



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Producción de xilanasas y feruloilesterasas por cepas autóctonas de *Aspergillus* utilizando nejayote como fuente de carbono

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

I. Q. Karla Montserrat González Reyes

TUTOR

Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Arturo Navarro Ocaña
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Mayo 2019



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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E de la Facultad de Química, UNAM, bajo la tutoría del Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero por parte de CONACyT (Beca de Maestría No. 322798) y del "Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP).

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia
Facultad de Química, UNAM

VOCAL: Dra. Carmina Montiel Pacheco
Facultad de Química, UNAM

VOCAL: Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

VOCAL: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Facultad de Química, UNAM

VOCAL: Dr. Francisco Ruíz Terán
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Arturo Navarro Ocaña
Facultad de Química, UNAM

ASESOR

Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

SUSTENTANTE

I.Q. Karla Montserrat González Reyes

AGRADECIMIENTOS

Sigo sin creer que me encuentro escribiendo estas palabras, de un trabajo que varias veces pensé que no terminaría. No puedo dejar de agradecer a la vida por permitirme lograr un objetivo más y por todas las lecciones que me ha obligado a aprender durante todo éste tiempo.

A la UNAM y la Facultad de Química, por todas las enseñanzas y oportunidades que, al día de hoy, me siguen proporcionando, espero algún día poder devolver a esta Casa de Estudios todo lo que me ha brindado.

Gracias al Dr. Guillermo Aguilar por su infinita paciencia, por su tiempo y dedicación a este ingeniero químico que no tenía idea de qué era el micelio. Fue un honor trabajar con usted, agradezco todas las enseñanzas, sobre todo las no sólo académicas, que ha compartido conmigo.

Con todo mi amor a Alejandro y Victoria, mi esposo e hija; ustedes son uno de los motivos de todo en mi vida, de la finalización de este proyecto, gracias por todo su amor, por creer en mí e impulsarme en todo momento.

Con especial dedicación a mi papá, Víctor, siempre has sido un gran ejemplo de perseverancia y me enseñaste lo importante del deber cumplido. Hoy concluyo este trabajo gracias a ti.

A Irma, mi mamá y Abi, mi abuela, gracias por enseñarme el verdadero significado del amor incondicional, del apoyo y del cuidado; soy muy afortunada de tenerlas en mi vida.

A mi hermanos, Sandy y Yayo, han sido mis compañeros de vida y maestros de la infancia. Gracias por permitirme maleducar a sus retoños.

Gracias a todos los compañeros del laboratorio 312 que siempre brindaron su tiempo para el aprendizaje y la convivencia: Brenda, María, Michelle, Diana, Mariana, Rafael; sería un placer trabajar con ustedes nuevamente.

Con especial cariño a todos mis amigos, que me han acompañado en todas las aventuras y uno que otro desacierto: Mariana, Óscar Cortés, Óscar Sánchez, Ángel, Pedro, Víctor, Vero Quintero, Marisol, Norma, Juan, Esteban y a Carlitos por las últimas adecuaciones a éste trabajo. Aunque a veces nos frecuentamos poco, son parte importante de mi vida. ¡Gracias por estar!

A la Dra. Marina Gavilanes, gracias por todo, no tengo palabras para expresar lo importante que es en mi vida.

Finalmente, a los miembros del Jurado por las aportaciones a éste trabajo, comentarios y sugerencias.

A todas las personas que han compartido conmigo su tiempo y su vida... ¡gracias!

Karla

“Para tener éxito, la planificación sola no es suficiente.

Uno debe improvisar también.”

Isaac Asimov

CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....	3
CAPÍTULO 1.....	4
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
CAPÍTULO 2.....	6
INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 3.....	8
ANTECEDENTES	8
▪ La pared celular de plantas.....	8
▪ El género <i>Aspergillus</i>	11
▪ Enzimas degradadoras de la pared celular de plantas.....	11
▪ Regulación genética de las enzimas degradadoras de pared celular en <i>Aspergillus</i>	14
▪ Aplicaciones de xilanasas y feruloilesterasas de <i>Aspergillus</i>	16
▪ Uso del nejayote para la producción de xilanasas y feruloilesterasas.....	18
CAPÍTULO 4.....	19
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	19
CAPÍTULO 5.....	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
▪ Objetivo general	20
▪ Objetivos Particulares.....	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
▪ Selección de la cepa de <i>Aspergillus</i>	20
▪ Diseño del medio de cultivo utilizando nejayote.....	21
▪ Comparación de la producción enzimática con cepas de colección.....	21
▪ Identificación de las enzimas producidas.....	21
CAPÍTULO 6.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
▪ Microorganismos	22
▪ Determinación del crecimiento de diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> en medio sólido	23
▪ Determinación de crecimiento de diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> en nejayote.	24
▪ Determinación de sólidos sedimentables del nejayote.....	24
▪ Producción de las enzimas en medio líquido	24

▪ Determinación de azúcares reductores.....	24
▪ Determinación de actividades enzimáticas en filtrados enzimáticos	25
▪ Determinación de ácido ferúlico por cromatografía en capa fina.....	25
▪ Concentración de filtrado enzimático por ultrafiltración.	25
▪ Concentración por precipitación con sulfato de amonio y liofilización.	26
▪ Purificación de las enzimas producidas	26
▪ Pretratamiento de las fracciones enzimáticas provenientes de la cromatografía para electroforesis SDS-PAGE.	26
▪ Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE	26
▪ Identificación por espectrometría de masas.....	27
CAPÍTULO 7.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
▪ Selección de la cepa de <i>Aspergillus</i>	28
▪ Diseño del medio de cultivo utilizando nejayote	35
▪ Comparación de la producción enzimática con cepas de colección.....	51
▪ Identificación de las enzimas producidas.....	55
CAPÍTULO 8.....	60
RESUMEN DE RESULTADOS.....	60
CONCLUSIONES.....	61
REFERENCIAS.....	62
ANEXO.....	69

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Arreglo de los polisacáridos en la pared celular de células vegetales	8
Figura 2. Representación esquemática del xilano.....	9
Figura 3. Representación estructural de la lignina	9
Figura 4. Representación del ácido ferúlico en la estructura de polisacáridos	10
Figura 5. Enzimas degradadoras del xilano	13
Figura 6. Esquema de la regulación genética de <i>faeA</i>	16
Figura 7. Registros fotográficos de las cepas con capacidad de crecimiento en etilferulato como única fuente de carbono ..	32
Figura 8. Actividad xilanolítica en los filtrados enzimáticos de fermentaciones	33
Figura 9. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de fermentaciones	34
Figura 10. TLC para detectar la presencia de ácido ferúlico en nejayote a diferentes pH.....	36
Figura 11. Crecimiento de las cepas seleccionadas de <i>Aspergillus</i> en medio con nejayote a diferentes pH.....	38
Figura 12. Actividad xilanolítica en los filtrados enzimáticos de <i>Aspergillus</i> con diferente fuente de carbono	40
Figura 13. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de <i>Aspergillus</i> con diferente fuente de carbono.....	42
Figura 14. Actividad xilanolítica en los filtrados enzimáticos de <i>Aspergillus</i> a diferente pH inicial de fermentación	45
Figura 15. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de <i>Aspergillus</i> a diferente pH inicial de fermentación ..	46
Figura 16. Fermentaciones con diferente pH inicial inoculadas con la cepa FP160	47
Figura 17. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de fermentaciones con diferente pH inicial	48
Figura 18. Actividad xilanolítica en los filtrados enzimáticos de fermentaciones con diferentes fuentes de nitrógeno	50
Figura 19. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de fermentaciones con diferente fuente de nitrógeno .	51
Figura 20. Crecimiento de cepas de <i>Aspergillus</i> en medio nejayote y salvado de trigo	52
Figura 21. Actividad enzimática en filtrados enzimáticos de fermentaciones inoculadas con diferentes cepas	53
Figura 23. TLC. Detección de ácido ferúlico en filtrados enzimáticos de fermentaciones inoculadas con diferentes cepas ...	54
Figura 24. Rutas metabólicas del ácido ferúlico vía ácido vanílico en <i>A. niger</i>	55
Figura 25. Cromatograma del concentrado enzimático producido por <i>Aspergillus niger</i> FP160	56
Figura 26. SDS-PAGE para identificar por espectrometría de masas.	57
Tabla 1. Cepas del género <i>Aspergillus</i> utilizadas.....	22
Tabla 2. Características macroscópicas de las cepas del género <i>Aspergillus</i>	28
Tabla 3. Crecimiento de diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> en presencia y ausencia de ácido ferúlico.....	30
Tabla 4. Crecimiento de diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> en presencia y ausencia de etilferulato.	31
Tabla 5. Determinación de sólidos sedimentables después de centrifugación en el nejayote.	35
Tabla 6. Características de los medios de fermentación para evaluar la producción de xilanasas y feruloilesterasas.	39
Tabla 7. Actividad de feruloilesterasas en fermentaciones con diferentes valores de pH inicial, detectada por la técnica de Ramírez <i>et al.</i> , 2008.	48
Tabla 8. Características de los medios de fermentación para evaluar el impacto de la fuente de nitrógeno en la producción de xilanasas y feruloilesterasas.	49
Tabla 9. Actividad de feruloilesterasas en fermentaciones con diferentes fuentes de nitrógeno, detectada por la técnica de Ramírez <i>et al.</i> , 2008.	51
Tabla 10. Organización de fracciones colectadas por cromatografía de intercambio iónico para SDS-PAGE.....	57
Tabla 11. Identificación por espectrometría de masas de las proteínas encontradas en las fracciones seleccionadas de la purificación de filtrados libres de celulas de <i>Aspergillus niger</i> FP160 creciendo en medio con nejayote.	58

Capítulo 1

RESUMEN

En busca de una alternativa para la reutilización del agua residual de la nixtamalización llamado nejayote; se determinaron las condiciones necesarias para utilizarlo como medio de cultivo en la producción de enzimas de interés industrial, específicamente xilanasas y feruloilesterasas, utilizando cepas del género *Aspergillus*, mismo que ha sido ampliamente utilizado para este fin.

Inicialmente, se seleccionaron las cepas potencialmente productoras de las enzimas de interés, examinando diferentes cepas de colección y autóctonas. Posteriormente se exploró la capacidad de degradar y asimilar determinados sustratos para su propio crecimiento y se valoró el incremento de la producción de xilanasas y feruloilesterasas en presencia de ácido ferúlico. De esta manera tres cepas autóctonas fueron seleccionadas.

Posteriormente, se probó la adición de nejayote al medio de cultivo en diferentes cantidades. De esta forma se encontró que el nejayote puede ser utilizado como medio de cultivo a una concentración de 75% y que el enriquecimiento con salvado de trigo al 1% mejora la producción de las enzimas de interés. En este momento, de las tres cepas autóctonas previamente seleccionadas, la cepa FP160 de *Aspergillus niger* fue la mejor productora de xilanasas y feruloilesterasas con esta fuente de carbono.

En la determinación del efecto del pH inicial de fermentación y de la fuente de nitrógeno, la mejor producción de xilanasas y feruloilesterasas se obtuvo a pH inicial de 6.8 y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Al comparar la producción obtenida con la producción de las cepas de colección *A. niger* N402 y *A. aculeatus* CBS172.66; se encontró que la producción de la cepa seleccionada es mayor a la de las cepas colección que han sido utilizadas en trabajos de producción de enzimas.

Finalmente, las enzimas de interés fueron parcialmente purificadas por cromatografía de intercambio iónico e identificadas mediante espectrometría de masas. De esta manera se corroboró que las enzimas contenidas en el concentrado enzimático corresponden a una endo-1,4- β -xilanasasa y a una feruloilesterasa tipo A, entre otras enzimas identificadas.

Este proyecto propone una tecnología completa para la reutilización de nejayote que requiere poca inversión de insumos en la adecuación de nejayote y se obtiene como producto de valor agregado un concentrado enzimático de xilanasas y feruloilesterasas con gran potencial para ser probado en procesos industriales.

ABSTRACT

In search of an alternative to reuse the residual water of process nixtamalization called nejayote, it was necessary to determine the appropriate conditions to handling it as a culture medium to produce different enzymes of industrial interest, specifically xylanases and feruloyl esterases, using different strains of the genus *Aspergillus*, which have been widely used for this purpose.

Initially, the strains potentially producing the enzymes of interest were selected; examining different collection and autochthonous strains. Subsequently, the ability to degrade and assimilate certain substrates for their own growth was explored and the increase in the production of xylanases and feruloyl esterases in the presence of specific inducers was evaluated. In this way three autochthonous strains were selected.

Subsequently, different strains were culture with the addition of different amount of nejayote to the culture medium. Moreover, it was founded that culture medium enriched with nejayote to 75% more 1% of wheat bran improved the production of xylanases and feruloyl esterases enzymes. At this time, of the three autochthonous strains previously selected, the FP160 strain of *Aspergillus niger* showed to be the best producer from these two enzymes, using these carbon sources.

Also, it was observed the effect of the initial pH of fermentation and nitrogen source, the best production of xylanases and feruloyl esterases was obtained at an initial pH of 6.8 and ammonium sulfate as a source of nitrogen. When comparing the *A. niger* FP160 production with the obtained by collection strains *A. niger* N402 and *A. aculeatus* CBS172.66; it was found that the production of the selected strain is greater than that of the collection strains that have been used in enzyme production works.

Finally, the enzymes of interest were partially purified by ion exchange chromatography and identified by mass spectrometry. In addition, it was corroborated that the enzymes contained in the enzyme concentrate correspond to an endo-1,4- β -xylanase and to a feruloyl esterase type A, among other identified enzymes.

This project proposes a complete technology to reuse the nejayote that presents low investments of inputs and costs, allowing the obtention of an enzymatic concentrate of xylanases and feruloyl esterases as a value added product with great potential to be tested in industrial processes.

Capítulo 2

INTRODUCCIÓN

En septiembre de 2013, la revista FORBES reportó una tasa de 150% de capacidad de carga en nuestro mundo, es decir, se requiere planeta y medio para subsistir con los recursos que hoy por hoy utilizamos (Montes y Berges, 2013). Por lo anterior, el fortalecimiento de las energías renovables y el máximo aprovechamiento de los recursos naturales son tendencias que están favoreciendo a los ecosistemas en todo el globo terráqueo ya que cuentan con amplia aceptación de la sociedad actual.

Uno de los principales focos de atención en investigación es el aprovechamiento de los residuos agroindustriales a nivel mundial, debido a que son generados constantemente y gran parte de sus constituyentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de interés, situación que prevalece en la actualidad y se prevé que continuará en el futuro.

Las características de los residuos agroindustriales son muy variadas ya que dependen de la materia prima y del proceso que los genera. En México, las tortillas representan el 47% de la ingesta calórica y el 1% de la industria alimenticia nacional (Gargallo, 2001). El método ancestral para preparar la masa y tortilla se conoce como nixtamalización y consiste en una operación de cocción alcalina, remojo y lavado del grano cocido, el cual genera aproximadamente 1.2×10^6 m³/mes de agua residual altamente contaminante, conocido como nejayote (Gutiérrez-Uribe *et al.*, 2010). El nejayote contiene una gran carga de sólidos y de materia orgánica suspendida y disuelta, lo que ocasiona el taponamiento de las alcantarillas y el drenaje; así como un alto contenido de sales de calcio y pH superior de 11 lo cual repercute en la corrosión de las tuberías (López-Maldonado, 2018). Se han implementado y patentado diferentes tecnologías para la recuperación de algunos de sus componentes, sin embargo, la tasa de generación es tan alta que ninguna tecnología ha logrado hacer frente a la disminución del impacto ambiental que provoca.

La reutilización de residuos agroindustriales como sustratos para la obtención de productos de valor agregado a través de procesos microbianos es otra alternativa que no ha sido explorada con este residuo. En este sentido, es viable la producción de enzimas degradadoras de pared celular utilizando nejayote como medio de cultivo, ya que contiene altas cantidades de arabinosilanos y xilanos, además de altas concentraciones de ácidos hidroxicinámicos y compuestos feruloilados, por lo que resulta ser un medio idóneo para inducir la producción de xilanasas y feruloilesterasas (Niño-Medina *et al.*, 2009; Gutiérrez-Uribe *et al.*, 2010).

Las xilanasas y feruloilesterasas forman parte de un gran número de enzimas que actúan colectiva y sinérgicamente para degradar los compuestos de la pared celular de plantas. Estas enzimas son de carácter inducible, reguladas por represión catabólica y se han encontrado en diversos organismos. Las xilanasas se encargan de hidrolizar las cadenas de xilano presentes en la pared celular mientras que las feruloilesterasas se encargan de liberar el ácido ferúlico y diferúlico que están involucrados en el entrecruzamiento de las cadenas laterales del xilano y en la unión a la lignina, por lo que enzimas como las xilanasas y feruloilesterasas son claves en el aumento de la biodegradabilidad de la pared celular de plantas.

Para lograr la producción de estas enzimas se requiere que el microorganismo productor sea capaz de tolerar la presencia de ácidos hidroxicinámicos, que son tóxicos en concentraciones elevadas y que están presentes en el nejayote. En este trabajo se probaron cepas autóctonas del género *Aspergillus* aisladas del medio ambiente; estas cepas presentan considerables ventajas para la obtención de diversos productos microbianos, debido a que desarrollan capacidades naturales para adaptarse a un medio ambiente cambiante y asimilar diversos nutrientes que pueden ser escasos, además de que resisten la competencia por estos últimos con otros organismos en su hábitat natural. Todo lo anterior hace que estas cepas tengan un enorme potencial por aprovechar en un proceso microbiano, gracias a su versatilidad bioquímica y metabólica.

Capítulo 3

ANTECEDENTES

▪ La pared celular de plantas

Los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza son los polisacáridos de la pared celular de las plantas; éstos se dividen en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina (Figura 1).

La mayor proporción corresponde a la celulosa, que consiste en un polímero lineal de residuos de D-glucosa unidos en posición β -1,4 y se localizan en estructuras ordenadas llamadas fibras cuya principal función es asegurar la rigidez de la pared celular.

La hemicelulosa es el polisacárido más heterogéneo y es el segundo más abundante en la pared celular de plantas. El polímero de hemicelulosa más abundante en cereales y en la madera es el xilano, el cual consiste en una cadena central formada por residuos de D-xilosa unidos en posición β -1,4, sustituidos lateralmente por diferentes grupos como acetyl, feruloil, o *p*-coumaroil, además de residuos de L-arabinosa, D-galactosa o ácido glucorónico (Wilkie y Woo, 1977).

Las pectinas son otro grupo de heteropolisacáridos, que consiste en una cadena central de residuos de ácido galacturónico unidos por un enlace α -1,4 en la zona lisa, mientras que en la zona rugosa esta cadena está interrumpida por residuos de ramnosa unidos en posición α -1,2. Las cadenas laterales son largas en esta zona y están formadas principalmente por residuos de L-arabinosa y D-galactosa; dependiendo del origen de la pectina, se puede encontrar ácido ferúlico unido a los residuos terminales de las cadenas laterales.

Los polisacáridos de hemicelulosa y pectina, así como un polímero compuesto de residuos aromáticos llamado lignina, interactúan con las fibras de celulosa creando una estructura rígida que refuerza la pared celular de las plantas. En ocasiones, estos polímeros forman entrecruzamientos unidos por enlaces covalentes limitando el crecimiento celular y disminuyendo la biodegradabilidad de la pared celular (Fry, 1986).

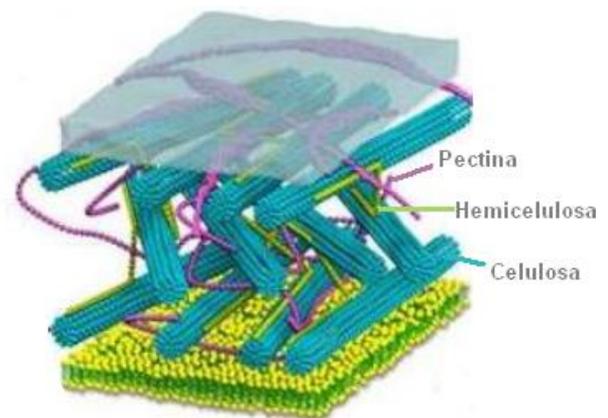


Figura 1. Arreglo de los polisacáridos en la pared celular de células vegetales (<http://5e.plantphys.net>).

- Residuos aromáticos en la pared celular de plantas

Diferentes ácidos aromáticos se encuentran naturalmente en la pared celular de plantas y éstos se dividen en dos clases: los cinamatos y los cinamatos conjugados. El ácido ferúlico es el cinamato con mayor prevalencia en la fibra de la remolacha azucarera y en las cáscaras de cereal. Otros cinamatos son el ácido *p*-cumárico, ácido cafeico y ácido sinápico. El grupo de los cinamatos conjugados consiste de los ácidos feruloilquinicos y *p*-coumaroilquinicos, conjugados de tartárico y málico (Clifford, 2000). Se cree que los compuestos aromáticos juegan un papel importante en la estructura y función de la pared celular de plantas. El ácido ferúlico puede estar unido tanto a la fracción hemicelulolítica (Smith y Hartley, 1983) como a la fracción péctica (Rombouts y Thibault, 1986b) de la pared celular de plantas y es capaz de formar entrecruzamientos entre estos polisacáridos o bien con la lignina (Ishi, 1991; Lam *et al.*, 1994), como se representa en la Figura 4. El entrecruzamiento de los polisacáridos resulta en un incremento en la rigidez de la pared celular, previniendo la degradación por las enzimas de microorganismos, por ejemplo, la degradación enzimática de arabinoxilano se limita a los entrecruzamientos formados por ferúlico (Eraso y Hartley, 1990; Grabber *et al.*, 1998). Por otra parte, la liberación de compuestos feruloilados resulta tóxico para los microorganismos (Aziz *et al.*, 1998) ayudando en la defensa contra fitopatógenos.

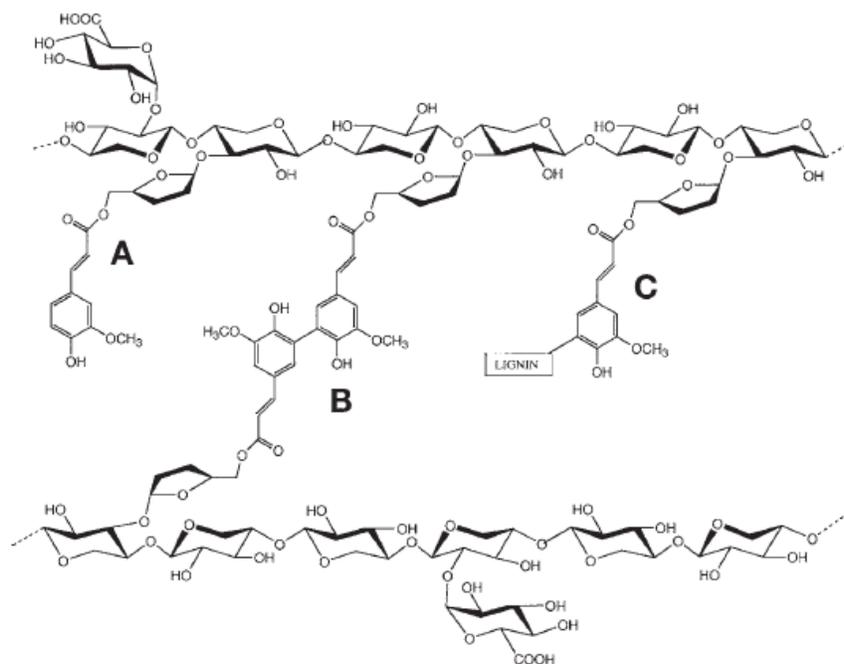


Figura 4. Representación del ácido ferúlico en la estructura de polisacáridos. **A:** Grupo feruloil unido a un residuo de arabinofuranosa. **B:** Ácido diferúlico involucrado en el entrecruzamiento de polisacáridos. **C:** ácido ferúlico involucrado en la unión con lignina (Wong, 2005).

▪ **El género *Aspergillus***

Aspergillus es un género de hongos descrito por Antonio Micheli en su publicación *Nova plantarum* en el año 1727 (Ainsworth, 1976). Este género está formado por una colección de hongos filamentosos que incluyen más de 250 especies (Geiser *et al.*, 2008), todas ellas agrupadas por la estructura de sus esporas asexuales. Los hongos del género *Aspergillus* pertenecen a los primeros organismos fúngicos en ser cultivados en medios artificiales y ser caracterizados bioquímicamente, ya que son de los más comunes en el ambiente (Bennett, 2010). Debido a esto, el número de cepas dentro de las especies es bastante extenso, cambios en la actividad de agua del medio tienen efecto sobre la evolución de la germinación y la esporulación (Gervais *et al.*, 1988; Gervais *et al.*, 2003) así como pequeños cambios en el intercambio de aire o el volumen de medio pueden afectar la morfología del hongo (Okuda *et al.*, 2000) lo cual dificulta su identificación. Para una adecuada identificación y clasificación se deben observar las características morfológicas al incubar cepas en diferentes medios a diferentes temperaturas (Klich, 2006). Además, se utilizan las características bioquímicas como la producción de metabolitos secundarios (Kozakiewicz, 1989).

