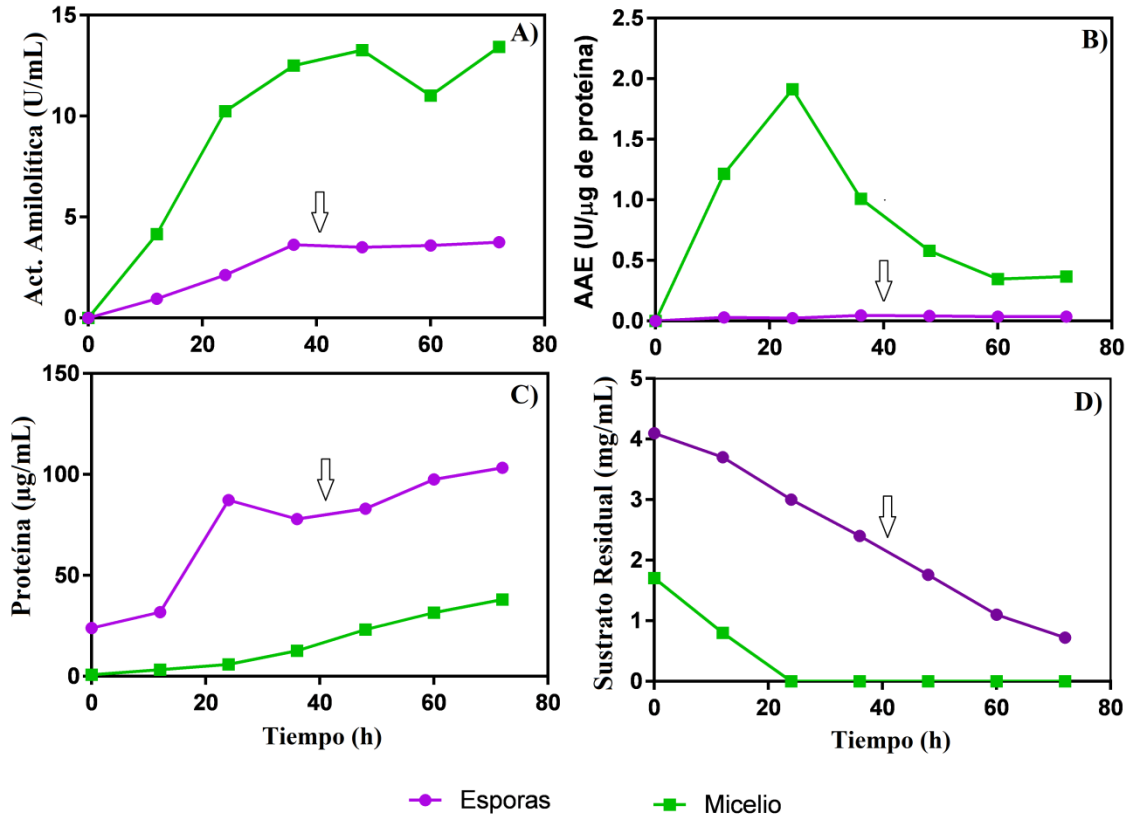


Figura 21. Efecto del inóculo en la actividad amilolítica y la proteína extracelular para la cepa *A. flavus* CECT 2687. Cultivo alimentado en el reactor con un volumen de 3 L a 37 °C, 1 vvm y pH 8 con inoculación de esporas (1×10^6 esporas/mL) o micelio (0.3 g/L). Alimentación de glucosa al 1% con un flujo de 15 mL/h, desde el tiempo cero para la condición con micelio y a las 40 horas para la condición con esporas (flecha). A) Actividad amilolítica volumétrica. B) Actividad amilolítica específica. C) Proteína. D) Sustrato residual.

De esta manera, la estrategia con micelio parece brindar ciertas ventajas sobre el cultivo con esporas. Una de las más importantes es que se evita el uso de extracto de levadura en el medio, que contiene carbohidratos sencillos que podrían estar actuando como inductores (Aranda *et al.*, 2008; Nahas & Waldemarin, 2002; Reddy, Nimmagadda & Sambassiva, 2003). La concentración inicial de fuente de carbono en el reactor es baja, iniciando la alimentación desde el tiempo cero manteniendo una baja concentración de fuente de carbono (limitación de nutrientes) durante todo el tiempo de cultivo. Al inocular micelio también se reduce de manera importante el tiempo de fermentación (36-40 horas) al evitarse la fase de germinación y formación de pellets.

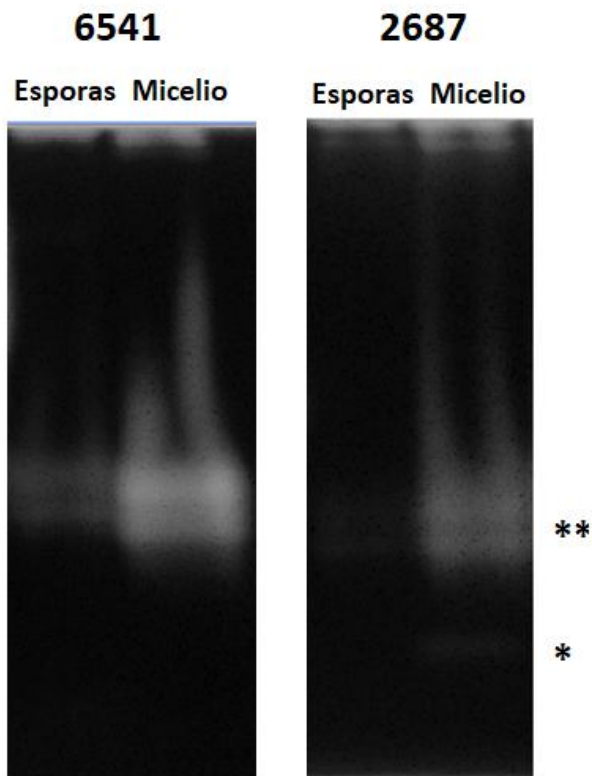


Figura 22. Zimograma de actividad amilolítica con esporas y micelio como inóculo. Geles SDS-PAGE con almidón, teñidos con lugol para revelar la actividad. * 28 kDa. **45-55 kDa.

Van Suijdam, Kossen & Paul (1980) describieron esta técnica para la producción de pellets fúngicos que son utilizados como inóculo. Los pellets son atractivos en cultivos ya que tienen la ventaja de disminuir la viscosidad del medio en comparación con una suspensión filamentosa. Además, aumenta el mezclado y las propiedades de transferencia de masa (van Suijdam *et al.*, 1980). En la industria el uso de

esporas como inóculo no es utilizado debido a la gran cantidad de esporas que

serían necesarias y la variabilidad del porcentaje de germinación, por lo que es más utilizado el micelio.

6.7 Limitación de Nutrientes

6.7.1 Limitación de glucosa

Se evaluó el efecto de la limitación de nutrientes en el reactor de 4 L, utilizando un volumen de trabajo de 3 L iniciales. El cultivo en lote (control) consistió de glucosa al 1% a un pH inicial de 8, 37 °C, 1 vvm de aireación y 400 rpm. El cultivo alimentado inició con 0.2% de glucosa a un pH de 8, 37 °C, 1 vvm de aireación, 400 rpm y alimentación (15 mL/h) desde el tiempo cero de una solución de glucosa al 1%. El cultivo alimentado facilita mantener una baja concentración de fuente de carbono durante el curso de la fermentación.

Fasoyin *et al.* (2018) reporta que una concentración de glucosa entre 0.05-0.1% mantiene al organismo en un estado de no represión catabólica. Esto permite además simular la situación en la que crecen normalmente los microorganismos en la naturaleza; esto es, una baja concentración de azúcares fácilmente asimilables (Harder & Dijkhuizen, 1983). Los organismos saprófitos son capaces de secretar un arsenal de hidrolasas que permiten la utilización de sustratos complejos, cuando no se encuentra en el medio un sustrato energéticamente más favorable (Ruijter & Visser, 1997; Scazzocchio *et al.*, 1995). Sin embargo, la actividad de estas enzimas no convierte el almidón rápidamente a glucosa, sino que la liberación de los azúcares ocurre lentamente (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2009). Como se observó en los experimentos a nivel matraz con almidón y maíz como fuentes de carbono, el crecimiento y actividad amilolítica de *A. flavus* se ve favorecido en estos sustratos complejos (condiciones de inducción). Además, en la condición con maíz no se observó un incremento en la concentración de azúcares en el medio (a pesar de que fue la condición con mayor crecimiento), manteniéndose baja durante todo el tiempo de fermentación, lo que refleja la lenta liberación de azúcares reductores al medio.

