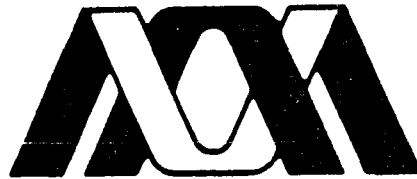


**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

---

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



**Casa abierta al tiempo**

ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA PRODUCCION  
DE LA INVERTASA POR DIFERENTES CEPAS DE  
*Aspergillus niger* EN MEDIO LIQUIDO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A :

**BIOL. LORENA BEATRIZ RUIZ PAVON**

DIRECTOR: DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

ASESORES: DR. ERNESTO FAVELA TORRES

DRA. PATRICIA LARRALDE CORONA

MEXICO, D. F.

JULIO 1999

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

**EI PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO  
DE BIOLOGIA MOLECULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS  
DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA  
UNIVERSIDAD METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.**

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

La Maestría de Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, se encuentra dentro del Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 309-0. 1407PN

Trabajo parcialmente financiado por el CONACyT con la beca de Maestría No. 95359.

**A MANUEL RUIZ CUPIL**

***In memoriam***

Por su gran amor y apoyo incondicional,  
En todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida.  
De quien aprendí el sentido de la honestidad  
y la lealtad hacia mi misma y a los demás.

**A mi madre,**  
Columba Pavón Sánchez,  
**A mi hermana Lourdes y a mi querida sobrina Arantxa**  
Por ser mis eternas compañeras en esta vida, por todo el amor  
y apoyo recibido durante todos estos años.

**A mi familia y amigos,**  
Que me han acompañado durante la vida, por creer y confiar en mi.

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente al **Dr. Gustavo Viniegra González**, por confiar en mi y compartir sus conocimientos y experiencias. Asimismo por la certera dirección de ésta Tesis y la paciencia que me brindó en esta etapa.

Al **Dr. Ernesto Favela Torres** y a la **Dra. Patricia Larralde Corona**, asesores de esta tesis, por su orientación constante y entusiasta participación en la elaboración de éste trabajo.

A los miembros del Jurado: **Dr. Gustavo Viniegra González**, **Dr. Ernesto Favela Torres** y **Octavio Loera Corral**.

A todos mis profesores de la Maestría en Biología Experimental, mis mas sinceros agradecimientos por contribuir a mi formación académica y compartir conmigo sus conocimientos.

A todos mis compañeros de la Maestría y del laboratorio por brindarme su amistad y apoyo durante esta etapa.

---

## RESUMEN

La producción de enzimas por microorganismos ha tomado en los últimos años una gran importancia debido a la facultad de algunas bacterias y hongos filamentosos de producir enzimas de importancia industrial.

La enzima invertasa ha sido estudiada principalmente en levaduras y en algunas especies de hongos filamentosos (*Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger*) como un modelo para el conocimiento del mecanismo de producción de enzimas.

Antier y col. (1993) aislaron dos clases de mutantes a partir de la cepa silvestre C28B25 de *Aspergillus niger*, que demostraron menor grado de represión de la producción de pectinasas por la presencia de glucosa, sacarosa o glucoronato. Un tipo de mutantes llamada AW 99 creció y esporuló rápido a alta actividad del agua ( $a_w$ ) y otra, llamada AW 96, lo hizo con bajo nivel de  $a_w$ .

Romero (1996) demostró que la desregulación de la síntesis de hidrolasas era general (pectinasas, amilasas, invertasas), y por lo tanto se asociaba a mutaciones probablemente pleiotrópicas de interés para la producción industrial de enzimas por tener aumentada su producción.

En esta tesis se planteó como objetivo evaluar el efecto combinado del tipo de sustrato (glucosa o sacarosa) y el nivel de  $a_w$  (0.96, 0.98, 0.99) sobre el perfil de producción de la enzima invertasa por las mutantes AW 96-3 y AW 99-iii, porque esta enzima solo tiene dos genes estructurales (*suc1* y *suc2*) cuya regulación está cada vez mejor conocida y por ello, puede ser un sistema modelo para analizar mejor esta clase de mutaciones. La hipótesis que se planteó para éste trabajo fue que estas mutantes están desreguladas en cuanto a la represión por glucosa de la síntesis de invertasa y que son muy distintas entre sí en su sensibilidad ante cambios de la actividad de agua.

Se corroboró que las cepas AW 96-3 y AW 99-iii son parcialmente resistentes al efecto inhibitorio de la glucosa en la síntesis de la invertasa, a comparación de la completa inhibición por glucosa (50g/L) observada con la cepa C28B25. Esto confirma la hipótesis de una mutación regulatoria de carácter general que reduce la represión de varios genes a la vez.

En todos los experimentos se observó que al disminuirse la actividad del agua se disminuyó el crecimiento de las cepas en estudio, siendo más sensibles a este efecto la cepa nativa (C28B25) y la cepa mutante AW 99- iii a comparación de la AW 96-3. En cuanto a la actividad enzimática, esta también fue afectada por los cambios en la actividad del agua, pero este efecto dependió del tipo de sustrato utilizado.

Al utilizar el medio de cultivo sacarosa y glucosa cada una por separado, como sustrato, la cepa AW 96-3 fue la que manifestó mayor adaptabilidad a las bajas actividades de agua produciendo mayor cantidad de enzimas, lo cual confirma la idea de utilizar medios selectivos con baja actividad de agua para aislar mutantes que pudieran ser de interés industrial por resistir mejor las concentraciones elevadas de sustrato y por ello ser menos susceptibles de infectarse con organismos indeseables.

# INDICE

	<b>Página</b>
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Antecedentes</b>	6
2.1. <i>Aspergillus niger</i> en la producción de enzimas	7
2.2. La invertasa, sus características y aplicaciones prácticas-bioquímicas	9
2.3. Regulación de la producción de enzimas	12
2.4. Aislamiento de mutantes con represión catabólica disminuida en <i>Aspergillus niger</i>	21
2.5. Comentarios a los antecedentes	24
<b>3. Hipótesis</b>	25
<b>4. Objetivos</b>	26
<b>5. Material y métodos</b>	27
5.1. Microorganismos	28
5.2. Medios de cultivo	28
5.3. Fermentación líquida	29
5.4. Separación de proteínas y determinación de biomasa	30
5.5. Cuantificación de proteínas	31
5.6. Ensayo de actividad enzimática	31
<b>6. Resultados y Discusión</b>	33
6.1. Influencia de la actividad de agua utilizando sacarosa como fuente de carbono sobre <i>Aspergillus niger</i>	34
6.2. Influencia de la actividad de agua utilizando glucosa como fuente de carbono sobre <i>Aspergillus niger</i>	42
6.3. Influencia de la actividad de agua utilizando glucosa más sacarosa como fuente de carbono sobre <i>Aspergillus niger</i>	51
<b>7. Conclusiones</b>	61
<b>8. Propuestas</b>	62
<b>8. Bibliografía</b>	63

---



# 1. INTRODUCCION

En sus inicios la industria enzimática se basó principalmente en el uso de plantas y animales como proveedores de enzimas. Posteriormente, con el desarrollo de fermentaciones en tanque agitado y de la manipulación genética de microorganismos para sobreproducir compuestos tales como: aminoácidos, ácidos nucleicos, antibióticos, vitaminas, enzimas y proteínas, los microorganismos han llegado a convertirse en los principales suministradores de enzimas (tanto en volumen como en variedad) (Stephanopoulos y Vallino, 1991)

Las enzimas son proteínas catalíticas altamente específicas. Como otros tipos de catalizadores, aceleran las reacciones reduciendo la energía de activación para un cambio químico en particular. Las enzimas se unen estrechamente a una molécula de sustrato y la conducen por una vía que reduce la energía de activación. Después que el producto de la enzima es liberado, éste se puede unir a una segunda enzima que cataliza un cambio adicional. De esta forma cada una de las moléculas en una célula se mueven de una enzima a la otra a lo largo de una ruta específica de reacción, y la suma de todas esas rutas es la que determina el metabolismo celular (Alberts y col. 1993)

El éxito de todos los organismos vivientes se atribuye a la habilidad de sus células para formar enzimas de diferentes tipos, cada una con propiedades específicas. Cada enzima tiene una forma única y un sitio de unión específico para un sustrato. Como otros catalizadores, las moléculas de enzima no sufren ningún cambio después de participar en una reacción y pueden funcionar una y otra vez (Alberts, y col., 1993)

El uso de microorganismos como fuentes de enzimas ha reducido el principal riesgo que representa utilizar residuos de animales y plantas como fuentes de esos catalizadores. La tecnología de la Ingeniería Genética, que permite transmitir genes de una especie a otra, acelera el desarrollo y producción de enzimas en bacterias y hongos. Las bacterias tienen la ventaja de rápido crecimiento y ciclos cortos de fermentación, mientras que los hongos pueden producir grandes cantidades de enzimas y procesar glucoproteínas. Actualmente, los hongos llamados imperfectos proporcionan una amplia variedad de enzimas comerciales que se producen a gran escala y tienen un espectro amplio de aplicaciones.

Las enzimas pueden ser intracelulares o extracelulares, según sean conservadas dentro de las células ó secretadas al medio de cultivo. Las enzimas extracelulares poseen tres ventajas: (1) dado que la molécula es segregada de la célula no se requieren técnicas de ruptura celular, técnicas difíciles de aplicar a gran escala, (2) el número de proteínas que segregan es limitado y por eso es relativamente fácil aislar una enzima concreta a partir de la mezcla y, (3) las enzimas extracelulares suelen presentar una estructura más compacta lo cual las hace menos susceptibles a la desnaturalización (Wang y col, 1978).

El uso industrial de enzimas es una parte integral de una amplia variedad de procesos comerciales y aplicaciones que varían desde su uso en la manufactura a gran escala de químicos y alimentos procesados, hasta su simple inclusión en muchos productos del supermercado. Las diversas propiedades de las enzimas les ha permitido ser aplicadas a una amplia variedad de procesos y productos.

Las enzimas se elaboran en una amplia variedad de formulaciones y actividades específicas. El costo del producto es generalmente inversamente proporcional al volumen producido y variedad de aplicaciones. En un extremo se encuentran las enzimas especialmente producidas por necesidades de investigación, las cuales son típicamente de alta pureza, altos costos y disponibles en muchas variedades y formas. En el otro extremo esta la técnica de producción a granel de enzimas de detergentes y alimentos, típicamente proteasas y enzimas que hidrolizan carbohidratos. Las enzimas que se clasifican entre las farmacéuticas son de mayor calidad que las que se clasifican entre las de alimentos y normalmente tienen mayor grado de pureza. Las enzimas que se clasifican dentro de las analíticas son de alta pureza y son similares a las de investigación (Lowe, 1992).

Aproximadamente el 80% de las enzimas producidas por fermentación y que se comercializan a escala industrial son hidrolíticas y casi todas son extracelulares. Las industrias que utilizan enzimas a gran escala incluyen la cervecería, panadería, detergentes, procesamiento de almidón, piel y textiles. Dentro de los organismos que se utilizan se encuentran una amplia variedad de bacterias y especies de hongos ( Arbige y Pitcher, 1989)

El mejoramiento de las cepas y de la tecnología de la fermentación se han desarrollado favorablemente para las especies de *Aspergillus* y existen cepas industriales que secretan arriba de los 30 g/L de una proteína específica (por ejemplo: celulasas, glucoamilasas) en procesos de fermentación a gran escala (Van Brunt, 1986).