Este género ha sido ampliamente estudiado y juega un papel significativo en el campo de la biotecnología (Harvey y McNeil, 1994). Diversas especies como *A. niger*, *A. terreus* y *A. oryzae* han sido utilizadas en la producción de metabolitos primarios como ácidos orgánicos, ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos (Ruijter *et al.*, 2002); *A. terreus* se ha empleado en la producción de metabolitos secundarios como lovastatina (Alberts, 1998) y en procesos fermentativos destacan *A. oryzae* y *A. sojae* que se emplean para la obtención de sake y pasta de soya de arroz respectivamente (Abe y Gomi, 2008). Las enzimas excretadas al medio de cultivo por *Aspergillus* se emplean en numerosos procesos industriales, por lo que el valor comercial de estas enzimas es elevado. Algunos ejemplos de éstas son: amilasas para la industria panificadora y cervecera, invertasas para industria confitera, pectinasas para aclaración de jugos y vino, fitasa utilizada como aditivo para alimentación animal y varias proteasas empleadas en fermentaciones de soya, como ablandadoras de carne y producción de cerveza (Bennett, 2010). En términos generales estas enzimas son de carácter inducible, por lo que existe un nivel basal de enzima que degradará su sustrato, generando compuestos de bajo peso molecular que pueden entrar a la célula y efectuar la inducción. En este sentido, la composición de los polisacáridos en el medio de cultivo tiene un efecto directo en la producción de enzimas degradadoras de pared celular.

▪ **Enzimas degradadoras de la pared celular de plantas**

Una degradación eficiente de los heteropolisacáridos presentes en la pared celular de plantas requiere de acciones cooperativas o sinérgicas entre las enzimas que hidrolizan los enlaces entre los residuos de las cadenas centrales o las cadenas sustituyentes presentes en el xilano. Los hongos del género

Aspergillus producen gran variedad de enzimas involucradas en la degradación de pared celular importantes para la industria farmacéutica y alimenticia (de Vries y Visser, 2001)

- **Degradación de la cadena central del xilano**

La hidrólisis enzimática del xilano depende de un grupo de enzimas denominadas xilanasas, incluyen a las endoxilanasas que son capaces de romper el enlace β -1,4 de la cadena central en pequeños oligosacáridos y las β -xilosidasas que los degradan hasta xilosa (Figura 5). Tanto enzimas, como los genes que las codifican, se han caracterizado en diversos organismos. De Vries y Visser (2001) mencionan 29 endoxilanasas que han sido identificadas en hongos del género *Aspergillus*. Aunque se detectan variaciones en la masa molecular y pH óptimo, la principal diferencia entre estas enzimas es su punto isoeléctrico (pI), que se encuentra en un amplio intervalo desde 3.5 (Ito *et al.*; 1992) hasta 9 (Fujimoto *et al.*, 1995). Las endoxilanasas de *Aspergillus* también muestran diferente actividad de degradación de xilano dependiendo de la procedencia del polisacárido.

Las β -xilosidasas también han sido identificadas en hongos del género *Aspergillus*. Este tipo de enzimas muestra alta especificidad por pequeños oligosacáridos de xilosa no sustituidos y como resultado de la actividad de hidrólisis de estas enzimas se liberan residuos de xilosa (van Peij *et al.*, 1997).

- **Degradación de las cadenas sustituyentes**

Las enzimas encargadas de degradar las cadenas sustituyentes de los heteropolisacáridos reciben el nombre de enzimas accesorias. Algunas de estas enzimas actúan sobre los enlaces de la cadena principal y un residuo, mientras que otras rompen enlaces internos o terminales entre los residuos de las cadenas laterales (de Vries y Visser, 2001). A continuación, se describen diferentes enzimas accesorias involucradas en la degradación del xilano que se han encontrado en *Aspergillus niger*.

- Las α -D-xilosidasas liberan residuos de xilosa a partir del xiloglucano, son altamente específicas en cuanto a que sólo actúan sobre enlaces de residuos de xilosa, pero los niveles de actividad difieren con respecto al tipo de enlace glucosídico que pueden hidrolizar (de Vries, 1999).
- Las α -L-arabinofuranosidasas y las arabinoxilano-arabinofuranohidrolasas liberan residuos de arabinosa de las cadenas del arabinoxilano (de Vries, 1999).
- Las α -glucuronidasas extraen los residuos de ácido glucurónico y sus 4-O-metil éteres del esqueleto del xilano. La enzima actúa principalmente en oligómeros de xilosa pequeños y por lo tanto depende de la acción de endoxilanasas (de Vries, 1999).
- Las acetilsterasas y metilsterasas liberan los grupos acetilo y metilo, respectivamente, de las cadenas centrales de los polímeros, xilano y pectina, de la pared celular de plantas (de Vries, 1999).

- Las feruloilesterasas y *p*-coumaroilesterasas hidrolizan los residuos feruloilo y *p*-coumaroilo unidos a los extremos O5 de la arabinosa en xilanos, en las pectinas estos residuos se localizan en posición O3 de la arabinosa y en posición O6 de la galactosa (Williamson *et al.*, 1998).

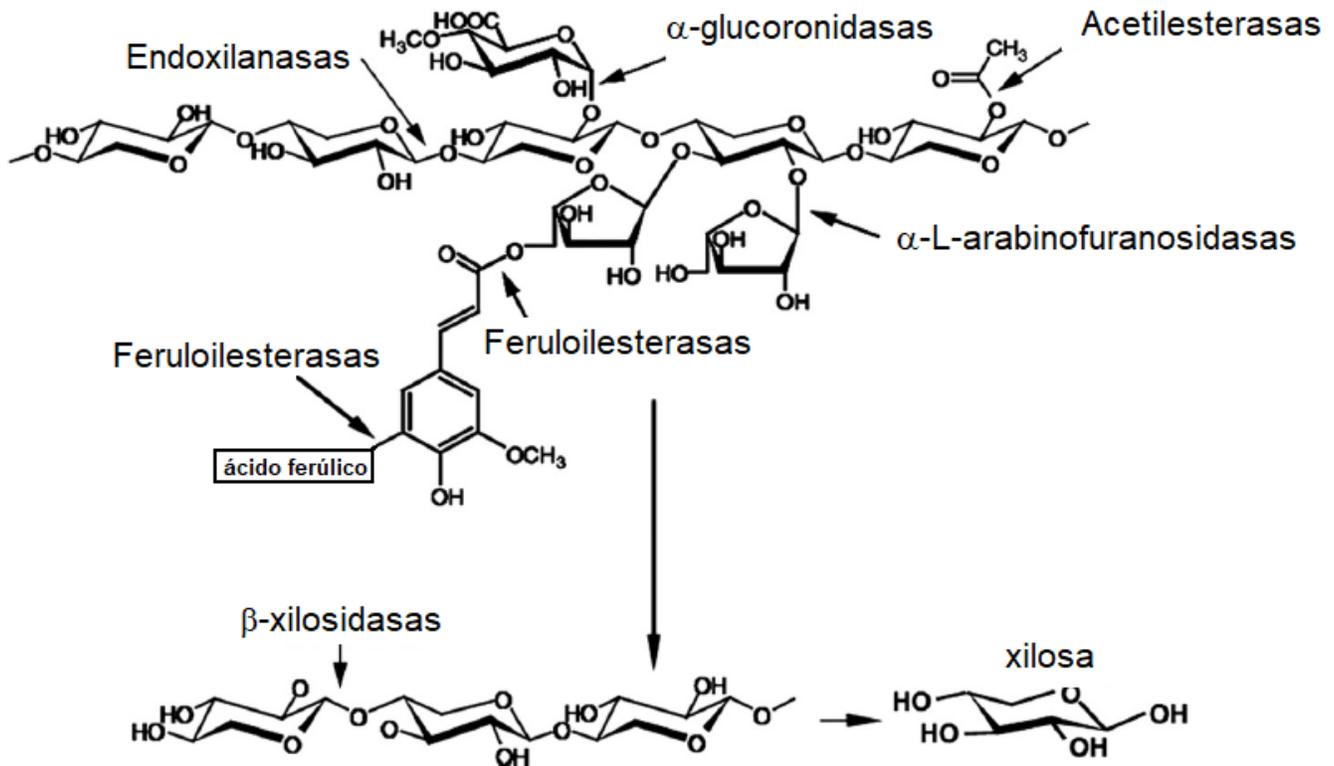


Figura 5. Enzimas degradadoras del xilano (Modificado de Sun *et al.*, 2012).

- Feruloilesterasas de *Aspergillus*

Las feruloilesterasas (FaE) pueden ser encontradas en un gran número de microorganismos (Christov y Prior, 1993; de Vries *et al.*, 1997; Donaghy y McKay, 1997; Faulds y Williamson, 1994; Kroon *et al.*, 1996) cuando crecen en fuentes complejas de carbono como xilano, pectina, salvado de trigo, o remolacha de azúcar. Muchas de estas enzimas son activas con oligosacáridos ferulilados obtenidos del xilano o de la pectina, pero muestran poca o nula actividad en los complejos poliméricos. Las características físicas de éstas enzimas difieren significativamente, con variación en el peso molecular entre 11 (Borneman *et al.*, 1991) y 112 kDa (McCrae *et al.*, 1994); el pI varía en un intervalo de 3.3 (de Vries *et al.*, 1997) y 7.9 (Faulds y Williamson, 1991). Este grupo de enzimas se ha clasificado en cuatro grupos, tipo A, B, C y D; de acuerdo a la actividad que muestran ante sustratos sintéticos y a su similitud en la secuencia de aminoácidos con otras enzimas. Las feruloilesterasas tipo A tienen actividad con

metilferulato (MFA), metil *p*-coumarato (MpCA) y metilsinapato (MSA). Estas FaE tienen secuencias de aminoácidos en el sitio activo similares a lipasas (de Vries *et al.*, 1997) y son capaces de hidrolizar dímeros de ácido ferúlico. Las FaE tipo B son específicas ante MFA, MpCA, metilcafeato (MCA) pero no con MSA; estas enzimas no hidrolizan dímeros de ácido ferúlico y su secuencia de aminoácidos es similar a la familia acetilxilanoesterasas. Las FaE de tipo C y D tienen actividad en los cuatro sustratos hidroxicinámicos; pero las enzimas tipo C no liberan dímeros de ácido ferúlico mientras que las de tipo D sí lo hacen. Las FaE tipo C tienen secuencias similares a la clorogenatoesterasas mientras que las enzimas tipo D tienen secuencia similar a las xilanoesterasas. Se han descrito varias estructuras tridimensionales para éstas enzimas (Wong, 2005). Estudios más detallados se han llevado a cabo en *Aspergillus niger*, organismo en el que se han identificado dos feruloilesterasas, FaEA y FaEB, que están clasificadas en tipo A y C respectivamente. La capacidad de hidrolizar sustratos naturales y liberar ácido ferúlico ha sido enfocada a FaEA, esta actividad ha sido estudiada en pulpa de remolacha de azúcar, salvado de trigo, olote de maíz y cáscara de avena (de Vries *et al.*, 1997; de Vries *et al.*, 2002; Faulds y Williamson, 1995; Yu *et al.*, 2004).

- **Regulación genética de las enzimas degradadoras de pared celular en *Aspergillus***

- **Represión catabólica por fuente de carbono**

La proteína CreA es la principal responsable del sistema de represión catabólica en *Aspergillus* (Dowzer y Kelly, 1991; Ruijter y Visser, 1997). Se ha reportado que la expresión de los genes que codifican para las enzimas degradadoras de pared celular en *Aspergillus* está regulada por CreA, es el caso de las arabinasas (Ruijter *et al.*, 1997), varias endoxilanasas (Fernández-Espinar *et al.*, 1994; Pérez-González *et al.*, 1998; Pinaga *et al.*, 1994; Ruijter *et al.*, 1997) así como β -xilosidasas (Kumar y Ramon, 1996); arabinoxilano-arabinofuranohidrolasas (Gielkens *et al.*, 1997) y feruloilesterasas (de Vries y Visser, 1999).

CreA es una proteína con estructura de dedos de zinc que se une a sitios específicos de un amplio número de genes (Kulmburg *et al.*, 1993). En presencia de sustratos fácilmente metabolizables, como glucosa o fructosa, CreA inhibe o disminuye la expresión de genes blanco. El gen *creA* se expresa fuertemente cuando se agregan fuentes de carbono monoméricas fácilmente asimilables al medio de cultivo y, por otra parte, la proteína CreA rápidamente inhibe la expresión de su propio gen (Strauss *et al.*, 1999).

- **Expresión de genes dependiente de pH**

Al igual que CreA en represión catabólica, PacC es la principal proteína involucrada en regulación genética regulada por pH en *Aspergillus*. A pH alcalino PacC activa genes que son reprimidos a pH

ácido, por lo que PacC tiene funciones duales (Tilburn *et al.*, 1995). En condiciones alcalinas PacC se activa mediante proteólisis en la región C-terminal, lo cual le permite unirse a sitios clave en el promotor de los genes blanco. Específicamente la regulación genética por pH de las enzimas que degradan la pared celular de plantas, no ha sido estudiada a detalle, sin embargo, se han obtenido indicios de una expresión dependiente de pH en los sistemas xilanolítico y pectinolítico (Kojima *et al.*, 1999; Gielkens *et al.*, 1999; MacCabe *et al.*, 1998; Pérez-González *et al.*, 1998; Stewart y Parry, 1981).

- **Regulación genética de las xilanasas.**

Se ha reportado que las enzimas que degradan el xilano en *Aspergillus* se producen cuando el hongo se desarrolla en medio con xilosa, xilano, y otros sustratos complejos que los contengan. Estas enzimas no pueden encontrarse cuando el hongo se desarrolla en medio con diferentes fuentes de carbono monoméricas como glucosa o galactosa, o en fuentes poliméricas como celulosa o pectina. Esto sugiere que los genes que codifican para estas enzimas están controlados por un sistema de regulación general. Varios genes que codifican para enzimas del sistema xilanolítico se han estudiado con respecto a inducción o represión, en todos estos estudios se señala la expresión de estos genes en presencia de xilosa, xilobiosa o xilano (de Graaf *et al.*, 1994; Fernández-Espinar *et al.*, 1994; Kumar y Ramón, 1996; van Peij *et al.*, 1997; Gielkens *et al.*, 1997; Pérez-González *et al.*, 1998). A su vez, la expresión de estos genes se reprime en presencia de glucosa. En *Aspergillus niger* se ha aislado un gen que codifica para un activador transcripcional denominado XInR (van Peij *et al.*, 1998a, van Peij *et al.*, 1998b); La caracterización de esta proteína demostró que es responsable de la expresión de los genes que codifican para enzimas degradadoras del xilano, arabinano y celulosa. Los genes que codifican para dos endoxilanasas (*xlnB* y *xlnC*), una β -xilosidasa (*xlnD*), una arabinoxilano-arabinofuranohidrolasa (*axhA*), una acetilxilanoesterasa (*axeA*), una α -glucoronidasa (*aguA*), una feruloilesterasa (*faeA*) y dos endoglucanasas (*eglA* y *eglB*) están regulados por XInR. Por otra parte, genes que codifican para α -arabinofuranosidasa (*abfB*) β -glucosidasa (*bgIA*) no son regulados por esta proteína. La expresión de genes (hemi) celulolíticos mediados por XInR resulta en la liberación de arabinosa, celobiosa, ácido ferúlico, galactosa, monómeros que pueden estar involucrados en la expresión específica de otros genes.

- **Expresión específica de *faeA***

El gen codificante de feruloilesterasas tipo A de *Aspergillus niger*, *faeA*, ha sido clonado y se ha estudiado su inducción (de Vries *et al.*, 1997). Se han detectado altos niveles de actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de cultivos que contenían arabinoxilanos de salvado de trigo; por otra parte, se detectaron bajos niveles de actividad de FaEA cuando *Aspergillus niger* se cultivó con pectina (de Vries y Visser, 1999). La adición de ácido ferúlico al medio de cultivo preparado con

olote de maíz incrementa los niveles de expresión de FaEA, resultando una mayor actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos (Faulds *et al.*, 1997).

El gen *faeA* se expresa en presencia de compuestos aromáticos con los siguientes sustituyentes: grupo metoxilo en C-3, grupo hidroxilo en C-4, y la posición C-5 sin sustituyente. El sustituyente en posición C-1 es menos importante para la inducción de este gen específico. Este gen es controlado, por lo menos, por tres sistemas regulatorios; *faeA* es coexpresado con otros genes involucrados en la degradación de xilano y está regulado por el activador transcripcional XlnR (Figura 6). Adicionalmente, este gen se regula por represión catabólica mediada por CreA (de Vries y Visser, 1999), y se induce por la presencia de ácido ferúlico en el medio de cultivo (Faulds y Williamson 1999).

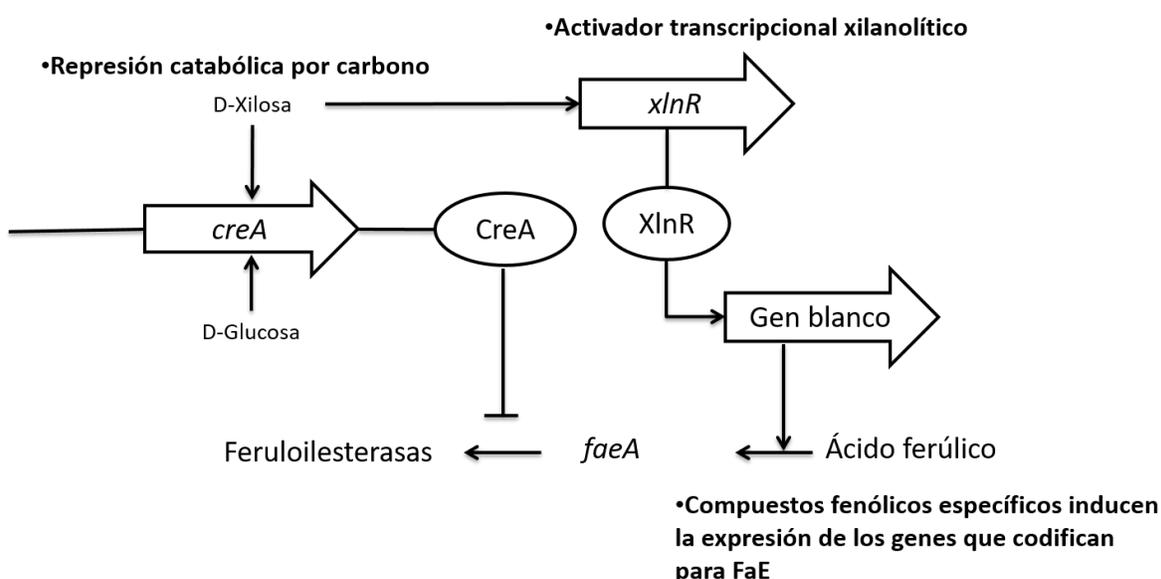


Figura 6. Esquema de la regulación genética de *faeA* (Modificado de de Vries y Visser, 2001).

▪ Aplicaciones de xilanasas y feruloilesterasas de *Aspergillus*

– Aplicaciones de las xilanasas

La heterogeneidad y complejidad del xilano han dado lugar a una amplia gama de xilanasas, las cuales difieren en sus propiedades fisicoquímicas, estructura, mecanismo de acción y especificidad de sustrato (Collins *et al.*, 2005). Debido a que los enlaces entre xilosas no son igualmente accesibles, es necesaria la producción de un sistema enzimático con funciones especializadas para mejorar la degradación del xilano (Wong *et al.*, 1988). Las potenciales aplicaciones de las xilanasas incluyen la bioconversión de materiales lignocelulósicos, así como desechos agroindustriales a productos fermentativos, la clarificación de jugos, la mejora de la consistencia de la cerveza y de la digestibilidad de alimento para animales (Wong *et al.*, 1998). Una de las aplicaciones biotecnológicas más importantes de estas

enzimas es el blanqueamiento de la pulpa de celulosa (Viikari *et al.*, 1994). Las xilanasas también pueden emplearse en los procesos para la obtención del rayón, celofán y varios productos químicos como ésteres de celulosa (acetatos, nitratos, propionatos y butiratos) y éteres de celulosa (carboximetilcelulosa, metilcelulosa y etilcelulosa) todas obtenidas por la disolución de la pulpa y fibras purificadas de otros carbohidratos (Subramaniyan y Prema, 2002). Se ha demostrado que el uso de enzimas xilanólíticas incrementa el brillo de la pulpa y se reduce la cantidad de químicos utilizados para el blanqueo (Madlala *et al.*, 2001). Chipeta *et al.*, 2005 evaluaron preparaciones de xilanasas crudas de *Aspergillus oryzae* NRRL 3485 y *Aspergillus phoenicis* ATCC 13157 y encontraron que utilizando 10 U/g de pulpa se puede reducir un 30% la cantidad de dióxido de cloro utilizado para blanquear la pulpa sin comprometer su brillo. Las xilanasas también pueden mejorar la extracción de café, aceites vegetales y almidón (Wong y Saddler, 1993). La xilosa resultante de la despolimerización del xilano se puede convertir en xilitol, un edulcorante valioso que tiene aplicaciones tanto en industrias farmacéuticas como alimenticias (Sirisansaneeyakul, 1995; Parajó *et al.*, 1998; Soleimani *et al.*, 2006).

- **Aplicaciones de las feruloilesterasas**

Se ha observado un incremento en el interés por la producción de feruloilesterasas debido a sus amplias aplicaciones biotecnológicas, en la industria alimenticia y farmacéutica, en el 2007 se reportó que la cantidad de investigaciones impulsadas por el interés en feruloilesterasas aumentó dramáticamente desde 1990 (Fazary y Ju, 2007). Este aumento se debe al gran número de aplicaciones potenciales en muchos procesos biotecnológicos, en la industria de combustibles (Tabka *et al.*, 2006); alimentos, salud y cosméticos (Kroon y Williamson, 1999); textiles y ropa; pasta de papel (Bajpai 1999; Mayer y Staples, 2002); alimentación y agricultura. También en sus posibles aplicaciones en la obtención de ácido ferúlico a partir de residuos agroindustriales como los producidos por la molienda de cereales, la pulpa del café y de la remolacha azucarera (Bonnin, *et al.*, 2002; Benoit *et al.*, 2006). El ácido ferúlico tiene un potente efecto antioxidante (Chen y Ho, 1997; Kikuzaky *et al.*, 2002) y antiinflamatorio (Murakami *et al.*, 2002) que es ampliamente utilizado en la industria cosmética (Shaku *et al.*, 1987; Egawa *et al.*, 1990) y farmacéutica, además es un precursor de la vainillina y su acceso a través de métodos biotecnológicos es crucial en la búsqueda de la vainillina natural (Priefert *et al.*, 2001). También se ha utilizado como conservador de alimentos utilizando su capacidad antimicrobiana (García *et al.*, 1998a; García *et al.*, 1998b). Aparte de ser explotadas como hidrolasas, se ha demostrado que las feruloilesterasas son un buen catalizador en la síntesis de ésteres fenólicos de azúcar (Mathew y Abraham, 2004; Topakas *et al.*, 2004; Topakas y Christakopoulos, 2004) y también podrían ser utilizadas para activar polímeros de azúcar mediante la adición de derivados fenólicos en los biopolímeros naturales.

▪ **Uso del nejayote para la producción de xilanasas y feruloilesterasas**

El proceso de elaboración de masa para la producción de tortillas a partir de maíz no ha sido modificado desde su implementación artesanal hace aproximadamente unos tres mil años. Este proceso, llamado nixtamalización, consiste en colocar los granos de maíz en una solución alcalina de hidróxido de calcio a una temperatura cercana al punto de ebullición. Tras la cocción, el maíz se deja inmerso en el caldo por un tiempo. La duración del tiempo de cocción y remojo del maíz varía según el tipo de maíz, las tradiciones locales y el tipo de alimentos a preparar. Al término de la cocción se obtiene un caldo alcalino, conocido como nejayote, que contiene altas cantidades de sólidos solubles e insolubles; Pflugfelder *et al.*, (1988) reportan que aproximadamente el 50% de los sólidos contenidos en el nejayote son insolubles y están compuestos por polisacáridos no amiláceos como el arabinoxilano en un 64%, por almidón en un 20% y proteína en un 1.4%. El otro 50% comprende sólidos solubles como proteínas, azúcares, vitaminas y fitoquímicos ricos en fenólicos y carotenoides. Generalmente este caldo de cocción es desechado al drenaje por los pequeños molinos productores de nixtamal, mientras que las grandes empresas sólo tratan este efluente por métodos aerobios y anaeróbicos con el objetivo de disminuir la demanda biológica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO) para su posterior desecho (Gutiérrez-Uribe *et al.*, 2010).