La Figura 23 resume los resultados obtenidos de los experimentos de cultivo alimentado y el efecto que tiene la limitación de nutrientes. La evolución de la concentración de glucosa revela que a pesar de que el medio es alimentado constantemente, la fuente de carbono disminuye hasta cero en las primeras 20 horas de cultivo. Comparando entre si las velocidades de consumo de sustrato (ϵ) (Figura 23 A) se observa que tienen valores esencialmente iguales. Recordando los valores que se obtuvieron en los experimentos con el biorreactor de 1 L (donde la condición con menor concentración de glucosa presentaba un valor ϵ menor), parece que en la condición de limitación de nutrientes el

microorganismo es capaz de aumentar su consumo de sustrato hasta igualar la tasa que se obtiene en el control. A pesar de que presentan una tasa consumo de sustrato similar, la actividad amilolítica está favorecida en el cultivo alimentado, como se observa en la Figura 23 B. El control presenta valores de actividad amilolítica volumétrica típicos de condiciones de alta concentración de glucosa (5-8 U/mL) para *A. flavus* en este estudio, mientras que los valores en limitación de nutrientes (14-16 U/mL) no son característicos de condiciones de alta concentración de glucosa (represión) ni en crecimiento en almidón o maíz (inducción).

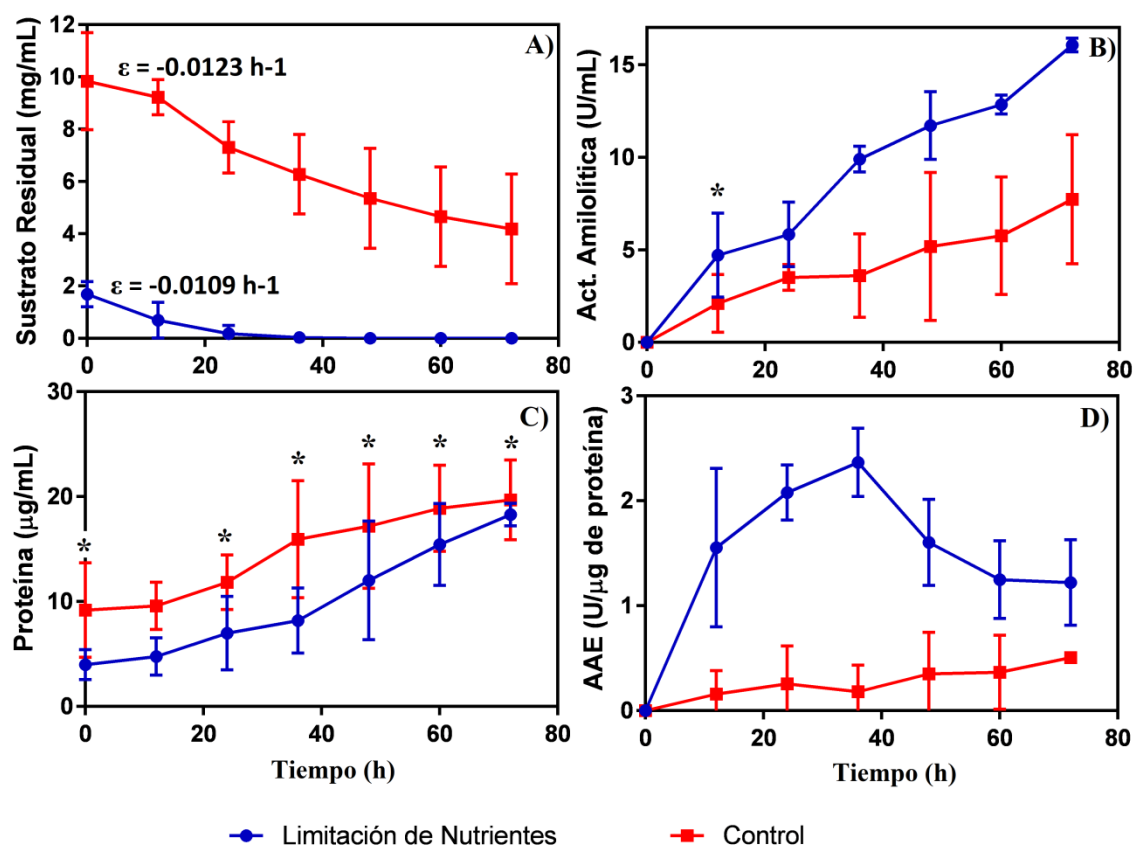


Figura 23. Efecto de la limitación de fuente de carbono (glucosa) en la cepa *A. flavus* NRRL 6541. Cultivo en reactor a 37°C, 1 vvm y pH 8 con glucosa al 0.2% y alimentación de glucosa al 1% con un flujo de 15 mL/hora. El control es un cultivo a las mismas condiciones con 1% de glucosa. A) Sustrato residual, expresado como azúcares reductores. B) Actividad amilolítica volumétrica. C) Proteína. D) Actividad amilolítica específica. El asterisco indica que los dos valores son estadísticamente iguales. Los valores son el promedio de tres experimentos independientes.

La concentración de proteína (Fig. 23 C) para ambas condiciones tiene un comportamiento similar, por lo que la actividad amilolítica específica es también mayor para la condición restrictiva (Fig. 23 D). En esta condición, aunque la proteína secretada es semejante, la actividad volumétrica revela que hay una mayor secreción de amilasas.

Los resultados obtenidos para la cepa CECT 2687 se muestran en la figura 24. La cinética de consumo de glucosa (Fig. 24 A) para el control revela que durante todo el tiempo de cultivo, esta condición se encuentra en alta concentración de carbono. Además, como sucedió con la cepa NRRL 6541, el microorganismo es capaz de crecer en baja concentración de fuente de carbono y aumentar su velocidad de consumo de sustrato (superando incluso la observada para el control).

Siguiendo con el mismo comportamiento observado, la actividad amilolítica volumétrica es mayor en la condición de limitación de nutrientes (Fig. 24 B). La concentración proteica para ambas condiciones tiene un incremento parecido (Fig. 24 C), implicando una mayor secreción de amilasas y, por ende, mayor actividad amilolítica específica (Fig. 24 D).

Este efecto que tiene la limitación de nutrientes sobre la producción de las amilasas fue observable en geles electroforéticos en condiciones desnaturalizantes. Teniendo como referencia el trabajo de Medina *et al.* (2005), se puede suponer que la actividad de proteasas es despreciable, ya que el tiempo de cultivo es de solamente tres días. Medina *et al.* reportan la presencia de proteasas secretadas al medio, pero en cultivos de 10-14 días donde el microorganismo se encuentra en condiciones de inanición. Asimismo, en todos los cultivos la concentración de proteína continúa en aumento durante el curso de la fermentación.