La investigación de enzimas segregadas por hongos filamentosos es de gran importancia. Entre algunas de las innovaciones en la investigación de enzimas se encuentra la creación de moléculas proteicas llamadas “recombinantes” porque son producidas de la recombinación de material genético de diversas especies. Estas tienen gran potencial terapéutico, según se viene demostrando en diversos laboratorios de investigación industrial y académica. Estas investigaciones están dirigidas a encontrar un huésped apropiado para producir altos niveles de esas proteínas (Van Brunt, 1986).

Una de las razones por la cual se han escogido como hospederos adecuados a los mohos del género *Aspergillus* es que han sido utilizados desde hace muchos años en la producción de alimentos y son aceptados para el consumo humano. Genecor es una de las empresas interesadas en la producción de enzimas industriales que han producido quimosina a gran escala en *A. niger* y *Trichoderma reesei*. Los científicos de Genecor conocen los requerimientos del medio de cultivo y la forma de recuperar las enzimas en miles de galones de medio de cultivo. El principal problema para este grupo ha sido la investigación de la genética de estos hongos (Van Brunt, 1986; Berka y col., 1994; Bedford y col., 1997)

Otra compañía que ha resultado beneficiada del uso de hongos filamentosos ha sido Novo Nordisk quienes también han desarrollado sistemas de expresión en hongos filamentosos. La compañía tiene una variedad de cepas productoras de enzimas que son inducibles y constitutivas. La compañía escogió *A. niger*, *A. awamori* y *T. reesei* como hospederos anfitriones porque son cepas bien desarrolladas a nivel industrial que se sabe son buenas secretoras de enzimas (Kofod y col., 1999; Lehmbeck, 1999; Berka y col., 1997)

Una gran cantidad de datos concernientes a la producción de proteínas heterólogas en hongos filamentosos han sido previamente reportados (Van Brunt, 1986). De estos datos es claro que, en general, la producción de la mayor parte de las proteínas heterólogas secretadas, son bajas en comparación con la producción de proteínas homólogas y alcanza niveles que en la mayoría de los casos no excede unos cuantos miligramos por litro del medio de cultivo. Diferentes estrategias se han desarrollado para mejorar esa producción, incluyendo (i) la inserción de un gran número de copias de genes, (ii) el uso de eficientes

promotores y señales de secreción de hongos, (iii) el uso de genes de fusión con un gene que codifica una proteína bien secretada (iv) el uso de cepas huéspedes deficientes en proteasas, (v) perfeccionamiento del medio de cultivo, y (vi) modificación de la proteína por mutagénesis al azar y subsecuente selección para utilizar el microorganismo de mayores niveles de producción. Sin embargo, es necesario realizar estudios más sistemáticos para identificar y eliminar los factores que provocan los niveles bajos de expresión de proteínas heterólogas (Gouka, 1996; van Gemeren, 1996)

## 2. ANTECEDENTES

## 2.1. *Aspergillus niger* EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS

*Aspergillus niger* es un hongo filamentoso de gran importancia económica ya que es un microorganismo utilizado ampliamente en la industria y en la investigación científica. Es una especie reportada como segura (GRAS), por lo cual es muy útil en la producción de alimentos, antibióticos y bioquímicos (Friedrich, 1989; Peberdy, 1994; Traon, y Pellerin, 1998; Manzanares, y col., 1998) Además es un hongo que se puede reproducir muy fácilmente, se cultiva en medios relativamente simples y económicos y los costos de fermentación son bajos. La recuperación a gran escala de las proteínas que secretan estos hongos no presenta gran dificultad y pueden ser analizados por métodos genéticos y bioquímicos sencillos (Berka y col. 1991; Punt y col. 1992)

Las especies del género *Aspergillus* producen una amplia gama de enzimas de importancia económica, dentro de las especies más importantes se encuentra *A. niger* que produce una gran variedad de enzimas hidrolíticas tales como las amilasas, pectinasas, lipasas, xilanasas, invertasas, etc. Estas tienen una aplicación importante en la industria de los alimentos, papel y de la medicina (Christensen, 1988). La primer enzima que se utilizó a nivel industrial fue preparada por Takamine en 1894, quien utilizó una cepa de *Aspergillus oryzae* para producir amilasas (Friedrich, 1989).

Por otra parte, estos microorganismos son atractivos para el estudio de la relación entre estructura y función de los elementos genéticos (cromosomas y mitocondrias), ya que son eucariotes menores y tienen un ciclo de vida complejo semejante al de eucariotes superiores (Punt y col. 1992)

Muchas de sus proteínas secretadas tienen un modelo de glucosilación que se parece al de las glucoproteínas de la célula animal, lo cual hace a estos hongos huéspedes atractivos para la expresión de genes heterólogos y producción de proteínas de otro origen (bacterias, levaduras, animales, etc.) (Carrez y col., 1990). Las proteínas probablemente son secretadas con la misma rapidez con la que son sintetizadas, lo cual es equivalente a la secreción constitutiva en células de mamíferos (Peberdy, 1994)

*Aspergillus niger* es un hongo filamentoso que es utilizado para la producción de enzimas homólogas y heterólogas. Para ambos tipos de enzimas se han implementado una

combinación de investigaciones en el ámbito de la biología molecular y la fisiología para incrementar la producción. El nivel de producción de la quimosina ha sido incrementado utilizando una combinación de planteamientos de biología molecular, genética y fisiología. Otro ejemplo ha sido también el estudio de la producción de la lisozima blanca del huevo de gallina en *Aspergillus niger*. Se ha demostrado que los métodos de biología molecular y fisiología contribuyen a la optimización de la producción (Archer, 1995)

Además de su importancia en la industria de la producción de proteínas y enzimas, la especie *Aspergillus niger* ha cobrado una gran importancia ya que se le considera un buen candidato para resolver algunos problemas de conservación del medio ambiente. Se han realizado algunos proyectos donde se utiliza esta especie en las investigaciones sobre los efectos tóxicos de metales pesados (plomo, cadmio, manganeso, cobre, etc.) en el crecimiento y actividades metabólicas de este microorganismo; y sobre los niveles de acumulación de estos metales que son capaces de tolerar y solubilizar, como una alternativa para inmovilizar metales tóxicos que se encuentran en el medio ambiente (Sayer, 1997)

Otra aplicación importante de *Aspergillus niger* es en la agricultura donde se ha utilizado por años el uso de ácidos para la precipitación de fosfatos en la manufactura de fertilizantes, los cuales ocasionan graves problemas de contaminación en el medio ambiente. Actualmente, se ha investigado que *A. niger* puede ser un sustituto importante para bioconvertir el fósforo de fosfatos naturales y obtener fertilizantes de origen orgánico (Bojinova, 1997)



## 2.2. LA INVERTASA, SUS CARACTERISTICAS Y APLICACIONES PRACTICAS-BIOQUIMICAS

La invertasa es una enzima que es producida por plantas y microorganismos y en los últimos años esta enzima ha recibido mucha atención como un buen modelo para el estudio de enzimas glucosiladas secretadas por levaduras y hongos filamentosos (Chen, 1995)

La sacarosa y la rafinosa son inductores y sustrato para la invertasa extracelular de *Aspergillus*. La hidrólisis de la sacarosa a D- glucosa y D-fructosa (fig. 1) está acompañada por un cambio en la rotación óptica de dextro a levogiro, por lo cual la sacarosa hidrolizada es algunas veces llamada azúcar invertida, y la enzima que cataliza este proceso es llamada invertasa (sacarasa,  $\beta$ -fructofuranosidasa,  $\beta$ -fructafuranósido fructohidrolasa, E.C. 3.2.1.26) la cual es específica para la unión de tipo  $\beta$ -D- fructofuranósido (Voet y Voet, 1995).

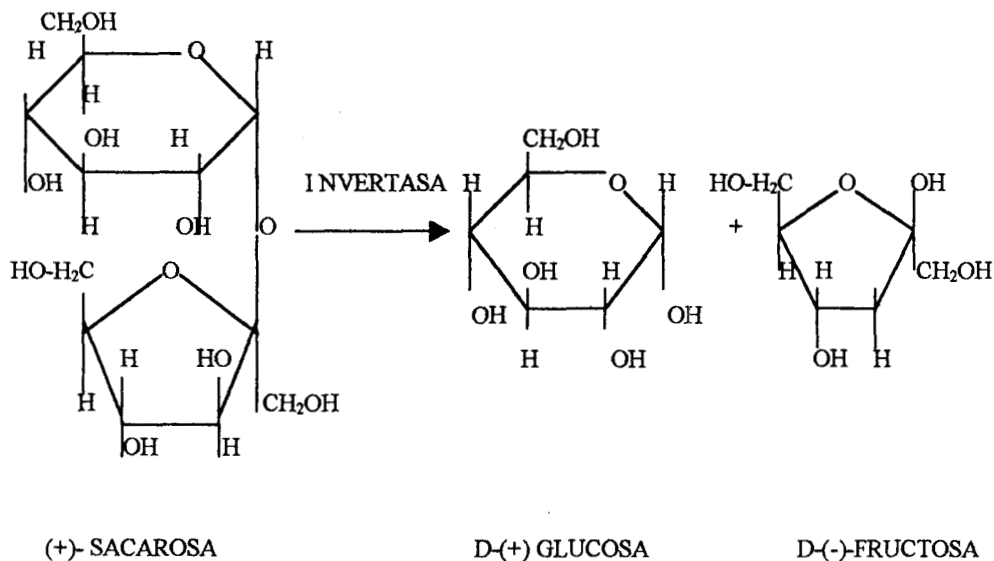


Fig.1. Hidrólisis de la sacarosa

La invertasa ha sido estudiada principalmente en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) a nivel molecular y bioquímico. Ha sido utilizada como proteína modelo para el estudio de cinéticas enzimáticas, biosíntesis de glucoproteínas, secreción de proteínas y regulación del gene, así mismo como un modelo para la investigación del papel de la glucosilación en la estabilidad y plegamiento de las proteínas ( Carlson, 1987 )

Actualmente se ha tomado un interés en particular para el estudio de esta enzima en hongos filamentosos, dado que existe una gran cantidad de proteínas de importancia económica secretadas por estos microorganismos que contienen en su estructura como elementos importantes cadenas de carbohidratos (10-50%), como son la  $\alpha$ - manosidasa,  $\beta$ - N- acetilhexosaminodasa,  $\beta$ - glucosidasa,  $\alpha$ - fucosidasa,  $\beta$ - galactosidasa,  $\beta$ -manosidasa y la celulasa (Chen, 1996).

