



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**PRODUCCIÓN DE ADITIVOS ALIMENTARIOS
POR HONGOS, CON ESPECIAL REFERENCIA A**

ASPERGILLUS NIGER

**FUNGAL PRODUCTION OF FOOD ADDITIVES,
WITH PARTICULAR REFERENCE TO**

ASPERGILLUS NIGER

Autor: Rodrigo Alberto Cao García

Tutora: Teresa María López Díaz

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Clasificación de los hongos.....	3
1.1.1. <i>Aspergillus</i>	3
1.1.1.1. <i>A. niger</i>	5
1.1.2. <i>Penicillium</i>	6
1.2. Aditivos alimentarios.....	7
2. OBJETIVO	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
4. PRODUCTOS FÚNGICOS CON INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	9
4.1 Ácidos orgánicos.....	9
4.1.1. Ácido cítrico.....	9
4.1.2. Ácido glucónico	10
4.2. Enzimas.....	11
4.2.1. Amilasas.....	12
4.2.2. Proteasas	13
4.2.3. Pectinasas.....	13
4.3. Metabolitos secundarios	14
4.3.1. Pigmentos.....	14
4.3.1.1. Carotenoides	15
4.3.1.2. <i>Monascus</i>	16
4.3.2. Vitaminas.....	16
4.3.2.1. Riboflavina (B2)	16
4.3.2.2. β -caroteno.....	17
5. ENFOQUE BIOTECNOLÓGICO	18
5.1. Proceso industrial.....	18
5.2. Edición génica.....	19
5.2.1. Aplicación para aditivos alimentarios	21
5.3. Micotoxinas	22
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	23
7. CONCLUSIONES	25
8. REFERENCIAS	27

RESUMEN

La importancia de los hongos en la industria alimentaria radica en el papel que juegan en la elaboración de alimentos fermentados como quesos y vinos. Su papel no se limita a esto, y es que a partir de estos organismos y sus procesos fermentativos se obtienen compuestos interesantes en su utilización como aditivos alimentarios. Es este último enfoque del empleo de hongos el que se tratará en este trabajo. Para recoger esta información se ha hecho uso de una búsqueda bibliográfica de artículos, libros y de información disponible en internet.

En el presente trabajo se recogen algunos de los aditivos alimentarios con origen fúngico, haciendo especial hincapié en aquellos provenientes de la especie *Aspergillus niger*, cuyas características principales son también citadas. Además, se tratará de dar una visión biotecnológica al proceso de obtención de estos compuestos, analizando técnicas enfocadas a la optimización de estos procesos, así como analizar el futuro de los hongos en la industria alimentaria.

PALABRAS CLAVE

Aspergillus niger, aditivos alimentarios, ácido cítrico, amilasas, micotoxinas, fermentación, edición génica, CRISPR-Cas.

ABSTRACT

The importance of fungi in the food industry lies in the role they play in the production of fermented foods such as cheese and wine. Their role is not limited to this, and it is from these organisms and their fermentation processes that interesting compounds are obtained for use as food additives. It is this latter approach to the use of fungi that will be discussed in this paper. In order to collect this information, a bibliographic search of articles, books and information available on the internet has been carried out.

In the present work, some of the food additives with fungal origin are collected, with special emphasis on those coming from the species *Aspergillus niger*, whose main characteristics are also mentioned. In addition, we will try to give a biotechnological vision of the process of obtaining these compounds, analysing techniques focused on the optimisation of these processes, as well as analysing the future of fungi in the food industry.

KEYWORDS

Aspergillus niger, food additives, citric acid, amylases, mycotoxins, fermentation, gene editing, CRISPR-Cas.

1. INTRODUCCIÓN

La organización de los organismos vivos presentes en la naturaleza atiende a características como la nutrición, la organización y tipología celular, la reproducción y el metabolismo. Así, actualmente se conocen 7 reinos en la naturaleza, Animalia, Plantae, Fungi, Chromista, Protozoa, Bacteria y Archaea (Ruggiero *et al.* 2015).

En el reino Fungi se encuentran clasificados los hongos, incluyendo las levaduras y los mohos, organismos eucariotas multicelulares, heterótrofos y aerobios, que disponen de pared celular con quitina (Alexopoulos *et al.*, 1996). Se caracterizan por ser saprófitos, es decir, se alimentan de materia orgánica viva o muerta. Existen entre 2-6 millones de especies, de las cuales solo unas 250000 han sido descritas por la ciencia (Garcés De Granada *et al.*, 2003).

Muchas especies de este reino son muy importantes para el humano, siendo útiles para la producción de alimentos (como por ejemplo panes o quesos) o para la industria farmacéutica y de producción de medicamentos (antibióticos). Si bien muchos de ellos son beneficiosos, también los hay perjudiciales para humanos y animales. Además, a los hongos también se les atribuye una labor de descomposición y reciclaje de nutrientes, contribuyendo al equilibrio ecológico de la biosfera (Alexopoulos *et al.*, 1996; Garcés De Granada *et al.*, 2003). Las principales características de los hongos se resumen a continuación.

Estructuralmente, se caracterizan por presentar distintas formas, tamaños y estructuras. Los hay unicelulares (como las levaduras), y pluricelulares, que disponen de estructuras más desarrolladas como los cuerpos fructíferos o setas. La mayoría de ellos son pequeños, pero también se pueden encontrar otros más grandes (como los champiñones). Su aspecto es filamentosos y están ramificados. Cuentan con un núcleo diferenciado con nucléolo, membrana nuclear y cromosomas lineales. Los hongos pueden disponer de uno o dos núcleos, pero también se pueden encontrar hongos polinucleados (cenocíticos) debido al fraccionamiento de las paredes celulares. Estas paredes celulares se caracterizan por presentar quitinas y glucanos, rodeando un contenido citoplasmático conformado por ribosomas, orgánulos citoplasmáticos y un citoesqueleto con microfilamentos de actina y microtúbulos de tubulina. Además, en membrana citoplasmática tienen esteroides (en concreto ergosterol). Otra estructura particular de estos organismos son las hifas, estructuras vegetativas de aspecto filamentosos, que se disponen formando el micelio (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Nutricionalmente, estos organismos son heterótrofos, es decir, obtienen su alimento de otros

organismos y materia orgánica muerta, ya que carecen de pigmentos y actividad fotosintética. Además, la mayoría son saprófitos, por lo que descomponen la materia orgánica con enzimas extracelulares para su absorción y empleo en procesos metabólicos de crecimiento y desarrollo. Este proceso también es beneficioso para otros organismos, ya que los gases y sales minerales secretados al medio pueden ser empleados por organismos autótrofos para la fotosíntesis. Otra característica interesante es que algunos pueden ser parásitos, alimentándose de otros organismos vivos, o simbióticos, estableciendo una relación de beneficio mutuo con el otro organismo (como por ejemplo en las micorrizas, en las que el hongo proporciona nutrientes a la planta a cambio de carbohidratos) (Alexopoulos *et al.*, 1996; Webster y Weber, 2007).

Además de emplear sustratos orgánicos exógenos, principalmente carbohidratos como la glucosa, como su principal fuente de carbono y energía, también pueden obtener nitrógeno metabolizando compuestos nitrogenados, como amonio o iones nitrato. Por otro lado, la mayoría son organismos aerobios estrictos, pero también se conocen algunos que pueden crecer en condiciones anaerobias (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Una de las actividades metabólicas de mayor interés para el provecho humano es la fermentación, proceso de oxidación anaerobia de un compuesto orgánico, convirtiéndolo en otro más simple, fermentando por ejemplo azúcares y produciendo etanol y otros productos (Facultad de Ingeniería Química, 2020).

Su reproducción puede ser sexual (fusión nuclear y meiosis) o asexual (división nuclear mitótica). La sexual (también llamada teleomorfa) se caracteriza por la producción de esporas por los cuerpos fructíferos del hongo (organizados en el himenio), transportadas por el viento, agua o animales para su germinación y formación de nuevos individuos, a través de la fusión de los núcleos haploides de células donadoras y receptoras, y después un proceso de meiosis. Por otro lado, en la reproducción asexual (anamorfa) la división se da por mitosis. En este tipo de reproducción destacan los conidios (esporas asexuales inmóviles), producidos por la gemación de elementos de las hifas (Alexopoulos *et al.*, 1996; Kuhar *et al.*, 2013).

El crecimiento de los hongos se da a través de la expansión del micelio, que es una red de filamentos ramificados llamados hifas. Este se extiende con el objetivo de encontrar nutrientes y humedad, actuando como una raíz. Así podrá alcanzar grandes tamaños. Además, el crecimiento también puede deberse a estímulos como la luz o la temperatura. Algunos

hongos pueden crecer rápidamente y formar estructuras como cuerpos fructíferos en pocos días (Alexopoulos *et al.*, 1996; Webster y Weber, 2007).

Los hongos, además de la importancia ecológica por la descomposición de la materia, son importantes en industrias como la médica (por ejemplo, por la producción de penicilina por *Penicillium*) o la alimentaria, conociéndose desde hongos comestibles hasta levaduras y hongos filamentosos presentes en la producción de vinos, pan, cerveza y quesos. Además, son importantes productores de metabolitos de utilidad en la industria alimentaria (aditivos como colorantes, saborizantes, proteínas o enzimas) (Unidad de Exhibición Biológica, 2012). Es este último aspecto, en el que centraremos el presente trabajo.

1.1. Clasificación de los hongos.

La clasificación de los hongos podría hacerse atendiendo a las características como su alimentación (saprófitos, parásitos o simbioses), estructura celular (unicelulares, pluricelulares o acelulares), o reproducción (sexual o asexual) ... Sin embargo, lo más preciso es hacerlo en base a árboles filogenéticos, midiendo las relaciones evolutivas de cada uno, a través de pruebas bioquímicas, morfológicas y genéticas, y, aunque a veces no son del todo precisas, han permitido llevar a cabo una clasificación en la cual se encuentran cinco filos o divisiones: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. En esta clasificación los grupos taxonómicos empleados son: reino, división, clase, orden, familia, género y especie (Alexopoulos *et al.*, 1996; Webster y Weber, 2007).