Basado en que los caldos de la nixtamalización se reutilizan tres veces como máximo, un estudio reveló que en México se generan mensualmente alrededor de 1.2 millones de m³ (Salmerón-Alcocer *et al.*, 2003). Este efluente es una de las aguas residuales más difíciles de tratar porque tienen un pH>10, y por lo menos el 80% del hidróxido de calcio utilizado al principio de la cocción, con DBO de 2.69 mg O₂/L (Velasco-Martínez *et al.*, 1997) y DQO de 10,200-20,000 mg/L (Jackson *et al.*, 1988) se clasifica como un contaminante severo. La mayoría de los componentes orgánicos del nejayote provienen de los polisacáridos del pericarpio y la aleurona de grano de maíz que es donde se encuentran considerables cantidades de ácido ferúlico conjugado a la pared celular (Pflugfelder *et al.*, 1988). Debido al proceso de hidrólisis alcalina a la que son sometidos durante la nixtamalización, el ácido ferúlico se libera ligeramente y los arabinoxilanos feruloilados son degradados parcialmente, ampliando la posibilidad de acceder al ácido ferúlico que contienen. En la fracción soluble del nejayote, se pueden encontrar hasta 1.6 mg/g de ácido ferúlico libre, 1.9 mg/g en oligómeros feruloilados de arabinoxilano y hasta 35.4 mg/g de ácido ferúlico en la fracción insoluble del nejayote (Gutiérrez-Uribe *et al.*, 2010), haciendo de este desecho, una opción ideal para producir xilanasas y feruloilesterasas por hongos del género *Aspergillus*.

Capítulo 4

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En México la nixtamalización es un proceso artesanal e industrial requerido para la elaboración de múltiples alimentos a base de maíz, por lo que en nuestro país se generan diariamente cantidades importantes del caldo de cocción residual de nixtamalización llamado nejayote.

Debido a la composición y propiedades de este desecho, puede ser utilizado como medio de cultivo para *Aspergillus* en la producción de enzimas degradadoras de pared celular, específicamente xilanasas y feruloilesterasas, que son de carácter inducible y requieren la presencia de ciertos compuestos para su obtención.

El grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México cuenta con un cepario de diferentes especies de *Aspergillus* que han sido aisladas de diferentes fuentes naturales. En este trabajo se evaluaron algunas cepas autóctonas del género *Aspergillus* tomadas del cepario del grupo de trabajo. La ventaja del uso de estas cepas está en la versatilidad metabólica que pueden presentar debido a las condiciones de desarrollo de las que fueron aisladas, por lo anterior, la selección de cepas productoras de xilanasas que muestren tolerancia al ácido ferúlico y que sean capaces de degradar etilferulato y asimilar ácido ferúlico como única fuente de carbono, así como el acondicionamiento del nejayote para ser utilizado como medio de cultivo serán determinantes para producir xilanasas y feruloilesterasas. Estas enzimas podrán ser utilizadas para la degradación de pared celular y la obtención de ácido ferúlico de ciertos desechos agroindustriales.

Capítulo 5

HIPÓTESIS

Si la producción de xilanasas y feruloilesterasas depende de la presencia de xilano y ácido ferúlico en el medio; y el nejayote contiene arabinoxilanos y ácidos hidroxicinámicos en solución, entonces al utilizar este residuo industrial como medio de cultivo se inducirá la síntesis de estas hidrolasas en cepas autóctonas de *Aspergillus*.

OBJETIVOS

▪ **Objetivo general**

Producir xilanasas y feruloilesterasas utilizando nejayote en el medio de cultivo para hongos del género *Aspergillus*.

▪ **Objetivos Particulares**

- Seleccionar la cepa de *Aspergillus* productora de xilanasas y feruloilesterasas utilizando salvado de trigo como fuente de carbono.
- Diseñar un medio de cultivo utilizando nejayote.
- Comparar la producción de xilanasas y feruloilesterasas de la cepa seleccionada con cepas de colección.
- Identificar las enzimas obtenidas mediante espectrometría de masas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

▪ **Selección de la cepa de *Aspergillus***

- ✓ Recuperar las cepas del género *Aspergillus* del cepario del Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos de la Facultad de Química.
- ✓ Evaluar el posible efecto tóxico del ácido ferúlico o etilferulato en el desarrollo de las cepas en medio sólido.
- ✓ Explorar qué cepas son aptas para crecer en ácido ferúlico o etilferulato como única fuente de carbono en medio sólido.
- ✓ Determinar el efecto de inducción en la producción de feruloilesterasas por la presencia de ácido ferúlico en medio de cultivo.

▪ **Diseño del medio de cultivo utilizando nejayote.**

- ✓ Explorar la presencia de ácido ferúlico en el nejayote.
- ✓ Determinar el crecimiento de las cepas de *Aspergillus* en medio sólido con nejayote.
- ✓ Comparar la producción de xilanasas y feruloilesterasas en medio líquido con nejayote y/o salvado de trigo.
- ✓ Examinar el efecto del pH inicial del medio de cultivo en la producción de enzimas de interés.
- ✓ Indagar el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de enzimas de interés.

▪ **Comparación de la producción enzimática con cepas de colección.**

- ✓ Contrastar el crecimiento en medio sólido con nejayote de dos cepas de colección con la cepa seleccionada.
- ✓ Comparar la producción de xilanasas y feruloilesterasas en medio líquido de dos cepas de colección con la cepa seleccionada.

▪ **Identificación de las enzimas producidas**

- ✓ Obtener un concentrado de xilanasas y feruloilesterasas.
- ✓ Purificar parcialmente el concentrado enzimático mediante cromatografía de intercambio iónico.
- ✓ Identificar las enzimas de interés por medio de espectrometría de masas.

Capítulo 6

MATERIALES Y MÉTODOS

▪ Microorganismos

Se utilizaron once cepas de *Aspergillus*: cinco cepas de colección y seis cepas autóctonas de México pertenecientes al Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos con la denominación FP (Fungal Physiology) que han sido identificadas por su morfología macroscópica y microscópicas en medios específicos y algunas cepas por técnicas moleculares. Se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas del género *Aspergillus* utilizadas.

Clave	Familia	Procedencia
FP120*	<i>A. flavus</i>	Cepario del grupo FP
FP160	<i>A. niger</i>	Cepario del grupo FP
FP250	<i>A. niger</i>	Cepario del grupo FP
FP290	<i>A. niger</i>	Cepario del grupo FP
FP500*	<i>A. flavipes</i>	Cepario del grupo FP
FP700	<i>A. terreus</i>	Cepario del grupo FP
NRRL502	<i>A. parasiticus</i>	Northen Research Regional Laboratories, USA
NRRL334	<i>A. niger</i>	Northen Research Regional Laboratories, USA
NRRL3112	<i>A. awamori</i>	Northen Research Regional Laboratories, USA
N402	<i>A. niger</i>	CBS, The Netherlands
CBS172.66	<i>A. aculeatus</i>	CBS, The Netherlands

*Identificadas por técnicas moleculares.

Las cepas resguardadas por liofilización en cristales de sílica, fueron recuperadas depositando tres cristales de sílica en placas de medio mínimo (NaNO_3 0.6%, KH_2PO_4 0.15%, KCl 0.05%, MgSO_4 0.05%), glucosa al 1% y extracto de levadura al 0.3%; se incubaron a 37°C durante 96 h. Posteriormente se inocularon por estriado en agar papa dextrosa (PDA), para seleccionar colonias. Para mantener las cepas viables, se inocularon placas y se incubaron a 37°C durante 72 h después se conservaron en refrigeración a 4°C, este proceso se repitió cada 6-8 semanas.

- **Cultivo de los microorganismos**

Las cepas de *Aspergillus* se propagaron en PDA por el método de siembra masiva, para lo cual se tomó una pequeña cantidad de cultivo con asa micológica estéril y se inoculó en el centro de la placa presionando ligeramente el asa sobre el agar. Posteriormente con un asa de Drigalsky se extendió en todo el medio. Las cajas se incubaron a 37°C durante 72 h.

- **Siembra por picadura central**

Las cepas de *Aspergillus* se propagaron en PDA por el método de siembra masiva, posteriormente se sembró por picadura en el centro de una placa de PDA. Las placas se incubaron a 37°C y se tomó registro fotográfico a los 4 y 7 días de incubación.

- **Preparación del inóculo: suspensión de esporas**

Para la obtención de la suspensión de esporas se utilizaron placas de PDA inoculadas con las diferentes cepas e incubadas por lo menos 72 h a 37°C; las esporas fueron liberadas mecánicamente mediante un raspado superficial con asa de Drigalsky estéril. Posteriormente fueron recuperadas con 10 mL de solución salina isotónica (NaCl 0.9%, Tween 80 0.005%) estéril. Dicha suspensión se centrifugó durante 5 min a 3350 g, el sobrenadante se desechó con el fin de eliminar el micelio presente. Las esporas se resuspendieron nuevamente en 10 mL de solución salina isotónica mediante agitación. Este lavado se realizó en condiciones asépticas cuantas veces fue necesario hasta obtener un sobrenadante transparente. Finalizando este proceso, las esporas se resuspendieron en 5 mL de solución salina isotónica estéril y se agitó por 2 min en vortex a máxima velocidad. La determinación de concentración de esporas se realizó mediante el método de conteo directo con cámara de Neubauer, para ello se realizó una dilución 1:50 de la suspensión original. A partir de la dilución se colocaron 10 µL en la cámara, se ajustó el microscopio a 40x y se procedió al conteo. Se contaron las esporas contenidas en 16 cuadros que conforman uno de los cuatro cuadrantes. La concentración de esporas de la solución se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = (\# \text{esporas contadas})(4 \text{ cuadrantes})(2500 \text{ factor de cámara})(50 \text{ dilución})$$

▪ **Determinación del crecimiento de diferentes cepas de *Aspergillus* en medio sólido**

- **En presencia de ácido ferúlico y etilferulato**

Se utilizaron placas con 30 mL de medio mínimo con glucosa al 1% y ácido ferúlico al 0.1% y placas con 30 ml de medio mínimo con glucosa al 1% y etilferulato al 0.05%. Se inocularon con 2 µL de suspensión de esporas de cada cepa utilizada y diluida a 5000 esporas/µL y se incubaron a 37°C. Se realizó registro

fotográfico a diferentes tiempos de incubación. Como control se utilizaron placas con 30 mL de medio mínimo y glucosa al 1%.

– **Uso de ácido ferúlico y etilferulato como única fuente de carbono.**

Se utilizaron placas con 30 mL de medio mínimo con ácido ferúlico al 0.1% y placas con 30 mL de medio mínimo con etilferulato al 0.05%. Se inocularon con 2 μ L de suspensión de esporas de cada cepa utilizada diluida a 5000 esporas/ μ L y se incubaron a 37°C. Se realizó registro fotográfico a diferentes tiempos de incubación. Como control se utilizaron placas con 30 mL de medio mínimo y glucosa al 1%.

▪ **Determinación de crecimiento de diferentes cepas de *Aspergillus* en nejayote.**

Se utilizaron placas con 30 mL de medio, preparadas con nejayote al 25, 50, 75 y 100%; cuyo pH fue de 4, 5, 6, 7 y 8, ajustado con H₂SO₄ al 5%. Posteriormente las placas se inoculaban como se describió previamente. Se realizó registro fotográfico a diferentes tiempos de incubación.

▪ **Determinación de sólidos sedimentables del nejayote**

Para determinar los sólidos sedimentables del nejayote se ajustó el pH con H₂SO₄ al 5% a los valores de 12.7, 8, 7, 6, 5 y 4. Se tomaron 50 g de nejayote homogenizado y se centrifugaron a 3350g durante 15 min. El botón obtenido se colocó en papel aluminio y se almacenó a 60°C hasta obtener un peso constante. Las pruebas se hicieron por triplicado.

▪ **Producción de las enzimas en medio líquido**

Las fermentaciones en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo elaborado con 100 mL de medio mínimo y fuente de carbono al 1%; el medio se inoculó con el volumen necesario de suspensión de esporas para tener una concentración final de 1 x 10⁶ esporas/mL de *Aspergillus*. Los matraces se incubaron a 36°C a 300 rpm. Se tomó alícuota del medio de cultivo a 0, 24, 48, y 72 h y se utilizaron filtros de nylon con poro de 0.22 μ m para obtener filtrados enzimáticos libres de células. Las pruebas se realizaron al menos por duplicado.

▪ **Determinación de azúcares reductores**

Los azúcares reductores se determinaron usando el método de Miller, 1959. En tubos de ensayo de 16x150 mm se adicionaron 0.1 mL del filtrado libre de células, se diluyeron con 0.9 mL de agua destilada y se agregó 1 mL de solución DNS (NaOH 1.4%, ácido 3,5-dinitrosalicílico 0.75%, tartrato de sodio y potasio 10%, fenol 0.54%, metabisulfito de sodio 0.59%). El tubo con la mezcla se colocó en baño María a ebullición durante 5 min. Posteriormente el tubo se enfrió adicionando 5 mL de agua destilada a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm. La concentración de los azúcares se calculó utilizando una curva estándar de xilosa.

▪ **Determinación de actividades enzimáticas en filtrados enzimáticos**

- **Actividad de xilanasas**

La actividad xilanólítica se determinó por la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática. En tubos de 16x150 mm se adicionaron 0.5 mL de una solución de xilano de abedul 1% en agua destilada y 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM pH 5, la reacción enzimática se inició agregando 0.1 mL del filtrado enzimático libre de células y se incubaron durante 20 min a 50°C. La reacción se detuvo adicionando 1 mL de solución DNS y se determinaron los azúcares reductores producidos por la degradación del xilano. En el blanco, el filtrado libre de células se agregó después de adicionar la solución DNS. La actividad se expresó en unidades definidas como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de xilosa en las condiciones de ensayo. Las pruebas se realizaron al menos por duplicado.

- **Actividad de feruloilesterasas por medio de la degradación de etilferulato en gel**

La actividad de feruloilesterasas se determinó por la medición de halos de degradación producidos por la actividad enzimática en un gel de 1 mm de grosor preparado con una solución amortiguadora de acetatos 100 mM pH 5, 1.5% agar bacteriológico y etilferulato 0.1%. Se formaron pozos de 7.4 mm de diámetro en los que se colocaron 15 μ L de filtrado enzimático libre de células; se incubó de 6 a 12 h a 37°C en cámara húmeda para observar la difusión y degradación de etilferulato. Finalmente se midieron los halos de degradación formados. La actividad se expresó en unidades definidas como la cantidad de enzima que hidroliza 1 mm de etilferulato en las condiciones de ensayo. Las pruebas se realizaron al menos por duplicado.

▪ **Determinación de ácido ferúlico por cromatografía en capa fina**

La determinación de ácido ferúlico en el medio se realizó por la metodología de cromatografía en capa fina (Sharma *et al.*, 1998). Se utilizó una placa de sílica gel 60F₂₅₄ soportada en aluminio, de 7 cm de ancho y 10 cm de alto. Las muestras se colocaron en la parte inferior a 1 cm del borde de la placa y se pusieron en contacto con 10 mL del eluyente hexano: acetato de etilo: ácido fórmico (40:60:1) en una cámara cromatográfica de 7.4 cm de diámetro. Después de 30 minutos, la placa se observó bajo luz ultravioleta y posteriormente se reveló con una solución de sulfato cérico o DPPH.

▪ **Concentración de filtrado enzimático por ultrafiltración.**

El filtrado enzimático obtenido se concentró 10 veces utilizando una celda de ultrafiltración Amicon empleando una membrana de 10 kDa y una presión de 40 psi con gas inerte (N₂). Antes de descartar el residuo se determinó la actividad de xilanasas y feruloilesterasas para asegurar que las enzimas de interés se hayan retenido en la cámara.

- **Concentración por precipitación con sulfato de amonio y liofilización.**

La muestra a concentrar fue saturada con sulfato de amonio hasta una concentración del 80% para precipitar las proteínas. Se agitó la muestra durante 20 min y se dejó sedimentar durante 24 h a 4°C. La suspensión se centrifugó a 3350 g durante 20 min y se desechó el sobrenadante, el botón obtenido se resuspendió en la décima parte de su volumen original. Este concentrado se dializó contra agua de la tubería municipal durante 30 min. Posteriormente se dializó 2 veces contra agua destilada durante 30 min. Se tomó el total del volumen previamente dializado y se congeló a -70 °C, se liofilizó a 5×10^{-3} mbar y -50 °C por 48 h. El sólido obtenido se resuspendió en una décima parte del volumen inicial con una solución amortiguadora TRIS 1.2% pH 7.5.

- **Purificación de las enzimas producidas**

La purificación de enzimas se realizó utilizando cromatografía de intercambio iónico con columna UNOsphere™ Q pH6.0 en equipo Biologic LP Chromatography System. Se equilibró la columna con solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 6 a un flujo de 1 mL/min, se alimentó 1 mL de la muestra concentrada 100X y se tomó registro durante 30 min. Posteriormente se alimentó NaCl 1M en gradiente de 0 a 50% durante 45 min para eluir la proteína y finalmente se alimentó con NaCl 1M a 100% durante 45 min para eluir las proteínas remanentes. Se recolectaron un total de 45 fracciones de 3 mL cada una, además se determinó la cantidad de proteína, la actividad de xilanasas y feruloilsterasas presente en cada una para la obtención de un cromatograma. A todas las soluciones utilizadas en este procedimiento se les extrajo el aire.

- **Pretratamiento de las fracciones enzimáticas provenientes de la cromatografía para electroforesis SDS-PAGE.**

Las fracciones seleccionadas fueron dializadas contra agua destilada durante 1 h. Posteriormente se dializaron contra solución amortiguadora TRIS 1.2% pH 7.5, dos ciclos de 1 h cada uno. Las fracciones se liofilizaron como se describió anteriormente y los sólidos obtenidos se resuspendieron en 50 µL de solución amortiguadora TRIZMA-BASE 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 1% pH 8.3.

- **Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE**

Se prepararon geles de poliacrilamida 12% de 8x8 cm con SDS para usarlos en condiciones desnaturalizantes. Se tomaron 5 µL de muestra a la cual se adicionó un volumen equivalente de solución amortiguadora TRIS 250 mM, SDS 8%, glicerol 40%, 2-β-mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0.01%, pH 6.8. La electroforesis se desarrolló a intensidad de corriente constante (15 mAmp/gel) con duración aproximada de 1.5 h a través de una unidad de geles verticales de 1.0 mm de grosor Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD Laboratories, Inc.); posteriormente los geles se tiñeron en una solución

de azul de Coomassie R-250 0.125%, metanol 50%, ácido acético 10%, durante 1 h con agitación suave para teñir la proteína; después los geles se destiñeron con solución de ácido acético 10%.

▪ **Identificación por espectrometría de masas.**

La identificación de proteínas por espectrometría de masas se realizó en el laboratorio universitario de proteómica IBT/UNAM, servicios de identificación, caracterización estructural y cuantificación de proteínas a través de la Espectrometría de Masas de alta resolución.

Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol, alquiladas con iodoacetamida (obtenida con Sigma-Aldrich) digeridas "in gel" con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro se realizó con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA)) y Ultramark 1621. En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico, en 120 minutos utilizando una columna capilar (ID 0.75 μm y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nL/min. Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2⁺, 3⁺ y 4⁺ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1⁺, superiores a 5⁺ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos se utilizó la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda restringida contra PDB de UniProt de *Aspergillus* en el Proteome Discoverer1.4.

Capítulo 7

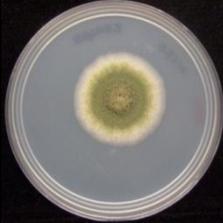
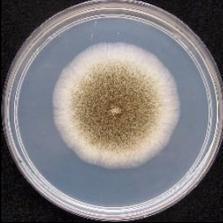
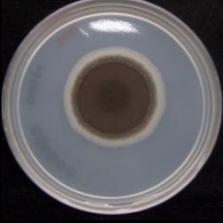
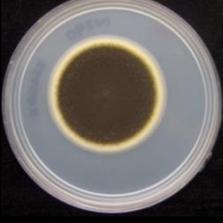
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

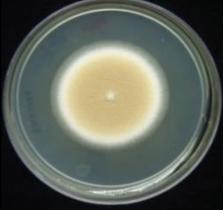
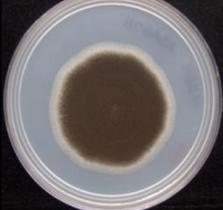
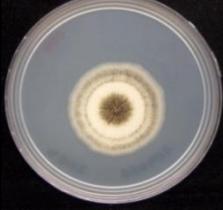
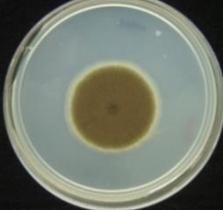
- **Selección de la cepa de *Aspergillus***

- **Recuperación de cepas del género *Aspergillus***

Fue importante verificar las características morfológicas macroscópicas de las cepas evaluadas, con la finalidad de verificar el registro del resguardo y asegurar la activación metabólica del hongo.

Tabla 2. Características macroscópicas de las cepas del género *Aspergillus* recuperadas del cepario del Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos de la Facultad de Química UNAM y cepas de colección. Medio PDA, incubación de 6 días a 37°C.

Cepa	Observaciones	Registro fotográfico
FP120 <i>A. flavus</i>	Desarrollo miceliar denso y aéreo en la parte central, crecimiento radial color verde oliváceo en la parte central y verde amarillento en la periferia, circunferencia blanca y filamentosa, textura aterciopelada.	
FP160 <i>A. niger</i>	Crecimiento ligeramente laxo con hifas aéreas largas, abundante esporulación de color negro pardo en la parte circundante al micelio central, se observó también un halo blanco en la periferia de la colonia. Textura algodonosa.	
FP250 <i>A. niger</i>	Desarrollo compacto con hifas cortas, esporulación color negro pardo con ligeras tonalidades cafés en círculos concéntricos, halo blanco en la periferia de la colonia.	
FP290 <i>A. niger</i>	Desarrollo compacto con hifas cortas, esporulación color negro pardo con ligeras tonalidades amarillas, halo amarillo en la periferia de la colonia.	

Cepa	Observaciones	Registro fotográfico
FP500 <i>A. flavipes</i>	Desarrollo compacto con hifas demasiado cortas, escasa esporulación color blanco, máximo crecimiento de la colonia.	
FP700 <i>A. terreus</i>	Desarrollo compacto con hifas cortas, colonia color café crema en la mayor superficie de la colonia, en blanco, la periferia y la parte central, abundante esporulación con textura algodonosa.	
NRRL502 <i>A. parasiticus</i>	Desarrollo miceliar denso y aéreo en la periferia de la parte central, crecimiento radial color verde en la parte central, circunferencia blanca y filamentosa, textura aterciopelada.	
NRRL334 <i>A. niger</i>	Desarrollo compacto con hifas cortas, la colonia no muestra periferia uniforme, esporulación color negro pardo, halo blanco en la periferia de la colonia.	
NRRL3112 <i>A. awamori</i>	Desarrollo miceliar compacto, en círculos concéntricos con tonalidades en color blanco y café, abundante esporulación con hifas cortas, el micelio en la parte central desarrolló hifas aéreas largas.	
N402 <i>A. niger</i>	Desarrollo compacto con hifas cortas, esporulación color café con ligeras tonalidades amarillas, halo blanco en la periferia de la colonia.	
CBS 172.66 <i>A. aculeatus</i>	Desarrollo compacto con hifas cortas, crecimiento irregular, esporulación escasa en el centro de la colonia con tonalidades color gris, el resto del micelio es de color blanco crema.	

Las cepas de *Aspergillus* fueron recuperadas exitosamente. Se observaron diferencias morfológicas entre las colonias de cepas de diferentes especies, así como entre las colonias de cepas de la misma especie, esto elevó la posibilidad de encontrar cepas capaces de producir xilanas y feruloilesterasas utilizando nejayote.

– **Efecto tóxico por ácido ferúlico y etilferulato en el medio de cultivo.**

Para la evaluación del posible efecto tóxico del ácido ferúlico se determinó la disminución en el diámetro de colonia en las cepas evaluadas en presencia de ácido ferúlico. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Chipley y Urah, (1980) reportan una disminución del 27% en el crecimiento del micelio para *A. flavus* 3145, sin embargo, al comparar el diámetro de colonia en el medio control con el medio adicionado con ácido ferúlico, no se observa un efecto tóxico generalizado. La disminución del diámetro va desde el 2% para la cepa de *A. niger* 402 hasta el 79% de la cepa de *A. awamori* 3112.

Tabla 3. Crecimiento de diferentes cepas de *Aspergillus* en presencia y ausencia de ácido ferúlico.

Cepa de <i>Aspergillus</i>	Control ¹	glu + AF ² (% disminución)	AF ³
	D_{glu} [cm]	D_{glu+AF} [cm]	D_{AF} [cm]
<i>A. niger</i> N402	2.07	2.04 (2%)	0.55
<i>A. flavipes</i> FP500	1.45	1.36 (6%)	1.46
<i>A. niger</i> FP290	2.53	2.22 (12%)	2.08
<i>A. terreus</i> FP700	2.65	2.32 (12%)	2.00
<i>A. niger</i> FP250	3.19	2.75 (14%)	1.19
<i>A. flavus</i> FP120	3.03	2.43 (20%)	2.54
<i>A. niger</i> NRRL334	2.89	2.27 (21%)	2.00
<i>A. niger</i> FP160	3.00	2.12 (29%)	2.17
<i>A. parasiticus</i> NRRL502	2.91	1.82 (37%)	1.07
<i>A. awamori</i> NRRL3112	3.26	0.67 (79%)	0.85

¹ medio con glucosa 1% (glu) 3 días de incubación, ² glucosa 1% y ácido ferúlico 0.1% (glu+AF) 3 días de incubación, ³ Acido ferúlico 0.1% (AF) como única fuente de carbono: 5 días de incubación. D = diámetro de las colonias (cm). Temperatura de incubación 37°C.