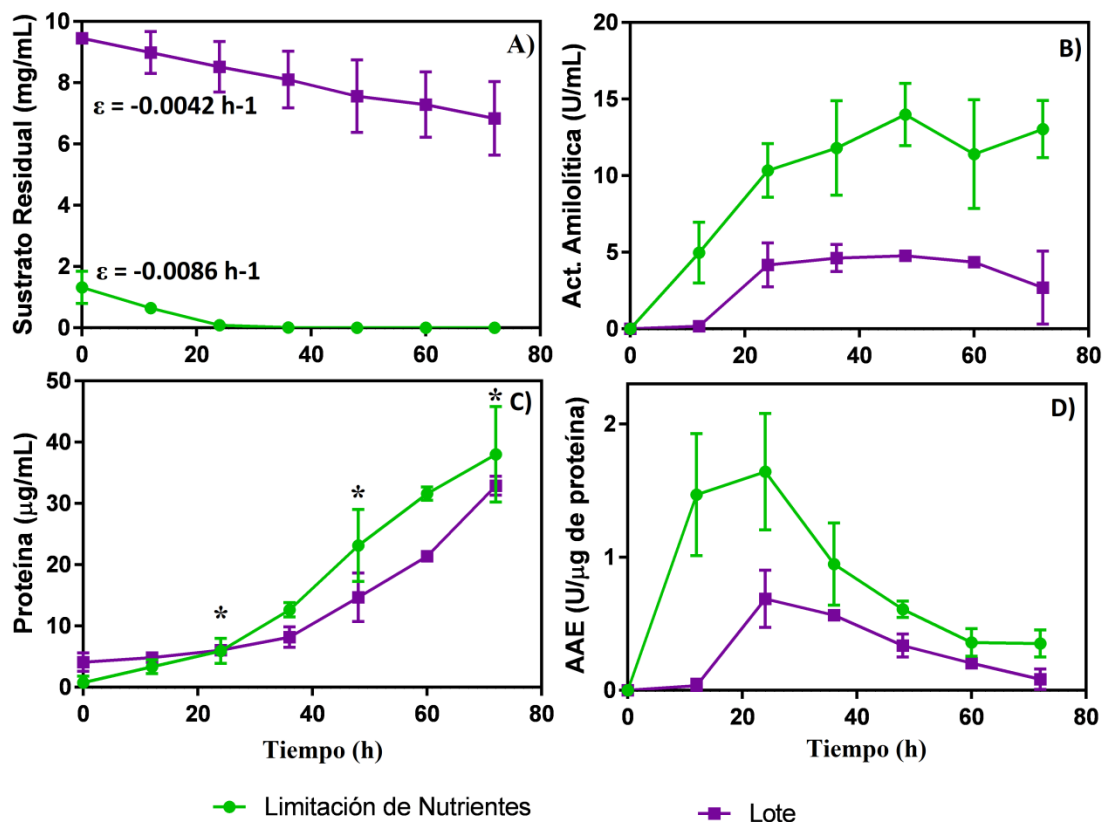


Figura 24. Efecto de la limitación de fuente de carbono (glucosa) en la cepa *A. flavus* CECT 2687. . Cultivo en reactor a 37°C, 1 vvm y pH 8 con glucosa al 0.2% y alimentación de glucosa al 1% con un flujo de 15 mL/hora. El control es un cultivo a las mismas condiciones con 1% de glucosa. A) Sustrato residual expresado como azúcares reductores. B) Actividad amilolítica volumétrica. C) Proteína. D) Actividad amilolítica específica. El asterisco indica que los dos valores son estadísticamente iguales. Los valores son el promedio de tres experimentos independientes.

La Figura 25 muestra el gel de proteína y su correspondiente zimograma para ambas cepas en las condiciones de lote y de cultivo alimentado. A pesar de que la concentración de proteína es baja y apenas distinguible en el gel SDS-PAGE (Figura 25), la actividad es visible en el zimograma. Aunque todos los carriles presentan dos bandas de degradación de almidón alrededor de los 45-55 kDa, existe una diferencia en la intensidad, siendo más intensas las de las condiciones de limitación de nutrientes para ambas cepas. Estos resultados coinciden con lo observado en los ensayos de actividad amilolítica, mayor actividad para los cultivos alimentados. Las dos bandas de peso molecular entre los 45-55 kDa pueden corresponder a α -amilasas, ya que se ha reportado que algunas de estas

enzimas tienen pesos entre los 50-60 kDa (Gupta, Gigras, Mohapatra, Goswani & Chauhan, 2003).

Sin embargo, nuevamente se presenta en la cepa CECT 2687 una banda de degradación hasta ahora desconocida con menor peso molecular (alrededor de 28 kDa) que sólo se presenta en la condición restrictiva. Si bien no es tan intensa como las demás bandas de degradación, aun no es claro a qué tipo de amilasa corresponda. Es necesario mayor estudio para lograr caracterizar esta proteína.

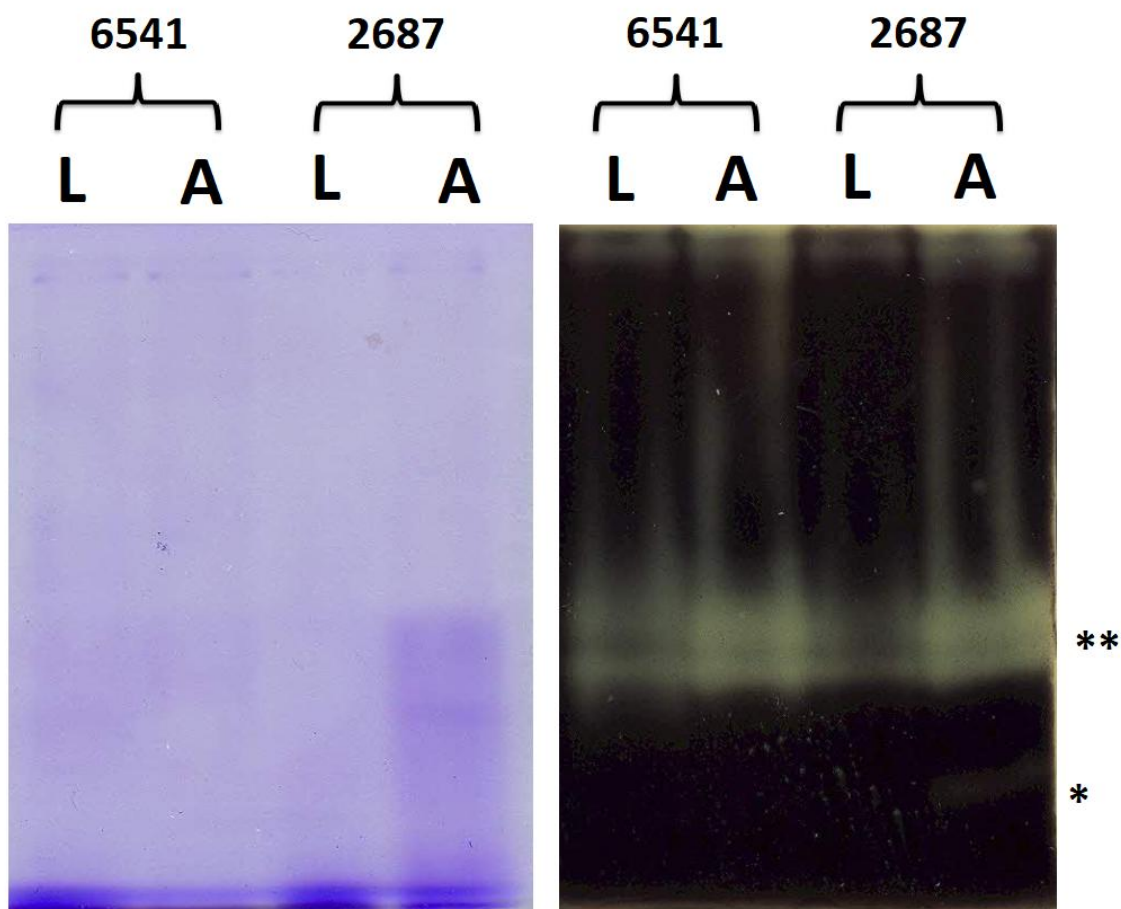


Figura 25. Gel SDS-PAGE y zimograma de actividad amilolítica en condición de limitación de glucosa para *A. flavus*. Proteína y actividad amilolítica de *A. flavus* NRRL 6541 y CECT 2687 en condiciones de abundancia (L=Lote) y de limitación de nutrientes (A=Cultivo alimentado).*28 kDa. **45-55 kDa.

Haciendo una comparación de la cantidad de glucosa disponible durante toda la fermentación, se tiene que para el control (cultivo en lote) hay 30 gr de glucosa totales; para la condición de limitación de nutrientes un total de 16 gr de glucosa. La diferencia reside en la manera en que esta cantidad está distribuida a lo largo del tiempo. El cultivo en lote tiene disponible todo el sustrato desde el principio, en una condición de represión catabólica (Roy *et al.*, 2008). En contraste, el cultivo alimentado siempre mantiene una concentración baja de glucosa, estando incluso la mayor parte de la fermentación por debajo del límite de detección del método de cuantificación de azúcares reductores. Esto implica que a pesar de tener menor disponibilidad de fuente de carbono en el cultivo alimentado, hubo mayor producción de amilasas.