El filo *Ascomycota* cuenta con una elevada importancia en el ámbito médico y alimentario, y es por ello que será el que mayor importancia tenga en este trabajo, destacando los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, sobre todo el primero (Ahmad *et al.*, 2017).

1.1.1. *Aspergillus*

En este género perteneciente al filo *Ascomycota* se engloban hongos filamentosos hialinos, saprófitos, conformados por hifas hialinas septadas (es decir, filamentosas y perforadas), reconociendo en él en torno a unas 340 especies (Klich *et al.*, 2002; Bennett, 2010).

Aunque la mayoría llevan a cabo reproducción asexual, se conocen algunos con reproducción sexual mediante ascos y ascosporas (como por ejemplo en *A. nidulans* y *A. oryzae*). La reproducción asexual es llevada a cabo mediante unas hifas especializadas denominadas conidióforos, en las cuales se encuentran las células (llamadas fiálides y dispuestas sobre la

vesícula) que forman los conidios (Loeffler, 1987; Klich *et al.*, 2002).

Morfológicamente, se caracterizan por estructura filamentosa conformada por hifas ramificadas. Por otro lado, el conidióforo, el cual supone la estructura más característica, es unicelular y está dividido en tres partes: vesícula, estipe y célula pie (Samson *et al.*, 1990). Otras estructuras características son las métulas (situadas entre la vesícula y las fiálides), células presentes solo en algunas especies (hay hongos uniseriados, solo con fiálides y hongos biseriados, con fiálides y métulas) (Pitt *et al.*, 2009). También se conocen diferentes tamaños (de micras a centímetros) y colores (blancos, verdes, amarillos, negros). Estas características son apreciables en los conidios, y son útiles para establecer una clasificación taxonómica (por ejemplo, *A. niger* presenta esporas negras, *A. ochraceus* amarillas...) (Bennett, 2010).

Su hábitat es principalmente terrestre (tierra o desechos vegetales), alimentándose de la materia orgánica degradándola en moléculas simples con enzimas y ácidos. Es por ello que se les denomina saprófitos. Entre los sustratos que estos hongos pueden utilizar se encuentran: polímeros vegetales, estiércol, tejidos, o incluso sustratos fabricados por los humanos (esto se conoce como biodeterioro). Además, la propagación de esporas a través de las corrientes de aire permite el alcance y germinación en diversos ambientes, por lo que se les considera ubicuos, estando presentes en suelos, desechos, aire y alimentos. También destaca su participación en el ciclo del carbono, aportando CO₂ y compuestos inorgánicos, y su implicación en el reciclaje de polímeros como el almidón, celulosa, pectina... y algunas especies hasta de grasas, aceites, quitinas y queratinas (Carroll *et al.*, 1992).

El interés para al humano se debe a su utilidad en varias industrias, como la alimentaria, farmacéutica, biotecnológica o de tratamiento de desechos. Entre las moléculas derivadas de *Aspergillus* empleadas en estas industrias están los ácidos orgánicos o las enzimas extracelulares (amilasas, proteasas, celulasas...), además de varios metabolitos secundarios (como vitaminas o pigmentos) (Venturini Copetti, 2019).

Sin embargo, también pueden presentar un riesgo para plantas y animales, debido a las micotoxinas, compuestos tóxicos que pueden encontrarse en algún alimento contaminado por *Aspergillus* y que pueden ocasionar enfermedades que en el caso de los animales son conocidas como aspergilosis (Bennett, 2010).

Dentro de este género de hongos con esporas sexuales con forma de aspérjula (instrumento empleado para rociar agua bendita), se puede encontrar una clasificación atendiendo a

diversas características de estos hongos, ya sean morfológicas (color y tamaño), fisiológicas (tasa de crecimiento o la termotolerancia), a análisis moleculares a nivel del ADN o análisis bioquímicos, o en otros aspectos como por ejemplo la presencia de teleomorfo y métulas, la disposición de las métulas sobre la vesícula... (Samson *et al.*, 1990; Houbraeken *et al.*, 2014).

Dentro de este gran grupo cabe destacar al hongo *A. niger*.

1.1.1.1. *A. niger*

Esta especie interesante para industrias como la alimentaria o la farmacéutica se sitúa taxonómicamente de la siguiente manera (Accensi i Alemany, 2000):

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Aspergillaceae

Género: *Aspergillus*

Especie: *Aspergillus niger* (Index Fungorum, 2007).

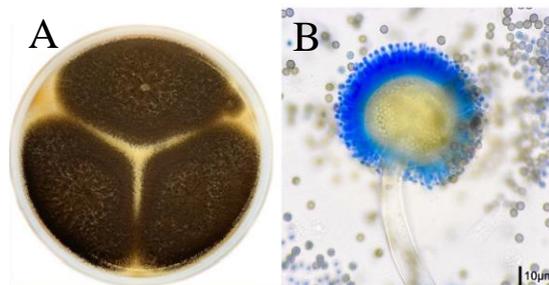


Figura 1. (A) Imagen macroscópica de *Aspergillus niger* (Imagen obtenida de Stemler *et al.*, 2023). (B) Imagen microscópica de una cabeza conidial de *Aspergillus niger*, a escala de 10 μm . (Imagen obtenida de Stemler *et al.*, 2023)

Las características de esta especie son en general las ya descritas para *Aspergillus*, pero resumidamente destacan: su reproducción asexual a través de los conidios, su morfología de hongo filamentoso pequeño y de color negro, su metabolismo saprófito con metabolitos de interés industrial (como el ácido cítrico o el glucónico y varias enzimas) y se encuentran en suelos, plantas, alimentos y materiales orgánicos en descomposición (Al-Musallam, 1980).

Este hongo es generalmente considerado seguro, y se encuentran dentro de la categoría GRAS (*Generally Recognized as Safe*) de la FDA (*Food and Drug Administration*), aunque puede suponer un riesgo por una posible contaminación de alimentos con micotoxinas y derivar en una infección en personas inmunocomprometidas. Algunas enfermedades conocidas en plantas son la antracnosis del algodón o el añublo en los higos (Accensi i Alemany, 2000).

La importancia de este hongo en este trabajo radica en su utilidad en industrias como la farmacéutica, la química y, en especial, la alimentaria (Accensi i Alemany, 2000). Algunos de los metabolitos y enzimas interesantes son el ácido cítrico y glucónico, las enzimas amilasas, proteasas y pectinasas, pigmentos como los carotenoides y las flavinas, y vitaminas, entre otros. Estos componentes pueden servir como aditivos de gran interés (por ejemplo, el ácido cítrico es empleado como acidulante, saborizante o conservante). Además, algunas características de los alimentos como la textura y el sabor pueden ser modificadas con ayuda de enzimas derivadas de este hongo. El aporte de estos metabolitos y enzimas en los alimentos se desarrollará en mayor profundidad en el apartado 3 (Venturini Copetti, 2019).

1.1.2. *Penicillium*

Este género agrupa más de 300 especies de hongos filamentosos, y responde a la siguiente clasificación taxonómica (Index Fungorum, 2011):

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Aspergillaceae

Género: *Penicillium* (Index Fungorum, 2011).

Morfológicamente, son hongos filamentosos de estructura ramificada compuesta por hifas, dispuestas formando el micelio. Tienen un tamaño pequeño y pueden tener un color blanco, amarillo, anaranjado, verde, púrpura o pardo (Webster, 1986).

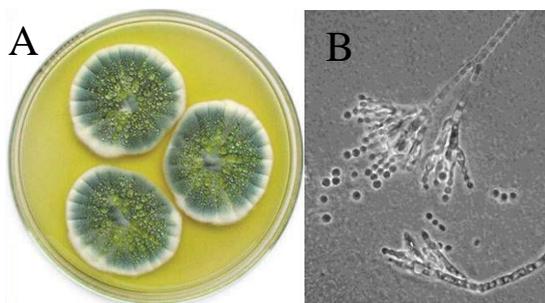


Figura 2. (A) Imagen macroscópica de *Penicillium chrysogenum*. (Imagen obtenida de Narain *et al.*, 2016). (B) Imagen microscópica de la cabeza conidial de *Penicillium chrysogenum* (Imagen obtenida de Volk, 2003).

Su reproducción es asexual a través de los conidios, unicelulares y con forma ovalada. Estos conidios se forman de manera ramificada, dando lugar a una apariencia de pincel (de ahí el nombre de este género) (Webster, 1986).

Estos también son saprófitos y se alimentan de materia orgánica muerta. También se conocen

algunos parásitos y patógenos para plantas y animales. También ofrecen metabolitos de interés industrial, como enzimas, ácidos orgánicos o incluso antibióticos (Pitt *et al.*, 2009). Por otro lado, se encuentran en suelos, aire, agua y materia orgánica en descomposición, por lo que se les considera ubicuos (Samson *et al.*, 1990).

Industrialmente es especialmente importante en la industria farmacéutica, ya que de la especie *Penicillium chrysogenum* se obtiene el importante antibiótico conocido como penicilina. Para la industria alimentaria ofrece una variedad de aditivos, además de enzimas, que modificarán los alimentos para darles cualidades beneficiosas. Además, algunas especies participan activamente en el tratamiento de algunos embutidos y quesos, aportándoles su aroma y sabor característico. Por otro lado, es importante tener en cuenta que estos hongos pueden suponer una contaminación en los alimentos por micotoxinas (Webster y Weber, 2007).

1.2. Aditivos alimentarios

El empleo de los hongos en la industria alimentaria es muy amplio, pero en particular su participación en la producción de aditivos alimentarios resulta muy importante e interesante, y es que los aditivos son empleados en una gran variedad de alimentos de consumo diario, tales como lácteos, bebidas, productos de panadería, carnes... (Wu *et al.*, 2022). Antes de centrarse en los aditivos que puedan aportar los hongos es importante conocer qué son los aditivos y a qué normativa está sujeta su empleo.