Por otra parte, se determinó que todas las cepas tienen la capacidad de utilizar el ácido ferúlico como única fuente de carbono en el medio de cultivo. El diámetro de las colonias fue menor en todas las cepas evaluadas excepto para las cepas *A. niger* N402 y *A. flavipes* FP500. El crecimiento fue difuso y se detectó esporulación en todas las colonias. El registro fotográfico se encuentra en la sección ANEXO (Tabla A1).

También se determinó la capacidad de las cepas de degradar etilferulato, los resultados de éstas pruebas se reportan en la Tabla 4. De todas las cepas evaluadas, sólo cuatro logran degradar el compuesto y utilizarlo como fuente de carbono. Cabe señalar que tres de estas cepas tuvieron un aumento en el diámetro de colonia en presencia de etilferulato, aunque la coloración de las esporas fue menor. Al comparar los diámetros de colonia entre el control y la adición de etilferulato en las demás cepas, se observa una disminución en el crecimiento.

El registro fotográfico se encuentra en la sección ANEXO (Tabla A2).

Tabla 4. Crecimiento de diferentes cepas de *Aspergillus* en presencia y ausencia de etilferulato.

Especie y cepa de <i>Aspergillus</i>	Control ¹	glu + EF ²	EF ³
	D_{glu} [cm]	D_{glu+AF} [cm]	D_{AF} [cm]
<i>A. terreus</i> FP700	2.24	3.38	1.65
<i>A. niger</i> FP160	2.20	1.37	0.63
<i>A. flavipes</i> FP500	1.04	1.48	0.54
<i>A. parasiticus</i> NRRL502	2.24	2.46	0.37
<i>A. flavus</i> FP120	1.89	0.81	nd
<i>A. niger</i> FP250	3.88	0.86	nd
<i>A. niger</i> FP290	2.76	1.29	nd
<i>A. niger</i> NRRL334	3.25	0.65	nd
<i>A. awamori</i> NRRL3112	1.96	0.76	nd
<i>A. niger</i> N402	2.38	1.98	nd

¹ medio con glucosa 1% (glu) 3 días de incubación, ² glucosa 1% y etilferulato 0.05% (glu+EF) 6 días de incubación, ³ Etilferulato 0.05% (EF) como única fuente de carbono: 11 días de incubación. D = diámetro de las colonias (cm). nd = No detectado. Temperatura de incubación 37°C.

Debido a que la degradación de etilferulato es un indicador de que las cepas producen feruloilesterasas, se seleccionaron las cepas que mostraron crecimiento en etilferulato como única fuente de carbono: *A. terreus* FP700, *A. niger* FP160, *A. flavipes* FP500 y *A. parasiticus* NRRL502. Los registros fotográficos se muestran en la Figura 7.

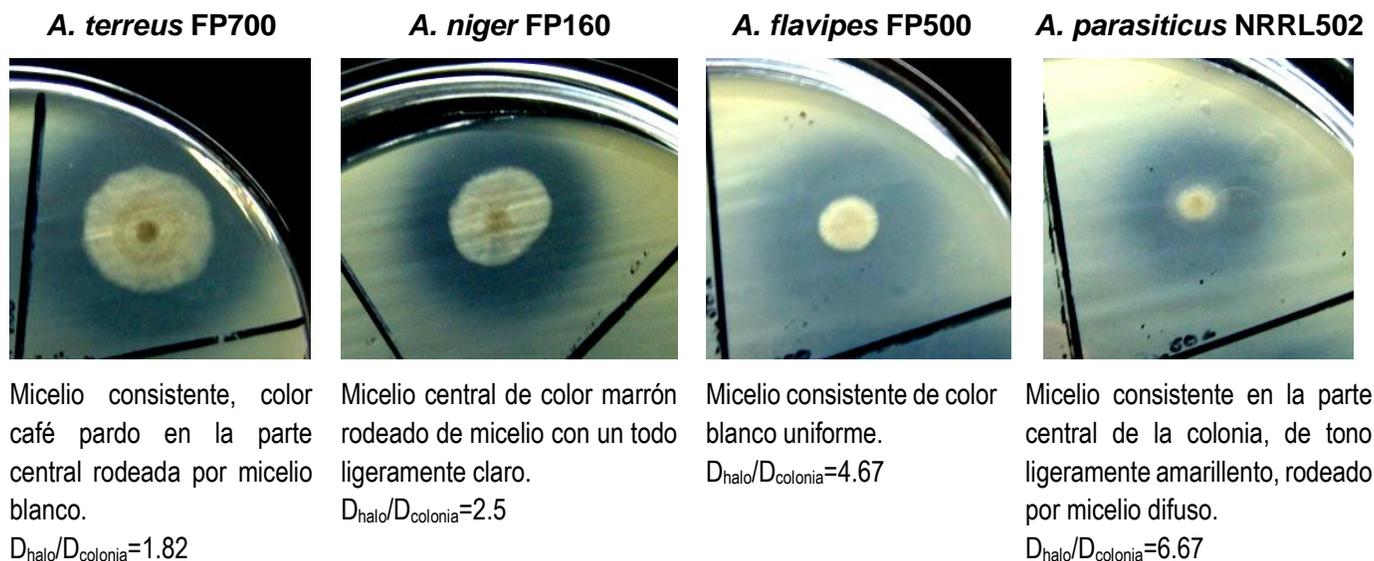


Figura 7. Registros fotográficos de las cepas con capacidad de crecimiento en etilferulato como única fuente de carbono, señaladas en la Tabla 4. Incubación a 37°C durante 11 días.

En los registros fotográficos de la Figura 7, se puede observar el halo formado por la degradación de etilferulato en la periferia de cada colonia. Mediante el índice de degradación ($D_{halo}/D_{colonia}$), se puede considerar que la cepa NRRL502 tuvo mayor capacidad para degradar el compuesto, sin embargo, el halo que se formó fue ligeramente difuso. De la misma forma la cepa FP500 mostró un índice de degradación elevado en comparación con las cepas restantes. La cepa FP700 tiene el menor índice de degradación, pero esta cepa tuvo mayor diámetro de colonia en comparación con las demás, esto sugiere que esta cepa tiene mayor capacidad de asimilación del compuesto degradado. La cepa FP160 tiene un índice de degradación con valor intermedio, cabe resaltar que el halo que desarrolló esta cepa tiene mayor claridad con respecto al halo formado por las demás cepas, la colonia es ligeramente asimétrica y sin coloración en las esporas que escasamente logró desarrollar.

Donaghy *et al.*, (1998), reportaron una técnica para detectar feruloilesterasas basada en la degradación de etilferulato por lo que los resultados de la Figura 7 indican que estas cepas son capaces de producir las hidrolasas de interés.

- **Efecto inductor del ácido ferúlico en medio de cultivo en la producción de feruloilesterasas**

Los principales desechos agroindustriales utilizados como sustratos para la producción de feruloilesterasas son el salvado de trigo y el olote de maíz por sus altas concentraciones de ácido ferúlico, 1% y 3% respectivamente (Hartley y Jones, 1977; Saulnier *et al.*, 1995), en comparación con otros sustratos complejos (Rombouts y Thibault, 1986a). Faulds *et al.*, (1997) reportan la obtención de xilanasas y feruloilesterasas utilizando salvado de trigo como fuente de carbono, y un aumento de actividad de feruloilesterasas al agregar ácido ferúlico al medio de cultivo, de 0.4 U en olote de maíz, hasta 1.7 U en olote de maíz con ácido ferúlico.

Debido a que el salvado de trigo contiene de 0.5 a 1% de ácido ferúlico en xilanos ferulolados (Faulds *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2004) fue seleccionado como fuente de carbono, con la finalidad de determinar el efecto de inducción en la producción de feruloilesterasas al agregar ácido ferúlico al medio de cultivo. Los resultados de la actividad xilanólica evaluada en los filtrados enzimáticos (Figura 8) sugieren que la adición de ácido ferúlico al medio de fermentación estimuló la producción de enzimas xilanolíticas en tiempos de fermentación posteriores a 48 h, desde un 10% para la cepa FP700 hasta un 200% para la cepa FP500. Al determinar la actividad de xilanasas a 24 h de fermentación, se observa que la adición de ácido ferúlico al medio de cultivo provocó una disminución de las enzimas evaluadas. Estos resultados son congruentes con los reportados por Faulds *et al.*, 1997. Esto podría deberse al efecto antibiótico del ácido ferúlico (Chipley y Urah, 1980).

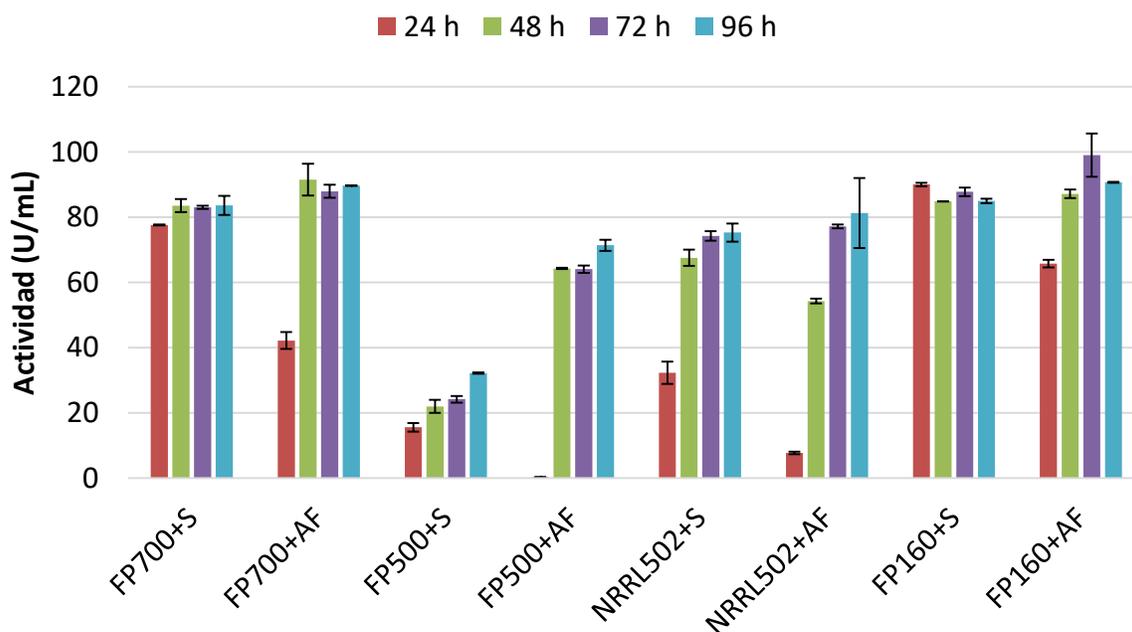


Figura 8. Actividad xilanólica en los filtrados enzimáticos de fermentaciones inoculadas con las cepas de estudio. 300 rpm a 37°C. **S:** Medios con salvado de trigo 1%. **AF:** medios con salvado de trigo 1% y ácido ferúlico 0.1%.

Como se observa en la Figura 9, la presencia de ácido ferúlico en el medio de fermentación logró inducir la producción de feruloilesterasas en todas las cepas evaluadas. Estos resultados son consistentes con los reportes en la literatura en los que se ha observado un incremento de hasta 230% en la producción de estas esterasas en presencia de ácido ferúlico (Faulds *et al.*, 1997).

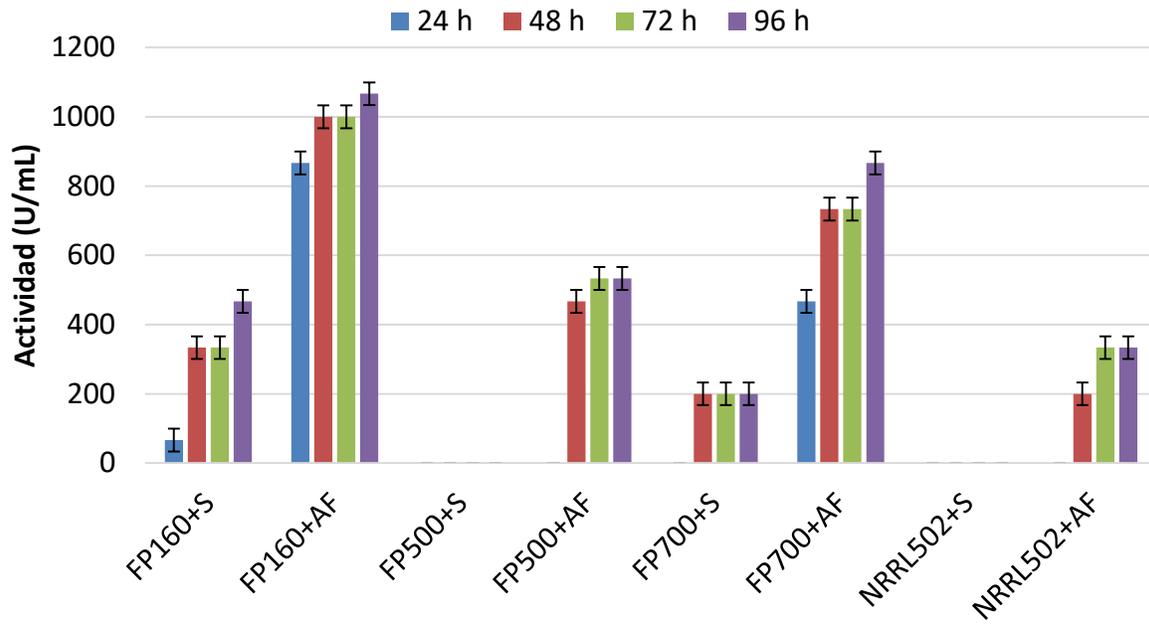


Figura 9. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de fermentaciones inoculadas con las cepas de estudio. 300 rpm a 37°C. **S:** Medios con salvado de trigo (1%). **AF:** medios con salvado de trigo (1%) y ácido ferúlico (0.1%).

El incremento en la producción de estas enzimas es evidente para las cepas FP160 y FP700 que lograron aumentar 200% y 300% respectivamente a las 96 h de fermentación. Para las cepas FP500 y NRRL502, no hubo producción en medio con salvado de trigo, pero es evidente la inducción en la producción de feruloilesterasas. En el caso específico de la cepa NRRL502 la producción en presencia de ácido ferúlico es inferior a la obtenida en todas las demás condiciones, incluso a la obtenida por la cepa FP160 sin ácido ferúlico; por lo que ésta cepa fue descartada en las pruebas posteriores. En general los perfiles de actividad de las enzimas xilanolíticas y de feruloilesterasas es similar, esto se debe a que la regulación de los genes que codifican para feruloilesterasas están ligados a la regulación genética de las enzimas xilanolíticas (de Vries y Visser, 1999); por lo que este comportamiento es congruente con los resultados de la literatura. Las pruebas anteriores fueron de gran importancia para identificar a las cepas que pueden ser utilizadas para la producción de feruloilesterasas, siendo seleccionadas las cepas FP160, FP500 y FP700 correspondientes a *A. niger*, *A. flavipes* y *A. terreus*, respectivamente. Cabe resaltar que las tres cepas seleccionadas fueron aisladas del medio ambiente por el Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos y que, a pesar de que se evaluaron diversas cepas de colección, ninguna mostró resultados equiparables a alguna de las cepas autóctonas evaluadas.

▪ **Diseño del medio de cultivo utilizando nejayote**

La adición de ácido ferúlico al caldo de cultivo con salvado de trigo resulta en un gasto que se puede evitar si se selecciona adecuadamente un residuo como el nejayote. Los ácidos hidroxicinámicos contenidos en él pueden resultar tóxicos para los microorganismos, por lo que un previo acondicionamiento, así como pruebas de crecimiento en nejayote son necesarios para la selección definitiva como fuente de carbono.

- **Nejayote como fuente de carbono**

Las muestras de nejayote utilizado fueron obtenidas de un molino de nixtamalización de la accaldía Milpa Alta, el cual presentó pH 12.7, y contenía sólidos suspendidos, que al paso de aproximadamente una hora sedimentan por gravedad. El primer paso a realizar fue la determinación de la cantidad de sólidos sedimentables, modificando el pH.

Como se muestra en la 5, al acidificar el nejayote los sólidos sedimentables tienden a disminuir, lo que sugiere que se aumenta la solubilidad de los componentes de la fracción insoluble. Al llegar a pH 4 la apariencia de suspensión se modifica y se forma un coloide, con esto, los sólidos sedimentables aumentan.

Tabla 5. Determinación de sólidos sedimentables después de centrifugación a 3350 g en el nejayote.

pH	Sólidos sedimentables (mg/ml)
12.7	3.39 ± 0.016
8	3.21 ± 0.009
7	2.76 ± 0.001
6	1.96 ± 0.011
5	1.93 ± 0.016
4	2.12 ± 0.012

Adicionalmente a la cantidad de sólidos sedimentables, se evaluó la presencia de ácido ferúlico en la fracción soluble del nejayote con la finalidad de garantizar la presencia del compuesto. Esta prueba se realizó antes y después de la esterilización del nejayote para asegurar la integridad del compuesto inductor.

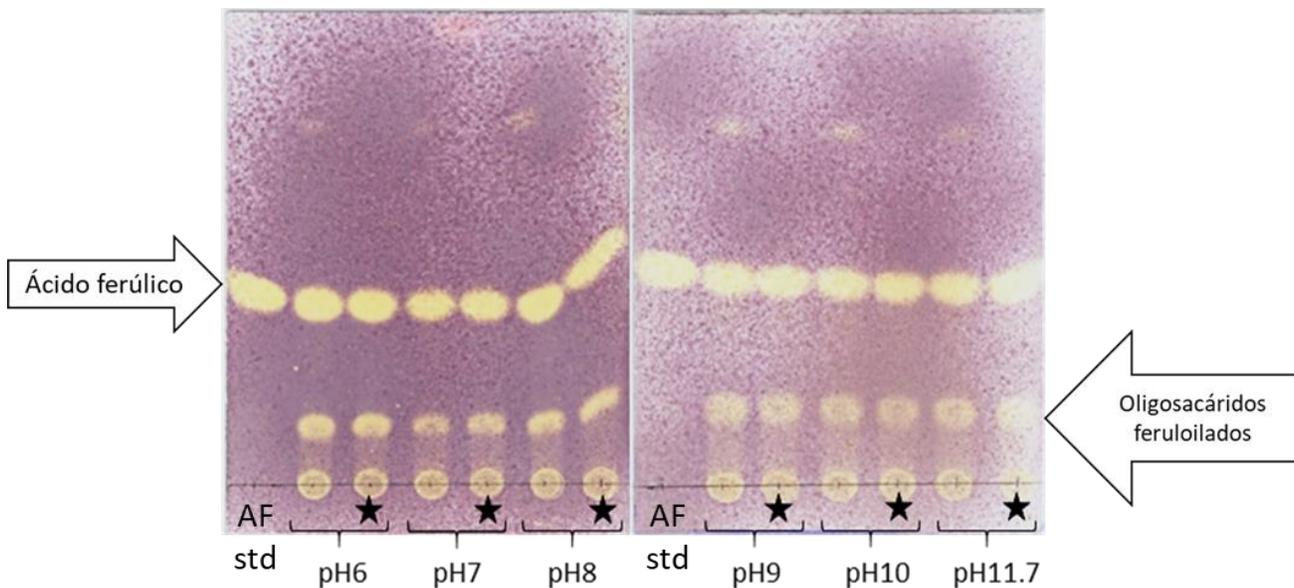


Figura 10. TLC para detectar la presencia de ácido ferúlico en nejayote a diferentes pH. **AF:** ácido ferúlico 0.1%. Las muestras esterilizadas se indican en la figura. ★

Como se observa en la Figura 10, se puede detectar ácido ferúlico en la fracción soluble del nejayote, antes y después del proceso de esterilización a diferentes valores de pH. Lo anterior indica que el nejayote puede ser utilizado como fuente de carbono para la producción de xilanasas y feruloilidasas.

- **Determinación del crecimiento de *Aspergillus* en nejayote**

Aunque se comprobó que las cepas autóctonas elegidas resisten el ácido ferúlico a una concentración de 0.1% en el medio de cultivo, es necesario evaluar su crecimiento en nejayote, ya que el ácido ferúlico no es el único ácido hidroxicinámico contenido en él, y estos componentes tienen actividad antimicrobiana (Aziz *et al.*, 1998).

Para evaluar este efecto se realizaron pruebas de crecimiento en placa, los resultados se encuentran en la Figura 11. Se observa claramente que, las tres cepas fueron capaces de crecer en medio preparado con nejayote. Evaluando los resultados del crecimiento por columna, podemos observar que a 25% de nejayote las cepas mostraron micelio consistente a pH 4, mismo que perdió consistencia y tonalidad al alcalinizar del medio. En la columna correspondiente a 50% de nejayote a pH 4 el diámetro de las tres colonias fue menor al alcanzado a pH 4. Se observó micelio más consistente, de manera similar, las colonias aumentaron su diámetro y el micelio se tornó difuso al aumentar la alcalinidad del medio. Evaluando el efecto de 75% de nejayote se observó que el diámetro de las colonias es más pequeño aún, al aumentar el valor de pH del medio el diámetro de colonia aumentó hasta un pH de 6, cabe mencionar que, a pH de 7, la colonia que corresponde a *A. terreus* FP700, secretó un pigmento de color marrón al medio, comportamiento que repite a pH 8. En la columna de 100% nejayote, a pH 4, la cepa

FP500 (*A. flavipes*) no pudo desarrollarse y las demás cepas exhibieron diámetros pequeños en sus colonias, al aumentar el pH a 5, las tres cepas aumentaron el diámetro de su colonia, también se observó que la cepa FP700 secretó un pigmento, cuya intensidad fue en aumento al incrementar el pH. En cuanto a la cepa FP160, mostró la mayor esporulación a pH 6.

Con base en estos resultados se realizó una selección previa de las condiciones para la producción de xilanasas y feruloilesterasas en medio líquido. Evaluando el diámetro de la colonia y la consistencia del micelio; las condiciones seccionadas fueron 75% nejayote en el medio a pH 6, en estas condiciones los diámetros de FP700, FP500 y FP160 fueron 2.68 cm, 1.22 cm y 4.03 cm, respectivamente.

		Concentración de Nejayote [%]			
		25	50	75	100
pH del medio	4				
	5				
	6				
	7				
	8				

Figura 11. Crecimiento de las cepas seleccionadas de *Aspergillus* en medio con nejayote a diferentes pH. Fotos de 120 h de incubación a 37 °C. **FP700:** Esquina superior izquierda. **FP500:** Esquina superior derecha. **FP160:** Esquina inferior.

- **Comparación de la producción de xilanasas y feruloilesterasas utilizando nejayote y salvado de trigo.**

Se evaluó la producción de xilanasas y feruloilesterasas a 5 condiciones de sustratos diferentes en medio líquido. Se utilizó salvado de trigo como control y salvado de trigo con ácido ferúlico como control de la inducción. Estos resultados se compararon con los obtenidos utilizando nejayote como fuente de carbono. Adicionalmente, se probó la combinación de ambas condiciones agregando salvado de trigo al nejayote; éstas condiciones se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Características de los medios de fermentación para evaluar la producción de xilanasas y feruloilesterasas.

Condición de fermentación	medio mínimo pH 6	nejayote pH6	1% salvado de trigo	0.1% ácido ferúlico
1. Nejayote (N)	25 ml	75 ml	-	-
2. Nejayote + salvado (N+S)	25 ml	75 ml	+	-
3. Salvado (S)	100 ml	-	+	-
4. Salvado + ácido ferúlico (S+AF)	100 ml	-	+	Agregado al inicio de la fermentación
5. Salvado + ácido ferúlico después de 24 h (S+pAF)	100 ml	-	+	Agregado 24h después de iniciada la fermentación

En la Figura 12 se muestran los resultados de la actividad xilanólítica evaluada.