6.7.2 Limitación de xilosa

Para seguir con el estudio del efecto de la limitación de nutrientes sobre la producción de enzimas amilolíticas, se diseñaron experimentos de cultivo alimentado utilizando xilosa como fuente de carbono. La xilosa es una pentosa que no está presente en el almidón y que se asimila por una ruta metabólica distinta a la glucosa (vía de las pentosas fosfato); (Nelson & Cox, 2009). El uso de este azúcar puede permitir observar, por medio del monitoreo de la actividad xilanolítica, cuando el organismo se encuentra en condiciones de represión o inducción. La xilosa es el inductor fisiológico de las xilanasas, además de que se ha reportado que la xilosa puede actuar como represor catabólico o como inductor de las mismas (Mach-Aigner *et al.*, 2010) dependiendo de la concentración.

El cultivo en lote contenía xilosa al 1% a un pH de 8, 37 °C, 1 vvm de aireación y 400 rpm. El cultivo alimentado inició con 0.2% de xilosa a un pH de 8, 37 °C, 1 vvm de aireación, 400 rpm y alimentación (15 mL/h) desde el tiempo cero de una solución de xilosa al 0.5%.

Se disminuyó la concentración del flujo de alimentación ya que, en un experimento previo, el uso de una solución de xilosa al 1% provocaba una acumulación del azúcar.

La Figura 26 muestra los resultados de los experimentos con xilosa como el nutriente limitante para la cepa NRRL 6541. En la cinética de consumo de sustrato (Figura 26 A) se observa que el control tiene una mayor velocidad de consumo comparado con la condición de restricción; el valor de ϵ es cuatro veces mayor. La concentración de xilosa se mantiene baja durante toda la fermentación, pero su velocidad de consumo no se comporta como en los experimentos con glucosa.

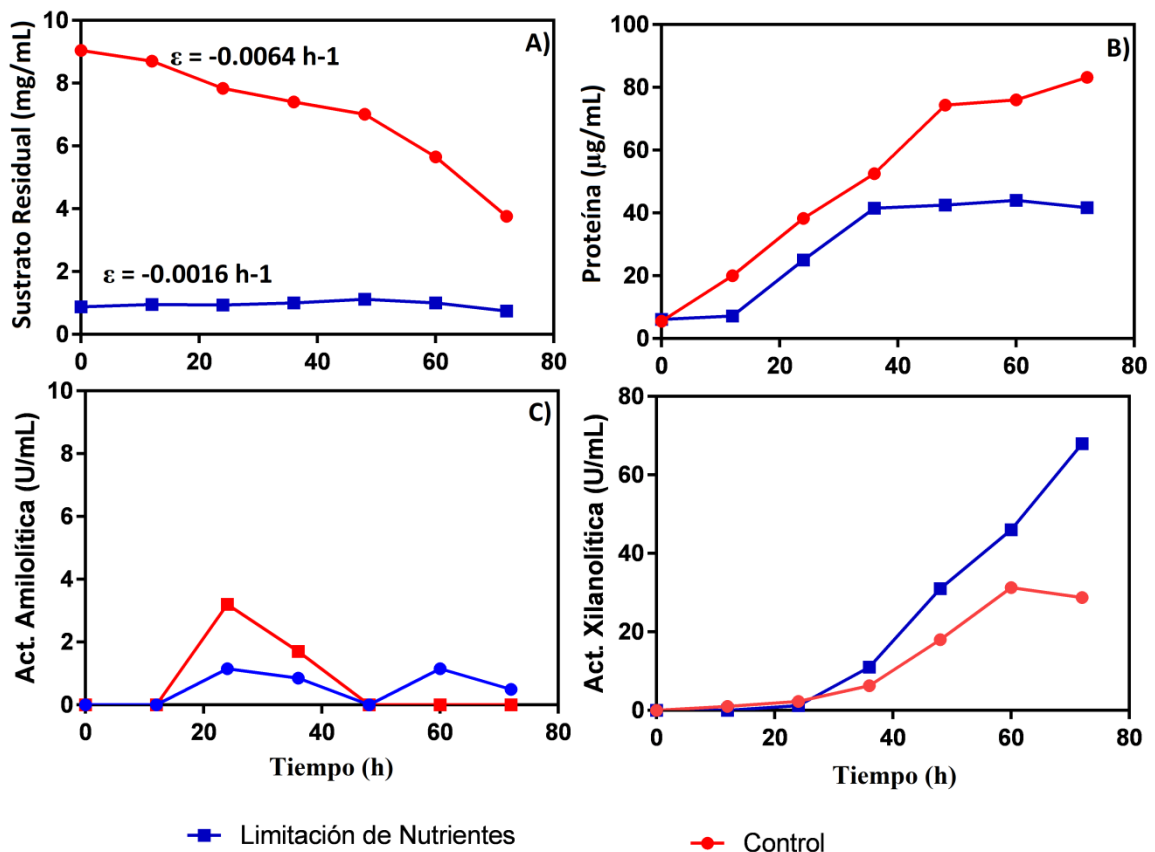


Figura 26. Efecto de la limitación de fuente de carbono (xilosa) en la cepa *A. flavus* NRRL 6541. Cultivo en reactor a 37°C, 1 vvm y pH 8 con xilosa al 0.2% y alimentación de xilosa al 1% con un flujo de 15 mL/hora. A) Consumo de sustrato. B) Proteína extracelular. C) Actividad Amilolítica Volumétrica. D) Actividad Xilanolítica Volumétrica.

Debido a que es una pentosa, la xilosa debe tener su propio sistema de transporte. No se han reportado en *Aspergillus* transportadores de xilosa de alta afinidad (de Vries *et al.*, 2017), como sucede con la glucosa (existen transportadores de alta y baja afinidad dependiendo de la concentración de azúcares). Existen transportadores, pero que son capaces de introducir a la célula múltiples azúcares (Colabardini *et al.*, 2014). En mutantes de *A. nidulans* con *crea* deletado, el microorganismo es capaz de consumir glucosa y xilosa al mismo tiempo, aunque la glucosa se consumió tres veces más rápido (David, Krogh, Roca, Akesson & Nielsen, 2005). El consumo disminuido de fuente de carbono afecta la velocidad de crecimiento en esta condición, presentando un valor de $\mu = 0.0147 \text{ h}^{-1}$, valor por debajo del obtenido en la condición con alta concentración de xilosa ($\mu = 0.0337 \text{ h}^{-1}$). La concentración de proteína extracelular en lote es marcadamente mayor que la condición de cultivo alimentado (Figura 26 B), debido probablemente al mayor crecimiento observado. La actividad amilolítica con xilosa como nutriente limitante no se ve favorecida como sucedió con glucosa (Figura 26 C). Los valores son menores a los obtenidos en alta o baja concentración de glucosa. Esto implica que la limitación de nutrientes no es suficiente para aumentar la producción de las amilasas.

La actividad xilanolítica que se muestra en la Figura 26 D permite confirmar que el microorganismo se encontraba en condiciones de no represión para el cultivo alimentado. En ambos casos, el inductor de las xilanasas se encuentra presente, pero en diferente concentración. Ya que la xilosa también desencadena represión catabólica (Prathumpai *et al.*, 2004), el aumento en la actividad para la condición de limitación implica un estado de no represión catabólica.