Por definición del Reglamento (CE) N° 1333/2008, un aditivo alimentario es “toda sustancia que normalmente no se consume como alimento en sí misma ni se use como ingrediente característico de los alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada – con un propósito tecnológico – a un alimento durante su fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento tenga por efecto, o quepa razonablemente prever que tenga por efecto, que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan directa o indirectamente en un componente del alimento” (Comisión Europea, 2008). Su origen puede ser natural (plantas, microorganismos o animales), o sintético (diseño químico). En su origen fúngico destacan géneros como *Aspergillus* o *Penicillium*, de cuyos metabolismos se obtienen productos con potencial como aditivos alimentarios (Wu *et al.*, 2022).

Además, es importante destacar que el uso de aditivos alimentarios podría suponer algún riesgo en el consumo humano, y por ello su uso requiere de un estudio previo a su comercialización y aceptación en la industria alimentaria, y la legislación que rige en el uso

de cada aditivo dependerá de cada país. En la Unión Europea, cada aditivo alimentario permitido tendrá como denominación una E seguida de un número que identificará el tipo de aditivo del que se trata (Mateos-Aparicio *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2022). Considerando la función de cada aditivo, se pueden dividir en los grupos recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación en grupos de los aditivos alimentarios atendiendo a sus funciones, dando ejemplos de cada uno y los números en los que se clasifican en la Unión Europea (Mateos-Aparicio *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2022).

GRUPO	FUNCIÓN	EJEMPLOS	Nº UE
Colorantes	Mantenimiento o mejora del aspecto y coloración de los alimentos	Carotenoides, clorofila (natural) y tartarina (artificial)	E100-E199
Conservantes	Mantenimiento y evitar deterioros y desarrollo de microorganismos	Ácido cítrico	E200-E299
Antioxidantes	Prevenir la oxidación y deterioro de los alimentos	Ácido cítrico y ascórbico	E300-E399
Estabilizantes, espesantes, gelificantes y emulsionantes	Modificación de texturas (emulsión, homogeneización, viscosidad o gelificación)	Agar y pectina	E400-E499
Aromatizantes	Mejora del aroma y sabor de los alimentos	Glutamato monosódico	E600-E699
Edulcorantes	Potenciar el dulzor con bajo nivel calórico	Aspartamo (artificial) y stevia (natural)	E900-E999

El empleo de aditivos alimentarios en la Unión Europea se encuentra estrictamente regulado por el Reglamento (CE) Nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, con sus debidas modificaciones y adaptaciones, para garantizar el buen uso de los mismos, estando regulado tanto el uso de distintos aditivos (enumerados en una lista), como la cantidad permitida, siempre para garantizar la seguridad, salud y bienestar de los ciudadanos. Además, es imprescindible que cada producto cuente con el debido etiquetado en el cual se informe de cada aditivo que haya podido ser empleado en el mismo (Comisión Europea, 2008).

2. OBJETIVO

El principal objetivo del trabajo es conocer la importancia del reino Fungi en la industria alimentaria, con especial referencia a la obtención de aditivos alimentarios. Por ello se detallan las características de los hongos interesantes para la industria (como *Aspergillus niger*), así como de los aditivos que pueden producir.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología empleada se ha basado en la búsqueda y lectura de artículos, libros y páginas web, destacando la búsqueda a través del portal Pubmed, mediante el cual se ha realizado una

búsqueda precisa de información mediante el ajuste de parámetros como la fecha de publicación o el tipo de artículo, y utilizando palabras clave como *A. niger*, seguido de otras como *citric acid* o *gene editing*. Además, se ha buscado algún libro en la biblioteca de Unileon, como por ejemplo el libro “*Fungi and food spoilage*” de Pitt *et al.*, 2009.

4. PRODUCTOS FÚNGICOS CON INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Varios productos obtenidos en los procesos fermentativos de los hongos son empleados como aditivos alimentarios en la industria alimentaria. Algunos se describen a continuación.

4.1. Ácidos orgánicos

Como definición, un ácido orgánico es un compuesto químico conformado por carbono, hidrógeno y oxígeno. En la naturaleza se pueden encontrar en gran parte de los seres vivos y en muchos de los alimentos de consumo diario. Su uso en la industria se debe a su papel como conservantes, acidulantes, antioxidantes, saborizantes, tampones para el mantenimiento del pH, agentes quelantes de metales pesados... (Venturini Copetti, 2019).

Destacan el ácido cítrico y el glucónico, obtenidos en gran parte del hongo *A. niger* mediante la fermentación de sustratos como la glucosa o la sacarosa (Venturini Copetti, 2019).

4.1.1. Ácido cítrico

Este es un ácido orgánico débil, con apariencia de polvo blanco cristalino, que tiene gran importancia la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, textil... (Behera, 2020).

El ácido cítrico representa el mayor porcentaje de entre los ácidos orgánicos utilizados en alimentación por su poder acidulante para la mejora de sabores y aromas, además de por su capacidad de control del pH, poder quelante, mantenimiento de la vitamina C, evitar el amarroneamiento enzimático de los alimentos, conservar alimentos frescos y congelados para evitar deterioros de apariencia y sabor... (Venturini Copetti, 2019). Algunos ejemplos de alimentos en los que se encuentra este aditivo son las bebidas carbonatadas, las mermeladas, productos de panadería, conservas, lácteos, vinos y sidras... (Behera, 2020).

También se usa en la industria farmacéutica (como agente tamponante y regulador del pH), en detergentes de limpieza, desinfectantes, tratamiento de textiles... A nivel ambiental, es empleado para la biorremediación de tierras por su poder quelante de metales pesados (Behera, 2020), y por la producción de embalajes ecológicos por ser un agente de reticulación y formar cadenas covalentes entre biopolímeros sustitutos de plásticos (Zhang *et al.*, 2023).

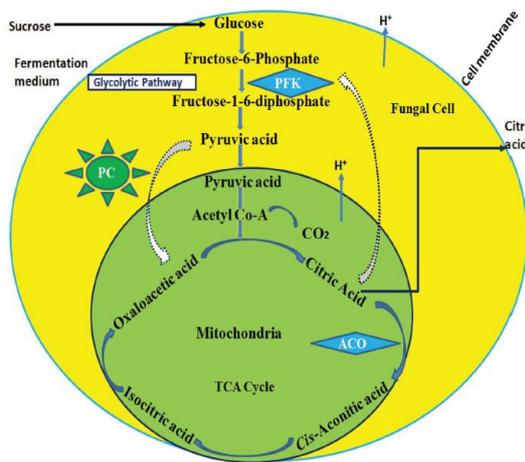


Figura 3. Ruta de producción del ácido cítrico por *A. niger*. (Imagen obtenida de Behera, 2020).

Este ácido puede obtenerse de cítricos como el limón, pero a escala industrial se da a través de hongos por su bajo coste, representando más del 90% de la producción (Venturini Copetti, 2019). Para ello se hace uso de la fermentación, cultivándose *A. niger* (dado al gran rendimiento que ha demostrado este hongo) en presencia de nutrientes como sacarosa, jarabe de glucosa, melaza (mezcla de azúcares y ácidos) ..., de modo que se produzca la fermentación, y así obtener el ácido cítrico de interés (Behera, 2020).

Entrando más en detalle, la producción del ácido cítrico (figura 3) comienza con la glicolisis del azúcar, produciéndose piruvato, que pasa al interior de la matriz mitocondrial y puede transformarse directamente en oxalacetato gracias a la enzima piruvato carboxilasa (PC), u oxidarse y combinarse con la coenzima A para dar lugar a una molécula de acetil co-A. Finalmente se combinan oxalacetato y acetil co-A, obteniendo ácido cítrico (Behera, 2020).

Con respecto a la normativa vigente del uso de este ácido como aditivo alimentario, cabe decir que está aprobado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Comisión Europea (CE), catalogándolo como un aditivo seguro y sin efectos tóxicos significativos asociados (se elimina fácilmente por la orina). Es por ello que no se establece un límite numérico exacto de su uso, siendo su dosis máxima quantum satis (traducido en latín como cantidad adecuada) (Comisión Europea, 2008; Comisión Europea, 2020).

4.1.2. Ácido glucónico

Al igual que el anterior, es un ácido orgánico débil, sin toxicidad y biodegradable, que presenta un color marrón claro (Goldberg *et al.* 2009). Este puede ser obtenido mediante procesos metabólicos como la fermentación, y que es ampliamente utilizado en las industrias alimentaria, farmacéutica, de limpieza... (Anastassiadis *et al.*, 2007).

Con respecto a la industria alimentaria, este ácido es mayoritariamente empleado como aditivo alimentario, actuando principalmente como acidulante, aunque también como conservante, regulador del pH... Además, gracias a su gran potencial como quelante, es

utilizado en alimentos envasados como estabilizante. Es por estas propiedades que varios alimentos cuentan con este ácido orgánico como aditivo, como por ejemplo lácteos, carnes o productos de repostería (Anastassiadis *et al.*, 2007).

También dispone de importancia en industrias como la farmacéutica, en la que desempeña el papel de agente quelante para la producción de medicamentos, en productos de limpieza del hogar, en el tratamiento de aguas y en cosmética, entre otras (Anastassiadis *et al.*, 2007).

Su obtención a partir de los hongos (en especial a *A. niger*), se puede dar de dos formas: a través de procesos de fermentación, por la conversión de carbohidratos como la glucosa a ácido glucónico, o bien utilizando enzimas fúngicas (glucosa oxidasa y catalasa) para catalizar la conversión de glucosa en este ácido (Venturini Copetti, 2019).

La normativa que rige su empleo como aditivo es prácticamente igual al ácido cítrico, estando aprobado su uso tanto por la EFSA como por la CE (Comisión Europea, 2008).