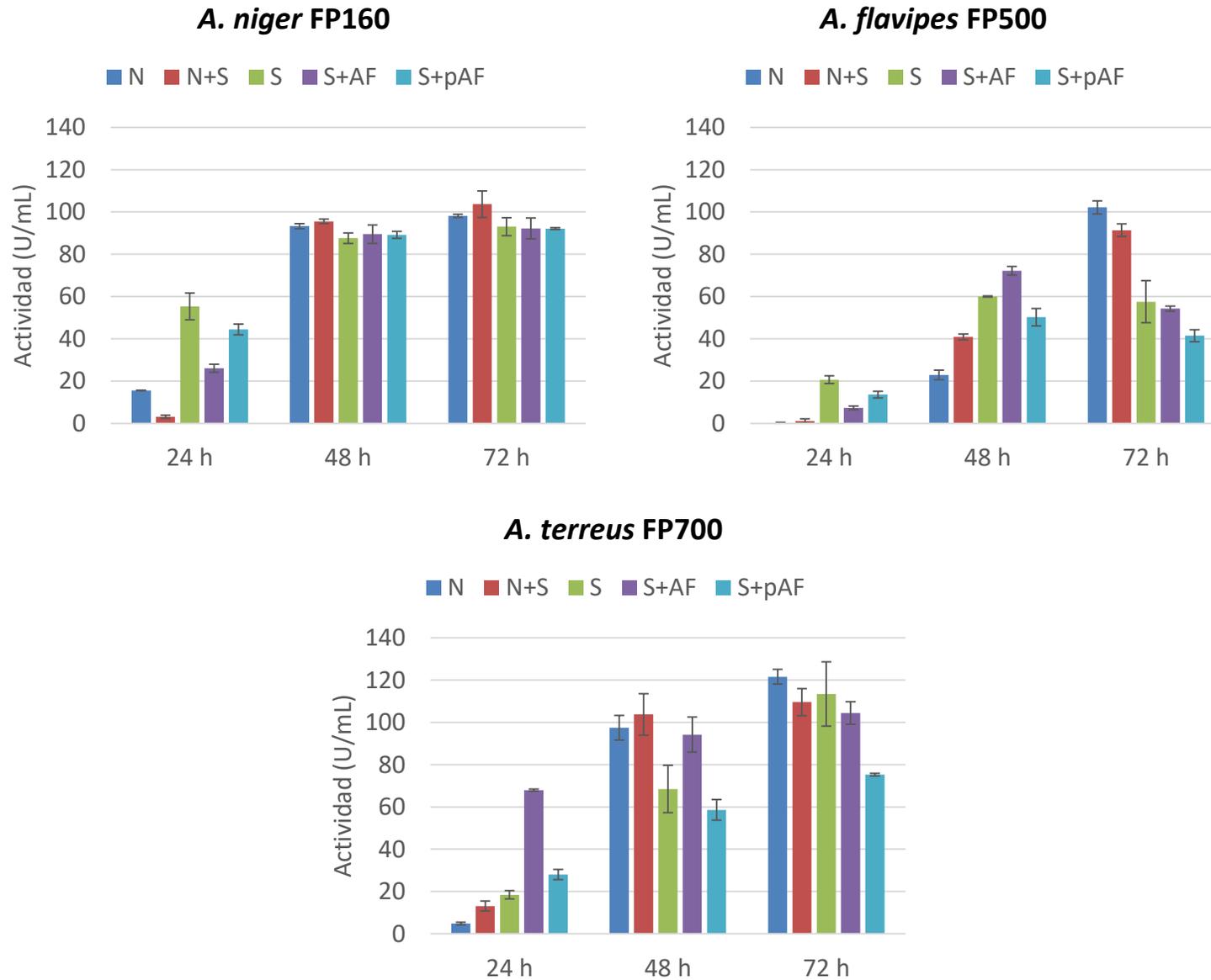


Figura 12. Actividad xilanólítica en los filtrados enzimáticos de *Aspergillus* con diferente fuente de carbono. 300 rpm a 37°C. Cada gráfico corresponde a la actividad de una cepa indicada en la parte superior. **N:** Nejayote; **N+S:** Nejayote + salvado de trigo; **S:** Salvado de trigo; **S+AF:** Salvado de trigo + ácido ferúlico al inicio de la fermentación; **S+pAF:** Salvado de trigo + ácido ferúlico adicionado a 24 h de iniciada la fermentación.

Al revisar la producción de xilanasas de la cepa FP160 a las 24 h se observó el que en el medio control (S) se obtuvo el mayor nivel de actividad seguido por la actividad determinada en el medio con salvado de trigo al que se adicionó el ácido ferúlico en ese momento (S+pAF), éstos resultados son coherentes, ya que no hubo diferencia significativa entre sí. Por otra parte, las tres condiciones restantes, que iniciaron la fermentación con ácido ferúlico disuelto, mostraron menor nivel de actividad de xilanasas, en primer lugar, el control de la inducción (S+AF), seguido por el nejayote sólo (N) y finalmente el nejayote con salvado de trigo (N+S). Estos resultados pueden deberse a que el efecto tóxico del ácido ferúlico retrasa la producción de xilanasas o bien, limita el crecimiento para *A. niger* (Chiple y Uraih, 1980). Este efecto se pierde a las 48 h, ya que los niveles de producción son similares en las condiciones evaluadas, así mismo la mayor producción se obtuvo en el medio preparado con nejayote y salvado de trigo a las 72 h de fermentación, sin embargo, no hay diferencias significativas en la producción de xilanasas para esta cepa.

Analizando los resultados de las fermentaciones de la cepa *A. flavipes* FP500 en los medios preparados con nejayote (N) la actividad de xilanasas se detectó hasta las 48 h de fermentación, durante éste tiempo, las fermentaciones con medio sin nejayote registraron niveles de actividad xilanólítica mayor. Estos valores fueron superados a las 72 h por los filtrados enzimáticos de las fermentaciones con nejayote (N), ya que registraron el doble de actividad xilanólítica que las demás fermentaciones evaluadas. Estos resultados sugieren que, aunque la producción de xilanasas es tardía en los medios con nejayote, se obtiene mayor producción de las enzimas después de 72 h.

Para el caso de *A. terreus* FP700, a las 24 h de fermentación, el control (S) registró mayor actividad xilanólítica comparada con las demás condiciones evaluadas. Después de 72 h las dos fermentaciones con nejayote (N, N+S) en comparación con el control (S) obtuvieron niveles similares de actividad, la producción de xilanasas en nejayote no se vio mejorada con la adición de salvado de trigo al medio de cultivo y no es significativamente diferente a la obtenida con salvado de trigo como fuente de carbono. Cabe resaltar que la producción de la fermentación con nejayote (N) fue superior a la del control de la inducción (S+AF), esto sugiere que el ácido ferúlico, conjugado y libre presente en el nejayote, fue mejor inductor que el reactivo analítico.

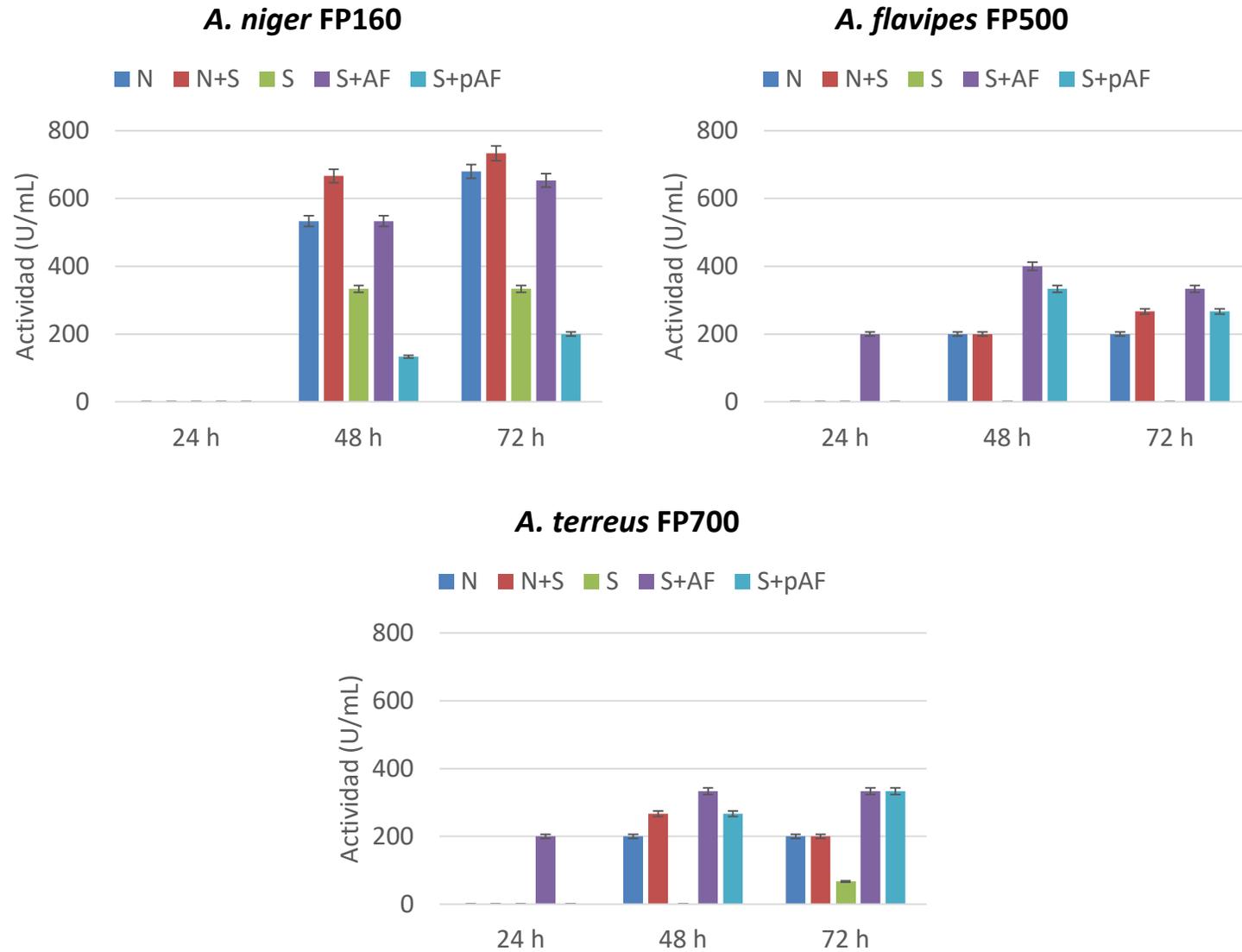


Figura 13. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de *Aspergillus* con diferente fuente de carbono. 300 rpm a 37°C. Cada gráfico corresponde a la actividad de una cepa indicada en la parte superior. **N:** Nejayote; **N+S:** Nejayote + salvado de trigo; **S:** Salvado de trigo; **S+AF:** Salvado de trigo + ácido ferúlico al inicio de la fermentación; **S+pAF:** Salvado de trigo + ácido ferúlico adicionado a 24 h de iniciada la fermentación.

Los resultados de la actividad de feruloilsterasas en los filtrados enzimáticos se encuentran en la Figura 13. La presencia de actividad se detectó hasta las 48 h de fermentación, lo cual podría estar asociado a que de forma inicial las xilanasas degradan el arabinoxilano feruloilado presente en el nejayote o en el salvado de trigo, según sea el caso, para que posteriormente y de manera sinérgica, las feruloilsterasas hidrolicen los enlaces del ácido ferúlico liberándolo al medio de cultivo (Pinaga *et al.*, 1994).

De forma general se observó que la actividad de feruloilsterasas en los filtrados enzimáticos es mayor en las fermentaciones inoculadas con *A. niger* FP 160, comparadas con *A. flavipes* FP500 y *A. terreus* FP 700. Al evaluar los resultados obtenidos en el medio que sólo contiene nejayote (N), se detectaron valores elevados de feruloilsterasas desde las 48 h, estos valores aumentaron ligeramente a las 72 h. Cuando se adicionó salvado de trigo al nejayote (N+S), los valores detectados de la actividad se elevaron un 10% desde las 48 h. Esto podría estar relacionado a que el salvado de trigo, al ser un sustrato insoluble, es utilizado por el hongo como un soporte sólido para lograr un crecimiento más robusto.

En la condición control, donde se evaluó la producción de feruloilsterasas utilizando sólo salvado de trigo (S), se detectó actividad de feruloilsterasas. Sin embargo, los valores fueron menores a los observados en las fermentaciones con nejayote (N) y nejayote con salvado de trigo (N+S). Cuando al salvado de trigo se le adicionó ácido ferúlico (S+AF), los niveles detectados de actividad de feruloilsterasas se elevaron, logrando alcanzar a los niveles detectados con sólo nejayote (N). Finalmente, se evaluó el probable efecto antimicrobiano del ácido ferúlico adicionándolo al medio de cultivo 24 h después de iniciado el proceso de fermentación (S+pAF), la actividad de feruloilsterasas en los filtrados enzimáticos fue menor a las 48 y 72 h.

Evaluando los resultados de la cepa *A. flavipes* FP500, se observó que los niveles de actividad de feruloilsterasas en ambos medios preparados con nejayote (N) y (N+S) fueron similares. Al compararlos con los niveles de feruloilsterasas producidos en el control (S) resultaron ser mayores, sin embargo, al compararlos con la producción de feruloilsterasas en medios preparados con salvado de trigo adicionado con ácido ferúlico fueron menores. Los perfiles de producción descritos fueron similares para la cepa FP700 de *A. terreus*.

Lo anterior indica que para las cepas FP500 y FP700, la producción de feruloilsterasas fue favorecida en medios preparados con salvado de trigo al 1% adicionados con ácido ferúlico. Para la cepa FP160, la producción de feruloilsterasas se ve favorecida en medio de cultivo con nejayote al 75% y salvado de trigo al 1%.

- **Determinación del efecto de pH inicial en la producción de enzimas de interés**

Uno de los parámetros importantes para evaluar es el pH inicial de la fermentación. Se ha reportado que a pH alcalino se activa la expresión de genes específicos y que a su vez se reprimen genes que están activos a pH ácido. Si bien el efecto directo en la producción de enzimas no se ha evaluado, se tienen indicios de una expresión dependiente de pH en el sistema xilanolítico (Tilburn *et al.*, 1995), por lo que la producción de xilanasas y feruloilesterasas podría verse afectada por el pH del medio de cultivo.

Se realizaron fermentaciones en paralelo, utilizando nejayote (75%), medio mínimo (25%) y salvado de trigo (1%), modificando el pH inicial (pHi) de la fermentación. Los valores iniciales fueron de 5.1, 5.4, 6.3, 7.7 y 8.7, se evaluó la producción de xilanasas (Figura 14) y feruloilesterasas (Figura 15) en las fermentaciones inoculadas con las cepas seleccionadas FP160, FP500 y FP700.

Al evaluar la producción de xilanasas en la Figura 14, se encontró un perfil de producción diferente para cada cepa evaluada. En la gráfica correspondiente a *A. niger* FP160 los niveles de actividad se detectaron desde las 24 h y fueron similares a 48 y 72 h, excepto en la fermentación con pHi 8.7 en el que la actividad se apreció hasta las 48 h. La máxima actividad se obtuvo en la fermentación con pHi 5.4 aunque los valores no fueron significativamente diferentes.

En el caso de *A. flavipes* FP500 la actividad de las hidrolasas de cada fermentación fue similar, la producción de xilanasas alcanzó su máximo valor (96 U/mL) a las 72 h de fermentación, siendo este valor menor al obtenido en *A. niger* FP160 (123 U/mL).

En la gráfica de *A. terreus* FP700 se observó una producción sostenida a lo largo de la fermentación, que alcanzó valores similares a *A. niger* FP160, hasta 72 h de fermentación.

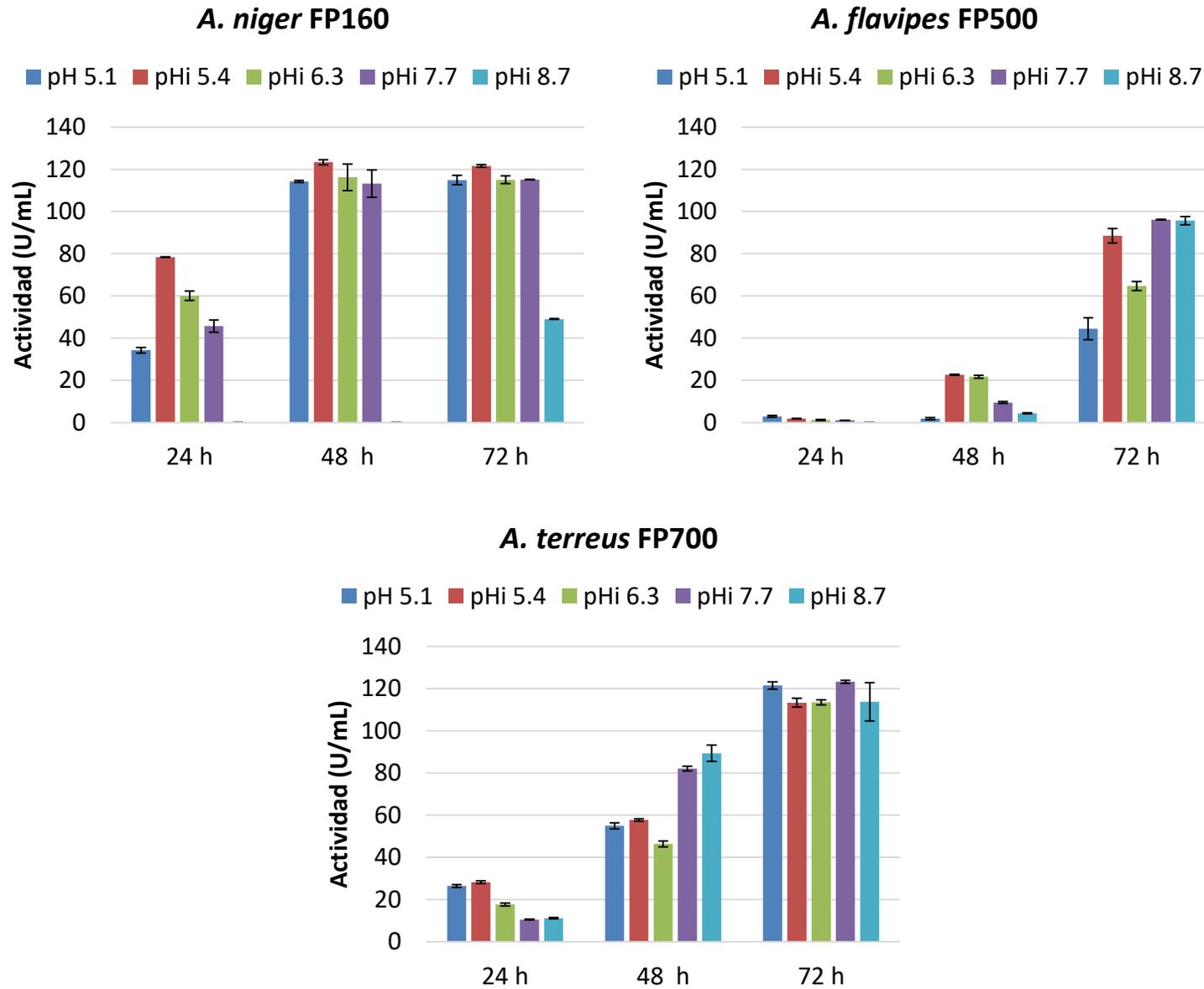


Figura 14. Actividad xilanolítica en los filtrados enzimáticos de *Aspergillus* a diferente pH inicial (pHi) de fermentación. 300 rpm a 37°C. Cada gráfico corresponde a la actividad de una cepa indicada en la parte superior.

Al determinar la actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos se determinó que la cepa que produce mayoritariamente las enzimas de interés corresponde a la cepa *Aspergillus niger* FP160 como se muestra en la Figura 15. Esta cepa produjo buenos niveles de FAE hasta un pH 7.7 ya que en la fermentación con pHi 8.7 no se detectó actividad enzimática. En el caso de *A. flavipes* FP500 a pHi 5.1 sólo se detectó actividad a las 72 h de fermentación, mientras que a pHi 8.7 no se detectó actividad; los valores máximos se obtuvieron a pHi 5.1 y 5.4 aunque no hay diferencia significativa con los resultados en los demás casos. En *A. terreus* FP700 la producción de la enzima de interés se obtuvo en todos los valores de pH evaluados, sorpresivamente la máxima actividad se obtuvo a pH 8.7. Esta cepa produjo sólo el 40% de la producción de *Aspergillus niger* FP160.

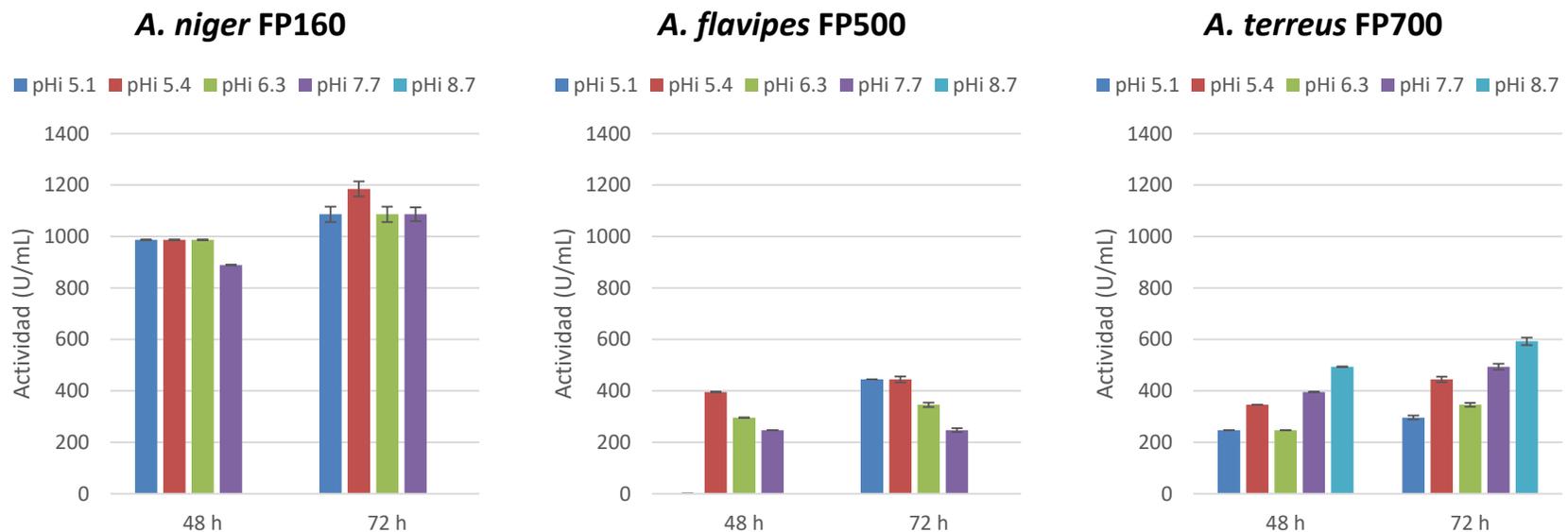


Figura 15. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de *Aspergillus* a diferente pH inicial (pHi) de fermentación. 300 rpm a 37°C. Cada gráfico corresponde a la actividad de una cepa indicada en la parte superior.

Estos resultados evidencian que la cepa FP160 *Aspergillus niger* es la mejor productora de xilanasas y feruloilesterasas en los pH iniciales evaluados, por lo que se seleccionó esta cepa para evaluar la producción de enzimas en medio con nejayote (75%), medio mínimo (25%) y salvado de trigo (1%), esterilizando por separado el nejayote con salvado de trigo y el medio mínimo. Los resultados se reportan en la Figura 16.

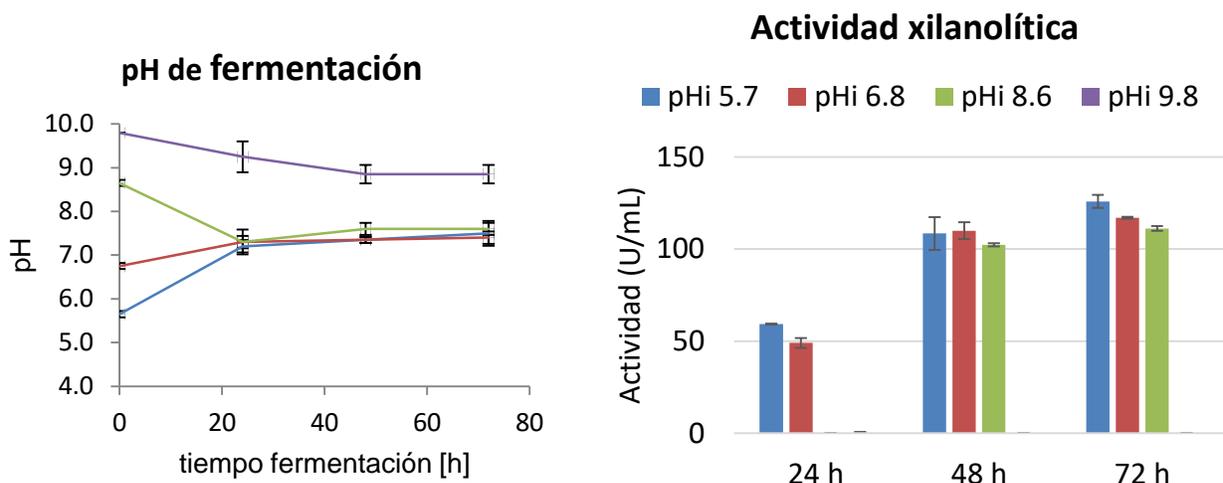


Figura 16. Fermentaciones con diferente pH inicial inoculadas con la cepa FP160. 300 rpm a 37°C **IZQ:** Registro de pH del medio de cultivo. **DER:** Registro de actividad xilanólica en los filtrados enzimáticos a diferente pH inicial (pHi).

Se observa que la cepa de *A. niger* FP160 logró neutralizar el pH a un valor cercano a 7.3, incluso la fermentación pHi 9.8 tiene el mismo perfil sin llegar al valor neutro. Este resultado es interesante ya que aparentemente *Aspergillus niger* FP160 adapta el medio de cultivo a sus necesidades nutricionales durante el crecimiento resultando en esta “neutralización” del medio de cultivo. Estos resultados son similares a los reportados por Chipeta *et al.*, (2008), en los que la producción de xilanasas se afectó por el pH de fermentación, obteniendo la máxima producción a un pH de 7.5, utilizando *Aspergillus oryzae* NRRL 3485.