Las invertasas ( $\beta$ -D- fructoranosa fructohidrolasa EC 3.2.1.26) también son un buen modelo para el estudio de la secreción de proteínas en hongos filamentosos. Los estudios que se han realizado hasta el momento comprenden desde la caracterización bioquímica y fisiológica, hasta la secuenciación genética de esta enzima. La invertasa ha sido purificada de un gran número de microorganismos. La variedad de invertasas purificadas muestran diferentes propiedades, y difieren en muchos aspectos que incluyen su peso molecular, la estructura de sus subunidades y el grado de glucosilación (Boddy y col. 1993)(Chen,1996)

### 2.2.1. La invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Los azúcares son asimilados por *Saccharomyces cerevisiae* por dos mecanismos principalmente. El primero que consiste en el paso de los azúcares intactos a través de la membrana celular. El segundo se da por la hidrólisis de los azúcares en el medio externo celular y la asimilación de algunos o todos los productos hidrolíticos dentro de la célula. El transporte del azúcar dentro de la célula microbiana se puede llevar a cabo por transporte activo, difusión facilitada y translocación de grupos ( Romano, 1986; Mwesigye y Barford, 1996)

La sacarosa es utilizada mediante la hidrólisis fuera de la célula de la levadura por la enzima extracelular invertasa ( $\beta$ - D- fructosidasa) en glucosa y fructosa las cuales son

transportadas dentro de la célula y metabolizadas. La mayor parte de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tienen dos formas de invertasa: Una invertasa externa grande, la cual es una glucoproteína y una invertasa interna pequeña (Gascón y Lampen, 1968; Neumann y Lampen, 1967; Mwesigye y Barford, 1996). En algunas cepas de *S. cerevisiae* la sacarosa es transportada intacta al interior de la célula.

Mwesigye y Barford (1996) estudiaron la regulación de la utilización de la sacarosa y la invertasa en presencia de glucosa, y concluyeron que la habilidad de una cepa para transportar directamente la sacarosa o hidrolizarla extracelularmente está estrechamente relacionada a los niveles de la actividad de la invertasa de las células y al estado de adaptación a la concentración de glucosa en el medio.

El uso de la sacarosa o del trisacárido rafinosa requiere la expresión de uno de los genes *SUC* que codifican la invertasa. La regulación de la asimilación de la sacarosa es en principio menos complejo que la de otros azúcares ya que la regulación es solamente por represión por glucosa.

### **2.2.2. La invertasa de *Aspergillus***

El estudio de la regulación de la secreción de la invertasa por *Aspergillus* ha aportado datos interesantes, que describen las características bioquímicas cuando son producidas en fermentación sumergida (SmF) y fermentación sólida (SSF), Romero y col. (datos no publicados), encontraron que la velocidad de la producción asociada al crecimiento de la invertasa por *A. niger* es mucho mayor en fermentación sumergida que en fermentación sólida y los valores de la actividad de la invertasa en ambos extractos fueron muy similares.

Otras investigaciones se han dirigido principalmente a la caracterización bioquímica y molecular de esta enzima. En *A. nidulans* se encontró que aproximadamente el 50% de la invertasa permanece en el espacio periplásmico o se encuentra unida a la pared celular (Vainstein y Peberdy, 1990). Uno de los genes de la invertasa de *A. niger* (*suc1*) ha sido clonado para transformar *Trichoderma reesei* la cual no puede crecer en sacarosa como única fuente de carbono (Berges y col. 1993). Este gene ha sido también secuenciado y

aparentemente codifica por una proteína de 566 a.a. con una masa molecular de 61kDa y contiene aproximadamente 47% (w/w) de carbohidratos (Boddy y col. 1993).

En *Aspergillus nidulans*, se han encontrado dos formas de la invertasa secretada. Una forma llamada S- invertasa (dímero) y otra F- invertasa (monómero), el peso molecular en ambas después de la desglucilación fue de 115kDa y 60 kDa, respectivamente. La actividad específica de la S- invertasa fue tres veces mayor que la de la forma F- invertasa antes y después de la desglucosilación (Chen, 1996).

### 2.3. REGULACION DE LA PRODUCCION DE ENZIMAS

Los genes estructurales que codifican para la síntesis de muchas enzimas normalmente están inactivos en la ausencia del sustrato de la enzima. Es decir, la producción de enzimas normalmente está reprimida. No obstante, cuando se añade el sustrato se enciende el gene estructural y se produce la enzima. Tal proceso se le llama inducción o desrepresión, y la enzima es considerada inducible (Wang, 1978). La inducción de la enzima también se puede llevar a cabo por efecto de los productos ó por la adición de una coenzima al medio de crecimiento.

La producción de algunas enzimas durante el crecimiento del microorganismo puede ser reprimida por productos finales del metabolismo. Otras enzimas son reprimidas cuando las células crecen en fuentes de carbono de fácil asimilación, lo cual hace un descenso en la concentración intracelular de AMP cíclico, provocando que los genes estructurales se inactiven (no sean transcritos). La represión del catabolito es muy importante en prácticas comerciales ya que muchas enzimas de importancia industrial están sujetas a este tipo de regulación, por ejemplo la invertasa está sujeta a la represión por fuentes de carbono como la glucosa, fructosa, xilosa y acetato (Wang, 1978)

Las mutaciones se pueden utilizar para eliminar la dependencia de la formación de enzimas en adición del inductor. Tal mutación es denominada como una mutación reguladora ya que su *locus* no se encuentra en un gene estructural sino en un gene regulador. De esta manera un inductor no es necesario si una mutación en el gene regulador elimina la producción de un represor activo, o si una mutación en el gene operador elimina

su habilidad para unirse a un represor. Las mutantes que producen una enzima normalmente inducible sin inductor son llamados mutantes constitutivos. Estos pueden ser seleccionados por una amplia variedad de métodos.

### 2.3.1. El modelo del operón *lac*

El metabolismo de la lactosa en *E. coli* es un modelo muy utilizado para explicar las bases del control de la expresión de los genes en organismos eucarióticos como lo son los hongos filamentosos, por lo cual es de gran importancia conocer su mecanismo.

*E. coli* regula la expresión de muchos de sus genes de acuerdo a la fuente de carbono que esté disponible en el medio ambiente. En *E. coli* la proteína activadora del catabolito (CAP) activa genes que permiten utilizar fuentes alternas de carbono cuando la glucosa no está disponible. Cuando los niveles de glucosa en el medio de cultivo disminuyen, se induce un incremento en AMPc (molécula de señalamiento intracelular), la cual se une a la proteína CAP, permitiéndole unirse a una secuencia específica de DNA cerca de los promotores blanco, encendiendo los genes apropiados. De esta forma, la expresión de un gene blanco es encendido o apagado, dependiendo de que los niveles de AMPc sean altos o bajos (Alberts, 1993)

El operón *lac* es controlado por un sistema dual, que incluye un control transcripcional negativo y uno positivo, los cuales son ejercidos por una proteína represora *lac* y por CAP respectivamente. El operón *lac* codifica proteínas que se requieren para el transporte de la lactosa al interior de la célula y para su degradación. CAP permite a la bacteria utilizar fuentes de carbono alternas tal como la lactosa en la ausencia de glucosa. CAP induce la expresión del operón *lac* si la lactosa no está presente y el represor *lac* asegura que el operón *lac* esté desconectado en la ausencia de lactosa. Este arreglo permite al operón *lac* responder a e integrar dos señales diferentes, así que se expresa solamente cuando se encuentran dos condiciones: la lactosa puede estar presente y la glucosa puede estar presente. Alguna de las otras tres posibles combinaciones de señales mantienen al gene en estado apagado (Alberts, 1993)

### 2.3.2. Regulación del consumo de azúcares en *Saccharomyces*.

En una cepa de levadura con la capacidad genética para utilizar un azúcar en particular, el consumo del azúcar es controlado por represión por glucosa, en un sistema regulador global que gobierna la respuesta de las células a la disponibilidad de glucosa, y afecta la expresión de una multitud de genes, incluyendo genes que fermentan el azúcar. Las levaduras utilizan preferentemente hexosas tales como la glucosa y la fructosa, que entran a la vía glucolítica directamente. Azúcares tales como la sacarosa y la galactosa no son metabolizadas en presencia de la glucosa. La represión por glucosa regula la expresión de genes de fermentación a nivel transcripcional. La glucosa también afecta el transporte de azúcares dentro de la célula y afecta la función de mecanismos reguladores para la inducción (Carlson, 1987; Rose y col. , 1991; Trumbly, 1991; Ronne, 1995)

Estudios en diferentes laboratorios han mostrado que la represión por glucosa es un sistema regulador complejo, y más de una docena de genes reguladores han sido identificados. El aparato regulador incluye mecanismos sensoriales y de señalamiento para verificar la disponibilidad de glucosa, y proteínas reguladoras que efectúan cambios en la expresión de una multitud de genes. (Carlson, 1987; Walsh, y col. ,1996)

Se conocen dos genes que afectan la represión global por glucosa, *HXX2* y *SNF1*. *HXX2* es el gene estructural para la isoenzima hexocinasa PII (B). Entian (1981) aisló mutantes *hxx2* que no afectan la función catalítica, pero provocan constituidad para enzimas represibles por glucosa, sugiriendo una función reguladora. Carlson (1987) ha demostrado que *SNF1* es un gene que codifica una proteína cinasa la cual transfiere un grupo fosfato terminal del ATP a un aminoácido. Estos hallazgos sugieren que la fosforilación de la proteína tienen un papel crítico en el mecanismo de la represión por glucosa en *S. cerevisiae*.

Diferentes cepas de *Saccharomyces*, relacionadas estrechamente, difieren en su habilidad para utilizar azúcares. La fermentación de disacáridos y oligosacáridos es controlada por familias de genes como: *SUC* (sacarosa), *MAL* (maltosa), *MEL* (melobiosa) y *MGL* ( $\alpha$ - metilglucosa) (Ronne, 1995). Cada familia incluye diferentes *locus* funcionalmente equivalentes, que controlan la habilidad de la fermentación de diversos azúcares, por

ejemplo: la familia *SUC* incluye 6 genes *SUC* diferentes, cada uno es un gene estructural para la invertasa.

La regulación de la expresión de *SUC* ha resultado ser un proceso complejo que requiere muchos genes. Las mutantes con defectos en desrepresión o represión de *SUC2* han sido aisladas, y todas muestran defectos en la regulación de otros genes también represores de la glucosa (Zimmerman y Schel, 1977)

Existen diversas mutaciones que provocan constituidad para la invertasa, maltasa y otras enzimas reprimidas por glucosa y que también provocan defectos pleiotrópicos que no están relacionados a la represión por glucosa (por ejemplo: agrupamiento, apareamiento y defectos en la esporulación).

Las mutaciones constitutivas funcionan en pasos tempranos en el circuito regulador, tal vez esos genes llevan a cabo funciones sensoriales o de señalamiento, lo cual le permitiría a la célula tener sensibilidad a disponibilidad de glucosa en el medio ambiente (Carlson, 1987)

### **2.3.3. Regulación del consumo de azúcares en *Aspergillus***

*A. nidulans* posee distintas vías de asimilación para D- glucosa ( $K_m = 0.04- 0.06$  mM), D- galactosa ( $K_m = 0.03$ mM) y D- fructosa ( $K_m = 0.4$  mM) las cuales pueden ser mediadas por proteínas acarreadoras constitutivas (Mark y Romano, 1971; Romano, 1986). El mecanismo mediante el cual la fructosa es asimilada es altamente específico, mientras que D- galactosa compite con la vía de consumo de la D-glucosa y viceversa (Mark y Romano, 1971). En la asimilación de los azúcares en hongos filamentosos, aparentemente no se requiere de la fosforilación de los azúcares.

La proteína intermediaria en el consumo de L- sorbosa es codificada por *sorA* (Elorza y Arst, 1971). La velocidad de consumo de la D- glucosa se observa levemente afectada en cepas que tienen una mutación en *sorA*-, lo cual indica que la D-glucosa puede ser consumida por una permeasa que es codificada por *sor A* (Elorza y Arst, 1971)

En *Aspergillus* se han relacionado las mutaciones en *CreB* y *CreC* con el mal funcionamiento de la permeabilidad de la membrana, lo cual da como resultado un consumo reducido de azúcares represores del catabolito del carbono (Arst, 1981). Basado en un buen número de observaciones, Arst (1981) ha concluido que la D- glucosa puede ser consumida por la permeasa *sorA*, la permeasa *mal A* y al menos por otros mecanismos que están ausentes en las cepas mutadas *cre B-* y *creC-*.