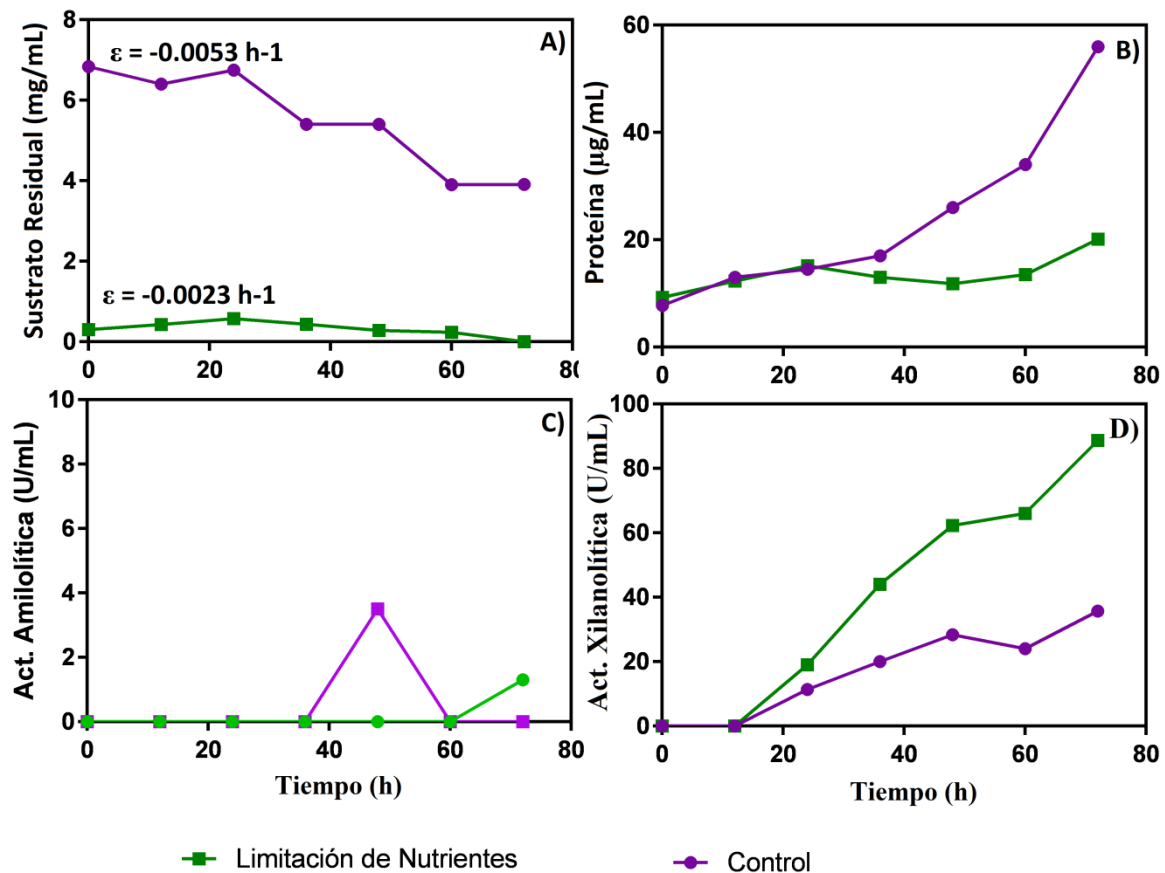


Figura 27. Efecto de la limitación de fuente de carbono (xilosa) en la cepa *A. flavus* CECT 2687. Cultivo en reactor a 37°C, 1 vvm y pH 8 con xilosa al 0.2% y alimentación de xilosa al 1% con un flujo de 15 mL/hora. A) Consumo de sustrato. B) Proteína extracelular. C) Actividad Amilolítica Volumétrica. D) Actividad Xilanolítica Volumétrica.

La cepa CECT 2687 tiene un comportamiento similar, como se muestra en la Figura 27. Nuevamente, la velocidad ϵ para la condición de limitación de nutrientes es menor a la observada en el cultivo en lote. De igual manera, el valor de μ es mayor en alta concentración de fuente de carbono comparado con el cultivo alimentado (0.0208 y 0.0126 h^{-1} , respectivamente). Este hecho muestra lo que sucede en condición de limitación de nutrientes, ya que el microorganismo no es capaz de crecer a la misma velocidad que en condiciones de abundancia. A pesar de encontrarse en esta condición, el comportamiento de la actividad amilolítica que se muestra en la Figura 27 C no corresponde a lo encontrado

con limitación de glucosa; para ambas condiciones con xilosa como fuente de carbono los valores de actividad son bajos.

Al igual que para la cepa no toxigénica, el perfil de actividad xilanolítica (Figura 27 D) muestra un incremento en actividad en la condición de limitación. Con el inductor presente y aliviada la represión catabólica al mantener una baja concentración de xilosa, se observa un incremento muy cercano a la linealidad. En la figura 28 se aprecia el zimograma de actividad amilolítica para las condiciones de lote y de cultivo alimentado. Similar a lo encontrado en los experimentos a diferentes concentraciones de xilosa, la actividad amilolítica fue nula.

La actividad *in vitro* para ambas cepas reflejaba un bajo nivel de actividad, pero el zimograma demostró que no existe tal actividad, lo que implica que los bajos niveles encontrados en los ensayos de actividad amilolítica *in vitro* son resultado de errores en el método, muy cerca del límite de detección.

Los resultados obtenidos para ambas cepas coinciden en que mantener una baja concentración de xilosa no es suficiente para aumentar la producción de amilasas comparado a cultivos con alta concentración de azúcares sencillos (glucosa y xilosa en este estudio). La medición de la actividad xilanolítica permitió comprobar que en la condición de limitación de nutrientes había un aumento en la producción de estas enzimas, comparado con el cultivo en lote. La actividad reveló de manera implícita que el microorganismo no se encuentra en condiciones de represión por carbono, observándose una mayor producción de xilanasas para la condición restrictiva en ambas cepas.

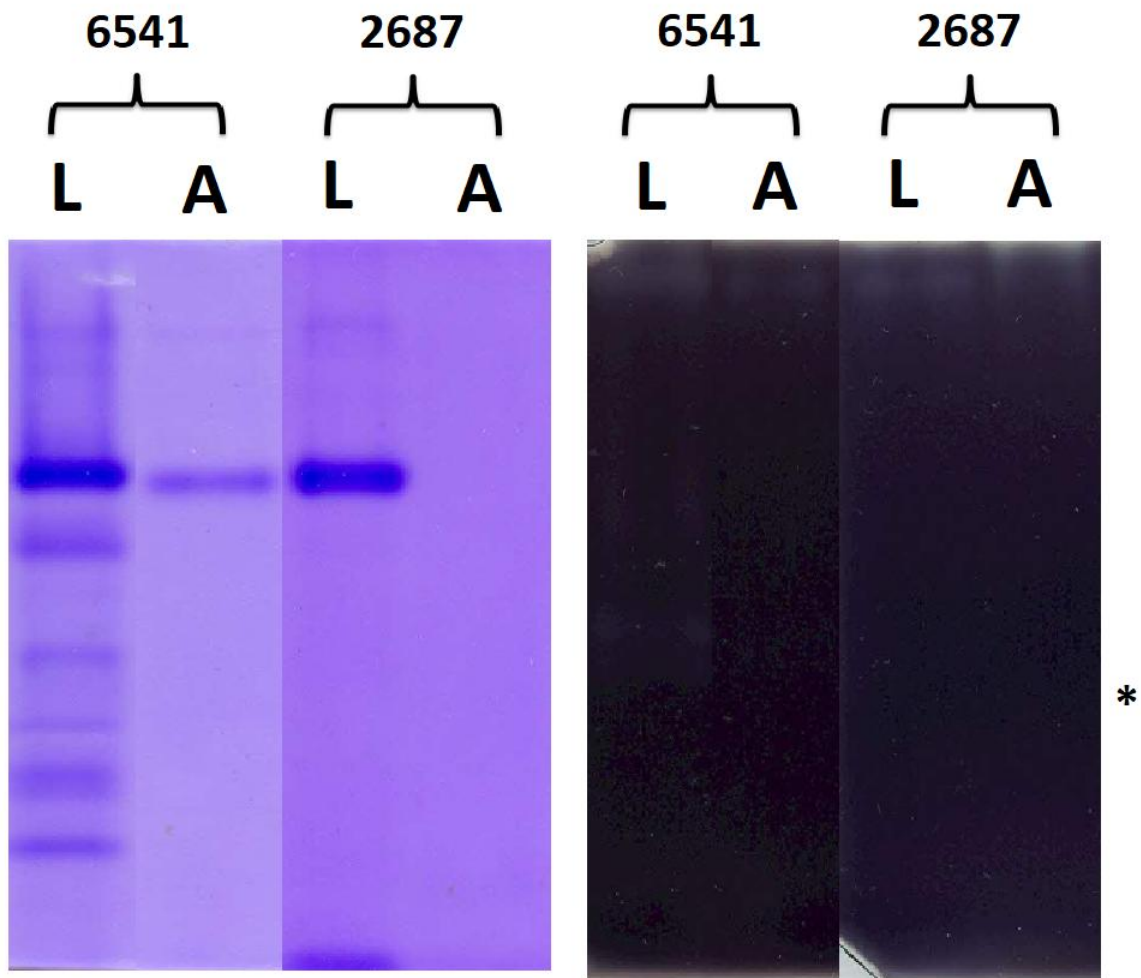


Figura 28. Gel SDS-PAGE y zimograma de actividad amilolítica en condición de limitación de xilosa para *A. flavus*. Proteína y actividad amilolítica de *A. flavus* NRRL 6541 y CECT 2687 en condiciones de abundancia (L=Lote) y de limitación de nutrientes (A=Alimentado). *45-55 kDa.