4.2. Enzimas

Las enzimas son moléculas orgánicas responsables de catalizar diversas reacciones químicas, y por ello son muy útiles para el procesamiento de los alimentos, pudiendo aportar cualidades como sabor, aroma, color, textura, estabilidad, valor nutritivo... Es por ello que resulta interesante encontrar la manera más eficaz de obtener estas enzimas, especialmente mediante el empleo de hongos como *Aspergillus niger* (Venturini Copetti, 2019). El uso de esta especie con este fin está aprobado en la Unión Europea, catalogando este hongo de producción como seguro y sin riesgo de micotoxinas (Comisión del Codex Alimentarius, 2016), clasificando muchas enzimas del mismo por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) como GRAS (generalmente reconocidas como seguras) (Ruggeiri *et al.*, 2016).

El interés en el uso de enzimas radica en su especificidad y eficiencia, además de su actividad fácilmente regulable con ajustes fisiológicos como de temperatura o pH, y que son fácilmente inactivadas una vez cumplida su función (Kuddus, 2018), aunque factores como su estabilidad y costes económicos pueden suponer una desventaja. Para solventar la primera de ellas es recomendable el uso de enzimas termoestables, estables con elevadas temperaturas y con poca actividad a bajas temperaturas, facilitando su manejo. Esta termoestabilidad dependerá de las características y del origen en particular de cada enzima (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011).

Entre las familias de enzimas utilizadas en la industria alimentaria destacan las tres siguientes.

4.2.1. Amilasas

Las amilasas son las enzimas que, a partir de moléculas de almidón (polisacárido de reserva energética de las plantas conformado por dos subunidades: la amilosa (polímero lineal de glucosas enlazadas en α -1,4) y la amilopectina (polímero de glucosas enlazadas en α -1,4 y ramificaciones en α -1,6)), hidrolizan los enlaces glicosídicos, obteniendo azúcares simples como la maltosa, la glucosa y la dextrina (Venturini Copetti, 2019).

Este grupo de enzimas se encuentra clasificado según su mecanismo de acción en:

- Endoamilasas: estas realizan cortes en el interior de la molécula de almidón en los enlaces α -1,4, generando moléculas más pequeñas de almidón, dextrinas y oligosacáridos (estas luego podrán ser procesadas por las exoamilasas para la generación de glucosas). Entre ellas destacan las α amilasas, las cuales pueden ser sacarificantes, si en su corte dejan azúcares libres, o licuadoras, que dan lugar a dextrinas (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011). El efecto más notorio de estas enzimas actuando en una pasta de almidón es la reducción de la viscosidad (sobre todo con las licuadoras), propiedad interesante para modificar texturas de alimentos. Algunos alimentos en los que se emplean son panes, siropes y cervezas. También cuentan con gran utilidad en la industria farmacéutica, textil, de detergentes... (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011).
- Exoamilasas: estas cortan los enlaces glicosídicos en los extremos no reductores de la molécula de almidón, generando azúcares simples como glucosa o maltosa. Dentro de las exoamilasas se distinguen 2 tipos: las β amilasas y las glucoamilasas. La diferencia entre ellas es que el primer tipo libera, como producto de su acción, maltosas, mientras que el segundo da como resultado moléculas de glucosa, además de que no solo es capaz de actuar sobre los enlaces α -1,4 terminales (a diferencia de las β -amilasas), sino que también actúa sobre enlaces α -1,6 (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011).
Las β -amilasas destacan en la industria alimentaria por su papel con alimentos, siropes y cervezas y bebidas alcohólicas. A las glucoamilasas se las conoce también por su empleo para la producción de siropes y productos de confitería, además de por la producción de biocombustibles como el etanol (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011).

Estas enzimas tienen origen en distintos microorganismos o plantas, pero destaca sobre todo su obtención a partir de hongos del género *Aspergillus*, especialmente *A. niger* y *A. oryzae* (Venturini Copetti, 2019). Para ello se hace uso de la fermentación, cultivando el hongo en

presencia de almidón, buscando la secreción de estas enzimas para romperlo y utilizar los productos de esa hidrólisis como fuente de carbono y energía. Las amilasas posteriormente serán purificadas para su utilización (Figueroa Ceballos, 2019).

4.2.2. Proteasas

Las proteasas son las enzimas encargadas de generar cortes hidrolíticos en los enlaces peptídicos (entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el amino de otro) de las proteínas, dando lugar a péptidos pequeños o aminoácidos libres. Estas enzimas están presentes en animales, plantas y microorganismos, aunque preferiblemente se obtienen de los últimos para el uso industrial, ya que permiten obtener una mayor cantidad, más estables y efectivas. Proviene principalmente de hongos del género *Aspergillus*, como *A. niger* o *A. oryzae*, haciendo uso de un proceso de fermentación para ello, con el cual, poniendo proteínas en el medio, se conseguirá la secreción de estas enzimas por parte del hongo (Kuddus, 2018).

Este grupo se puede clasificar en función de la reacción que catalizan en exopeptidasas (si actúa en el enlace terminal), endopeptidasas (si actúa en el interior de la molécula), aminopeptidasas (si actúa sobre el extremo amino libre) y carboxipeptidasas (si actúa sobre el extremo carboxilo terminal), o en función del sustrato sobre el que actúan en serina proteasas, cisteína proteasas, aspartil proteasas y metaloproteasas (Kuddus, 2018; Troncoso *et al.*, 2022).

Las aplicaciones de estas enzimas en la industria alimentaria son, entre otras, la mejora de texturas en productos de panadería por acción en las moléculas de gluten, obtención de quesos y proteínas lácteas por precipitación del cuajado, y maduración y ablandamiento de la carne (Díaz Rubio, 1994). Además, también cuentan con utilidad en otras industrias como la farmacéutica, cosmética y de productos de limpieza (Kuddus, 2018).

4.2.3. Pectinasas

Las enzimas pécticas o pectinasas son las enzimas encargadas de la degradación de la pectina, la cual se encuentra formando parte de las paredes celulares de las plantas y se trata de un polisacárido caracterizado por ser un polímero de moléculas de ácido galacturónico enlazadas en α -1,4. Estas moléculas ácidas serán precisamente el producto de la acción de las enzimas pécticas (Franchi *et al.*, 2014).

Dentro de este grupo de enzimas tenemos principalmente las pectin metilesterasas (PME), las cuales atacan a los grupos metilos unidos a las moléculas de ácido galacturónico, y las

poligalacturonasas (PG), que se encargan de la rotura de enlaces α -1,4 entre las moléculas de ácido galacturónico, y pueden ser endo o exo (si atacan en el interior o exterior de la cadena, respectivamente) (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011; Venturini Copetti, 2019).

La acción de estas enzimas rompiendo las pectinas va a facilitar una reducción en viscosidad y consistencia, lo cual resulta especialmente en la industria alimentaria para el tratamiento de zumos, consiguiendo la clarificación y concentración del líquido a tratar. También resultan útiles para el tratamiento de granos de café para facilitar el procesamiento del mismo (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011; Venturini Copetti, 2019).

Estas enzimas, además de encontrarse en plantas, se pueden obtener de hongos como *Aspergillus niger*, los cuales en presencia de pectina en el medio sintetizarán pectinasas para su descomposición (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011).

4.3. Metabolitos secundarios

Dentro de este grupo se incluyen aquellos componentes que los seres vivos producen en su metabolismo, que, a diferencia de los primarios, no se consideran esenciales, pero sí que aportan algún aspecto positivo al organismo, y que se encuentran generalmente en bajas concentraciones (Park *et al.*, 2017).

Dentro de este grupo hay que distinguir entre perjudiciales (como las micotoxinas, y dentro de ellas cabe resaltar las aflatoxinas de algunas especies dentro del género *Aspergillus*), y los que pueden ser beneficiosos, como los pigmentos y vitaminas empleados como aditivos alimentarios (Park *et al.*, 2017).

4.3.1. Pigmentos

Los pigmentos (o también conocidos como colorantes alimentarios) son aquellas sustancias que se emplean para modificar el color de los alimentos y bebidas, los cuales pueden ser clasificados según su procedencia en dos grupos: los hay naturales (por ejemplo, β -carotenos o flavinas), obtenidos de plantas, hongos, animales o minerales, o sintéticos (por ejemplo, tartrazina o amaranto), obtenidos químicamente. Si bien los sintéticos cuentan con la ventaja de ser más baratos, más estables o aportar una coloración uniforme, estos suponen cierta toxicidad al consumo humano, por lo que el empleo de colorantes naturales podría ser más beneficioso (Wu *et al.*, 2022).

Para mencionar algunos ejemplos de alimentos en los que se pueden encontrar colorantes

como aditivos tenemos: carotenos en lácteos, bebidas, frutas procesadas..., antocianinas en mermeladas, bebidas... Además, estos colorantes tienen más aplicaciones en otras industrias, como por ejemplo en la farmacéutica, cosmética, textil o de pinturas (Wu *et al.*, 2022).

En la obtención de pigmentos con relevancia en la industria alimentaria destaca la producción mediante la fermentación de hongos filamentosos, consiguiendo una amplia variedad de pigmentos de esta manera (carotenoides, antocianinas, clorofilas, melaninas, flavinas...) (Dufossé *et al.*, 2014), de entre los cuales se comentarán los siguientes:

4.3.1.1. Carotenoides

Los carotenoides son el grupo de pigmentos empleados para otorgar una coloración anaranjada a los alimentos. Dentro de esos cabe resaltar el β -caroteno, el cual, aparte de emplearse como pigmento anaranjado, también se utiliza por ser precursor de la vitamina A y un antioxidante (Venturini Copetti, 2019). Podemos encontrarlos en alimentos como lácteos o productos de panadería, además de tener utilidad en la industria farmacéutica y cosmética (Archer *et al.*, 2008).

Estos se obtienen principalmente de *Blakeslea trispora* (Venturini Copetti, 2019), productor de β -caroteno mediante la ruta de la figura 4.