Por otro lado se ha observado que la asimilación de glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, galactosa, manosa, manitol, sorbitol y glicerol, excepto la sacarosa, es inhibida por acetato, lo cual indica que es posible que existe un sistema de consumo diferente para la sacarosa (Romano y Kornberg, 1968). La sacarosa puede ser consumida cuando es hidrolizada por la invertasa en glucosa y fructosa y una fracción menor puede ser consumida como sacarosa.

Varios pueden ser los compuestos que inhiben la vía de consumo de la glucosa, entre esos factores se encuentran las concentraciones altas de piruvato, acetato y citrato como se ha observado en estudios de consumo *in vivo* (Mischak y col., 1984)

*Aspergillus* crece muy bien en hexosas, especialmente en glucosa y fructosa. Cuando la glucosa es utilizada como única fuente de carbono, otros azúcares necesarios para la síntesis de la pared celular (glucolípidos y glucoproteínas) tienen que ser formados a partir de la glucosa (Ronne, 1995)

La glucosa es catabolizada a través de la glucólisis y a través de la vía de las pentosas-fosfato. Un importante punto de ramificación para la distribución del flujo es al nivel de la glucosa 6- fosfato, la cual es el sustrato para la vía de la glucólisis, la vía de las pentosas- fosfato y síntesis de componentes de la pared celular. La distribución en las dos primeras rutas depende de varios parámetros, tales como requerimientos de NADPH, velocidad de suministro de glucosa (Carter y col., 1971), fuente de carbono utilizada y temperatura. De los datos obtenidos en cultivos continuos limitados en glucosa de *A. nidulans* se ha concluido que a concentraciones bajas de glucosa, aproximadamente el 80% de la glucosa es metabolizada a través de la glucólisis ( Carter y Bull, 1969)



Otro factor importante que dirige la distribución del flujo de la vía metabólica hacia glucólisis o pentosas fosfatos en *A. nidulans* es la fuente de nitrógeno suministrada. Para la reducción del nitrato son necesarias la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. Ambas enzimas son dependientes de NADPH.

En el primer estado de la fermentación la vía de la pentosa-fosfato es la ruta prevaleciente, mientras que en un segundo estado el flujo se desvía hacia la glucólisis. En el primer estado de la fermentación hay un consumo de hexosas y la producción de biomasa es lenta, durante la fermentación tardía se segrega una mayor cantidad de citrato y el consumo de azúcar disminuye (Rohr y col. 1987)

La regulación central del metabolismo de las hexosas toma lugar a diferentes niveles:

- (1) Control de la expresión del gene
- (2) Control traduccional
- (3) Control a nivel de la actividad enzimática
- (4) Control a través de la distribución espacial de las enzimas

#### **2.3.4. Represión catabólica en *Aspergillus*.**

La represión catabólica es un término que se utiliza para describir el suceso en el cual algunas fuentes de carbono metabolizadas fácilmente son utilizadas preferentemente a otras fuentes de carbono más complejas. Esto se lleva a cabo por la reducción en la síntesis de enzimas involucradas en la utilización de otras fuentes de carbono en presencia de fuentes de carbono fácilmente utilizables (Kelly, 1994)

En *Aspergillus nidulans* se han demostrado dos tipos de regulación en la producción de enzimas: la inducción y la represión catabólica, las cuales afectan la síntesis de *novó* de las proteínas y el control es ejercido a nivel de la transcripción (Arst y Bailey, 1977)

Las proteínas de unión al DNA (activadores y represores) que se unen a los promotores de un subgrupo de genes forman el conjunto de elementos para la inducción coordinada de *Aspergillus* como es el caso de otros organismos como *Saccharomyces cerevisiae*.

Los microorganismos usualmente apagan un gran número de genes en la presencia de glucosa. Se cree que es una respuesta para ahorrar energía y afecta a las enzimas utilizadas para metabolizar otras fuentes de carbono, las cuales no son necesarias en la presencia de glucosa.

La represión por glucosa en hongos no es mediada por una disminución en los niveles de AMPc y también difiere de la represión del catabolito en que ésta involucra control directo negativo de promotores blanco por una proteína represora de unión al DNA (Ronne, 1995).

Las regiones del DNA que controlan la expresión de un gran número de genes en los hongos han sido investigadas en gran detalle. Varios elementos que constituyen un promotor central han sido identificados (secuencias  $\rho$ , AAG, CT, TATAAA y CAAT) los cuales se cree son necesarias para los niveles basales de la expresión de los genes. Además, se han encontrado secuencias responsables para el control de la expresión de genes específicos, los cuales expresan proteínas reguladoras que se ha descubierto se unen al DNA.

Como en la mayoría de los sistemas estudiados, la transcripción en hongos filamentosos es regulada al menos en dos niveles diferente. Un tipo de control es vía-específico mientras que el otro es más global (por ejemplo: regulación del carbono o el nitrógeno). La interacción entre los niveles diferentes de control es un factor primario para determinar la producción final de una proteína en particular. Las evidencias acumuladas sugieren que los sitios de unión para algunas proteínas pueden traslaparse o ser adyacentes una a otra, lo cual indica una competencia para la unión al DNA(fig.2)

En el control global ó de amplio dominio, la expresión de muchos genes es regulada por un número relativamente pequeño de proteínas reguladoras. La represión de vías particulares puede ser controlada por los niveles de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo o sulfato fácilmente asimilables, y la expresión es solamente encendida una vez que uno o más de esos nutrientes llegan a ser limitados.

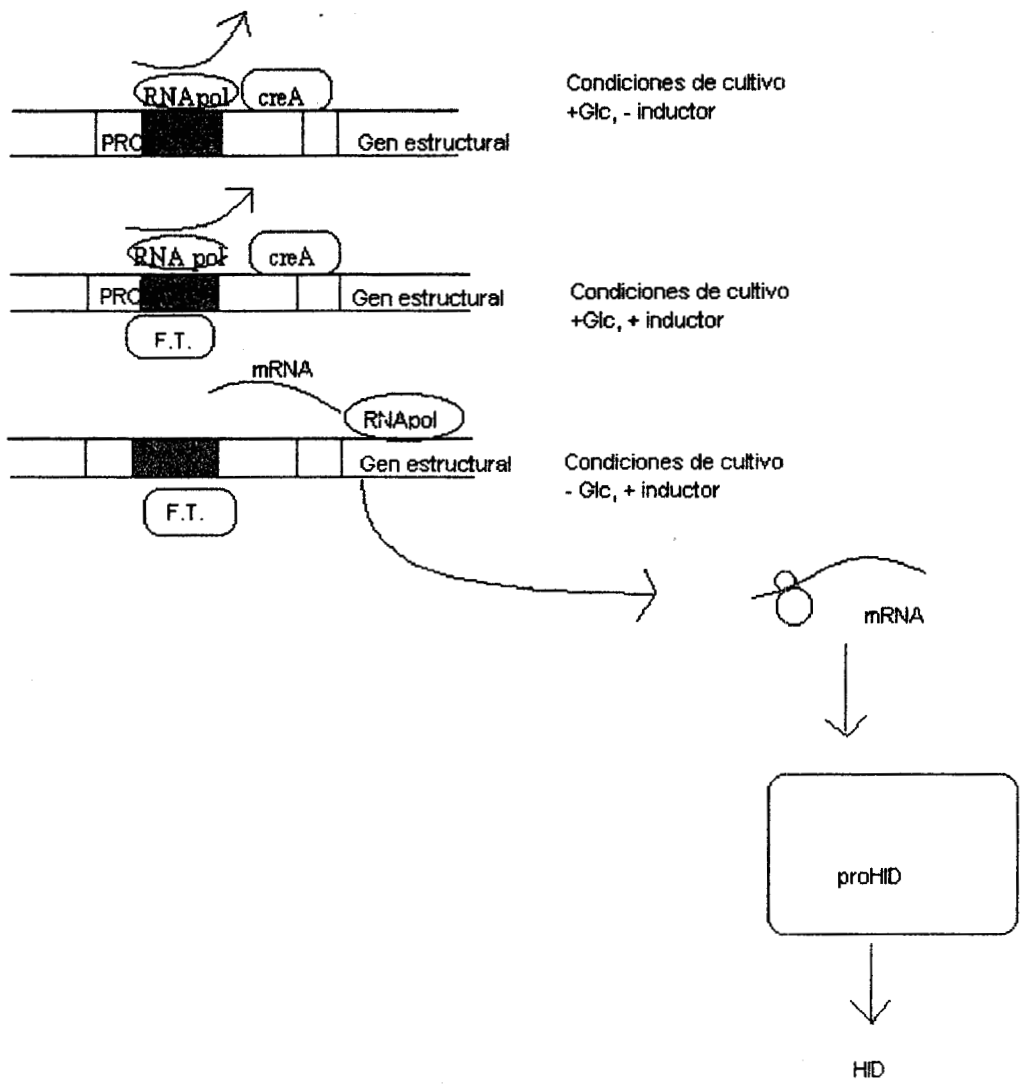
En *A. nidulans*, los análisis mutacionales han identificado tres genes involucrados en la represión del catabolito del carbono (*creA*, *creB* y *creC*) (Chen y col., 1995). En las proteínas CREA que actúan negativamente, se ha demostrado que contienen dos secuencias

de dedos de zinc de la clase Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> y una región rica en alanina y muchas proteínas de unión al DNA (Arst y Bailey, 1977; Mackenzie y col. 1993).

La represión del metabolito del nitrógeno es mediada por los activadores transcripcionales AREA en *A. nidulans*. La función de AREA ha sido investigada cortando la región C- terminal dejando fuera el dominio de unión al DNA. En este estudio, la eliminación del C- terminal afectó la activación de genes dentro del control de AREA en vías diferentes, indicando que esta región puede tener diferentes papeles dependiendo del control en el gene. Se cree que AREA interactúa en su C- terminal con otros factores de transcripción para el efecto de la regulación de la expresión del gene. La proteína AREA actúa positivamente activando la transcripción, mientras que la proteína CREA reprime la transcripción. La proteína CREA impide la unión o actividad de un activador positivo esencial (el cual puede ser un factor de transcripción general o un gene o vía específica). Para los genes regulados por este sistema la ausencia de CREA puede permitir al activador positivo iniciar la transcripción insensible a la presencia de AREA y a la inversa, la presencia de la unión de AREA debe vencer el efecto represor de CREA para permitir la transcripción. Un simple mecanismo para mas tarde sería si AREA pudiera desplazar a CREA debido a la mayor afinidad por la cercanía de los sitios (Kelly, 1994) (fig. 2)

La presencia de sitios adyacentes, traslapados para AREA, CREA y proteínas reguladoras vía específica puede ser una característica de un complejo control transcripcional de los genes sobre los que actúan y tendrían que ser tomados en cuenta especialmente cuando los elementos promotores son confeccionados para la expresión de genes heterólogos.