Los experimentos con xilosa se realizaron solamente una vez, ya que fue evidente que en ninguna de las condiciones se observaba actividad amilolítica. Además, se tenía la referencia de los cultivos en lote, donde tampoco se había encontrado actividad de amilasas.

La limitación de nutrientes es la condición principal a la que están expuestos los microorganismos de manera cotidiana (Harder & Dujkhuizen, 1983). Aceptando esta premisa, se espera que la evolución haya ejercido una fuerte presión para desarrollar

mecanismos que permiten adecuarse a estas condiciones restrictivas. El principal objetivo de estos mecanismos es permitir a la célula crecer bajo las condiciones de limitación de nutrientes, economizando el gasto de energía. Harder & Dijkhuizen (1983) propusieron que uno de estos mecanismos es la habilidad de incrementar la tasa de transporte del nutriente limitante, ya sea por la síntesis de más proteínas del sistema de transporte (aumentando la V_{\max}) o a la producción de un sistema de transporte de alta afinidad por el sustrato limitante. Los organismos adecuan su metabolismo de tal manera que la fuente de carbono limitante se utilice de una manera eficiente.

El aumento en la velocidad de consumo de sustrato en las condiciones con glucosa coincide con el efecto que se ha descrito, una mayor eficiencia en el transporte y utilización de la fuente de carbono. Con xilosa no hay un aumento en la tasa de consumo en el cultivo alimentado, probablemente debido a la ausencia de transportadores de alta afinidad que se expresen en estas condiciones de limitación. Ha habido reportes de hongos filamentosos que expresan diferentes transportadores de hexosas bajo diferentes condiciones (Delgado-Jarana, Moreno & Benitez, 2003; Torres *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2004). *Aspergillus nidulans* expresa dos sistemas de transporte (MacCabe, Miró, Ventura & Ramón, 2003), un transportador de baja afinidad ($K_m=1.4$ mM) y otro de alta afinidad ($K_m=16$ μ M) sometido a represión catabólica. También en *A. nidulans* se describió un transportador de hexosas de alta afinidad que se inducía solamente cuando la concentración de glucosa en el medio era menor a 0.5% (Forment, Flipphi, Ramon, Ventura & MacCabe, 2006).

Durante la limitación de nutrientes los organismos disminuyen considerablemente la conversión de energía a productos extracelulares, manteniendo las vías anabólicas en niveles tales que permitan solamente la proliferación celular y las catabólicas son liberadas

de la represión (Harder & Dijkhuizen, 1983). En los experimentos con glucosa se observó que el perfil de proteína extracelular fue muy parecido al lote, solamente diferenciados por la mayor actividad amilolítica. No obstante, con xilosa si fue evidente este fenómeno, ya que la concentración proteica en el medio de cultivo fue menor en la condición de limitación de nutrientes (a pesar de presentar una mayor actividad xilanolítica).

Los resultados obtenidos de actividad y zimografía revelan que aunque la cantidad de proteína que es secretada al medio es limitada, está favorecida hacia las enzimas que pueden proveer fuente de carbono. En condiciones de limitación, los genes involucrados en el aprovechamiento de fuentes de carbono no ideales son liberados de la represión catabólica, lo que se traduce a una mayor cantidad de enzimas amilolíticas.

Los experimentos con micelio como inóculo a nivel matraz con diferentes concentraciones de glucosa y xilosa (0.5, 1 y 2%) revelaron que en lote se observan niveles basales de actividad que son directamente proporcionales al crecimiento. En modelos cinéticos de generación de producto (Luedeking & Piret, 1959), este comportamiento se conoce como asociado al crecimiento; a mayor concentración de sustrato, mayor crecimiento y, por ende, mayor actividad. Esta conducta llevaría a creer que en condiciones de muy baja concentración de fuente de carbono la actividad se vería disminuida. Sin embargo, al utilizar el cultivo alimentado con glucosa se observa un aumento en la producción de amilasas, lo que demuestra que en condiciones de limitación de nutrientes hay un aumento en la producción de enzimas hidrolíticas.

6.8 Regulación de las Enzimas Amilolíticas

Las amilasas, como muchas otras enzimas degradadoras de polisacáridos complejos, están reguladas a nivel transcripcional (Fasoyin *et al.*, 2018; Mach-Aigner *et al.*, 2010; Makita *et al.*, 2009). En *Aspergillus*, cuando en el medio se encuentra una fuente de carbono energéticamente favorable (como la glucosa), los genes de hidrolasas que proveen energía a partir de fuentes de carbono complejas son reprimidos por el represor global CreA (Roy *et al.*, 2008). La proteína CreA de *Aspergillus flavus* tiene un 100% de identidad con la de *A. oryzae* y un 81% con la de *A. nidulans* (Fasoyin *et al.*, 2018). Específicamente para las enzimas amilolíticas, el activador transcripcional AmyR es el encargado de promover su síntesis en presencia de un inductor (Makita *et al.*, 2009).

En condiciones de limitación de nutrientes, la baja concentración de fuente de carbono libera a las hidrolasas de la represión (Fasoyin *et al.*, 2018; Mach-Aigner *et al.*, 2010). También, se ha reportado que en estas condiciones, *amyR* aumenta su transcripción (dos Reis *et al.*, 2017). Entonces, el hecho de que se libere de represión catabólica y que AmyR sea sintetizado, puede llevar a la producción de enzimas amilolíticas que están controladas por este regulador transcripcional.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado y propuesto por investigaciones anteriores. La xilosa, dependiendo de la concentración, es capaz de tener un efecto represor (via represión catabólica) o un efecto inductor sobre las xilanasas en *Aspergillus nidulans* (Prathumpa *et al.*, 2004) y *Trichoderma reesei* (Mach-Aigner *et al.*, 2010). Mantener en el cultivo una baja concentración de fuente de carbono permite aliviar la represión causada por CreA (Fasoyin *et al.*, 2018), pero esto no es suficiente para aumentar la producción de las enzimas amilolíticas. Se conoce que en otras especies de *Aspergillus*; *nidulans*, *niger* y

oryzae (Murakoshi *et al.*, 2012; Carlsen & Nielsen, 2001; vanKuyk *et al.*, 2012), la glucosa es capaz de actuar como un inductor de las amilasas. Es necesaria la presencia de un inductor que estimule la activación de AmyR a un estado que permita activación transcripcional (Makita *et al.*, 2009). La xilosa, un producto de degradación del xilano de cinco carbonos, al parecer no tiene un efecto sobre AmyR. En contraste, la glucosa es el producto final de la degradación del almidón y, de acuerdo a lo propuesto por otros grupos de trabajo y a los resultados de este estudio, tiene la capacidad de influir en el proceso de inducción de las enzimas amilolíticas de *Aspergillus flavus* cuando se encuentra en bajas concentraciones que no permiten represión catabólica.

Nuestros resultados resaltan el papel de la limitación de nutrientes en la naturaleza. Ya que es la principal condición existente, los productos que son secretados en esta condición deben ser esenciales para el desarrollo del microorganismo. En un ambiente de alto contenido amiláceo, como lo es el maíz, las enzimas amilolíticas deben ser claves en la colonización. De esta manera, conocer más sobre la producción de las amilasas puede ayudar a entender los procesos de colonización del maíz.

7. CONCLUSIÓN

Aspergillus flavus es un hongo saprófito capaz de afectar cultivos de importancia, como el maíz. Para ello, tiene la necesidad de producir enzimas hidrolíticas que le permitan degradar los sustratos complejos y obtener energía. Nuestros resultados demuestran que, a pesar de que *A. flavus* es capaz de crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono (glucosa, xilosa, sacarosa, almidón, maíz), tiene una preferencia sobre los sustratos complejos. Ambas cepas estudiadas ven favorecida su actividad amilolítica a pH alcalino y con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, debido principalmente a que el pH ácido parece tener un efecto negativo sobre la producción y a la facilidad con la que puede ser asimilado el amonio, respectivamente.