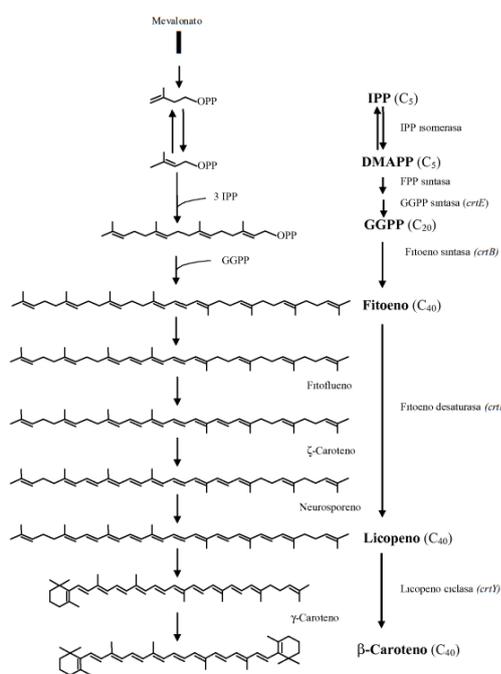


Figura 4. Ruta de obtención de β -caroteno por *Blakeslea trispora* (obtenida de Costa Pérez *et al.*, 2003)

El proceso comienza con la toma de carbón (por ejemplo, de glucosa) por el hongo, convirtiéndolo en acetil-CoA, el cual por otro lado será convertido en IPP (isopentenil pirofosfato), el cual más adelante dará lugar a GGPP (geranilgeranil pirofosfato), y este, a través de la acción de distintas enzimas y pasando por varios intermediarios, será transformado en última instancia en β -caroteno (Costa Pérez *et al.*, 2003).

Su uso está aprobado en la Unión Europea por la EFSA y la CE, lo cual permite un uso razonable del mismo, dado a que se trata de un aditivo seguro y que no supone ningún riesgo para la salud, pero procurando no sobrepasar el consumo individual de

5-10 mg/día del mismo (Comisión Europea, 2015).

4.3.1.2. *Monascus*

Otro ejemplo son los pigmentos *Monascus*, provenientes de especies de hongos del género *Monascus*, que se dividen por colores en rojos, naranjas y amarillos. Además, estudios han demostrado un poder antibiótico y antifúngico en estos pigmentos. Sin embargo, el uso de estos no está aprobado en la Unión Europea por riesgo de contaminación con micotoxinas, concretamente la citrinina, a diferencia del Sudeste Asiático, donde su uso está permitido (por ejemplo, en el arroz rojo fermentado) (Venturini Copetti, 2019).

El proceso industrial de obtención de este pigmento consiste en una fermentación que comienza con la toma de una fuente de carbono y mediante procesos enzimáticos termina en la producción del pigmento (Velázquez Arellano, 2016).

Como alternativa no micotoxigénica de producción de pigmentos *Monascus*, se ha descubierto que los hongos del género *Talaromyces* son capaces de producir pigmentos de poliquetidos azafilona similares a *Monascus* (MPA), los cuales resultan más seguros por no ser capaces de producir citrinina estos hongos (Dufossé *et al.*, 2014).

4.3.2. Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos considerados micronutrientes esenciales, cuyo aporte necesitan los animales en la dieta, ya que no son capaces de sintetizarlos o lo hacen en cantidad muy baja. Es por ello que una buena alimentación resulta tan importante. Estas se pueden clasificar en dos grandes grupos: vitaminas hidrosolubles (B y C) y liposolubles (A, E, D y K). La importancia de estos compuestos radica en que son fuente de energía para el cuerpo, importantes para el metabolismo y el sistema inmune... (Venturini Copetti, 2019).

Muchos alimentos disponen de vitaminas suficientes para el consumo, sin embargo, hay algunos que requieren el uso de aditivos para ser una fuente de nutrientes. En la producción de vitaminas a nivel industrial destaca, una vez más, la fermentación microbiana, mediante la cual, una vez seleccionada la cepa de hongos necesaria y con ayuda de determinados nutrientes, se obtiene la vitamina de interés (Venturini Copetti, 2019).

4.3.2.1. *Riboflavina (B2)*

Es una vitamina soluble del grupo de las vitaminas del complejo B, en concreto la B2, que, además de ayudar en la producción de energía, es importante por sus propiedades

antioxidantes, antiinflamatorias, de mantenimiento de los glóbulos rojos y el metabolismo de otras vitaminas, entre otras (Suwannasom *et al.*, 2020). Esta vitamina, aparte de su empleo como aditivo para aportar valor nutritivo a los alimentos, es también usada como colorante, dado que es capaz de otorgar una coloración amarillenta a los alimentos (Venturini Copetti, 2019).

Esta vitamina se encuentra de manera natural en varios alimentos (como lácteos, órganos animales, levadura de cerveza, verduras de hojas verdes...), pero para garantizar su consumo en la dieta de forma equilibrada se añade esta vitamina B2 como aditivo, como en los lácteos (en los que se aumenta su contenido en B2), zumos, cereales y suplementos (Suwannasom *et al.*, 2020).

Para la producción mediante fermentación microbiana de esta vitamina se hace uso mayoritariamente del hongo *Ashbya gossypii* (Venturini Copetti, 2019), aunque también se puede hacer uso de hongos como *A. niger* o especies del género *Penicillium*, comenzando con la toma de carbono de una fuente como la glucosa y continuando, a través de enzimas e intermediarios, hasta obtener la riboflavina (Archer *et al.*, 2008).

El uso de la B2 como aditivo alimentario está aprobado por la EFSA y la CE, siendo una vitamina de consumo seguro, que no genera toxicidad debido a que no se almacena en el organismo y su exceso se elimina fácilmente por la orina, por lo que se permite su uso y no se exponen peligros en su ingesta (Comisión Europea, 2019).

4.3.2.2. β -caroteno

Como se ha comentado antes, el β -caroteno, además de servir como colorante, también se utiliza como precursor de la vitamina A o retinol (pro-A), vitamina liposoluble importante para numerosas funciones vitales, como el mantenimiento de la integridad epitelial, una visión adecuada (ayuda en la regeneración de pigmentos visuales de la retina, de ahí que también se le llame retinol), producción de glóbulos rojos, etc. (Martins Soares, 2019).

El ser un precursor de la vitamina A quiere decir que su uso como vitamina no está inmediatamente disponible, y requiere de la conversión de esta forma de provitamina a vitamina A propiamente dicho, de modo que se ingiere en la dieta a modo de β -caroteno y con ayuda de enzimas del cuerpo se obtiene la vitamina de interés (Martins Soares, 2019).

Este apartado se resume a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Función, origen y seguridad del empleo de distintos compuestos como aditivos alimentarios.

PRODUCTOS		FUNCIÓN	ORIGEN	SEGURIDAD
ÁCIDOS ORGÁNICOS	Ácido cítrico	Acidulante y conservante	<i>A. niger</i>	Aprobado por la EFSA y CE
	Ácido glucónico	Acidulante y conservante	<i>A. niger</i>	Aprobado por la EFSA y CE
ENZIMAS	Amilasas	Modificar texturas y producir siropes	<i>A. niger</i> y <i>A. oryzae</i>	GRAS por la FDA
	Proteasas	Modificar texturas y proteínas	<i>A. niger</i> y <i>A. oryzae</i>	GRAS por la FDA
	Pectinasas	Reducir viscosidad y consistencia	<i>A. niger</i>	GRAS por la FDA
PIGMENTOS	Monascus	Coloración roja	<i>Monascus</i>	Riesgo de contaminación por micotoxinas
	β -caroteno	Coloración naranja y valor nutritivo	<i>Blakeslea trispora</i>	Aprobado por la EFSA y CE. (5-10 mg/día)
VITAMINAS	Riboflavina (B2)	Valor nutritivo, coloración amarillenta	<i>Ashbya gossypii</i> , <i>A. niger</i> y <i>Penicillium</i>	Aprobado por la EFSA y CE

5. ENFOQUE BIOTECNOLÓGICO

En este apartado se tratará de comentar las aplicaciones de la biotecnología en la industria, mencionando distintas técnicas de edición génica de hongos para lograr una optimización y un mayor rendimiento de producción de cara a la industria alimentaria. Estas aplicaciones se enfocarán principalmente a *Aspergillus niger*, hongo muy importante y útil para el tratamiento de distintos alimentos, así como para la producción de aditivos alimentarios. La biotecnología ha tratado de mejorar este hongo hacia una mayor producción, además de dar una solución a algunos inconvenientes, como la posible exposición de los alimentos a las micotoxinas. Antes de entrar en detalle en estas técnicas es importante conocer el procedimiento seguido para la producción de los compuestos empleados como aditivos alimentarios (Behera, 2020).

5.1. Proceso industrial

A escala industrial, el cultivo de *A. niger* tendrá lugar considerando la productividad y rendimiento del mismo. Es por ello, que para la obtención de productos con interés alimentario se buscan tres formas de favorecer el proceso de fermentación y lograr un mayor rendimiento en la producción del compuesto deseado (Behera, 2020):

1. *Fermentación sumergida*: consiste en el cultivo de *A. niger* sumergido en un medio líquido

con los sustratos y fuente de carbono para que tenga lugar la fermentación anaeróbica y obtener el producto de interés. Este proceso tendrá lugar en un biorreactor en condiciones controladas para optimizar su cultivo (regulando parámetros como la temperatura, el pH, la agitación o la aireación). Este método cuenta con las ventajas de tener altos rendimientos, permitir un buen control del proceso, bajo coste... aunque también cuenta con la desventaja de formación de espuma, favoreciendo el uso de agentes antiespumantes. Para la producción de ácido cítrico se emplea este tipo de fermentación (Behera, 2020).

2. *Fermentación superficial*: se caracteriza por una fermentación en batch, en una superficie con una capa delgada de medio semisólido, que simplifica el proceso y requiere un menor consumo de energía. Sin embargo, ofrece menores rendimientos, además de estar expuesta a mayores contaminaciones, requiriendo el uso de filtros bacteriológicos (Behera, 2020).
3. *Fermentación en estado sólido*: se emplea una superficie sólida humedecida de material insoluble, que aporta los nutrientes necesarios al cultivo. Cuenta con las ventajas de ser fácil, barato y no requerir equipo costoso, además de tener un alto rendimiento y bajos riesgos de contaminación y requerimientos energéticos. Sin embargo, una de las desventajas con respecto a los otros tipos es que dificulta el control de los parámetros del proceso, así como que no garantiza un empleo eficiente de todos los nutrientes del medio. Este proceso puede emplearse, por ejemplo, en la obtención de enzimas (Behera, 2020).