La modificación de controles de amplio dominio representa otra área importante de investigaciones futuras en la producción de proteínas heterólogas por hongos filamentosos. (MacKenzie, 1993)



**Fig.2 Modelo de la regulación de la síntesis de hidrolasas en hongos filamentosos (Mackenzie y col. 1993)**

## **2.4.AISLAMIENTO DE MUTANTES CON REPRESION CATABOLICA DISMINUIDA EN *Aspergillus niger*.**

*Aspergillus* puede crecer fácilmente en agar sólido o en medio líquido y requiere solamente una fuente de carbono y nitrógeno, sales minerales y oxígeno. En este género es relativamente fácil obtener mutantes mediante técnicas bioquímicas, genéticas y moleculares. La manipulación genética de cepas silvestres es una herramienta indispensable para dilucidar los mecanismos de represión catabólica (Kelly, 1994).

### **2.4.1.Mutantes resistentes a la 2-desoxiglucosa**

En estudios de metabolismo del carbono la mayor parte de la información se ha obtenido del aislamiento de mutantes resistentes a análogos en la desoxiglucosa (DG), la cual es fácilmente fosforilada por hexocinasas de hongos (Allen y col., 1989) El compuesto resultante, 2- desoxiglucosa- 6 fosfato, se acumula e inhibe enzimas glucolíticas primarias, así como la incorporación de glucosa y manosa en los polisacáridos de la pared celular. La disminución de ATP durante la fosforilación de la 2- deoxiglucosa puede también contribuir a la toxicidad de este azúcar análogo.

Muchas mutantes resistentes a DG parecen tener alteraciones reguladoras pleiotrópicas en la actividad de enzimas tales como la invertasa, la  $\alpha$ -glucosidasa y la malato deshidrogenasa (Antier y col. 1993b)

En trabajos mas recientes, Antier y col. (1993a) demostraron que con el uso combinado del 15% de etilenglicol como un depresor de la actividad del agua ( $a_w$  0.96) y altas dosis de desoxiglucosa ( 10 y 100mg l<sup>-1</sup>) se puede seleccionar mutantes a partir de una cepa silvestre (C28B25) de *A. niger*, sensible a DG. Esos nuevos tipos de mutantes fueron denominados dgr AW 96, y tienen propiedades interesantes ya que presentan incrementada la producción de pectinasas (tipo endo) tanto en fermentación sumergida (SmF) como en estado sólido (SSF). Esta clase de mutantes es diferente del fenotipo AW 99 (mutantes aisladas en  $a_w$  0.99), ya que estas últimas no están adaptadas a incrementar la producción de pectinasas por SSF a baja actividad de agua, sino solamente están adaptadas para incrementar la producción de pectinasas por SmF.

Se han comparado la esporulación y producción de pectinasa por los dos tipos de cepas mutantes mencionadas anteriormente. Estas fueron diferentes cuando se cultivaron en mezclas de desoxiglucosa y glucosa. Se observó que el fenotipo de resistencia a la desoxiglucosa (*dgr*) está asociado a una mayor velocidad de crecimiento apical durante la fase vegetativa y la esporulación comparada con la tipo silvestre. Aparentemente, la presencia del análogo de la glucosa actúa como un estímulo para el crecimiento y el proceso de diferenciación de las cepas *dgr* además de ser diferente para cada tipo de cepa, lo cual nos indica diferentes fenotipos de adaptación metabólica al estrés impuesto por la desoxiglucosa. Aparentemente el fenotipo *dgr* está asociado con estados fisiológicos desreprimidos, los cuales permanecen como tal cuando se pierde la resistencia al análogo de la glucosa, es decir, la desrepresión fisiológica puede estar relacionada a diferentes *locus* que codifican para la resistencia a la desoxiglucosa (Minjares y col., 1997)

Finalmente se realizó un estudio de la identificación de fenotipos de crecimiento en las mutantes AW 99-iii2 y AW 96-4 obtenidas de la cepa silvestre C28B25 de *Aspergillus niger*, las cuales mostraron mayor velocidad relativa de crecimiento ( $\mu$ ) en presencia de la 2DG en las actividades de agua 0.99 y 0.96 (Loera y Viniegra, 1998).

También se ha demostrado que estas mutantes tienen mutaciones que parecen independientes de los fenotipos de resistencia a 2DG y sobreproducción de pectinasas, ya que el diploide (D4) que se obtuvo de dos cepas haploides resistentes a 2DG (AW 99iii2 y AW 96-4) es sensible a 2DG (Loera, datos no publicados).

#### **2.4.2. Actividad del agua como presión de selección.**

La actividad de agua ( $a_w$ ) se define como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con la del sustrato (Hahn, 1986; Mildenhall, y Trollope, 1981).

$$a_w = P / P_0$$

Donde P es la presión de vapor de agua en el líquido y  $P_0$  es la presión de vapor del agua pura. La actividad de agua está directamente relacionada a la humedad relativa (R.H).

De esta manera, multiplicando la actividad del agua por 100 tenemos la humedad relativa de la atmósfera en equilibrio con el material.

$$\text{R.H. (\%)} = 100 \times a_w$$

Los microorganismos no reconocen el contenido de agua de un material en particular, pero si reconocen la cantidad de agua disponible, la cual difiere considerablemente, dependiendo del soluto (Hahn, 1986). En general los iones se unen más a la molécula del agua que los polímeros. Los azúcares y los péptidos presentan fácilmente una posición intermedia. De esta manera, las sales disminuyen más la actividad de agua que los azúcares. El agua pura tiene una  $a_w$  de 1 y la actividad de agua disminuye con la adición de los solutos. Los hongos filamentosos y las levaduras pueden crecer en valores bajos de  $a_w$  (0.6-0.7). Los microorganismos que pueden crecer y llevar a cabo sus actividades metabólicas a bajas  $a_w$  son apropiados para procesos de SSF (Pandey, 1992)

Ya que la actividad de agua de un sustrato condiciona el crecimiento y viabilidad de los microorganismos, uno de los objetivos de la adaptación de algunas especies de hongos filamentosos como *Aspergillus niger* a crecer y producir enzimas a bajas actividades de agua, van encaminados precisamente a que estos microorganismos pueden ser adaptados a crecer en sustratos sólidos con bajas actividades de agua, Esto es de importancia tanto en la investigación científica como en el uso industrial, para la producción a gran escala de enzimas industriales. Se ha observado que en el crecimiento de los hongos en SSF, las altas actividades de agua favorecen la esporulación y las bajas actividades de agua favorecen la germinación de las esporas o el crecimiento del micelio (Pandey, 1992)

La actividad de agua influye también en la actividad de las enzimas, ya que la estabilidad de las proteínas depende de la disponibilidad de agua y si la reacción es hidrofílica, el agua toma parte como un reactante. La actividad de agua del medio es un parámetro fundamental para la transferencia de agua y solutos a través de la membrana celular. El control de este parámetro puede ser utilizado para modificar la producción metabólica o secreción de proteínas de un microorganismo (Hahn, 1986; Pandey, 1992)

Oriol y col. (1988b) observaron que cultivos de *A. niger* que crecen en bagazo de caña mezclado con glucosa y sales minerales, pueden consumir altos niveles de

concentración de azúcar a niveles relativamente bajos de actividad de agua ( $a_w$ ). Diferentes autores han demostrado que el nivel de agua es una variable que afecta el metabolismo de los microorganismos.

## 2.5. COMETARIOS A LOS ANTECEDENTES

De los antecedentes aquí presentados se puede concluir que las cepas AW 96-3 y AW 99-iii son de interés para el estudio de la regulación de la síntesis de enzimas excretadas por *A. niger* y de manera muy especial si éstas cepas tienen disminuida la sensibilidad a la represión de glucosa para la síntesis de invertasa porque podrían haber analogías estrechas en la regulación de la expresión de *SUC1* y *SUC 2* entre levaduras y *Aspergillus* y estas podrían ser objeto de estudios precisos a nivel molecular.

Por ello resulta interesante la caracterización fisiológica de la producción de invertasa por las cepas C28B25 (cepa nativa) y sus mutantes AW 96-3 (sobreproductoras de pectinasas con  $a_w$  baja) y AW 99-iii (sobreproductora de pectinasas con  $a_w$  alta) porque confirmaría la utilidad de esas cepas para la búsqueda de los defectos genéticos específicos asociados a la regulación coordinada de enzimas.



### **3.HIPOTESIS**

1. Las cepas mutantes de *Aspergillus niger* AW 96-3 y AW 99-iii tienen mutaciones de carácter general que regulan la producción de invertasas, además de las ya conocidas para las pectinasas.
2. El efecto de la actividad de agua sobre la producción de invertasas por *A. niger* depende de la naturaleza del sustrato ( glucosa o sacarosa) porque pudieran haber diferencias de los diversos sistemas reguladores involucrados en función de ese parámetro físico-químico.

# 4. OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la producción de invertasas en una cepa silvestre y dos mutantes resistentes a 2-DG de *Aspergillus niger* en medio líquido, con diferentes fuentes de carbono y niveles de  $a_w$ .

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar que las cepas resistentes a 2-DG, AW 96-3 aislada en baja actividad de agua y AW 99-iii aislada en alta actividad de agua son mutantes desreprimidas para la producción de invertasas en presencia de glucosa.
2. Demostrar que el efecto de la  $a_w$  sobre la producción de la enzima depende del tipo de cepa y del sustrato utilizado.

# 5. MATERIAL Y METODO

## 5.1. MICROORGANISMOS

En este estudio se utilizaron las siguientes cepas de *Aspergillus niger*:

Silvestre:

C28B25, aislada en una plantación de café en el Estado de Chiapas (Aquiahuatl y col. 1989)

Mutantes:

dgr AW 99-iii, obtenida de C28B25 por irradiación con UV, aislada en  $a_w$  0.99 en 10 mg/L de 2-DG, (Antier y col. 1993)

drv AW 96-3, obtenida de C28B25 por irradiación con UV, aislada al 15 % de E.G. y 100mg/L de 2-DG (Antier y col. 1993)

Todas las cepas fueron preservadas en PDA a 4°C, y se encuentran depositadas en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos Filamentosos de la UAM-Iztapalapa.

## 5.2. MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron dos medios de cultivo. El primero basado en el cultivo formulado por Acuña-Arguelles (1995) el cual constó de la siguiente composición (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  17.4, Urea 4.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9.0,  $\text{MgSO}_4$  0.27,  $\text{FeSO}_4$  0.001,  $\text{MnSO}_4$  0.001,  $\text{CuSO}_4$  0.001,  $\text{ZnCl}$  0.001; se utilizaron como fuentes de carbono (g/L): sacarosa 50, glucosa 50.

El segundo medio de cultivo que se utilizó fue el de Pontecorvo (1953), el cual constó de la siguiente composición (g/L):  $\text{NaNO}_3$  6.0,  $\text{KCl}$  0.52,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.52,  $\text{MgSO}_4$  0.52,  $\text{FeSO}_4$  0.001,  $\text{MnSO}_4$  0.001,  $\text{CuSO}_4$  0.001,  $\text{ZnCl}$  0.001; se utilizaron como fuentes de carbono (g/L): sacarosa 10, glucosa 10.

### 5.3.FERMENTACION LIQUIDA.

Todos los medios se ajustaron a un pH inicial de 4.5 . El inóculo utilizado fue de  $2 \times 10^7$  esporas/g de fuente de carbono. El procedimiento y las condiciones de la fermentación líquida para cada cepa fue el siguiente:

En el primer ciclo de fermentación se utilizó como fuente de carbono sacarosa, en el segundo se utilizó glucosa y en el tercer ciclo de fermentación se utilizó una mezcla de sacarosa y glucosa.