Claramente, el almidón es la fuente de carbono que más favorece la actividad amilolítica (por su condición de inducción), mientras que la glucosa ejerce represión catabólica. Por otro lado, la xilosa no tuvo un efecto sobre la producción de amilasas lo que ratifica que las amilasas de estudio son inducibles.

El uso de micelio como inóculo en biorreactor en lugar de esporas acorta los tiempos de fermentación de los cultivos alimentados y aumenta la actividad amilolítica específica. La baja concentración de glucosa y xilosa en los cultivos alimentados permite liberar al microorganismo de la represión catabólica y aumentar la producción de amilasas y xilanasas, respectivamente. Se evidenció que la glucosa en bajas concentraciones tiene un efecto positivo sobre la producción de enzimas amilolíticas, ya sea al actuar como un inductor débil o como algún tipo de señalización, lo que ya ha sido observado para otras especies del género *Aspergillus*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, G., & Huitrón, C. (1986). *Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by Aspergillus sp.* Enzyme and Microbial Technology. 8(9): 541-545.
- Alva, S., Anupama, J., Savla, J., Chiu, Y. Y., Vyshali, P., Shruti, M. *et al.* (2007). *Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from Aspergillus sp. JGI 12 in solid state culture.* African Journal of Biotechnology. 6(5): 576-581.
- Amaike, S., & Keller, N. (2009). *Distinct roles for VeA and LaeA in development and pathogenesis of Aspergillus flavus.* Eukaryotic Cell. 8(7): 1051-1060.
- Amaike, S., & Keller, N. (2011). *Aspergillus flavus.* The Annual Review of Phytopathology, 49-107.
- ANSES (2012). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Obtenido de <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2012sa0053Fi.pdf>
- Aranda, J. S., Cabrera, A. I., Chairez, J. I. (2008). *Predicción del contenido intracelular de trehalosa en el proceso de producción de biomasa de Saccharomyces cerevisiae.* Revista Mexicana de Ingeniería Química. 7(1): 71-78.
- Benítez C., C. G. (2006). *El Maíz: origen, composición química y morfología.* Materiales Avanzados. 7: 15-20.
- Bennett, J. W., (2010). *An overview of the genus Aspergillus.* PP. 1-17. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics.* M. Machida and K. Gomi (eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Bhargava, S., Wenger, K. S., & Marten, M. R. (2003). *Pulsed Addition of Limiting-Carbon During Aspergillus oryzae Fermentation Leads to Improved Productivity of a Recombinant Enzyme.* Biotechnology and Bioengineering. 82:111-117.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Moore, G. G. (2014). *Aspergillus flavus.* Encyclopedia of Food Microbiology. 1: 72-79.
- Bradford, M. M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.* Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

- Campbell, W. H. (1999). *Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 277-303.
- Carlsen, M., & Nielsen, J. (2001). *Influence of carbon source on alfa-amylase production by Aspergillus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 57:346-349.
- Chulkin, A. M., Vavilova, E. A. & Benevolenskij, S. V. (2010). *Transcriptional regulator of carbon catabolite repression CreA of filamentous fungus Penicillium canescens*. Molecular Biology. 44(4): 596-605.
- Cinar, A., Parulekar, S. J., & Undey, C. (2003). *Batch Fermentation: Modeling, Monitoring and Control*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Colabardini, A. C., Annick R., L. N., Brown, N. A., dos Reis, T. F., Savoldi, M., Goldman, S. H. M. *et al.* (2014). *Functional characterization of a xylose transporter in Aspergillus nidulans*. Biotechnology for Biofuels. 7(1):46.
- David, H., Krogh, A. M., Roca, C., Akesson, M., Nielsen, J. (2005). *CreA influences the metabolic fluxes of Aspergillus nidulans during growth on glucose and xylose*. Microbiology. 151: 2209-2221.
- D'enfert, C. (1997). *Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of Aspergillus nidulans and Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology. 21: 163-172.
- Duran, R. M., Gregersen, S., Smith, T. D., Bhetariya, P. J., Cary, J. W., Harris-Coward, P. Y., Mattison, C. P. *et al.* (2014). *The role of Aspergillus flavus veA in the production of extracellular proteins during growth on starch substrates*. Applied Microbiology and Biotechnology. 98: 5081-5094.
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G. *et al* (2017). *Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus Aspergillus*. Genome Biology. 18(1): 18-28.
- Delgado-Jarana, J., Moreno M., M. A., & Benitez, T. (2003). *Glucose uptake in Trichoderma harzianum: Role of gtt1*. Eukaryotic Cell. 2(4): 708-717.
- Denison, S. H. (2000). *pH Regulation of Gene Expression in Fungi*. Fungal Genetics and Biology. 29: 61-71.
- dos Reis, T. F., Nitsche, B. M., Almeida de Lima, P. B., de Assis, L. J., Mellado, L., Harris, S. D., Meyer, V. *et al* (2017). *The low affinity glucose transporter HxtB is also*

- involved in glucose signalling and metabolism in Aspergillus nidulans*. Scientific Reports. 7(1):1-15.
- Dowzer, C., & Kelly, J. (1991). *Analysis of the creA gene, a regulator of carbon catabolite repression in Aspergillus nidulans*. Molecular and Cellular Biology, 11(11):5701-5709.
- FAO (2001). *El Maíz en los Trópicos: Mejoramiento y Producción*. Roma: FAO.
- FAO (2018). Obtenido de <http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/maize/en/>
- Fasoyin, O. E., Wang, N., Qiu, M., Han, X., Chung, K-R., Wang, S. (2018). *Carbon catabolite repression gene creA regulates morphology, aflatoxin biosynthesis and virulence in Aspergillus flavus*. Fungal Genetics and Biology. 115: 41-51.
- FDA (2015). U.S. Food and Drug Administration. Obtenido de <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074703.htm>.
- Forment, J. V., Flippi, M., Ramon, D., Ventura, L., MacCabe, A. P. (2006). *Identification of the mstE gene encoding a glucose-inducible, low affinity glucose transporter in Aspergillus nidulans*. The Journal of Biological Chemistry. 281(13): 8339-8346.
- Ghosh, P. & Ghosh, U. (2017). *Bioconversion of Agro-waste to Value-Added Product Through Solid-State Fermentation by a Potent Fungal Strain Aspergillus flavus PUF₅*. Utilization and Management of Bioresources. pp 291-299.
- Goto, C. E., Barbosa, E. P., Kistner, L. C. L., Moreira, F. G., Lenartovicz, V., Peralta, R. M. (1998). *Production of amylase by Aspergillus fumigatus utilizing α -methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate*. FEMS Microbiology Letters. 167(2): 139-143.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003). *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*. Process Biochemistry. 38: 1599-1616.
- Guzman-Maldonado, H., Paredes-Lopez, O., Biliaderis, G. C. (1995). *Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch: A Review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 35(5): 373-403.
- Harder, W., & Dijkhuizen, L. (1983). *Physiological Responses to Nutrient Limitation*. Annual Reviews in Microbiology. 37: 1-23.
- Haro, R., Garcíadeblas, B. & Rodríguez-Navarro, A. (1991). *A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport*. FEBS Letters. 291(2): 189-191.