5.2. Edición génica

Una de las alternativas biotecnológicas propuestas es la modificación genética de los hongos, en este caso *A. niger*, para otorgarle las características de interés. Esto puede suponer una edición génica del ADN de este hongo, o la introducción de ADN exógeno en el mismo, para lo cual se puede hacer uso de los siguientes métodos de transformación (Li *et al.*, 2020):

1. *Polietilenglicol (PEG)-mediated transformation (PMT)*. Para esta técnica son necesarios los protoplastos de *A. niger*, conseguidos mediante la digestión de la pared celular de la célula vegetal, haciendo uso, principalmente, de enzimas líticas, quitinasas o β -glucuronidasas. Tras esto, y con ayuda del PEG y Ca^{+2} , se media la introducción del material genético exógeno en la célula (Li *et al.*, 2020).
2. *Agrobacterium tumefaciens mediated transformation (AMT)*. Se requiere el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria de la cual se hará uso de su mecanismo de infección en plantas, de su DNA de transferencia (T-DNA) incluido en un plásmido inductor de

tumores (plásmido Ti). Así, incluyendo el gen de interés en el T-DNA y cocultivando *A. tumefaciens* con *A. niger*, se introduce el gen de interés (Li *et al.*, 2020).

3. *Electroporación*. Este método es el más sencillo, y consiste en la introducción del DNA exógeno en las células a través de poros reversibles en las membranas plasmáticas, los cuales se pueden generar haciendo uso de fuertes pulsos eléctricos (Li *et al.*, 2020).

Cada método es usado según lo que se busque, de modo que si, por ejemplo, se busca una mayor efectividad, se hará uso del primero de ellos, si lo que se busca es un procedimiento más simple, se empleará la electroporación, o si se busca una recombinación homóloga precisa, convendrá el método AMT. Es importante también la selección de cepas transformadas sobre las que no, por lo que se ha de conocer el empleo de distintos marcadores de selección. En este caso, estos marcadores podrán ser, por ejemplo, los genes de resistencia *bla* (resistencia al antibiótico zeocina), *hygB* (a la higromicina), u *oilC* (a la oligomicina), seleccionando de esta manera a las cepas capaces de crecer en medios con los antibióticos a los cuales presentan resistencia, y que, por tanto, han sido transformadas (Li *et al.*, 2020).

Por otro lado, es posible llevar a cabo la edición génica endógena de una cepa de *Aspergillus niger*, mediante el desarrollo de las siguientes técnicas:

1. *Recombinación homóloga (HR)*: consiste en la recombinación genética entre dos secuencias homólogas al realizar un corte de doble hebra en una secuencia de ADN, pudiendo incluir así secuencias de ADN exógenas. Por otro lado, se ha observado una mayor probabilidad de reparación del corte por unión de extremos no homólogos (NHEJ), que no precisa de homología y lleva a cabo reparaciones aleatorias, pudiendo inducir mutaciones. Es por ello que la recombinación buscada será la homóloga, ya que permite la introducción de la secuencia de ADN de interés (Li *et al.*, 2020).
2. *Sistema CRISPR-Cas*: se basa en la presencia de secuencias palindrómicas cortas repetitivas en el genoma de las bacterias (CRISPR), acompañadas por un grupo de genes cas que codifican para las enzimas de corte Cas. Este sistema funciona generando un corte en un punto preciso de la secuencia del material genético, para lo cual se requiere de un RNA guía (gRNA) que lleve al sistema a ese punto y garantice la introducción de la secuencia de interés en el sitio adecuado. Es por ello que resulta tan importante conseguir un buen diseño del gRNA (Li *et al.*, 2020).

La identificación de cepas editadas se hace por genes reporteros como *pptA* (responsable de un color blanco en las esporas), *olvA* (amarillo) o *brnA* (marrón) (Li *et al.*, 2020).

5.2.1. Aplicación para aditivos alimentarios

Estos métodos se pueden emplear para la optimización del proceso de producción de los compuestos fúngicos empleados como aditivos alimentarios. Algunos ejemplos de productos en los que se ha conseguido una sobreproducción son (Li *et al.*, 2020):

- *Ácido cítrico*: una de las estrategias para la sobreproducción de este ácido en *A. niger* es la ruptura de los genes *pyrG* y *kusA*. El primero participa en la síntesis de pirimidina, mientras que el segundo desempeña un papel importante en la NEHJ. Para la disrupción de estos genes se hace uso de la tecnología CRISPR/Cas 9 con ayuda de un promotor constitutivo rRNA 5S, que generará dos roturas de doble hebra (una para cada locus), inactivando estos genes, y siendo reparadas por recombinación homóloga (Zhang *et al.*, 2020). Así, se produce una interferencia en el metabolismo central de *A. niger*, derivando a un gran incremento en la producción de ácido cítrico en *A. niger* (Behera, 2020).

La obtención de ácido cítrico puede verse favorecida también mediante la sobreexpresión constitutiva o inducible del gen *cexA*, que codifica para un transportador de membrana del ácido cítrico, permitiendo la secreción del mismo de la célula, lo cual es un paso limitante en la producción de este (Soares-Silva *et al.*, 2020). Para ello se emplea un promotor inducible por sistema tet-on, permitiendo su sobreexpresión solo en la etapa de producción con ayuda de doxiciclina. El empleo de un promotor constitutivo supone una interferencia con la conidiación de la cepa, por lo que, aunque la secreción de ácido cítrico aumente, hay que tener en cuenta el impacto negativo en la fisiología de la cepa (Steiger *et al.*, 2019)).

- *Amilasas*: la producción de glucoamilasas y α -amilasas está regulada, en *A. niger*, por los genes *glaA* y *amyA*, respectivamente. Una de las estrategias para la sobreproducción de estas enzimas es la inserción de copias adicionales de sus genes en una cepa de *A. niger*, haciendo uso de la transformación mediada por *A. tumefaciens*. El primer paso consiste en la clonación de los genes *amyA* y *glaA* mediante PCR, para su inserción en un vector, el cual, con ayuda de *A. tumefaciens*, llevará a cabo la transformación de las cepas de *A. niger* mediante la integración de los genes del vector en su genoma. Para verificar la transformación de las cepas se lleva a cabo una PCR. Además, para cuantificar la expresión génica y verificar que la inserción de copias adicionales conlleva una sobreproducción de las enzimas se puede llevar a cabo una PCR cuantitativa en tiempo

real. Los resultados de esta confirman una sobreexpresión de los genes y por tanto se valida este método para la mayor obtención de las enzimas de interés. Por otro lado, se ha observado que la presencia de fosfopéptidos de caseína (CPPs) aumentan la producción de glucoamilasa y α -amilasa, ya que regula la homeostasis del Ca^{+2} en las células y permite que las enzimas se plieguen adecuadamente y salgan de forma controlada. Es por ello que se suele añadir en los medios de fermentación en un 1% (An *et al.*, 2019).

- *Pectinasas*. Para su sobreproducción en *A. niger* se recurre a la transformación a través del uso de protoplastos, consiguiendo cepas de *A. niger* con la cualidad deseada. Para esto se hace uso de los genes responsables de la codificación de estas enzimas, que son los genes de la familia *gaa* (*gaaA*, *gaaB*, *gaaC*, *gaaD*), cuya transcripción viene inducida por la presencia de ácido galacturónico (GA), y está controlada por el factor de transcripción GaaR. Es importante, además, tener en cuenta la presencia de la proteína GaaX, que actúa como represor de la transcripción inhibiendo GaaR en ausencia de GA. La estrategia seguida será sobreexpresión del gen *gaaR*, codificador del factor de transcripción, para conseguir una transcripción constitutiva incluso en ausencia de GA. Mediante la creación de un plásmido con el gen *gaaR* amplificado por PCR y regulado por un promotor de *A. nidulans*, con ayuda de enzimas de restricción, y mediante el empleo de una cepa de *E. coli* para la amplificación del vector de clonación, se consiguen, haciendo uso de protoplastos, cepas de *A. niger* con una sobreexpresión constitutiva del gen *gaaR*. De esta forma se consigue que la concentración de GaaR supere en gran escala la de GaaX, no inhibiéndose la transcripción incluso en ausencia de inductor, y, en última instancia, una sobreproducción de enzimas pectinasas. Por otro lado, otra estrategia podría ser la de enfocar el control en la inhibición de transcripción, observándose también una expresión constitutiva mediante la represión del inhibidor GaaX, aunque la producción en este caso sería menor. Además, a través de la inactivación del gen *creA*, el cual es responsable de reprimir la expresión de genes que participan en la degradación de carbono, y que se le ha visto correlación con la represión de genes codificadores de pectinasas, también se ha conseguido favorecer la producción de pectinasas en *A. niger* (Alazi *et al.*, 2018).

5.3. Micotoxinas

Como se comentó previamente, las micotoxinas suponen un riesgo para la salud humana, y el empleo de hongos en la industria alimentaria puede suponer la exposición de los alimentos a la presencia de estas. Es por ello que, desde un punto de vista biotecnológico, se han tratado

de eliminar, conociéndose distintas técnicas para lograr esto. Una de ellas supone la modificación genética de los hongos empleados en estos procesos para poder alterar las rutas metabólicas que llevan a la producción de las micotoxinas para evitarlo (Li *et al.*, 2020).