Para los cultivos en sacarosa se utilizaron cajas de cultivo celular con seis pozos de 10 ml cada uno en los cuales se agregaron 5 ml del medio y para los cultivos en glucosa se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125ml a los cuales se les agregó 25ml del medio. En ambos experimentos se utilizó el medio de cultivo de Acuña- Arguelles (1995). Para los cultivos que se prepararon con la mezcla sacarosa-glucosa se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml del medio de cultivo cada uno. Se utilizó el medio de cultivo de Pontecorvo (1953).

Tanto los matraces como las cajas fueron incubados a  $30^{\circ}\text{C}$ . Las cajas de cultivo fueron agitadas a 160 rpm y los matraces a 180 rpm durante 48 horas. Se tomaron muestras cada 12 horas, los matraces y los pozos de las cajas de cultivo fueron preparados por duplicado.

La  $a_w$  se calibró por medio de un medidor de la actividad de agua marca "Decagon" y así se determinó la cantidad de etilenglicol que se le agregó a los matraces con  $a_w$  0.99, 0.98 y 0.96 (Tabla 1)

Los pozos y los matraces antes citados se prepararon con las tres actividades de agua por duplicado para cada tiempo de la fermentación. Durante el tiempo que duró la fermentación se determinaron diferentes parámetros ( biomasa, pH y actividad enzimática)

$a_w$	Medio de cultivo (ml)	Etilenglicol (ml)	% Etilenglicol
0.999	5.0	0	0
0.98	4.8	0.2	4
0.963	4.6	0.4	8
0.947	4.4	0.6	12

Tabla 1. Calibración de las diferentes  $a_w$

#### 5.4.SEPARACION DE PROTEINAS SOLUBLES Y DETERMINACION DE BIOMASA

La separación de proteínas se llevó a cabo mediante la filtración del medio de cultivo (después de un período de fermentación) en papel filtro Whatman 41. Del líquido filtrado se tomó una muestra de 5ml y se almacenó a 4°C para realizar la determinación de proteínas y ensayo enzimático posteriormente.

El micelio sobrante de la filtración se lavó con agua destilada y a continuación se secó en una estufa a 60°C durante 24 horas. Posteriormente el micelio secado se colocó en un desecador durante 20 min. Para ser pesado posteriormente. Al peso obtenido se le restó el peso del papel seco sin micelio para obtener el peso seco del micelio.

Los datos obtenidos del peso seco fueron sometidos a un modelo matemático de crecimiento de biomasa. La ecuación logística es la siguiente:

$$X \text{ teórica} = \frac{X_m}{1 + Ce^{-\mu t}}$$

$$C = \frac{X_m - X_0}{X_0} \quad \text{donde,}$$

C= Crecimiento

X= g/L de biomasa al tiempo "t"

$X_m$ = concentración máxima de biomasa

$\mu$ = tasa (velocidad) específica de crecimiento

$X_0$ = concentración inicial de biomasa

Los datos obtenidos fueron el resultado de minimizar la suma de residuos cuadrados usando el programa solver de Excel (Microsoft) mediante la siguiente fórmula:

$$Sr = \sum^n (X \text{ observada} - X \text{ teórica})^2$$

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue calculada mediante la ecuación de regresión lineal.

### **5.5. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.**

Las proteínas solubles en el filtrado del cultivo se estimaron de acuerdo al método de Bradford (1976). Se preparó una solución estándar de albúmina sérica de bovino que contenía 1mg/ml. La mezcla de reacción consistió de 100 $\mu$ l de la muestra, 700 $\mu$ l de agua destilada y 200 $\mu$ l del reactivo Bradford, leyéndose a 595nm. Todas las muestras se manejaron por duplicado.

### **5.6. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.**

La actividad de la invertasa se determinó con sacarosa como sustrato. Para este fin se utilizó el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller (1959). La reacción se compuso de la mezcla de 0.5ml de amortiguador de acetato de sodio, 0.35ml de la solución del sustrato y 0.15ml de la preparación de la enzima (filtrado original o convenientemente diluido). Se incubó a 35°C durante 30min. Después de la incubación se detuvo la reacción adicionando 1ml del reactivo DNS. Las muestras se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 15min. y posteriormente se puso a enfriar durante 5 min. La absorbancia fue leída a 575nm.

La actividad de la invertasa se calculó como la cantidad de enzima que libera un  $\mu$ mol de azúcar reductor por minuto, expresándose como AE= Unidad/L.

Las muestras fueron preparadas por triplicados, y fueron analizadas mediante la prueba estadística t de Student con un intervalo de confianza del 95% ( $p \leq 0.05$ ) bajo la curva.

El rendimiento ( $Y_{p7x}$ ) se calculó con la ecuación de la regresión lineal entre el nivel de la producción de la enzima (E) y de biomasa (X)

$$E = Y_{p7x}(X) + b$$

Donde b es una constante empírica

La productividad específica se calculó como el producto de la velocidad específica de crecimiento por el rendimiento:

$$q_p = \mu (Y_{p/x})$$



# 6. RESULTADOS Y DISCUSION

## 6.1. INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD DE AGUA UTILIZANDO SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO SOBRE *Aspergillus niger*.

En cada una de las cepas de estudio (C28B25 , AW 99-iii y AW 96-3) se estudió la evolución de la producción de invertasa durante 48 horas y se tomaron muestras cada 12 horas. Se midió la producción de biomasa y de enzimas en cada uno de los cinco tiempos. Para este experimento se utilizaron las cajas de cultivo celular con 50g/L de sacarosa.

### 6.1.1. PRODUCCION DE BIOMASA

Como podemos observar en la figura 3, en cada una de las cepas la disminución de la actividad de agua afectó la velocidad de crecimiento. Esto confirma que el nivel de agua es una variable que afecta el metabolismo de los microorganismos. (Pandey,1992; Oriol, 1998b)

La cepa mutante que presentó mayor crecimiento fue AW 96-3 en  $a_w$  0.99 comparada a la cepa silvestre C28B25. La cepa mutante AW 99-iii tuvo menor crecimiento que la cepa AW 96-3 en  $a_w$  0.99, pero mayor que la cepa silvestre (Tabla 2)

Tabla 2  
Crecimiento máximo,  $X_m$  (g/L) de *A. niger* en sacarosa\*

$a_w$	C28B25	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	9 ± 0.2	17 ± 0.13	20 ± 0.8
0.98	7 ± 0.1	11 ± 0.12	12 ± 0.1
0.96	3 ± 0.04	7 ± 0.11	2 ± 0.03

\* Datos obtenidos por duplicado, los intervalos ± fueron estimados como la mitad de las diferencias entre los duplicados.

Estos resultados están de acuerdo con el reporte previo de que el fenotipo *dgr* está asociado a una mayor velocidad de crecimiento en las cepas mutantes AW 99-iii y AW 96-3 comparada con la tipo silvestre C28B25 (Minjares y col. 1997)

El análisis del ajuste de los datos calculados con los datos teóricos se llevó a cabo minimizando la suma de los residuos de los mínimos cuadrados ( $S_r$ ), utilizando un modelo matemático para el crecimiento (sección 5.4)

Observando los datos calculados de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en la figura 4, podemos ver que la cepa que mostró una  $\mu$  más elevada fue la cepa AW 96-3, en  $a_w = 0.99$  comparada con la cepa C28B25, la cual tuvo la  $\mu$  más baja en  $a_w = 0.99$ . La cepa mutante AW 99-iii tuvo una  $\mu$  más baja que la cepa AW 96-3 en  $a_w = 0.99$ , pero mayor que la cepa silvestre (Tabla 3)

Tabla 3

Velocidad específica de crecimiento ( $\mu = h^{-1}$ ) de *A. niger* en sacarosa

$a_w$	C28B25		AW 99-iii		AW 96-3	
	$\mu$	$R^2$	$\mu$	$R^2$	$\mu$	$R^2$
0.99	0.4	0.98	0.6	0.99	0.7	0.98
0.98	0.2	0.99	0.4	0.97	0.4	0.98
0.96	0.1	0.99	0.3	0.99	0.06	0.99

$R^2$  es el coeficiente de la regresión  $\ln(X) = \mu \ln t + c$  (sección 5.4)

De acuerdo al trabajo realizado por Loera y Viniegra (1998), con las mismas cepas de este estudio, la cepa que presentó la mayor  $\mu$  fue la C28B25 en  $a_w = 0.99$  ( $\mu = 0.7$ ) en medio sólido y utilizando pectina como sustrato, en el caso del presente trabajo la cepa que mayor velocidad de crecimiento manifestó fue la cepa AW 96-3 en  $a_w = 0.99$  en medio líquido y utilizando sacarosa como sustrato.

Comparando la velocidad específica de crecimiento de la cepa silvestre C28B25 de este trabajo con el realizado por Romero y col. (datos no publicados), los cuales obtuvieron una  $\mu = 0.05h^{-1}$  y  $X_{\text{máx}}$  de  $38 \text{ gL}^{-1}$  en  $a_w = 0.99$ , tenemos como resultado que la cepa silvestre presentó una  $\mu$  más alta al ser analizada en esta investigación.

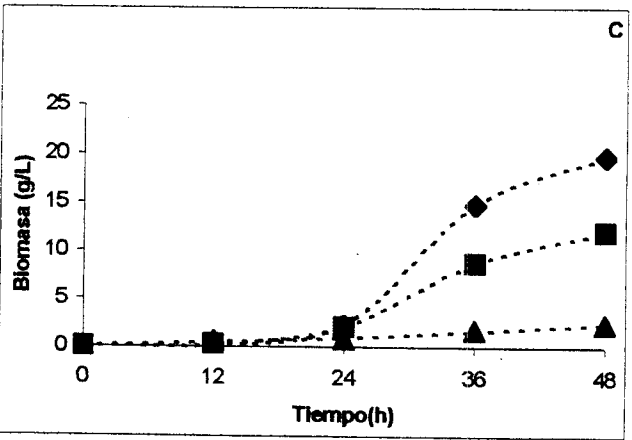
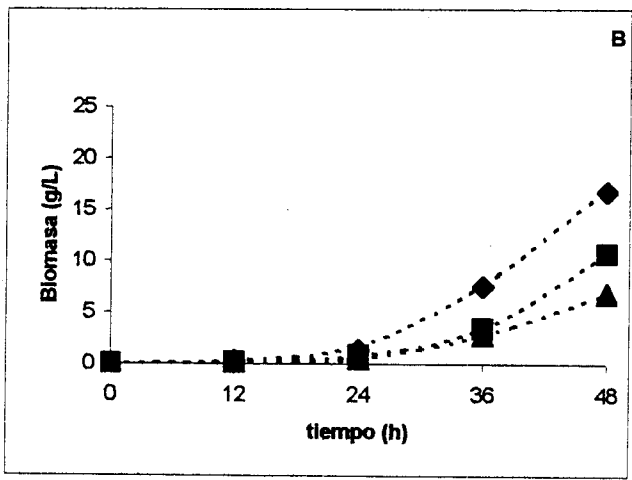
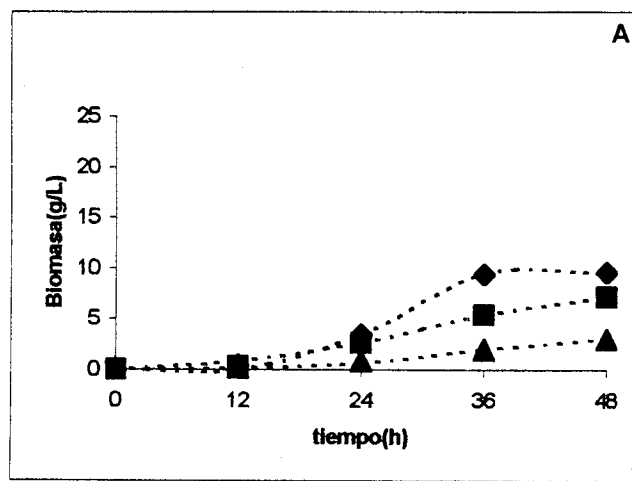