- Hasper, A. A., Trindade, L. M., van der Veen, D., van Ooyen, A. J. J., de Graaff, L. H. (2004). *Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from Aspergillus niger*. *Microbiology*. 150: 1367-1375.
- Hemansi, Gupta, R., Kuhad, R. C., Saini, J. K. (2018). *Cost effective production of complete cellulase system by newly isolated Aspergillus niger RCKH-3 for efficient enzymatic saccharification: Medium engineering by overall evaluation criteria approach (OEC)*. *Biochemical Engineering Journal*. 132: 182-190.
- Jenkins, P. J. & Donald, A. M. (1995). *The influence of amylose on starch granule structure*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 17(6): 315-312.
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus: the major producer of aflatoxin*. *Molecular Plant Pathology*. 8(6): 713-722.
- Lim, H. C., & Shin, H. S. (2013). *Fed-Batch Cultures*. New York: Cambridge University Press.
- Link, H. F. (1809). *Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin*. 3(1): 3-42.
- Luedeking, R., & Piret, E. L. (1959). *A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH*. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*. 1(4): 393-412.
- MacCabe, A. P., Miró, P., Ventura, L., Ramón, D. (2003). *Glucose uptake in germinating Aspergillus nidulans conidia: involvement of the CreA and SorA genes*. *Microbiology*. 149:2129-2136.
- Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., Mach, R. L. (2010). *D-Xylose as a Repressor or Inducer of Xylanase Expression in Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(6): 1770-1776.
- Makita, T., Katsuyama, Y., Tani, S., Suzuki, H., Kato, N., Todd, R. B., Hynes, M. J. *et al* (2009). *Inducer-dependent nuclear localization of a Zn(II)2Cys6 transcriptional activator, AmyR, in Aspergillus nidulans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 73(2): 391-399.
- Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme kinetics: A modern approach*. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey.
- Margelis, S., D'Souza, C., Small, A. J., Hynes, M. J., Adams, T. H. & Davis, M. A. (2001). *Role of Glutamine Synthetase in Nitrogen Metabolite Repression in Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*. 183(20): 5826-5833.

- Mazzani, C., Borges, O., Luzón, O., Barrientos, V. & Quijada, P. (1999). *Incidencia de Aspergillus flavus, Fusarium moniliforme, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela*. Fitopatología Venezolana 12(1): 9-13.
- Medina, M. L., Haynes, P. A., Breci, L. & Francisco, W. A. (2005). *Analysis of secreted proteins from Aspergillus flavus*. Proteomics. 5: 3153-3161.
- Mellon, J. E., Cotty, P. J., & Dowd, M. K. (2007). *Aspergillus flavus hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization*. Applied Microbiology and Biotechnology. 77: 497-504.
- Miller, G. L. (1959). *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry. 31(3): 426-428.
- Monod, Jacques (1949). *The growth of bacterial cultures*. Annual Review of Microbiology. 3:371-394.
- Murakoshi, Y. Makita, T., Kato, M., Kobayashi, T. (2012). *Comparison and characterization of α -amylase inducers in Aspergillus nidulans based on nuclear localization of AmyR*. Applied Microbiology and Biotechnology. 94: 1629-1635.
- Sistema de Información de Biodiversidad (2016). *Aspergillus flavus*. Administración de Parques Nacionales. Obtenido de <http://www.sib.gov.ar/taxonomia/genero/aspergillus>
- Nahas, E. & Waldemarin, M. M. (2002). *Control of amylase production and growth characteristics of Aspergillus ochraceus*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 44(1): 5-10.
- Nakamura, T., Maeda, Y., Tanoue, N., Makita, T., Kato, M., Kobayashi, T. (2006). *Expression profile of amylolytic genes in Aspergillus nidulans*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 70(10): 2363-2370.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Okafor, N. (2007). *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Boca Raton, FL: Science Publishers.
- Osharov, N. & Hay, G. (2000). *Conidial Germination in Aspergillus nidulans Requires RAS Signaling and Protein Synthesis*. Genetics. 155(2): 647-656.
- Palomares R., J. A. (2007). *Producción secuencial de enzimas degradadoras de polisacáridos por cepas de Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus creciendo en sustratos complejos*. UNAM, México D.F.: Tesis.

- Pedersen, H., & Nielsen, J. (2000). *The influence of nitrogen sources on the alpha-amylase productivity of Aspergillus oryzae in continuous cultures*. Applied Microbiology and Biotechnology. 53: 278-281.
- Pedersen, H., Beyer, M., & Nielsen, J. (2000). *Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivations by an industrial of Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology. 53:272-277.
- Petersen, K. L., Lehmbeck, J., & Christensen, T. (1999). *A new transcriptional activator for amylase genes in Aspergillus*. Molecular and General Genetics. 262: 668-676.
- Pita M., M. L. (2006). *Maíz y Nutrición*. ILSI Argentina.
- Prathumpai, W., McIntyre, M. & Nielsen, J. (2004). *The effect of CreA in glucose and xylose metabolism in Aspergillus nidulans*. Applied Microbiology and Biotechnology. 63: 748-753.
- Rajoka, M. I. & Yasmeen, A. (2005). *Induction, and production studies of a novel glucoamylase of Aspergillus niger*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21:179-187.
- Reddy, N. S., Nimmagadda, A., Sambassiva Rao, K. R. S. (2003). *An overview of the microbial α -amylase family*. African Journal of Biotechnology. 2(12): 645-648.
- Robledo, M. de L., Marín, S.. & Ramos, A. J. (2001). *Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el estado de Nayarit (México)*. Revista Iberoamericana de Micología. 18: 141-144.
- Roy, P., Lockington, R. A., & Kelly, J. M. (2008). *CreA-mediated repression in Aspergillus nidulans does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localisation or degradation of CreA*. Fungal Genetics and Biology. 45(5): 657-670.
- Ruijter, G. J., & Visser, J. (1997). *Carbon Repression in Aspergilli*. FEMS Microbiology Letters. 151: 103-114.
- Saldaña D, B. L. (2009). *Actividad Pectinolítica en Esporas y Micelio de Aspergillus en Diferentes Etapas de Desarrollo*. UNAM, Mexico, D.F.: Tesis Maestría.
- Scazzocchio, C., Gavrias, V., Cubero, B., Panozzo, C., Mathieu, M., Felenbok, B. (1995). *Carbon catabolite repression in Aspergillus nidulans - a review*. Canadian Journal of Botany. 73: 160-166.
- Strauss, J., Horvath, H. K., Abdallah, B. M., Kindermann, J., Mach, R. L., Kubicek, C. P. (1999). *The function of CreA, the carbon catabolite repressor of Aspergillus*

- nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Molecular Microbiology*. 32(1): 169-178.
- Szabó, I. J., Johansson, G., & Görán, P. (1996). *Optimized cellulase production by Phanerochaete chrysosporium: control of catabolite repression by fed-batch cultivation*. *Journal of Biotechnology*. 48: 221-230.
- Tani, S., Katsuyama, Y., Hayashi, T., Suzuki, H., Kato, M., Gomi, K., Kobayashi, T. *et al.* (2001). *Characterization of the amyR gene encoding a transcriptional activator for the amylase genes in Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*. 39: 10-15.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2003). *Starch - composition, fine structure and architecture*. *Journal of Cereal Science*. 39: 151-165.
- Tester, R. F., Qi, X., & Karkalas, J. (2006). *Hydrolysis of Native Starches with Amylases*. *Animal Feed Science and Technology*. 130: 39-54.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. *et al.* (1995). *The Aspergillus PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH*. *The EMBO Journal*. 14(4): 779-790.
- Torres, N. V., Riol-Cimas, J. R., Wolschek, M., Kubicek, C. P. (1996). *Glucose transporters by Aspergillus niger: the low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentration*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44: 790-794.
- Trinci, A. P. J. (1969). *A Kinetic Study of the Growth of Aspergillus nidulans and Other Fungi*. *Journal of General Microbiology*. 57: 11-24.
- vanKuyk, P. A., Benen, J. A. E., Wösten, H. A. B., Visser, J. & de Vries, R. P. (2011). *A broader role for AmyR in Aspergillus niger: regulation of the utilisation of D-glucose or D-galactose containing oligo- and polysaccharides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93: 285-293.
- van Suijdam, J. C., Kossen, N. W., & Paul, P. G. (1980). *An inoculum technique for the production of fungal pellets*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 10: 211-221.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., Highton, G. (2001). *Industrial Microbiology: An introduction*. London: Blackwell Science Ltd.
- Wei, H., Vienken, K., Weber, R., Bunting, S., Requena, N., Fischer, R. (2004). *A putative high affinity hexose transporter, hxtA, is induced in vegetative hyphae upon*

starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. Fungal Genetics and Biology. 41: 148-156.

Wolf-Márquez, V. E., Garcia-Garcia, E., Aguilar-Osorio, G., Martínez-Trujillo, M. A. (2015). *Batch and Pulsed Fed-Batch Cultures of Aspergillus flavipes FP-500 Growing on Lemon Peel at Stirred Tank Reactor.* Applied Biochemistry and Biotechnology. 177: 1201-1215.