Aunque el empleo del hongo *A. niger* es considerado seguro, pudiendo obtener productos catalogados como GRAS, hay que tener en cuenta la posible presencia de micotoxinas en los compuestos obtenidos de estos, que, aunque puedan ser pocas, suponen un riesgo. Las principales micotoxinas conocidas en esta especie y que pueden ser perjudiciales son tres, dos conocidas por ser carcinogénicas, la fumonisina (FUM) y la ocratoxina A (OTA), y el ácido oxálico (OA), que es un compuesto tóxico para el riñón. De estas micotoxinas se conocen los clústeres genéticos responsables de su codificación, por lo que la búsqueda de una cepa de *A. niger* sin toxicidad asociada está enfocada a la eliminación de estos clústeres. De esta manera se consiguen cepas seguras para la industria alimentaria, aunque es necesaria la búsqueda del equilibrio con la producción, ya que la eliminación de determinados clústeres genéticos podría afectar negativamente a la obtención del producto (Li *et al.*, 2020).

Además, otro factor que puede influir en la producción de micotoxinas son las condiciones del medio y el cultivo de la fermentación. Se ha observado una reducción/ inhibición en la producción de enzima en medios de agar a base de plantas, a bajas temperaturas y actividad de agua, y a un pH menor de 4. Además, se ha observado que la sacarosa puede estar implicada en la producción de OA, desaconsejándose su uso (Li *et al.*, 2020).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Vista la importancia que depositan los hongos a nivel industrial, en particular en la industria alimentaria y especialmente en la producción de aditivos alimentarios, es importante perseguir la innovación en los procedimientos y técnicas llevados a cabo para optimizar esta producción y obtener mejores resultados (Li *et al.*, 2020).

Es por ello que las técnicas de cultivo y de mejora genética de hongos están en constante proceso de mejora, buscándose aquellas que resulten más eficaces y la mejor manera de llevarlas a cabo, además de prestar atención a las técnicas emergentes. Por ejemplo, la técnica CRISPR-Cas, de la cual se ha comentado su eficacia para la mejora genética, está siendo objeto de estudio para optimizarla y conseguir que los resultados sean los mejores posibles (Li *et al.*, 2020).

Además de la búsqueda de una producción óptima, también hay que prestar atención a las

técnicas de análisis, y es que, para analizar los aditivos alimentarios, las actuales técnicas cuentan con algunas dificultades, como por ejemplo la gran variedad de aditivos existentes, las diferentes composiciones en los alimentos en los que se emplean aditivos o las similitudes entre estructuras de algunos aditivos (Wu *et al.*, 2022).

No solo se pretende la mejora en las técnicas de obtención de productos, sino también en las características de estos últimos con perspectiva a sus diversas aplicaciones. Por dar un ejemplo, un producto del cual se espera una mejora es de la enzima α -amilasa, de la cual se pretende mejorar su termoestabilidad y desempeño a menores pH, buscando una reducción en los costes y la simplificación de algunos procesos en los que participa. Es por ello que se pretende la búsqueda de las mejores cualidades de los productos para cada situación, de cara a optimizar las aplicaciones de estos (Uma Maheswar Rao *et al.*, 2011). Además, también se están buscando nuevas fuentes fúngicas para la producción de aditivos, como por ejemplo hongos marinos, muchos de los cuales se ha visto que cuentan con la coloración característica de sus organismos huéspedes, y por ello se pueden considerar entidades marinas, como las algas, como fuente de hongos para obtención de colorantes (Dufossé *et al.*, 2014).

Otra cuestión a la cual las investigaciones están prestando atención en la obtención de cepas mejoradas, es en el estudio de las micotoxinas, con el objetivo de poder manejar hongos que lleven asociada la menor toxicidad posible y por tanto resulten más seguros para el ser humano (Li *et al.*, 2020).

Más allá de las ya comentadas y conocidas utilidades de los hongos en la industria alimentaria, otra de las muchas aplicaciones y que ofrecen una buena visión futura, es la de aportar un producto alternativo a la carne (Kumar *et al.*, 2017).

En la industria alimentaria se ha tratado, y se sigue tratando, de proponer alternativas más sostenibles a la carne. Para ello se ha hecho uso de varios productos de distintos orígenes. Una de las alternativas más interesantes (más incluso que las de origen vegetal) es el empleo de hongos (Kumar *et al.*, 2017).

Los hongos filamentosos son organismos que cuentan con una estructura que se asemeja a la estructura muscular de los animales, y que por tanto cuentan con una textura similar. Esta textura también se debe gracias a la micoproteína, proteína de origen fúngico, obtenida industrialmente haciendo uso de la fermentación, que cuenta con mayor presencia en el micelio de los hongos, y que resulta muy interesante para la industria alimentaria (Kumar *et*

al., 2017; De Giacomi, 2023).

El empleo de la micoproteína para obtener un producto alternativo a la carne eleva la calidad del mismo, debido a que esta permitiría garantizar un gran aporte proteico, además de ofrecer una amplia variedad de minerales y vitaminas. Por otro lado, esta fuente fúngica de proteínas presenta varias ventajas sobre la cárnica, y es que, además de los innegables beneficios ambientales, supone un alimento bajo en grasas y colesterol LDL, y contiene una gran cantidad de antioxidantes y aminoácidos esenciales (Kumar *et al.*, 2017; De Giacomi, 2023).

Otro factor que hace de la micoproteína un componente interesante en la creación de un análogo a la carne es que es insípida e incolora, y que, como se ha comentado, tiene una textura muy similar a la carne. Por ello, y mediante el empleo de saborizantes y colorantes, se podría conseguir un producto con gran valor en el mercado que imite a la carne o el pescado. Esto, junto con los beneficios para la salud de los hongos, permiten reconocer esta alternativa como una de las mejores entre las existentes (Kumar *et al.*, 2017; De Giacomi, 2023).

Por mencionar un ejemplo de un equipo investigador pionero en este ámbito, en España, un grupo de investigadores han creado una empresa (Innomy) para dar con la fórmula perfecta para producir un producto de apariencia, sabor y textura similar a la carne, pero de origen fúngico, con los beneficios que eso conlleva. Dicen emplear tecnologías amoldadas a los hongos con los que trabajan y garantizan que su producto supondrá una fuente de proteínas sostenible para el planeta, destacando que “con medio kilo de materia vegetal más agua puede lograrse un kilo de micelo” (De Giacomi, 2023), con el correspondiente y elevado nivel de proteínas que eso supone (Kumar *et al.*, 2017; De Giacomi, 2023).

7. CONCLUSIONES

En conclusión, la presencia de los hongos en la industria alimentaria es de gran importancia, en concreto en la producción de aditivos alimentarios. Esto es gracias a sus destacables características, así como a la elevada y sencilla producción de aditivos de cada grupo, que, además, cuentan con una reconocida seguridad para el consumo. Cabe destacar el papel de *Aspergillus niger*, hongo clave en la obtención de aditivos alimentarios, que proporciona algunos tan importantes como lo son el ácido cítrico o las enzimas amilasas y pectinasas, los cuales aportan no solo cualidades organolépticas, sino que también proporcionan una mayor durabilidad y conservación de los alimentos.

Además, gracias al gran conocimiento en la fisiología de este hongo se ha podido hacer uso

de las emergentes técnicas biotecnológicas, tales como CRISPR-Cas, para la optimización de los procesos fermentativos de producción de los compuestos empleados como aditivos, dirigiéndose a la sobreproducción de genes involucrados en la ruta de obtención de estos productos, así como a evitar el papel inhibitorio que pueden tener algunos genes.

Por otro lado, la biotecnología también ha aportado una eficaz manera de conferir una mayor seguridad en el consumo de productos derivados de hongos. Esto se ha conseguido interfiriendo en aquellos genes codificadores de micotoxinas, responsables de intoxicaciones alimentarias y que, por tanto, se desean evitar.

El futuro de la industria alimentaria va de la mano del avance en el conocimiento y mejora de los hongos y sus productos, siendo objeto de investigación aquellas técnicas prometedoras en la optimización de los procedimientos de obtención de productos fúngicos importantes. Por otro lado, se está estudiando su papel como sustitutivo de alimentos como la carne, proponiendo un análogo de elevado valor proteico y cualidades organolépticas excepcionales.