Fig. 3. Influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ) en el crecimiento de *A. niger*, donde  $\blacklozenge$   $a_w$  0.99,  $\blacksquare$   $a_w$  0.98,  $\blacktriangle$   $a_w$  0.96, — ajuste de los datos con la ecuación logística.  
 A) C28B25, B) AW 99-iii, C) AW 96-3

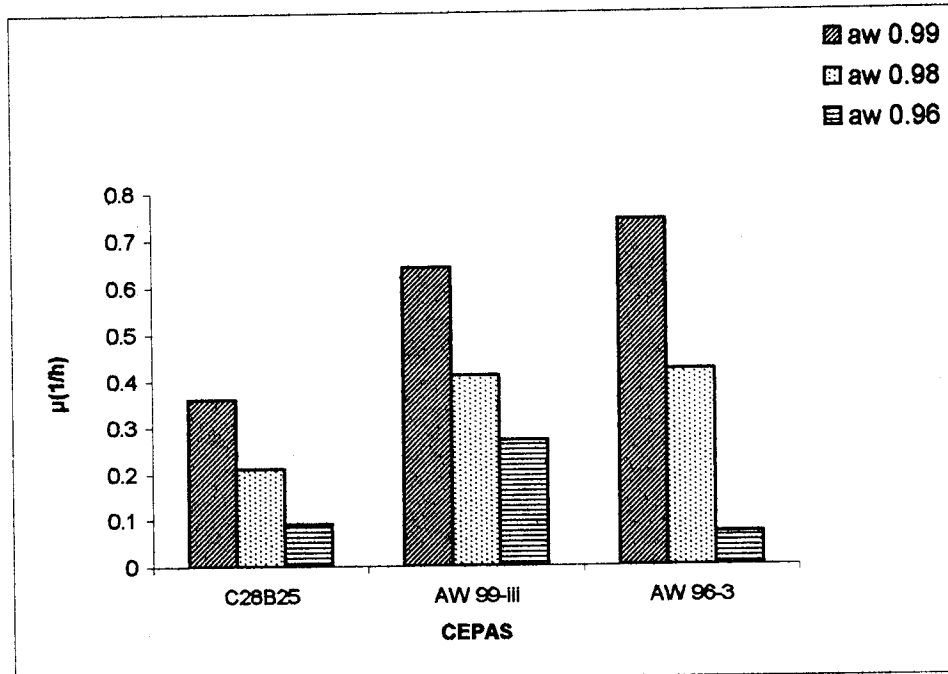


Figura 4. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *A. niger* en sacarosa.

### 6.1.2. PRODUCCION DE LA INVERTASA.

La producción de la invertasa también fue afectada por el descenso en la actividad de agua en cada una de las cepas. En la figura 5 se observan los resultados de la actividad de la invertasa. Las cepas mutantes AW 99-iii y AW 96-3 tuvieron una mayor actividad enzimática en comparación a la cepa silvestre C28B25, lo cual está de acuerdo con reportes previos de que el fenotipo *dgr* está asociado con desrepresión de síntesis de hidrolasas por *Saccharomyces cerevisiae* (Zimmerman, 1977), *Neurospora crassa* (Allen y col. 1989) y *Aspergillus niger* (Antier y col. 1993)

La mayor actividad volumétrica se obtuvo en la cepa AW 96-3 en  $a_w = 0.99$ , en comparación a la cepa silvestre C28B25 y a la cepa mutante AW 99-iii (Tabla 4)

La actividad de la invertasa en la cepa AW 96-3 en  $a_w = 0.99$  fue mayor que la previamente reportada para *Aspergillus nidulans* (1.2 UI/ml) (Chen y col. 1996), *Aspergillus niger* (0.11 UI/ml) (Wallis y col. 1999) y *Aspergillus niger* (5 UI/ml) (Romero y col. 1999).

Tabla 4

Actividad enzimática máxima (UI/L) de la invertasa en *A.niger* en sacarosa

$a_w$	C28B25	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	915 ± 274 <sup>a,b,d,g</sup>	3661 ± 204 <sup>c</sup>	9793 ± 274 <sup>l</sup>
0.98	444 ± 74 <sup>a,o</sup>	682 ± 101 <sup>d,e,f,i</sup>	8769 ± 501 <sup>j</sup>
0.96	830 ± 96 <sup>b,f,h</sup>	864 ± 23 <sup>g,h,i</sup>	5174 ± 151 <sup>k</sup>

Cifras con superíndices son significativamente diferentes entre si con una  $p \leq 0.05$

El mayor rendimiento ( $Y_p/x$ ) se observó en la cepa AW 96-3 en  $a_w = 0.96$ , en comparación a la cepa mutante AW 99-iii y la cepa silvestre (fig. 6-A). Esto nos indica que la cepa AW 96-3 es la más eficiente en cuanto a la relación de producción de enzimas por gramo de biomasa. Esto probablemente se deba al hecho de que esta cepa fue mutada y aislada a baja actividad de agua ( $a_w = 0.96$ ) por Antier y col. (1993), lo cual probablemente se asocia a ciertas propiedades de adaptabilidad a un ambiente hiperosmótico.

Al comparar el rendimiento de esta cepa con la obtenida por Romero y col. (datos no publicados) obtuvimos que la cepa C28B25 en  $a_w = 0.99$  tuvo un mayor rendimiento en la producción de invertasa ( $Y_{p/x} = 6770$ ) comparados a los que se obtuvieron en este caso (tabla 5)

Tabla 5

Rendimiento  $Y_{p/x}$  (UI/gX) en *A. niger* en sacarosa

$a_w$	C28B25		AW 99-iii		AW 96-3	
	$Y_{p/x}$	$R^2$	$Y_{p/x}$	$R^2$	$Y_{p/x}$	$R^2$
0.99	353	0.99	672	0.98	679	0.97
0.98	116	0.93	153	0.95	4449	0.99
0.96	1061	0.97	26	0.97	4501	0.99

$R^2$  es el coeficiente de la regresión  $E = Y_{p/x}(X) + b$  (sección 5.6)

En cuanto a la productividad específica ( $q_p$ ) podemos observar que ésta fue afectada por los cambios de la actividad del agua en las tres cepas (fig. 6-B). La mayor productividad se obtuvo en la cepa AW 96-3 en una  $a_w$  de 0.98 (tabla 6). De esta manera confirmamos nuevamente que las cepas mutantes AW 96-3 parecen ser las más eficientes en cuanto a productividad y rendimiento en baja actividad de agua y está desregulada para la producción de enzimas. La velocidad de la producción de la invertasa por *A. niger* asociada al crecimiento en la cepa mutante AW 96-3 en  $a_w = 0.99$ , fue mayor a la reportada por Romero y col. (datos no publicados) en la cepa silvestre C28B25 ( $q_p = 338.5 \text{ UIgX}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), aunque esta última fue mayor que la reportada aquí para la cepa silvestre.

Tabla 6

Productividad específica  $q_p$  (UI/gXh) de *A. niger* en sacarosa

$a_w$	C28B25	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	141	403	475
0.98	23	61	1780
0.96	106	8	270

Las diferencias de los valores con los previamente reportados se pueden deber a las condiciones muy distintas de cultivo: tiempo de fermentación, diferente capacidad de secreción de las diferentes cepas y especies, concentración y tipo de sustrato y las características del material utilizado para llevar a cabo la fermentación (pozos o matraces).