La producción de enzimas xilanólicas mostrado en la Figura 16 panel derecho, tuvo niveles de actividad similares en las fermentaciones con pHi de 5.7 y 6.8; y a pHi 8.6 hasta las 48 h de fermentación. A pHi de 9.8 no se detectó actividad xilanólica en ninguno de los filtrados enzimáticos evaluados. Los niveles máximos de actividad a las 72 h de fermentación en las tres condiciones iniciales fueron similares, lo que sugiere que a tiempos largos el pH inicial de la fermentación no es un factor de alto impacto. Sin embargo, a las 24 h de fermentación, la actividad de la fermentación con pHi de 8.6 fue indetectable, esto podría deberse a que la cepa FP160 de *A. niger* primero adecua el pH de la fermentación y posteriormente produce las enzimas de interés.

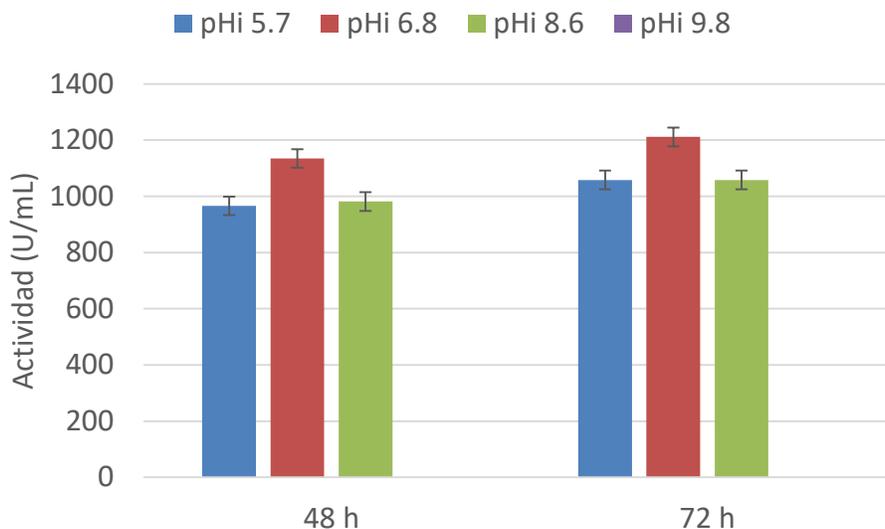


Figura 17. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de fermentaciones con diferente pHi inicial de fermentación inoculadas con la cepa FP160. 300 rpm a 37°C.

En la Figura 17, se muestra la actividad de feruloilesterasas presente en los filtrados enzimáticos. Se observa claramente la actividad de las enzimas de interés desde las 48 h, en las condiciones con pHi de 5.7, 6.8 y 8.6; mientras que en la fermentación con pHi de 9.8 no se detectó actividad de feruloilesterasas. Este comportamiento también se obtuvo con la producción de enzimas xilanolíticas. La fermentación con pHi de 6.8 mostró la mayor actividad de feruloilesterasas a las 48 y 72 h, con 1134 ± 33 y 1211 ± 33 U/mL respectivamente. Estos resultados fueron 14% mayores en promedio a los obtenidos en las otras fermentaciones; para tener un valor más robusto de ésta diferencia se evaluó la actividad de los filtrados enzimáticos por la metodología de Ramírez *et al.*, (2008). Se puede observar claramente que la actividad máxima de feruloilesterasas se obtuvo con pHi de 6.8. Este resultado era esperado debido a que *Aspergillus niger* FP160 modifica el pH inicial de la fermentación hasta valores cercanos a un $\text{pH } 7.3 \pm 0.1$ por lo que iniciar la fermentación cerca a este valor de pH favoreció la producción de xilanasas y feruloilesterasas, como se aprecia en la Figura 16.

Tabla 7. Actividad de feruloilesterasas en fermentaciones con diferentes valores de pH inicial, detectada por la técnica de Ramírez *et al.*, 2008.

Actividad de feruloilesterasas [U/ml]	Filtrados enzimáticos a 72 h de fermentación		
	pHi 5.7	pHi 6.8	pHi 8.6
	184.3 ± 2.97	326.0 ± 2.24	231.2 ± 2.75

– **Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de enzimas de interés**

Los hongos del género *Aspergillus* son capaces de utilizar una gran variedad de sustancias como fuente de nitrógeno, incluyendo amonio, nitratos, nitritos, purinas, amidas, así como muchos aminoácidos, con preferencia por el amonio, glutamina y glutamatos (Marzluf, 1997). La utilización de fuentes de nitrógeno alternativas esta altamente regulada y tiene un efecto directo en el crecimiento, producción y pH de la fermentación (Dutta y Debnath-Das, 2017) por lo que es fundamental seleccionar una fuente de nitrógeno que permita potenciar la producción de xilanasas y feruloilesterasas por la cepa seleccionada *Aspergillus niger* FP160.

Para dilucidar el efecto que la fuente de nitrógeno ejerce en la producción de xilanasas y feruloilesterasas se evaluaron paralelamente el uso del nejayote a 100% y 75% de concentración, adicionando las sales de medio mínimo y agregando el medio mínimo esterilizado por separado. Además, se evaluaron fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas, agregando la cantidad suficiente para que el nitrógeno en el medio de cultivo tenga una concentración de 1%. Estas fermentaciones se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Características de los medios de fermentación para evaluar el impacto de la fuente de nitrógeno en la producción de xilanasas y feruloilesterasas.

Condición	Nejayote	Medio mínimo	Agua destilada	Fuente de nitrógeno
M1	100%	-	-	-
M2	75%	-	25%	-
M3	100%	+	-	-
M4	75%	+	25%	-
M5	75%	25%	-	Sulfato de amonio (1.88)
M6	75%	25%	-	Nitrato de sodio (1.22%)
M7	75%	25%	-	Peptona de carne (0.5%)
M8	75%	25%	-	Extracto de levadura (0.5%)
M9	75%	25%	-	Urea(0.44%)
M10	75%	25%	-	Licor de maíz (2.68%)

+Se adicionan las sales de medio mínimo sin disolver.

El perfil de actividad xilanólítica en las diferentes fermentaciones se reporta en la Figura 18.

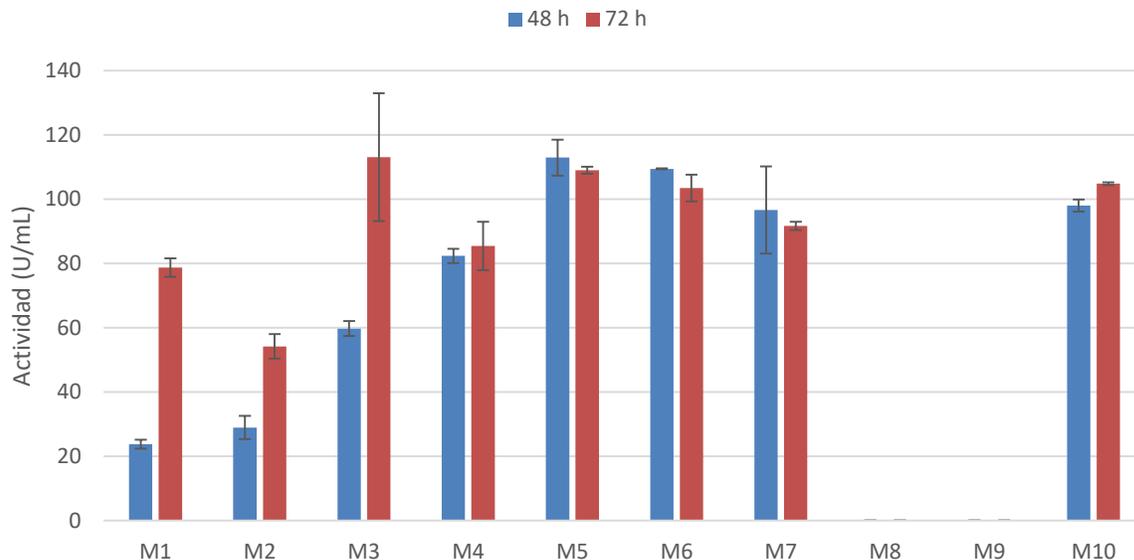


Figura 18. Actividad xilanólítica en los filtrados enzimáticos de fermentaciones con diferentes fuentes de nitrógeno descritas en Tabla 8. 300 rpm a 37°C **M1:** Nejayote 100%; **M2:** Nejayote 75%; **M3:** Nejayote 100% y sales de medio mínimo; **M4:** Nejayote 75% y sales de medio mínimo; **M5:** Sulfato de amonio; **M6:** Nitrato de sodio; **M7:** Peptona de Carne; **M8:** Extracto de levadura; **M9:** Urea; **M10:** Licor de maíz.

En ambas gráficas se observa que, la actividad de xilanasas se detectó a partir de las 24 h de fermentación, en algunos casos la máxima actividad se alcanzó a las 48 h como en el caso del nejayote con sales de medio mínimo (M4), sulfato de amonio (M5), nitrato de sodio (M6) y peptona de carne (M7). En las demás condiciones la máxima actividad se alcanzó a las 72 h de fermentación. En los casos de extracto de levadura y urea no se detectó actividad xilanólítica en los filtrados enzimáticos.

Como se mencionó anteriormente, se espera que la producción de feruloilesterasas tenga un comportamiento similar al de la producción de xilanasas. Los resultados de las determinaciones de actividad de feruloilesterasas por el método de placa fina se reportan en la Figura 19. Se observó que el nejayote enriquecido con medio mínimo en ambas concentraciones (M3 y M4) así como el cultivo con sulfato de amonio (M5), nitrato de sodio (M6), peptona de carne (M7) y licor del maíz (M10) son fuentes de nitrógeno que favorecieron la producción de feruloilesterasas, siendo específicamente el sulfato de amonio (M5), nitrato de sodio (M6) y licor de maíz (M10) los que resultaron idóneos para la producción.

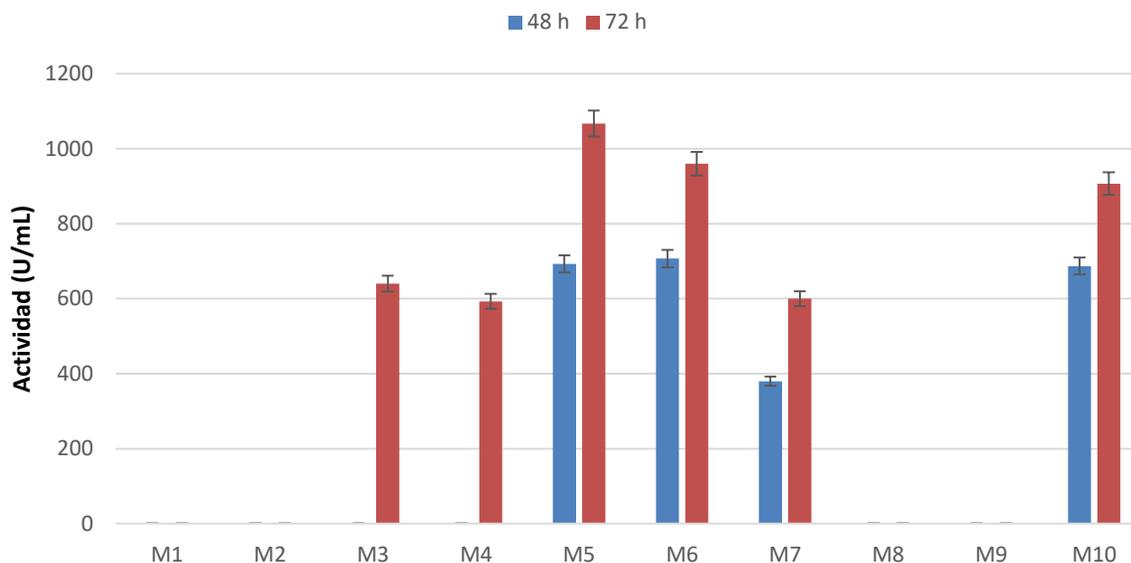


Figura 19. Actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos de fermentaciones con diferentes fuentes de nitrógeno descritas en Tabla 8. 300 rpm a 37°C **M1:** Nejayote 100%; **M2:** Nejayote 75%; **M3:** Nejayote 100% y sales de medio mínimo; **M4:** Nejayote 75% y sales de medio mínimo; **M5:** Sulfato de amonio; **M6:** Nitrato de sodio; **M7:** Peptona de Carne; **M8:** Extracto de levadura; **M9:** Urea; **M10:** Licor de maíz.

Al determinar la actividad de feruloilesterasas por el método de Ramírez *et al.*, (2008) (Tabla 9) para observar con mayor claridad las diferencias se corroboró que el sulfato de amonio fue la fuente de nitrógeno óptima en la producción de las enzimas de interés, además de ser una fuente de bajo costo, por lo que presenta una mayor ventaja para ser utilizado como fuente de nitrógeno comparado con el licor de maíz.

Tabla 9. Actividad de feruloilesterasas en fermentaciones con diferentes fuentes de nitrógeno, detectada por la técnica de Ramírez *et al.*, 2008.

Actividad de feruloilesterasas [U/ml]	Filtrados enzimáticos a 72 h de fermentación		
	Sulfato de amonio	Nitrato de sodio	Licor de maíz
	358.6 ± 2.5	285.5 ± 1.5	305.5 ± 5.7

▪ Comparación de la producción enzimática con cepas de colección

Aspergillus niger es uno de las especies del género *Aspergillus* que ha logrado la designación GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (U. S. Food and Drug Administration); por lo que posee numerosas aplicaciones industriales, sumado a la alta productividad de ácidos cítrico y glucónico, así como la gran variedad de producción en enzimas industriales y de proteínas humanas heterólogas (van Brunt, 1986; Dunn-Coleman *et al.*, 1991; Punt *et al.*, 2002; Karaffa y Kubicek, 2003; Singh y Kumar 2007). La cepa autóctona FP160 demostró producir xilanasas y feruloilesterasas, sin embargo, es

importante comparar su nivel de producción de enzimas con la producción de otras cepas de colección: la cepa de *Aspergillus niger* N402 una mutante de baja esporulación utilizada para producir feruloilsterasas (de Vries y Visser, 1999) y la cepa de *Aspergillus aculeatus* CBS172.66, especie reportada como buena productora de enzimas degradadoras de pared celular (Fujimoto *et al.*, 1995; Kauppinen *et al.*, 1995), utilizando las condiciones de fermentación seleccionadas: nejayote 75%, medio mínimo 25%, salvado de trigo 1% y sulfato de amonio 1.88%.

Inicialmente se llevó a cabo la inoculación de placas con medio sólido, esto con la finalidad de apreciar el crecimiento de las cepas a comparar. Los resultados se muestran en la Figura 20. Se observa que la cepa *A. niger* FP160 obtuvo crecimiento superior al de las otras cepas, con un aumento del 30% respecto a *A. niger* N402 y 50% respecto a *A. aculeatus* CBS172.66 la cepa que presentó menor crecimiento.

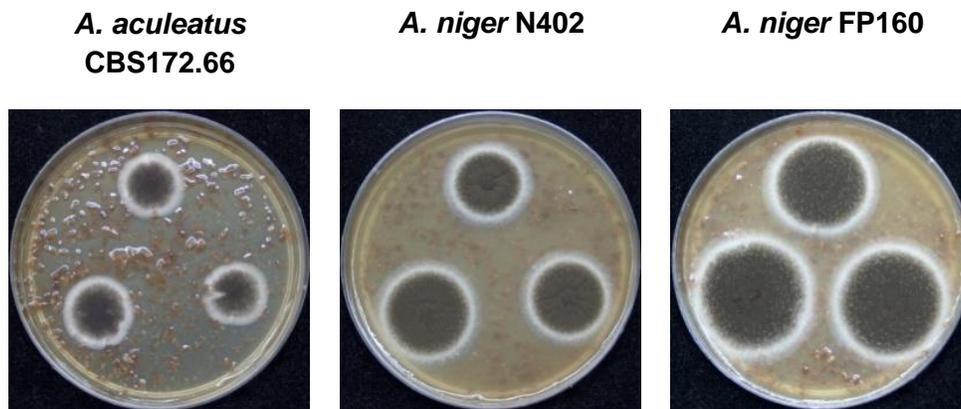


Figura 20. Crecimiento de cepas de *Aspergillus* en medio nejayote [75%] y salvado de trigo [1%]. Uso de diferente inóculo. Fotos de 72 h de incubación a 37 °C. **SUPERIOR:** 1×10^3 esporas. **INFERIOR DERECHA:** 1×10^4 esporas. **INFERIOR IZQUIERDA:** 1×10^5 esporas.

La actividad de xilanasas presentes en los filtrados enzimáticos de las diferentes fermentaciones se encuentran reportadas en la Figura 21. Las tres cepas mostraron producción de xilanasas desde las 24 h siendo la cepa de *A. aculeatus* CBS172.66 la que produjo los niveles más bajos con valores que oscilan entre 20 y 30 U/ml de actividad. Mientras que las cepas de *A. niger* N402 y FP160 produjeron 3 y 4 veces más que la cepa de *A. aculeatus* CBS172.66 respectivamente.

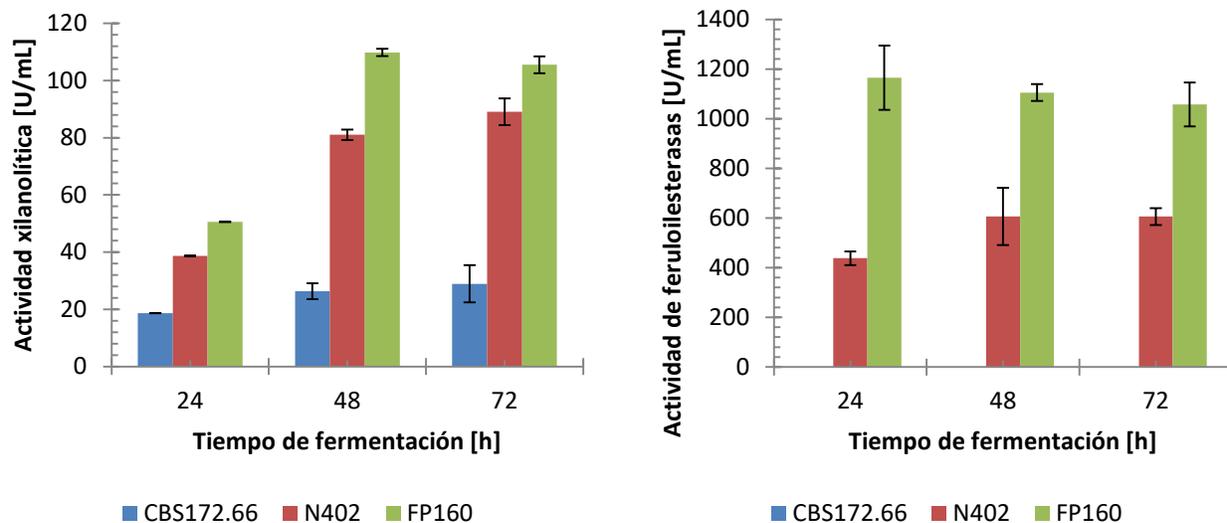


Figura 21. Actividad enzimática en filtrados enzimáticos de fermentaciones inoculadas con diferentes cepas. 300 rpm a 37°C. **IZQ:** Actividad xilanolítica. **DER:** Actividad de feruloilesterasas.

Al evaluar la actividad de feruloilesterasas en los filtrados enzimáticos se observa que la cepa de *A. aculeatus* CBS172.66 no produjo las enzimas a lo largo de la fermentación, mientras que las cepas de *A. niger* restantes obtuvieron valores máximos de feruloilesterasas a las 48 h: 605 ± 115 U/ml de N404 y 1105 ± 34 U/ml de FP160.

En la Figura 23, se presentan los resultados de una cromatografía en capa fina de cada uno de los filtrados enzimáticos de las fermentaciones anteriores, realizada para analizar la presencia de ácido ferúlico durante el proceso de fermentación, ya que se ha reportado que *Aspergillus niger* es capaz de desmetilar el ácido ferúlico para la obtención de ácido vanílico (Guiraud *et al.*, 1992). El ácido vanílico tiene el efecto reprimir la activación transcripcional de la producción de feruloilesterasas (Faulds y Williamson, 1999), lo que eventualmente podría ser repercutorio para la producción de las enzimas, aunque se requieren estudios moleculares para comprobar esta hipótesis.

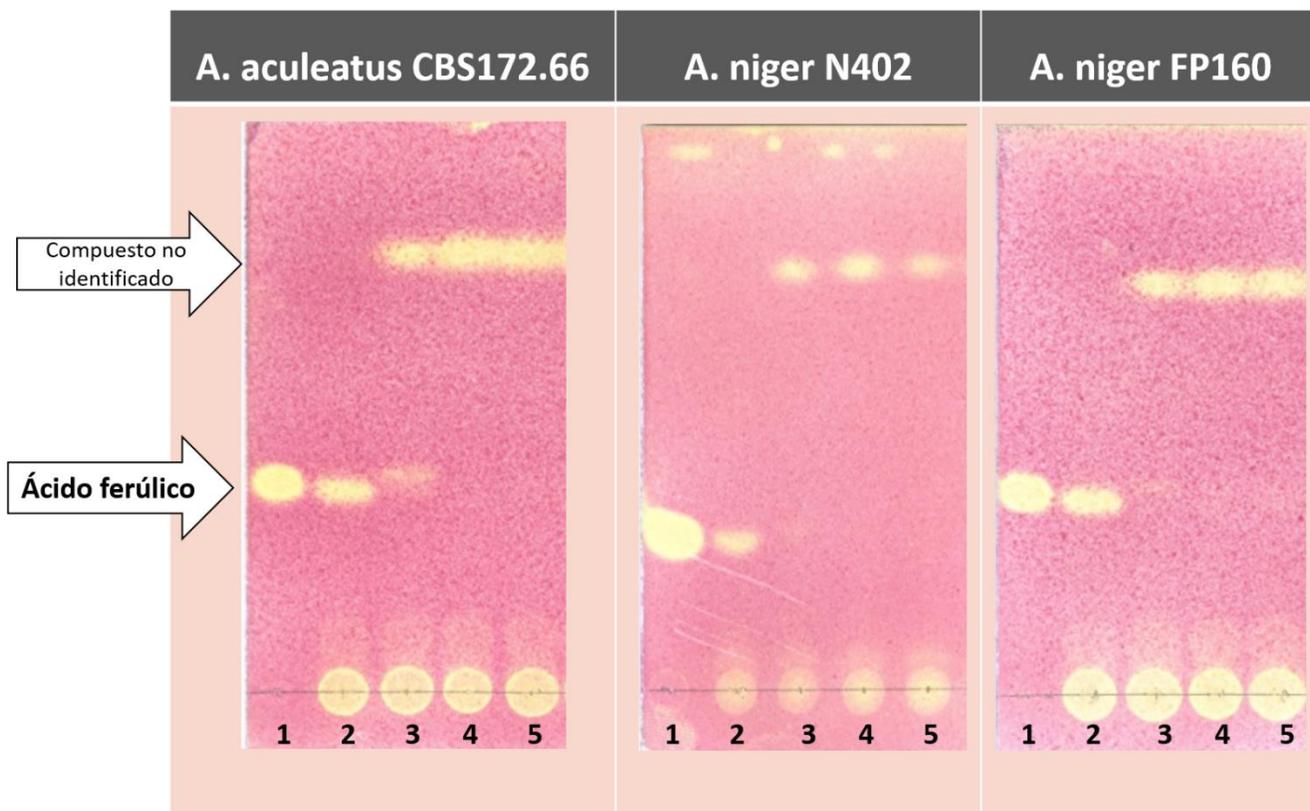


Figura 22. TLC. Detección de ácido ferúlico en filtrados enzimáticos de fermentaciones inoculadas con diferentes cepas. Carriles: 1: Solución ácido ferúlico 1%; 2: 0 h de fermentación; 3: 24 h de fermentación; 4: 48 h de fermentación; 5: 72 h de fermentación.

Para la cepa de *A. aculeatus* CBS 172.66 se observó la presencia de ácido ferúlico a las 0 y 24 h, para las cepas de *A. niger*, N402 y FP160; el ácido ferúlico sólo fue detectable en el inicio de la fermentación. En los tiempos posteriores no se detectó ácido ferúlico, esto podría deberse a que es convertido a ácido vanílico que puede ser transportado a través de la pared celular con mayor eficiencia respecto al ácido ferúlico (Faulds y Williamson, 1999), posteriormente, el ácido vanílico puede ser metabolizado a ácido protocatecuico vía desmetilación (Milstein *et al.*, 1983) o bien a metoxihidroquinona via descarboxilación (Milstein *et al.*, 1988; Lesage-Meessen *et al.*, 1996).

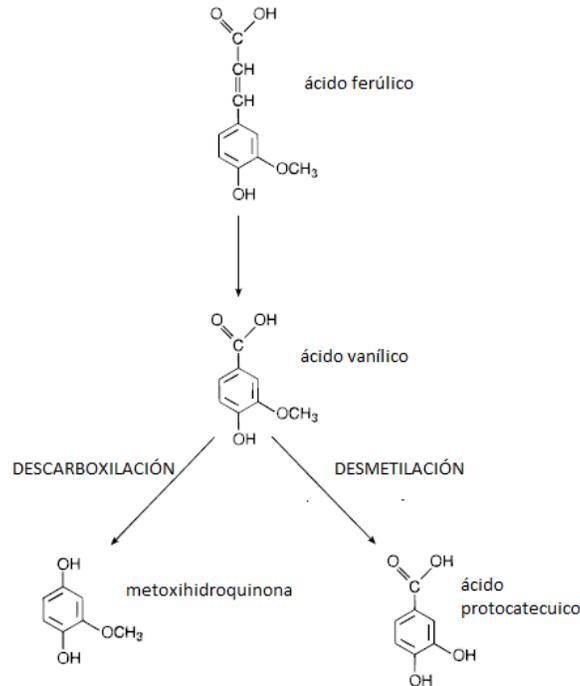


Figura 23. Rutas metabólicas del ácido ferúlico vía ácido vanílico en *A. niger* (Modificado de Faulds y Williamson, 1999).