8. REFERENCIAS

- Accensi i Alemany, F. (2000) *Aportación al conocimiento de Aspergillus sección Nigri*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Ahmad, N., Lagunoff, M., Reller, L. B., Drew, W. L., Pottinger, P. y Sterling, C. R. (2017) “Hongos. Conceptos básicos”, en Kenneth J. Ryan, C. George Ray (eds.) *Sherris. Medical microbiology*. 6ª. ed. Nueva York: McGraw-Hill, pp. 535-539.
- Alazi, E., Knetsch, T., Di Falco, M., Reid, I. D. *et al.* (2018) "Inducer-independent production of pectinases in *Aspergillus niger* by overexpression of the D-galacturonic acid-responsive transcription factor gaaR", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), pp. 2723–2736. doi:10.1007/s00253-018-8753-7.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. y Blackwell, M. M. (1996) *Introductory Mycology*. 4.ª ed. Nueva Jersey: Wiley
- Al-Musallam, A. (1980) *Revision of the black Aspergillus species*. Utrecht: Utrecht University.
- An, X., Ding, C., Zhang, H., Liu, T. *et al.* (2019) "Overexpression of amyA and glaA substantially increases glucoamylase activity in *Aspergillus niger*", *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 51(6), pp. 638–644. doi:10.1093/abbs/gmz043.
- Anastassiadis, S. y Morgunov, I. G. (2007) “Gluconic Acid Production”, *Recent Patents on Biotechnology*, 1(2), pp. 167-180.
- Archer, D. B., Connerton, I. F. y MacKenzie, D. A. (2008) “Filamentous Fungi for Production of Food Additives and Processing Aids” *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 111, pp. 99–147. https://doi.org/10.1007/10_2007_094.
- Behera, B. C. (2020) “Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview”, *Critical Reviews in Microbiology*, 46(6), Taylor and Francis Ltd., pp. 727-749. DOI: 10.1080/1040841X.2020.1828815.
- Bennett, J. W. (2010) “An overview of the genus *Aspergillus*” en Machida, M. y Gomi, K. (eds.). *Aspergillus: Molecular biology and genomics*. U.K.: Caister Academic Press, pp.
- Carroll, G.C., y Wicklow, D.T. (1992). *The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Comisión del Codex Alimentarius (2016) “Programa conjunto de la FAO/OMS sobre normas alimentarias Comité del Codex sobre aditivos alimentarios 48.ª reunion xi’an (China), 14-18 de marzo de 2016. Propuestas de adiciones y cambios a la lista de prioridades de los aditivos alimentarios propuestos para su evaluación por el JECFA”, *Diario Oficial del Codex Alimentarius*, 18 de marzo de 2016.
- Comisión Europea (2008) “Reglamento (CE) n o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios”, *Diario Oficial de la Unión Europea, Serie L*, 31 de diciembre de 2008, (354), pp. 16-33
- Comisión Europea (2015) “Reglamento (UE) 2015/1378 de la Comisión de 11 de agosto de 2015 que modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta al uso de riboflavinas (E 101) y carotenos (E 160a) en granulados y copos de patata seca”, *Diario Oficial de la Unión Europea, Serie L 213/1*, 12 de agosto de 2015, pp. 1-3.
- Comisión Europea (2019) “Reglamento de Ejecución (UE) 2019/901 de la Comisión de 29 de mayo de 2019 relativo a la autorización de la riboflavina producida por *Ashbya gossypii* (DSM 23096), la riboflavina producida por *Bacillus subtilis* (DSM 17339 y/o DSM 23984) y la riboflavina-5'-fosfato sódico producida por *Bacillus subtilis* (DSM 17339 y/o DSM 23984) (fuentes de vitamina B2) como aditivos en piensos para todas las especies animales”, *Diario Oficial de la Unión Europea, Serie L 144/41*, 3 de junio de 2019, pp. 41-46.
- Comisión Europea (2020) “Reglamento (UE) 2020/1419 de la Comisión de 7 de octubre de 2020 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n.o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo al uso de ácido ascórbico (E 300) y ácido cítrico (E 330) en hortalizas blancas destinadas a una transformación ulterior”, *Diario Oficial de la Unión Europea, Serie L 326/11*, 8 de octubre de 2020, pp. 11-13.
- Costa Pérez, J., Marcos Rodríguez, A. T., De La Fuente Moreno, J. L., Rodríguez Saiz, M. *et al.* (2003) *Procedimiento de producción de β -caroteno por fermentación en cultivo mixto utilizando cepas (+) y (-) de Blakeslea trispora*. Patente no. EP1367131A1.
- De Giacomi, J. P. (2023) “Proteínas alternativas sostenibles y saludables gracias a los hongos”, *Revista alimentaria*.
- Díaz Rubio, O. (1994) *Efecto de la adición de proteasas en el proceso madurativo de los embutidos crudos curados*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S. A. S. *et al.* (2014) "Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry". *Current Opinion in Biotechnology*, 26, pp. 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.007>.

Facultad de Ingeniería Química (2020) *Mundo microscópico I: la levadura*. Disponible en: <https://www.fiq.unl.edu.ar/culturacientifica/extension-fiq/mundo-microscopico-i-la-levadura/> (Accedido: 20 de mayo de 2023).

Figueroa Ceballos, R., Morales Esquivel, O., Bran González, M. C. (2019) "Producción de amilasas por cepas de hongos anamorfos aislados de la hojarasca de *Quercus* sp." *Revista Científica Universidad de San Carlos de Guatemala*, 29(1).

Franchi, M. L., de la Parra, D. F., Pose, G. N. y Cavalitto, S. F. (2014) "Producción nacional de pectinasas de origen fúngico y su aplicación al procesamiento frutihortícola". *SNS*, 5(60), pp. 36-42.

Garcés De Granada, E., Correa De Restrepo, M., Coba De Gutiérrez, B., Zapata L., A. C., Anacona Chingana, A. y Patricia Sabogal, S. (2003) *Morgología y clasificación de los hongos*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias.

Goldberg, I. y Rokem, J. S. (2009) "Organic and Fatty Acid Production, Microbial" en Schaechter, M. (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. 3ª. Jerusalem: Hebrew University of Jerusalem, pp. 421-442.

Houbraken, J., de Vries, R. P. y Samson, R. A. (2014) "Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species", *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc., 86, pp. 199-249. doi:10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4.

Index Fungorum (2007) Disponible en: <https://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=541106> (Accedido: 4 de 06 de 2023).

Index Fungorum (2011) Disponible en: <https://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=563132> (Accedido: 4 de 06 de 2023).

Klich, M. A. (2002) *Identification of common 'Aspergillus' species*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Kuddus, M. (2018) *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Cambridge: Academic Press.

Kuhar, F., Castiglia, V. y Papinutti, L. (2013) "Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos", *Revista Boletín Biológica*, (28), pp. 11-18.

Kumar, P., Chatli, M. K., Mehta, N., Singh, P. *et al.* (2017) "Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(5), pp. 923–932. doi:10.1080/10408398.2014.939739.

Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J. *et al.* (2020) "Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production", *Biotechnology Advances*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630>.

Loeffler W. (1987). "Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics", en Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds.) *Proceedings of the First International Penicillium and Aspergillus Workshop*. 6.ª ed. New York: Plenum Press, pp. 79-84.

Martins Soares, M., Alves Silva, M., Coelho Garcia, P. P., Saraiva da Silva, L. *et al.* (2019) "Effect of vitamin A supplementation: a systematic review", *Ciência & Saúde Coletiva*, 24(3). <https://doi.org/10.1590/1413-81232018243.07112017>.

Mateos-Aparicio, I., de Prádena y Lobón, J. M., Morales, P., Escudero-Gilete, M. L. *et al.* (2017) *Aditivos alimentarios*. Madrid: Dextra Editorial.

Narain, U. y Gupta, A. (2016) "Penicillosis in Patient of Acute Kidney Injury with Adenocarcinoma Lung: A Rare Presentation", *Journal of Nephrology & Therapeutics*. OMICS Publishing Group, 06(02). doi:10.4172/2161-0959.1000241.

Park, H. S., Jun, S. C., Han, K. H., Hong, S. B. *et al.* (2017) "Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi", *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc., 100, pp. 161-202. doi:10.1016/bs.aambs.2017.03.001.

Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009) *Fungi and food spoilage*. 3.ª ed. Nueva York: Springer New York.

Ruggeiri, G. y Spelzini, D. (2016) *Producción de proteasas aspárticas de *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido y su aplicación en hidrolizados de proteína de quinua*. Hoja técnica de divulgación. Universidad Nacional de Rosario.

- Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D. y Kirk, P. M. (2015) "A Higher Level Classification of All Living Organisms", *PLOS ONE* 10(4). DOI:10.1371/journal.pone.0119248.
- Samson, R. A. y Pitt, J. I. (1990) *Modern concepts in penicillium and aspergillus classification*. Nueva York: Springer US.
- Soares-Silva, I., Ribas, D., Sousa-Silva, M., Azevedo-Silva, J. *et al.* (2020), "Membrane transporters in the bioproduction of organic acids: State of the art and future perspectives for industrial applications", *FEMS Microbiology Letters*, 367(15). doi:10.1093/femsle/fnaa118.
- Steiger, M. G., Rassinger, A., Mattanovich, D. and Sauer, M. (2019) "Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*", *Metabolic Engineering*, 52, pp. 224–231. doi:10.1016/j.ymben.2018.12.004.
- Stemler, J., Többen, C., Lass-Flörl, C., Steinmann, J., Ackermann, K., Rath, P. M., Simon, M., Cornely, O. A. y Koehler, P. (2023) "Diagnosis and Treatment of Invasive Aspergillosis Caused by Non-fumigatus *Aspergillus* spp.", *Journal of Fungi*, 9(4). doi:10.3390/jof9040500.
- Suwannasom, N., Kao, I., Pruß, A., Georgieva, R. *et al.* (2020) "Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin", *International journal of molecular sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030950>
- Troncoso, F. D., Sánchez, D. A., & Ferreira, M. L. (2022) "Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review" *ChemistryOpen*, 11(3). <https://doi.org/10.1002/open.202200017>
- Uma Maheswar Rao, J. L., Boorgula, G. D. Y. y Leitão, A. L. (2011) "Fungal Enzymes: Present Scenario and Future Perspectives", en Monteiro Durão Leitão, A.L. (ed.) *Mycofactories*. Portugal: Bentham Science, pp. 3-27.
- Unidad de Exhibición Biológica (2012) *Introducción a los hongos*. Hoja técnica de divulgación. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Velázquez Arellano, M. E., Benavente Valdés, J. R., Morlett Chávez, J. A., Aguilar González, C. N. (2016) "Producción de pigmentos por *Monascus* spp. en medio sólido empleando residuos agroindustriales", *Investigación y Ciencia*, 24(69), pp. 89-95.
- Venturini Copetti, M. (2019) "Fungi as industrial producers of food ingredients", *Current Opinion in Food Science*. Elsevier Ltd, 25, pp. 52-56. doi:10.1016/j.cofs.2019.02.006.
- Volk, T. J. Tom Volk's *Fungus of the Month for November 2003*. Disponible en: https://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/nov2003.html (Accedido: 04 de 06 de 2023).
- Webster J. (1986). *Introduction to Fungi*. 2.^a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Webster, J., Weber, R. (2007) *Introduction to fungi*. 3.^a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wu, L., Zhang, C., Long, Y., Chen, Q., *et al.* (2022) "Food additives: From functions to analytical methods", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd., pp. 8497-8517. doi:10.1080/10408398.2021.1929823.
- Zhang, L., Zheng, X., Cairns, T. C., Zhang, Z. *et al.* (2020), "Disruption or reduced expression of the orotidine-5'-decarboxylase gene pyrG increases citric acid production: A new discovery during recyclable genome editing in *Aspergillus niger*", *Microbial Cell Factories*, 19(1). doi:10.1186/s12934-020-01334-z.
- Zhang, W., Roy, S., Assadpour, E., Cong, X. y Jafari, S. M. (2023) "Cross-linked biopolymeric films by citric acid for food packaging and preservation", *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.cis.2023.102886.