▪ **Identificación de las enzimas producidas**

Se han identificado feruloilesterasas en *Aspergillus awamori* (McCrae *et al.*, 1994) en *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1993; Kroon y Williamson, 1996; Barbe y Dubordieu, 1998) en *Aspergillus oryzae* (Tenkanen *et al.*, 1991) y en *Aspergillus tubingensis* (de Vries, 1999). Las propiedades físicas de estas enzimas varían según la especie de origen. En *A. niger* se han estudiado las propiedades de las dos feruloilesterasas que produce, FaEA tiene una masa molecular de 36 kDa (de Vries, 1999), mientras que FaEB de 74 kDa (Kroon *et al.*, 1996) por lo que la identificación por espectrometría de masas fue de gran utilidad.

- **Purificación e identificación de xilanasas y feruloilesterasas**

Se obtuvo un concentrado enzimático 30X que presentó 7,300 U/ml de actividad de feruloilesterasas y 1,100 U/ml de actividad xilanólítica, la cual se purificó por cromatografía de intercambio iónico, perfil proteico y posterior identificación por espectrometría de masas.

En la Figura 24 se observa el fraccionamiento del concentrado enzimático. Una vez que se alimenta la muestra, las primeras proteínas eluidas (fracción 3 a 7) presentan actividad de feruloilesterasas y xilanasas. Posteriormente, de la fracción 16 a 21 se eluyen proteínas que presentan actividad sólo de feruloilesterasas, y de la fracción 22 en adelante, la proteína liberada no muestra actividad enzimática de interés. Por lo que las fracciones del primer y segundo intervalo mencionados se organizaron y se prepararon para determinar su perfil proteico en gel de poliacrilamida, de acuerdo a la Tabla 10. Los resultados se encuentran en la Figura 25.

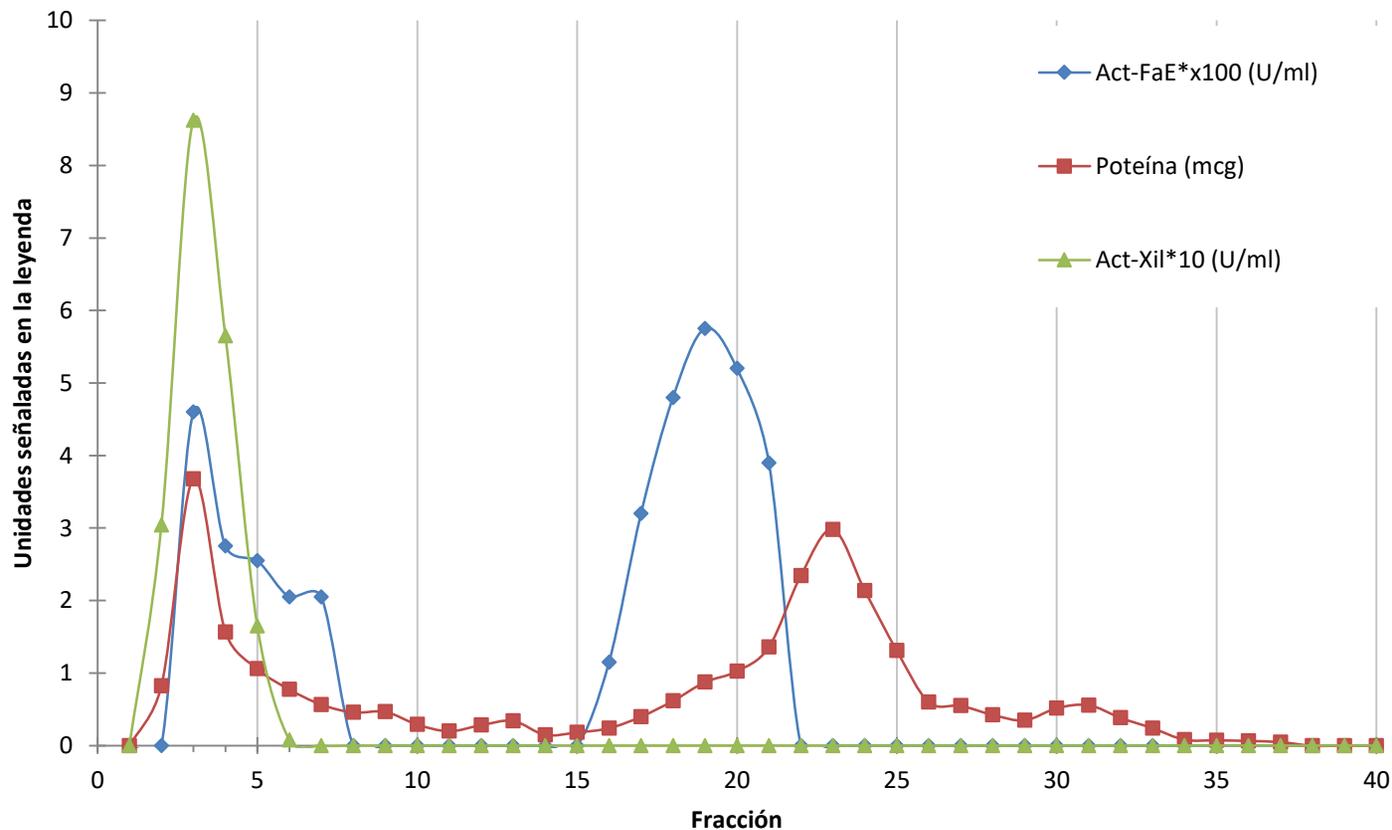


Figura 24. Cromatograma del concentrado enzimático producido por *Aspergillus niger* FP160. Condiciones descritas en materiales y métodos.

Tabla 10. Organización de fracciones colectadas por cromatografía de intercambio iónico para SDS-PAGE.

Pozo	Fracciones	Pozo	Fracciones	Pozo	Fracciones
1	Marcador de peso molecular	4	6 y 7	7	18
2	3	5	16	8	19 y 20
3	4 y 5	6	17	9	21

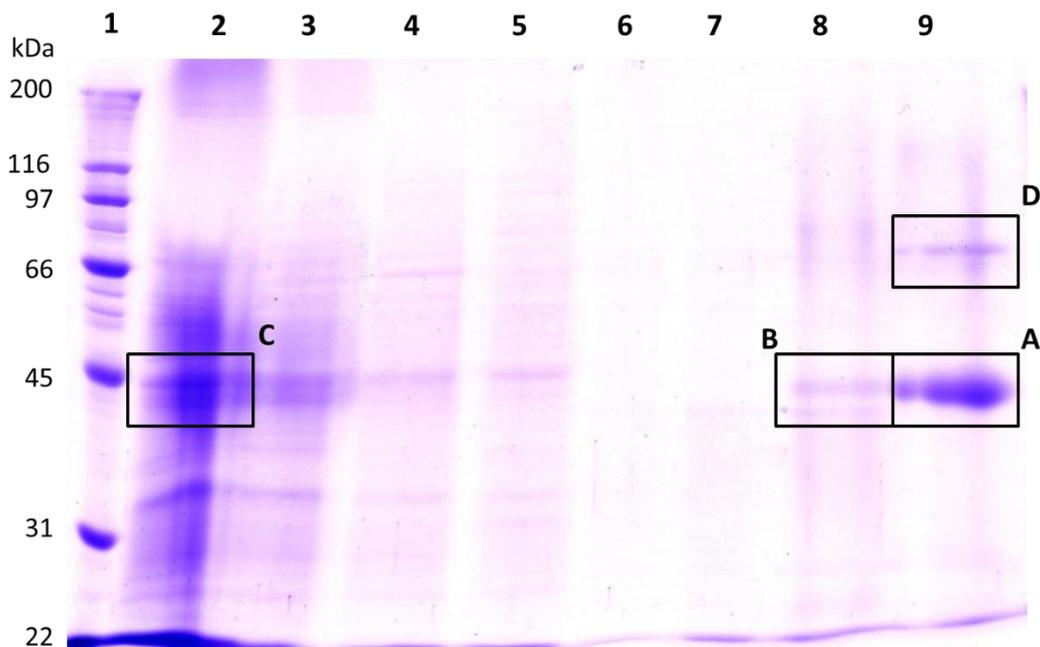


Figura 25. SDS-PAGE 12% Carriles indicados en la Tabla 10. A, B, C, D secciones realizadas para identificar por espectrometría de masas.

Las feruloilesterasas pueden presentar masas moleculares desde los 11 (Borneman *et al.*, 1991) hasta los 112 kDa (McCrae *et al.*, 1994). Faulds *et al.*, (1997) reportaron que la enzima FaEA de *Aspergillus niger* tiene una masa molecular de 36 kDa. Utilizando este criterio se seleccionaron las zonas A, B, señaladas en la Figura 26. La zona C fue seleccionada por la presencia de proteína con actividad xilanolítica, finalmente la zona D fue seleccionada debido a que en esa fracción sólo se detectó actividad de feruloilesterasa y se ha reportado que la enzima FaEB presenta una masa molecular de 75 kDa (Kroon *et al.*, 1996). El gel fue seccionado y se realizó una identificación por espectrometría de masas en el Laboratorio Universitario de Proteómica IBT/UNAM (ANEXO Tabla A3). La secuencia se alineó contra todas las traducciones no redundantes de *Aspergillus niger* mediante BLAST-NCBI. Los resultados se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11. Identificación por espectrometría de masas de las proteínas encontradas en las fracciones seleccionadas de la purificación de filtrados libres de celulas de *Aspergillus niger* FP160 creciendo en medio con nejayote.

Muestra	Resultado	Identidad	Cobertura	Número de acceso
A	Endo 1,4-β-glucanasa (<i>Aspergillus niger</i>)	98.57%	100%	XP_001402433
B	Feruloilesterasa A (<i>Aspergillus niger</i>)	95.73%	100%	AHJ37526
	1,3-β-glucanosiltransferasa (<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88)	100%	100%	XP_001402433
	Proteína hipotética ASPNIDRAFT_51400 (<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015)	100%	100%	EHA20306
	Proteína sin nombre (<i>Aspergillus niger</i>)	100%	100%	SPB50099
C	1,3-β-glucanosiltransferasa (<i>Aspergillus niger</i>)	99.35%	100%	GAQ47593
	Probable α-L-arabinofuranosidasa <i>axhA</i> (<i>Aspergillus niger</i>)	98.21%	100%	GAQ35594
	Endo-1,4-xilanasas (<i>Aspergillus niger</i>)	100%	100%	AAM08362
D	Exoglucanasa I (<i>Aspergillus niger</i>)	99.34%	100	ADZ46377
	Aldosa 1-epimerasa (<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88)	100%	100%	XP_001400045
	Glucoamilasa (<i>Aspergillus niger</i>)	98.44%	100%	GAQ47133
	Dioxigenasa extracelular (<i>Aspergillus niger</i>)	99.73%	100%	GAQ45717

El nejayote contiene una gran variedad de componentes, que podrían inducir la producción de diferentes enzimas degradadoras de pared celular en *Aspergillus niger* FP160. Las xilanasas y feruloilesterasas son dos de estas enzimas que son inducidas por las altas concentraciones de arabinoxilano y ácido ferúlico contenidos en el sustrato complejo.

Mediante la espectrometría de masas y la alineación con las bases de datos del NCBI, se encontró una feruloilesterasa tipo A en la muestra B. La cobertura y la identidad de la secuencia indican que la enzima corresponde a la secuenciada en el genoma de *Aspergillus niger*. No existen trabajos publicados acerca

de la caracterización o de la actividad hidrolítica de la enzima, por lo que la purificación de la misma, para la evaluación de sus parámetros es otra importante ventana de exploración.

Por otra parte, en la muestra C se logró identificar una endo- β -1,4-xilanasas. La identidad y cobertura del 100% obtenidas en la base de datos de NCBI indican que corresponde a la identificada en el genoma de *Aspergillus niger*. De la misma forma que la ferulilesterasa A encontrada, no existen trabajos publicados sobre la caracterización o actividad hidrolítica de la xilanasas, por lo que se pueden realizar estas pruebas, previa purificación de la enzima.

Adicionalmente se identificaron enzimas responsables de la degradación de la celulosa, que son inducidas por la presencia de oligosacáridos de glucosa. Estos componentes que podría provenir del β -glucano presente en el salvado de trigo (Nandini y Salimath, 2001; Prückler *et al.*, 2014).

Durante la nixtamalización, componentes del maíz son liberados al caldo de cocción, Gutiérrez-Uribe *et al.*, (2010) reportaron la presencia de almidón en el nejayote (20%), por lo que la presencia de enzimas amilolíticas, como la glucoamilasa, fue consistente.

Capítulo 8

RESUMEN DE RESULTADOS

- Se seleccionaron las cepas *A. niger* FP160, *A. flavipes* FP500 y *A. terreus* FP700 capaces de desarrollarse en etilferulato y en ácido ferúlico como única fuente de carbono. Produjeron feruloilesterasas utilizando salvado de trigo como sustrato y se indujo la producción de estas enzimas al adicionar ácido ferúlico al medio de fermentación.
- Se evaluó la capacidad de las tres cepas de crecer en medio sólido con nejayote para estimular la producción de xilanasas y feruloilesterasas siendo la mejor productora cepa FP160 de *Aspergillus niger*, ya que en los filtrados enzimáticos de las fermentaciones inoculadas con esta cepa se detectó aproximadamente el doble de actividad de feruloilesterasas que en las demás cepas.
- Se estableció que la composición del medio de cultivo para mejorar la obtención de xilanasas y feruloilesterasas fue nejayote al 75%, medio mínimo al 25% y salvado de trigo al 1%.
- Al evaluar el efecto del pH fue posible determinar que al iniciar la fermentación con pH 6.8 se favorece la producción, resultando en 40% mayor actividad de feruloilesterasas a las 72 h de fermentación, comparado con las fermentaciones con otros pH iniciales evaluados.
- Se determinó que el uso de sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno, es beneficioso para el crecimiento del microorganismo, lo cual se refleja en una mejor producción de las enzimas de interés.
- Se corroboró que la cepa autóctona FP160 de *Aspergillus niger* presenta mayor nivel de producción de feruloilesterasas, cerca del doble, comparado con el nivel de producción de la cepa de colección *Aspergillus niger* N402, mientras que la cepa de colección *A. aculeatus* CBS172.66 no presentó producción de feruloilesterasas.
- Se obtuvo un concentrado enzimático 30X con 7,300 U/ml de actividad de feruloilesterasas, 1,100 U/ml de actividad xilanolítica.
- Con la purificación por cromatografía de intercambio se logró la obtención de fracciones con actividad de xilanasas y feruloilesterasas que fueron analizadas mediante SDS-PAGE.
- Se identificaron las enzimas de interés seleccionando bandas en SDS-PAGE utilizando espectrometría de masas y alineación mediante BLAST-NCBI.

CONCLUSIONES

Uno de los temas que preocupan al sector industrial es el desecho de efluentes industriales que son vertidos al drenaje municipal, en ocasiones sin tratamiento alguno. En el caso del nejayote, las propiedades fisicoquímicas de este residuo agroindustrial lo convierten en un potente contaminante, que ha sido difícil tratar debido a su compleja composición. Se han patentado diferentes procesos para recuperar alguno de los componentes como la goma de arabinoxilanos o ácidos hidroxicinámicos. En este trabajo se logra reutilizar el nejayote en su totalidad.

El desarrollo de este trabajo permitió determinar las condiciones y tratamiento necesario para utilizar nejayote como medio de cultivo en la producción de enzimas degradadoras de pared celular, la presencia de arabinoxilanos y ácido ferúlico en el nejayote permiten la inducción de enzimas identificadas como xilanasas y feruloilesterasas en buenas cantidades así como diversas enzimas degradadoras de pared celular, empleando como microorganismo productor *Aspergillus niger* FP160, una cepa autóctona de nuestro grupo de trabajo que ha logrado superar a otras especies de *Aspergillus*, autóctonas y de colección que fueron probadas.

El uso de microorganismos catalogados como GRAS permite que los productos obtenidos tengan una amplia aceptación en la industria, por lo que el uso de *Aspergillus niger* en la producción de enzimas degradadoras de pared celular es una propuesta viable. Adicionalmente al concentrado enzimático con un amplio consorcio de enzimas, se puede evaluar la presencia de ácidos hidroxicinámicos con alto valor agregado, como el ácido vanílico, que pudieran ser purificados previa extracción de las enzimas.

REFERENCIAS

- Abe K, Gomi K** (2008) Food products fermented by *Aspergillus oryzae*. In: The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods, Goldman GH and Osmani SA eds (Boca Raton FL: CRC Press, Taylor & Francis Group) 429-439.
- Ainsworth GC** (1976) Introduction to the History of Mycology. Cambridge: Cambridge Univ Press.
- Alberts AW** (1998) Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol* **62**: 10J-15J.
- Aziz NH, Farag SE, Mousa LAA, Abo-Zaid MA** (1998) Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbiology* **93**: 43-54.
- Bajpai P** (1999) Applications of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Prog* **15**: 147-157.
- Barbe C, Dubourdieu D** (1998) Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. *J Sci Food Agr* **78**: 471-478.
- Bennett JW** (2010) An overview of the Genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus* Molecular Biology and Genomics. ISBN 978-1-904455-53-0. 1-17.
- Benoit I, Navarro D, Marnet N, Rakotomanana N, Lesage-Meessen L, Sigoillot JC, Asther M** (2006). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial byproducts. *Carbohydr Res* **341**: 1820-1827.
- Bonnin E, Saulnier L, Brunel M, Marot C, Lesage-Meessen L, Asther M, Thibault JF** (2002) Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme Microbiol Technol* **31**: 1000-1005.
- Borneman WS, Ljungdahl LG, Hartley RD, Akin DE** (1991) Isolation and partial characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl Environ Microbiol*. **57**: 2337-2344
- Chen JH, Ho CT** (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agr Food Chem* **45**: 2374-2378.
- Chipeta ZA, du Preez JC, Lew C** (2008) Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *J Microbiol Biotechnol* **35**: 587-594.
- Chipeta ZA, du Preez JC, Szakacs G, Christopher L** (2005) Xylanase production by fungal strains on spent sulphite liquor. *Appl Microbiol Botechnol* **69**: 71-78.
- Chiple JR, Uraih N** (1980) Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. *App Environ Microbiol* **40**: 352-357.
- Chistov LP, Prior PA** (1993) Esterases of xylan-degrading microorganism: production, properties and significance. *Enzyme Microb Technol* **15**: 460-475.
- Clifford MN** (2000) Miscellaneous phenols in food and beverages-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agr* **80**: 1126-1137.
- Collins T, Gerday C, Feller G** (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 3-23.
- De Graaff LH, van den Broeck HC, van Ooijen AJJ, Visser J** (1994) Regulation of the xylanases-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubingensis*. *Mol Microbiol* **12**: 479-490.
- De Vries RP** (1999) Accesory enzymes from *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Thesis Landbouwniversiteit Wageningen.
- De Vries RP, Michelsen B, Puolsen CH, Kroon PA, van den Heuvel RHH, Fauld CB, Williamson G, van den Hombergh JPTW, Visser J** (1997) The *faeA* genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encoded ferulic acid esterases involved in the degradation of complex cell wall polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4638-4644.

- De Vries RP, van Kuyk PA, Kester HCM, Visser J** (2002) The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem J* **363**: 377-386.
- De Vries RP, Visser J** (1999) Regulation of the feruloyl-esterase (*faeA*) gene from *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5500-5503.
- De Vries RP, Visser J** (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 479-522.
- Donaghy J, Kelly PF, McKay AM** (1998) Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus sp.* and lactobacilli. *App Microbiol Biotechnol* **50**: 257-260.
- Donaghy J, McKay AM** (1997) Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum*. *J Appl Microbiol* **83**: 718-726.
- Dowzer CEA, Kelly JM** (1991) analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **11**: 5701-5709.
- Dutta D, Debnath-Das M** (2017) Effect of carbon and nitrogen source on mycelial biomass and biosynthesis of antifungal protein for *Aspergillus giganteus* MTCC 8408 in submerged fermentation. *J Sci Ind Res* **76**: 369-375.
- Egawa M, Ishida K, Maekawa M, Sato Y** (1990) Skin preparations containig antioxidants and ellagic acids. *Japan Kokai* **89**: 50118.
- Eraso F, Hartley RD** (1990) Monomeirc and dimeric phenolic constituents of plant cell walls-possible factors influencing wall biodegradability. *J Sci Food Agr* **51**: 163-170.
- Faulds CB, de Vries RP, Kroon PA, Visser J, Williamson G** (1997) Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 239-244
- Faulds CB, Williamson G** (1991) The purification of 4-hydroxy-3- methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *J Gen Microbiol* **137**: 2339-2345
- Faulds CB, Williamson G** (1993) Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: Purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. *Biotechnol Appl Biochem* **17**: 349-359.
- Faulds CB, Williamson G** (1994) Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology* **140**: 779-787.
- Faulds CB, Williamson G** (1995) Influence of different xylanases on the activity of ferulic acid esterases on wheat bran *Appl Microb Biotechnol* **43**:1082-1087.
- Faulds CB, Williamson G** (1999) Effect of hydroxycinnamates and benzoates on the production of feruloilesterasas by *Aspergillus niger*. *J Sci Food and Agr* **79**: 450-452.
- Fazary AE, Ju YH** (2007) Feruloyl esterase as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochem Biophys Sinica* **39**: 811-828.
- Fernández-Espinar M, Pinaga F, de Graaff L, Visser J, Ramon D, Valles S** (1994) Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Appl Microb Biotechnol* **42**: 555-562.
- Fry SC** (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol* **37**: 165-186.
- Fujimoto HT, Ooi T, Wang SL, Takiwaza T, Hidaka H, Murao S, Arai M** (1995) Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 538-540.
- Garcia BL, Ball AS, Rodriguez J, Perez-Leblic MI, Arias ME, Copa-Patino JL** (1998a). Production and characterization of ferulic acid esterase activity in crude extracts by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 213-218.

- Garcia BL, Ball AS, Rodriguez J, Perez-Leblic MI, Arias ME, Copa-Patino JL** (1998b). Induction of ferulic acid esterase and xylanases activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30. *FEMS Microbiol Lett* **158**: 95-99.
- Gargallo J** (2001) Corn tortilla consumption in Mexico. AACC Annu Meet. The American Association of Cereal Chemists, Charlotte, North Carolina.
- Geiser DM, Samson RA, Varga J, Rokas A, Witiak SM** (2008) A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus*, and prospects for a robust genus - wide phylogeny. In *Aspergillus in the Genomic Era*. Varga J and Samson RA eds. Netherlands Wageningen Academics Pubs. pg 17-32.
- Gervais P, Molin P, Grajek W, Bensoussan M** (1988) Influence of water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol Bioeng* **31**: 457-463.
- Gervais P, Molin P** (2003) The role of water in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* **13**: 85-101.
- Gielkens MMC, Dekkers E, Visser J, de Graaff LH** (1999) Two cellobiohydrolase-encoding genes of *Aspergillus niger* require D-xylose and the xilanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4340-4345.
- Gielkens MMC, Visser J, de Graaff LH** (1997) Arabinoxylan degradation by fungi: characterization of the arabinoxylan arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. *Curr Genet* **31**: 22-29.
- Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD** (1998) Ferulate cross-links limit enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. *J Agr Food Chem* **46**: 2609-2614
- Grabber JH** (2005) How do lignin composition, structure and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci Society of America* **45**: 820-831.
- Guiraud P, Steiman R, Seigle-Murandi F, Benoit-Guyod JL** (1992) Metabolism of vanillic acid by Micromycetes. *J Microbiol Biotechnol* **8**:270-275.
- Gutiérrez-Urbe JA, Rojas-García C, García-Lara S, Serna-Saldívar SO** (2010) Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *J Cereal Sci* **52**: 410-416.
- Hartley RD, Jones EC** (1977) Phenolics components and degradability of cell walls of grass and legume species. *Phytochemistry* **16**: 1531-1534.
- Harvey LM, McNeil B** (1994) Liquid fermentation system and product recovery of *Aspergillus*. Smith JE *Biotechnol Handbooks 7. Aspergillus* Plenum Press New York. 7: 141-176.
- Ishii T** (1991) Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydr Res* **219**: 15-22.
- Ito K, Ogasawara H, Sugimoto T, Ishikawa T** (1992) Purification and properties of acid stable xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 547-550.
- Jackson DS, Rooney LW, Kunz OR, Waniska RD** (1998) Alkalyne processing properties on stress cracked and broken corn (*Zea mays* L). *Cereal Chem* **65**: 133-137.
- Jung HJG, Ni W** (1998) Lignification of plant cell walls: Impact of genetic manipulation. *Natl Acad Sci USA* **95**: 12742-12743.
- Kauppinen S, Christgau S, Kofod LV, Halkier T, Dorreich K, Dalboge H** (1995) Molecular cloning and characterization of a rhamnogalacturonan acetylerase from *Aspergillus aculeatus*. Synergism between rhamnogalacturonan degrading enzymes. *J Biol Chem* **270**: 27172-27178
- Klich MA** (2006) Identification of clinically relevant aspergilli. *Med Mycol* **44**: S127-S131.
- Kojima Y, Sakamoto T, Kishida M, Sakai T, Kawasaki H** (1999) Acidic condition-inducible polygalacturonase of *Aspergillus kawachii*. *J Mol Catal Ser B* **6**: 351-357.
- Kozakiewicz** (1989) *Aspergillus* Species on stored products (Wallingford: CAB International).
- Kroon PA, Faulds CB, Williamson G** (1996) Purification and characterization of a novel esterase induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Biotechnol Appl Biochem* **23**: 255-262.

- Kroon PA, Williamson G** (1996) Release of ferulic acid from sugarbeet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Appl Biochem* **23**: 263-267.
- Kroon PA, Williamson G** (1999) Hydroxycinnamates in plants and food: Current and future perspectives. *J Sci Food Agr* **79**: 355-361.
- Kulmburg P, Mathieu M, Dowzer C, Kelly J, Felenbok B** (1993) Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CreA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **7**: 847-857
- Kumar S, Ramon D** (1996) Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **135**: 287-293.
- Lam TBT, Liyama K, Stone BA** (1994) An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionated cell walls of wheat internodes. *Phytochem* **37**: 327-333.
- Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Thibault JF Colonna-Ceccaldi B, Brunerie P, Asther M** (1996) A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol* **50**: 107-113.
- López-Maldonado EA** (2018) ¿Sabías que el nejayote es un biopolielectrolito? Recuperado de <https://www.cideteq.mx/sabias-que-el-nejayote-es-un-biopolielectrolito/>.
- Madlala A, Bissoon S, Singh S, Christov L** (2001) Xylanase-induced reduction of chlorine dioxide consumption during elemental chlorine-free bleaching of different pulp types. *Biotechnol Lett* **23**: 345-351.
- MacCabe AP, Orejas M, Peres-Gonzalez JA, Ramon D** (1998) Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *J Bacteriol* **180**:1331-1333.
- Mathew S, Abraham TE** (2004) Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit Rev Biotechnol* **24**: 59-83
- Mayer AM, Staples RC** (2002) Laccase: new functions for and old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551-565.
- Marzluf GA** (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:17-32.
- McCrae, S. I., Leith, K. M., A. H. G. and Wood, T. M.** (1994) Xylan degrading enzyme system produced by the fungus *Aspergillus awamori*: isolation and characterization of a feruloyl esterase and a p-coumaroyl esterase. *Enzyme Microb Technol* **16**: 826-834.
- Milstein O, Vered Y, Shragina L, Gressel J, Flowers HM, Hüttermann A** (1983) Metabolism of lignin related aromatic compounds by *Aspergillus japonicus*. *Arch Microbiol* **135**: 147-154.
- Milstein O, Trojanowski J, Hüttermann A, Gressel J** (1988) Metabolism of single ring aromatic acids by *Aspergillus* species. *Microbios* **55**: 7-16.
- Mohan D, Pittman CU, Steele PH** (2006) Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. *Energ Fuel* **20**: 848-889.
- Montes L, Berges G** (2013) Las empresas más sustentables de México. México FORBES. Recuperado de <https://www.forbes.com.mx/las-empresas-mas-sustentables-de-mexico/>.
- Murakami A, Nakamura Y, Koshimuzu K** (2002) Fa15, a hydrofobic acid derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid. *Cancer Lett* **180**: 121-129.
- Nandini CD, Salimath PV** (2001) Carbohydrate composition of wheat, wheat bran, sorghum and bajra with good chapati/roti (Indian flat bread) making quality. *Food Chem* **73**: 197-203.
- Niño-Medina G, Carvajal-Millán E, Lizardi J, Rascon-Chu A, Marquez-Escalante JA, Gardea A, Martínez-López AL, Guerrero V** (2009) Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content. *Food Chem* **115**: 1286-1290.
- Okuda TM, Klich A, Seifert KA, Ando K** (2000) Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. In: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and*

Aspergillus Classification, Samson RA and Pitt JI. Eds (Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Pubs). 83-99.

- Parajó JC, Domínguez H, Domínguez J** (1998) Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technol* **65**: 191-201.
- Pérez-González JA, van Peij NNM, Bezoen A, MacCabe AP, Ramon D, de Graaff LH** (1998) Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans xlnD* gene encoding β -xylosidase. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1412-1419.
- Pflugfelder RL, Rooney LW, Waniska RD** (1988) Fractionation and composition of commercial corn masa. *Cereal Chem* **65**: 262-266.
- Pinaga F, Fernández-Espinar MT, Valles S, Ramon D** (1994) Xylanase production in *Aspergillus nidulans*: Induction and carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett* **115**: 319-324.
- Priefert H, Rabenhorst J, Steinbuchel A** (2001). Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 296-314.
- Prückler M, Siebenhandl-Ehn S, Apprich S, Höltinger S, Haas C, Schmid E, Kneifel W** (2014) Wheat bran based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *Food Sci Technol* **56**: 211-221.
- Quintero JC, Feijoo G, Lema J** (2006) Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. ISSN-0121-4004. Universidad de Antioquia, Medellín Colombia **13**: 61-67.
- Ramírez L, Arrizon J, Sandoval G, Cardador A, Bello-Mendoza R, Lappe P, Mateos-Díaz JC** (2008) A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification feruloyl esterases, tannases, and chlorogenate esterases. *Appl Biochem Biotechnol* **151**: 711-723.
- Rombouts FM, Thibault JF** (1986a) Enzymatic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar-beet pulp. *Carbohydr Res* **154**: 189-203.
- Rombouts FM, Thibault JF** (1986b) Feruloylated pectin substrates from sugar-beet pulp. *Carbohydr Res* **154**: 177-187.
- Ruijter GJG, Kubicek CP, Visser J** (2002) Production of organic acids by fungi. In: *The Mycota Vol. X. Industrial Applications*, Osiewacz HD, ed. (Heidelberg: Springer-Verlag) 213-230.
- Ruijter GJG, Vanhanen SI, Gielkens MMC, van de Vondervoort PJI, Visser J** (1997) Isolation of *Aspergillus niger creA* mutants: effects on expression of arabinases and L-arabinosa catabolic enzymes. *Microbiology* **143**: 2991-1998.
- Ruitjer GJG, Visser J** (1997) Carbon repression in aspergilli. *FEMS Microbiol Lett* **151**: 103-114
- Salmeron-Alcocer A, Rodríguez-Mendoza N, Pineda-Sanitago N, Cristiani-Urbina E, Juarez-Ramirez C, Ruiz-Ordaz N, Galindez-Mayer J** (2003) Aerobic treatment of maize processing wastewater (nejayote) in a single stream multi stage reactor. *J Environ Eng Sci* **2**: 401-406.
- Saulnier L, Marot C, Chanliaud E, Thibault JF** (1995) Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydr Polym* **26**: 279-287.
- Shaku S, Matsugami M, Koiso I, Suzuki T** (1967) Face lotion preparation. US Patent 3320133.
- Sharma P, Krishan-Bhat T, Singh B** (1998) Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *J Chromatography* **822**: 167-171.
- Sirisansaneeyakul S** (1995) Screening of yeast of production of xylitol from D-xylose. *J Ferment Bioeng* **80**: 565-570.
- Smith MM, Hartley RD** (1983) Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr Res* **118**: 65-80.

- Soleimani M, Tabil L, Panigrahi S, Alberta E** (2006) Bio-production of a polyalcohol (xylitol) from lignocellulosic resources. Annu Conf CSBE/SCGAB paper 6.
- Stewart JC, Parry JB** (1981) Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). J Gen Microbiol **125**: 33-39.
- Strauss J, Horvath HK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL, Kubicek CP** (1999) The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. Mol Microbiol **32**: 169-178.
- Subramaniyan S, Prema P** (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. Crit Rev Biotechnol **22**: 33-64.
- Sun J, Tian C, Diamond S, Louise-Glass** (2012) Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell **11**: 482-493.
- Tabka MG, Herpoël-Gimberta I, Monod F** (2006) Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment: Enzyme Microbiol Technol **39**: 897-902.
- Tenkanen M, Schuseil J, Puls J, Poutanen K** (1991) Production, purification and characterisation of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. J Biotechnol **18**: 69-84.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Penalva MA, Arst HA** (1995) The *Aspergillus pacC* zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. EMBO J. **14**:779–790.
- Topakas E, Christakopoulos P** (2004) Production and partial characterization of alkaline feruloyl esterases by *Fusarium oxysporum* during submerged batch cultivation. J Microbiol Biotechnol. **20**: 245-250.
- Topakas E, Stamatis H, Biely P, Christakopoulos P** (2004) Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. Appl Microbiol Biotechnol **63**: 686-690.
- Van-Peij NNME, Visser J, de Graaff LH** (1998a) Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. Mol Microbiol **64**: 3615-3619.
- Van-Peij NNME, Gielkens MMC, de Vries RP, Visser J, Graaff LH** (1998b) The transcriptional activator *xlnR* regulates both xylanolytic and endoglucanase expression in *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol **64**: 3615-3619.
- Van-Peij NNME, Brinkmann J, Vrsanska M, Visser J, de Graaff LH** (1997) β -xylosidase activity, encoded by *xlnD*, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. Eur J Biochem **245**: 164-173.
- Velasco-Martinez M, Angulo M, Vazquez-Couturier O, Arroyo-Lara A, Monroy-Rivera JA** (1997) Effect of dried solids of nejayote on broiler growth. Poultry Sci **76**: 1531-1534.
- Viikari L, Kantelinen A, Sundquist J, Linko M** (1994) Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. FEMS Microbiol Rev **13**: 335-350.
- Wilkie KCB, Woo SL** (1977) A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. Carbohydr Res **57**: 145-162.
- Wilkie KCB** (1979) The hemicelluloses of grasses and cereals. Adv Carbohydr Chem Biochem **36**: 215-264.
- Williamson G, Kroon PA, Faulds CB** (1998). Hairy plant polysaccharides: A close shave with microbial esterases. Microbiology **144**: 2011-2023.
- Wong DWS** (2005) Feruloyl esterase. App Biochem Biotechnol **133**: 87-112
- Wong KK, Richardson JD, Mansfield SD** (2000) Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving papermaking properties. Biotechnol Prog **16**: 1025-1029.

- Wong KK, Tan LU, Saddler JN** (1988) Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev* **52**: 305-317.
- Wong KKY, Saddler JN** (1993) Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: *Hemicelluloses and Hemicellulases*, Coughlan MP, Hazlewood GP eds (Portland Press, London) p 152.
- Yu P, MacKinnon JJ, Maentz DD, Racz VJ, Christensen DA** (2004) The specificity and the ability of *Aspergillus* feruloyl esterase to release p-coumaric acid from complex cell walls of oat hulls. *J Chem Technol Biotechnol* **79**: 729-733.
- Zhou K, Su L, Liangli Y** (2004) Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *J Agr Food Chem* **52**: 6108-6114.

ANEXO

Tabla A1. Registro fotográfico de las cepas del género *Aspergillus* creciendo en presencia de ácido ferúlico. Medios y tiempos de incubación señalados en tabla. 37 °C.

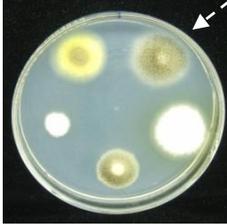
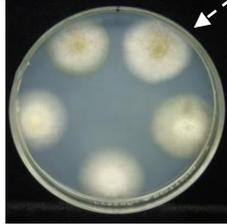
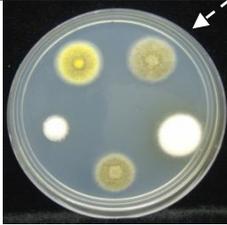
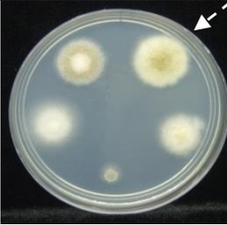
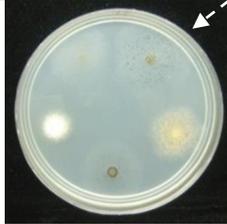
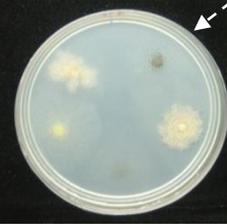
Medio en placa	Días de incubación	Grupo 1	Grupo 2
		En sentido de las manecillas del reloj iniciando por la flecha 1. FP120; 2. FP700; 3. N402; 4.FP500; 5. FP290	En sentido de las manecillas del reloj iniciando por la flecha 1. FP250; 2. FP160; 3. NRRL3112; 4.NRRL502; 5. NRRL334
Medio mínimo + Glucosa 1%	3		
Medio mínimo + Glucosa 1% + Ácido ferúlico 0.1%	3		
Medio mínimo + Ácido ferúlico 0.1%	5		

Tabla A2. Registro fotográfico de las cepas del género *Aspergillus* creciendo en presencia de etilferulato. Medios y tiempos de incubación señalados en tabla. 37 °C.

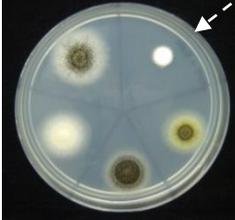
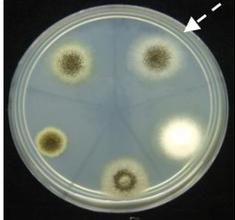
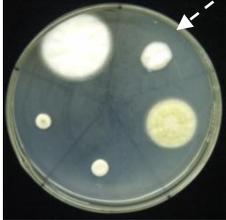
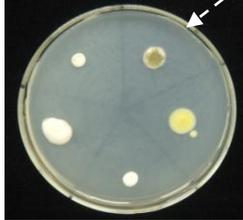
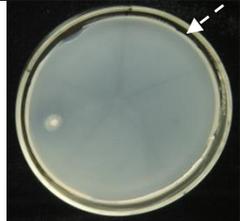
Medio	Días de incubación	Grupo 1	Grupo 2
		En sentido de las manecillas del reloj iniciando por la flecha 1. FP500; 2. FP250; 3. FP120; 4.NRRL502; 5. FP290	En sentido de las manecillas del reloj iniciando por la flecha 1. NRRL3112; 2. FP700; 3. FP160; 4.N402; 5. NRRL334
Medio mínimo + Glucosa 1% (control)	6		
Medio en placa	Días de incubación	Grupo 1	Grupo 2
		En sentido de las manecillas del reloj iniciando por la flecha 1. FP500; 2. NRRL502; 3. FP250; 4.N402; 5. FP700	En sentido de las manecillas del reloj iniciando por la flecha 1. NRRL3112; 2. FP290; 3. NRRL334; 4.FP160; 5. FP120
Medio mínimo + Glucosa 1% + Etilferulato 0.05%	6		
Medio mínimo + Etilferulato 0.05%	11		

Tabla A3. Resultados de la identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Muestra A	<p>MKEINTVSCL TLLSLTAKI AAHGHVSNIV INGVSYRGWD INSDPYNSDP PVVVAWQTPN TANGFITPDE YGTDDIICHL DATNAEGHAV IAAGDKISLQ WTTWPD SHHG</p> <p>PVISYLANCG SSCETVDKTT LEFFKIDGVG LVDDSSVPGT WGDDQLIADN NTWLVEIPPD IAPGYVLRH ELIALHGASS ENGAQNYQC FNLQVTSGBT AEPGVLGTE</p> <p>LYSPTDPGIL IDIYQSLSTY EVPGPTLIPE AVSVVQSSST ITASGTPVTG TAASATS</p>
Muestra B	<p>MKQFSAKYAI AVVVTAGHAL AASTQGISED LYSRLVEMAT ISQAAYADLC NIPSTIIKGE KIYNSQTDIN GWILRDDSSK EIITVFRGTG SDTNLQLDTN YTLTPFDLTP</p> <p>QCNSCEVHGG YYIGWISVQD QVESLVQQQV SQFPDYALTV TGHSLGASLA ALTAAQLSAT YDNIRLYTFG EPRSNQAFAS YMNDAFQASS PDDTQYFRVT HANDGIPNLP</p> <p>PADEGYAHGV VEYWSVDPYS AQNTFVCTGD EVQCCEAQQG QGVNNAHTTY FGMTSGHCTW</p> <p>MKGTAVATAL ALGASTALAA PSSTIKARDD VTAITVKGNA FFKGDDRFYI RGVDYQPGGS SKLADPIADA DGCKRDIEKF KELGLNTRIV YSDNSKDHD ECMNALADAG</p> <p>IYLVLDVNTK KYSLNRADPA PSYNDVYLQY IFATVDKFAFAS YKNTLAFFSG NEVINDGPSS KAAPYVKAVT RDLRQYIRSR NYREIPVGYS AADIDTNRQLQ MAEYMNCGTD</p> <p>DERSDFFAFN DYSWCDPSSF TTSGWDQKVK NFTGYGLPLF LSEYGCNTNK REFEEVSALY DTKMTGVYSG GLVYEYSQES SNYGLVEING DSVKTLSDYD ALKSAYSKTS</p> <p>NPEGDGGYNK TGGANPCPAK DSPNWDVDGD SLPAIPEPAK KYMTEGAGKG AGFSGSGSMN AGTASTSTAT PGSGSASSSS SSSGSSGTST SSTGAAAGLQ VPGFAMAPVM</p> <p>VGLVTVLSTV FGAGLVLL</p> <p>MKLSLSLFF TPIFALPSHL TPRNDIPFF LLAGDSTTAV QSSGGGGWGD GFINTTLHKG AKGINYGHGD ATTVSFRSGG DWATVLSKVA EYKSDYRAFV TIQFGHNDQK</p> <p>PAANISLAEY TSNLEQFAKD VKNAGGTPIL VTPLSRRNYD NSTGTPLVIE NLAEQRAATI DAAKNTDTSY IDLNKASTDY LNSIGPADAY TYNLASDDYT HLNGEYSIVF</p> <p>GGMVASLIDQ DFTELKSDGY VKVNAKLLAA LEEGKYYWP</p> <p>SSGYSGSCSS GSPCTGDLTY YVAGLGSCGI TSNGNMVMV ALPHGIMQDS DCGKTVKITY NGVTDYGTWV DKCMGCDDVS IDLSEKLFKK FGTESEGRLT GAEWYI</p>
Muestra C	<p>MKGTAVATAL ALGASTALAA PSSTIKARDD VTAITVKGNA FFKGDDRFYI RGVDYQPGGS SKLADPIADA DGCKRDIEKF KELGLNTRIV YSDNSKDHD ECMNALADAG</p> <p>IYLVLDVNTK KYSLNRADPA PSYNDVYLQY IFATVDKFAFAN YKNTLAFFSG NEVINDGPSS KAAPYVKAVT RDLRQYIRSR NYREIPVGYS AADIDTNRQLQ MAEYMNCGTD</p> <p>DERSDFFAFN DYSWCDPSSF TTSGWDQKVK NFTGYGLPLF LSEYGCNTNK REFEEVSALY DTKMTGVYSG GLVYEYSQES SNYGLVEIDG NNVKTLSDYD ALKSAYSKTS</p> <p>NPEGDGGYNK TGGANPCPAK DSPNWDVDGD SLPAIPEPAK KYMTQGAGKG AGFSGSGSMN AGTQSTSTAT PGSGSVSSSS SSSGSSGTST SSTGAAAGLQ IPGLAMAPVM</p> <p>VGLVTVLSTV FGAGLVLL</p> <p>MKFFKAKGSL LSSGIYLIAL TPFVNAKCAL PSSYSWSSTD ALATPKSGWT ALKDFTDVVS DGKHIVYAST TDEAGNYGSM TFGAFSEWSN MASASQTATP FNAVAPTLFY</p> <p>FKPKSIWVLA YQWGSSTFTY RTSQDPTNVN GWSSEQUALFT GKISDSSTNA IDQTVIGDDT NMYLFFAGDN GKIYRSSMSI NDFPGSFGSQ YEVILSGARN DLFEAVQVYT</p> <p>VDGGEGDTKY LMIVEAIGST GHRYFRSFTA SSLGGEWTAQ AASEDQPFAG KANSGATWTE DISHGDLVRN NPDQMTVDP CNLQLLYQGH DPNSSGDYNL LPWKPGVLTLL KQ</p> <p>YIVESYGDYN PGSGGTYKGT VTSDGSVYDI YTATRINAAS IQGTATFTQY WSRQNKRVG GTVTTSNHFN AWAKLGMNLG THNYQIVATE GYQSSGSSSI TVQ</p>

Muestra D	<p>MHQRALLFSA LLTAVRAQQA GTLTEEVHPS LTWQKCTSVG SCTEQSGSVV IDSNWRWTHS VDDSTNCYTG NTWDSTLCPD DETCATNCAL DGADYESTYG ITTDGDSLTL</p> <p>KFVTGSNVGS RVYLMDSDE KYQTFDLLDA EFTFDVDVSN LPCGLNGALY FTAMDADGGT SRYPANKAGA KYGTGYCDSQ CPRDLKFING EANVDGWEPSSNNNTGIGN</p> <p>HGSCCEPMDI WEANKISTAL TPHPCDSSSQ TMCEGNCCGG TYSDDRYGGT CDPDGCDFNP YRMGNESFYG AGKIVDTGSK MTVVTQFID GSSSLSEIKR YVQNGK VIA</p> <p>NAESSISGVT GNSITDFCT AQKKAFGDDD VFAAHNLAG ISDAMSSMVL ILSLWDDYYS SMEWLSDSDYP ENATATDPGV ARGTCDSSESG VPATVEGAHP DASVTFSNIK</p> <p>FGPINSTFSA SA</p>
	<p>MHVKSYSLSAV LYGLPALTQV AAAKSTGDPF QLYTISAENI TAKLIPYGAR LTSLLPDRD GNFQDVVVGY DDPKQYLKDT ETNHTYFGAV VGRYANRIKN GTFSIGSDVY</p> <p>HIPENENDGE DTLHGTVGY DQRNWTVTAY SNSSITFTLV DRAFEDFPDG VITHATFSVQ TKVTPENPQG LPQLTTKLVS LALTETTPIM LANHIYWNLN AFKDEILED</p> <p>TWLQPLSKR LIGTNGILIP NGTILDVDVY DGAPDFVSGK LVGQDIEKTD GLCGTDCIGY DNCFIVDRPP QYAARNSIVP IHHMNSSTTG ISLDVATNQQ ALQIYACNSQ</p> <p>NGTIPVKQSQ VQRNKAEGVD GAEYVNHGHC IVIETEGWID GINNPQWGQL PDQIYSPETG PAVNWATYQF GTV</p>
	<p>MSFRSLALS GLVCSGLASV ISKRATLDSW LSNEATVART AILNNGIADG AWWSGADSGI VVASPSTDNP DYFYTWTRDS GLVIKTLVDL FRNGDTLLS TIENYISSQA</p> <p>IVQGISNPSG DLSSGGLGEP KFNVDETAYT GSWGRPQRDG PALRATAMIG FRQWLLDNGY TSAATEIWP LVRNDLSYVA QYWNQTYDL WEEVNGSSFF TIAVQHRALV</p> <p>EGSAFATAVG SSCSWCDSQA PQILCYLQSF WTGEYILANF DSSRSGKDTN TLLGSIHTFD PEAGCDDSTF QPCSPRALAN HKEVDSFRS IYTLNDGLSD SEAVAVGRYP</p> <p>KDSYYNGNPW FLCTLAAEQ LYDALYQWDK QGSLEITDVS LDFQALYSD AATGTYSSES STYSSIVDAV KTFADGFVSI VETHAASNGS LSEQYDKSDG DELSARDLTW</p> <p>SYAALLTANN RRNSVMPPSW GETSASSVPG TCAATSASGT YSSVTVTSSP SIVATGGTTT TATTTGFGGV TSTSKTTTTA SKTSTTTST SCTTPTAVAV TFDLTATTTY</p> <p>GENIYLVGSI SQLGDWDTSD GIALSADKYT SSNPLWYVTV TLPAGESFEY KFIRIESDDS VEWESDPNRE YTVPQACGES TATVDTWR</p>
	<p>MVQLNTLLTG LAGLASVSA HPGHDIRAEA AERAAFMKRA PRSLSDCSAK LKARGLEKQS IARRENAVNA IRQKRGQTH APLLKARDLD TILNTTHSS LNVSPETDPN</p> <p>VLFASNATCV LGPDVTQGPY YVTGELIRND ITETQEGVPL YLDIQLDTS TCEPVPEIYI DIWHCNATGV YSGVAASNGG DSSDTSNLDA TFLRGIQQTD SDGVVQFNSI</p> <p>FPGHYTSRAT HIHVLSHSPN ETTALPNNTI SGLYTSHANY VGQLFFDQDL ITKVEATSPY STNTQELTEN ADDSILSEEA DTIDPFVEYV LLGDDVSDGV FGWISLGIDV</p> <p>SENSEITPAA EYTADGGVEN DSSSSGMGGG GGSAPSGGAA PSGSA</p>