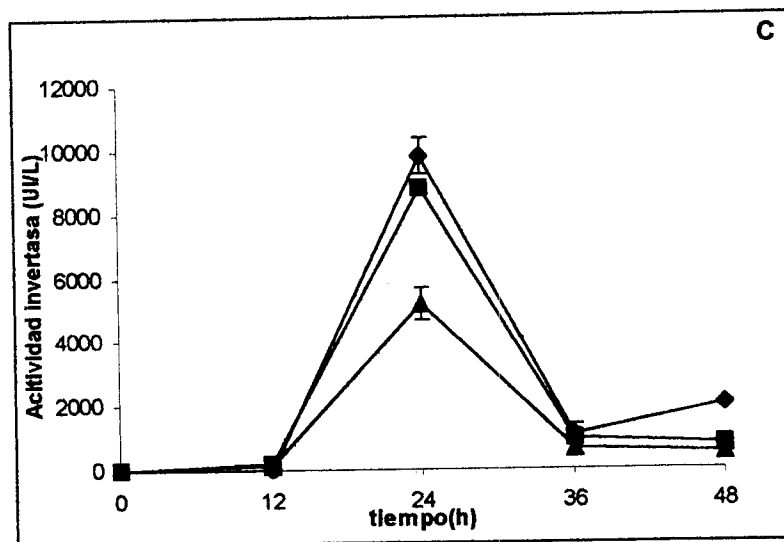
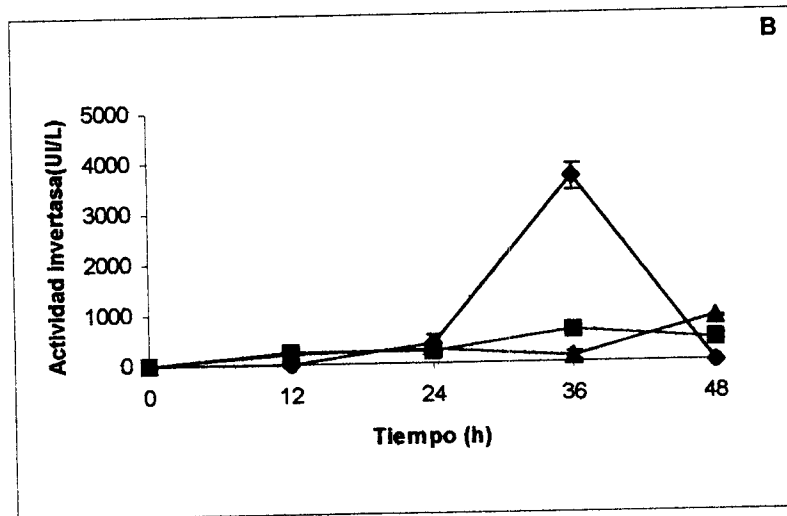
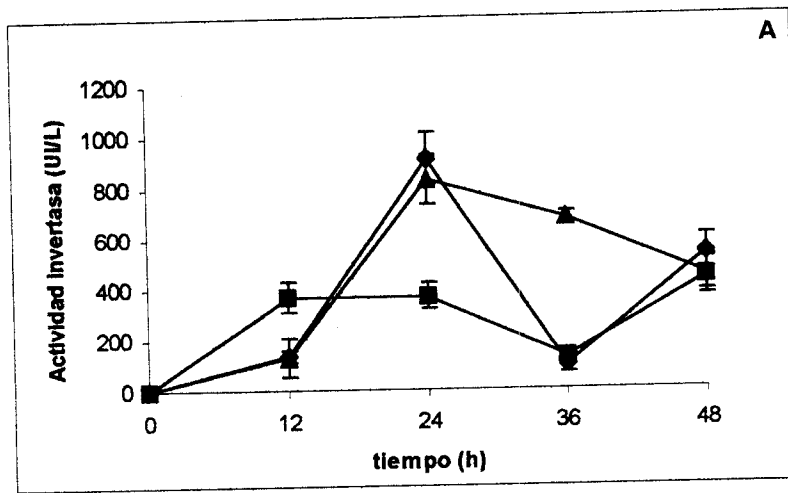
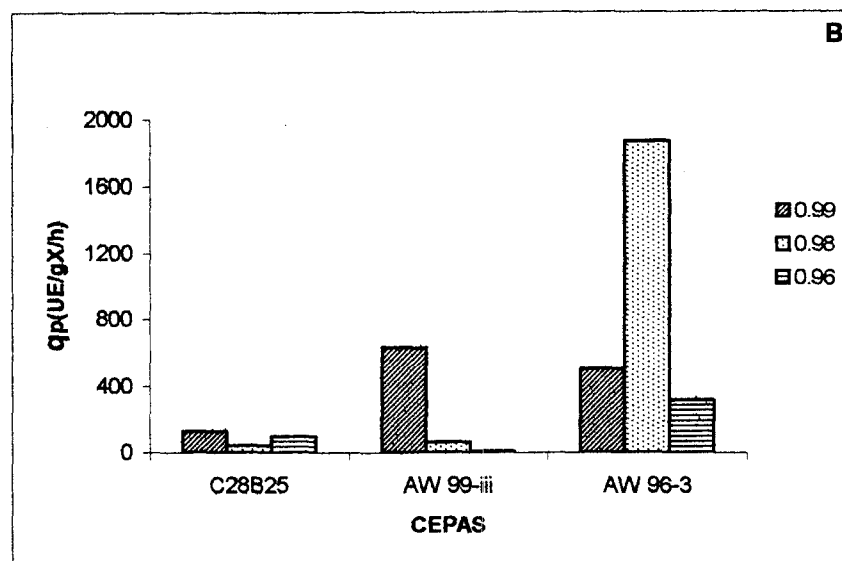
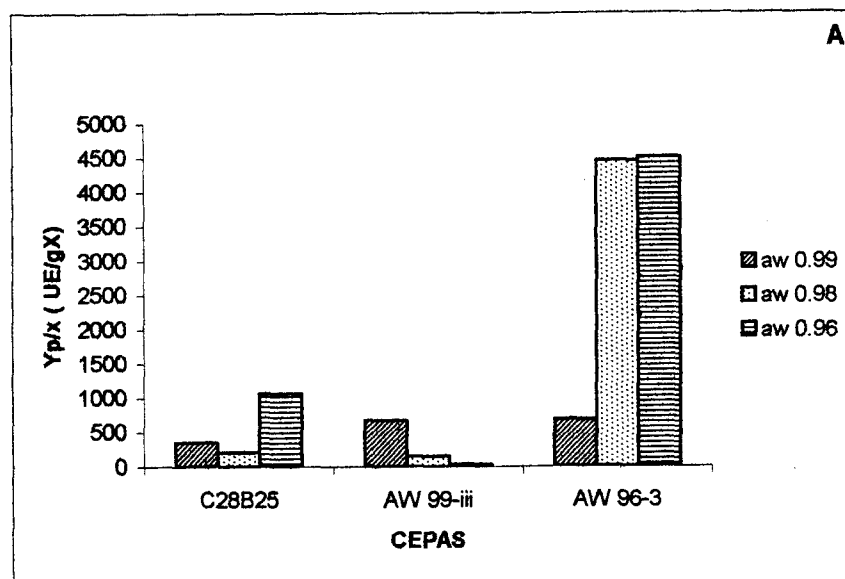


Figura 5. Influencia de la  $a_w$  en la actividad de la invertasa en *A. niger* utilizando como sustrato sacarosa Donde ◆  $a_w=0.99$ , ■  $a_w=0.98$ , ▲  $a_w=0.96$ . A) C28B25, B) AW 99-3, C) AW 96-3





**Fig. 6** Rendimiento ( $Y_{p/x}$ )- A y Productividad específica( $q_p$ )- en *A. niger* utilizando como sustrato sacarosa

222867

## 6.2. INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD DE AGUA UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO EN *Aspergillus niger*.

En cada una de las cepas de estudio (C28B25 , AW 99-iii y AW 96-3) se estudió la evolución de la producción de invertasa durante 48 horas y se tomaron muestras cada 12 horas. Se midió la producción de biomasa y la producción de la enzima en cada uno de los cinco tiempos. Para este experimento se utilizaron matraces Erlenmeyer y 50 g/L de glucosa.

### 6.2.1. PRODUCCION DE BIOMASA.

El efecto de la actividad de agua en el crecimiento de *A. niger* utilizando glucosa como sustrato, se puede observar en la figura 7. Podemos ver que a baja actividad de agua el crecimiento fue menor en cada una de las cepas. La cepa AW 96-3 fue la que mayor crecimiento presentó en la actividad de agua 0.99 en comparación a la cepa silvestre C2825 y la cepa mutante AW 99-iii (tabla 7)

Tabla 7  
Crecimiento máximo,  $X_m$  (g/L) de *A. niger* en glucosa

$a_w$	C28B25	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	5 ± 0.7	2.2 ± 0.2	6 ± 1.4
0.98	3 ± 0.03	2.4 ± 0.06	4 ± 0.1
0.96	2 ± 0.005	1 ± 0.006	1 ± 0.2

\* Datos obtenidos por duplicado, los intervalos  $\pm$  fueron estimados como la mitad de las diferencias entre los duplicados.

El análisis del ajuste de los datos calculados con los datos teóricos se llevó a cabo minimizando la suma de los residuos de los mínimos cuadrados ( $S_r$ ), utilizando un modelo matemático para el crecimiento (sección 5.4)

En general, se obtuvo un crecimiento pobre lo cual puede estar relacionado a la concentración de oxígeno en el medio la cual normalmente es baja en medio líquido (5mg/L), y también a la concentración de glucosa que se utilizó (50 g/L), lo cual requiere una mayor demanda de oxígeno.

En cuanto a la velocidad específica de crecimiento( $\mu$ ), podemos observar en la figura 8 que la cepa AW 96-3 presenta una  $\mu$  más elevada en  $a_w = 0.99$ , aproximadamente tres veces mayor respecto a las otras dos cepas, las cuales tuvieron una  $\mu$  semejante en alta actividad de agua (tabla 8)

Tabla 8  
Velocidad específica de crecimiento ( $\mu = h^{-1}$ ) de *A. niger* en glucosa

$a_w$	C28B25		AW 99-iii		AW 96-3	
	$\mu$	$R^2$	$\mu$	$R^2$	$\mu$	$R^2$
0.99	0.08	0.99	0.07	0.99	0.2	0.99
0.98	0.1	0.99	0.08	0.99	0.1	0.97
0.96	0.07	0.99	0.04	0.99	0.03	0.98

$R^2$  es el coeficiente de la regresión  $\ln(X) = \mu \ln t + c$   
(sección 5.4)

La cepa mutante AW 96-3 también presenta una  $\mu$  mas elevada si comparamos con la  $\mu$  obtenida por Romero y col. ( $\mu = 0.05$ ) (datos no publicados) al utilizar sacarosa como sustrato, en  $a_w 0.99$  con la cepa C28B25.

Así mismo, si comparamos entre sí los resultados obtenidos en este mismo trabajo con sacarosa podemos observar que el crecimiento y la velocidad específica de crecimiento fueron mayores al utilizar sacarosa como sustrato que al utilizar glucosa. No podemos definir exactamente cuales son las causas de estas diferencias ya que en el experimento con sacarosa se utilizaron pozos de cultivo celular y en éste experimento se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml.

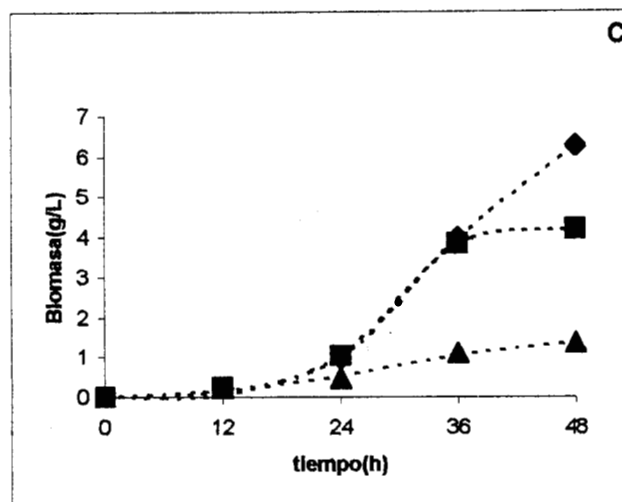
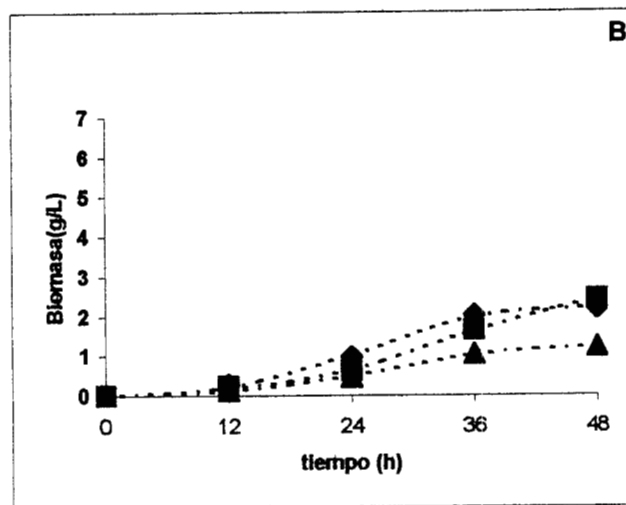
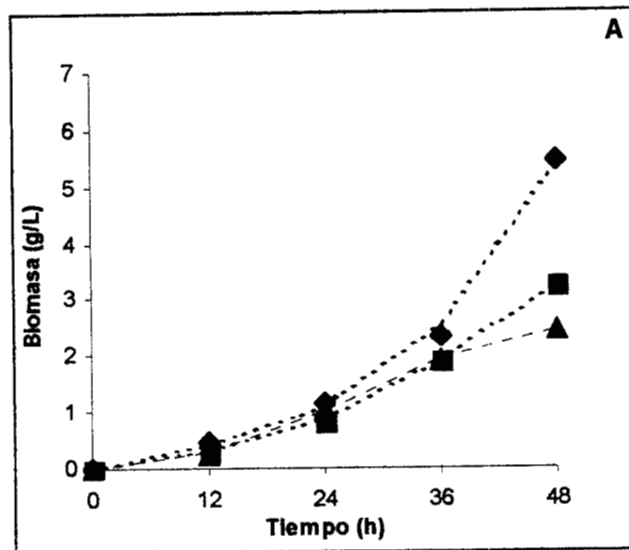


Figura 7. Influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ) en el crecimiento de *Aspergillus niger* en glucosa, donde ◆ 0.99, ■ 0.98, ▲ 0.96. — ajuste de los datos con la ecuación logística  
 A) C28B25, B) AW 99-iii, C) AW 96-3

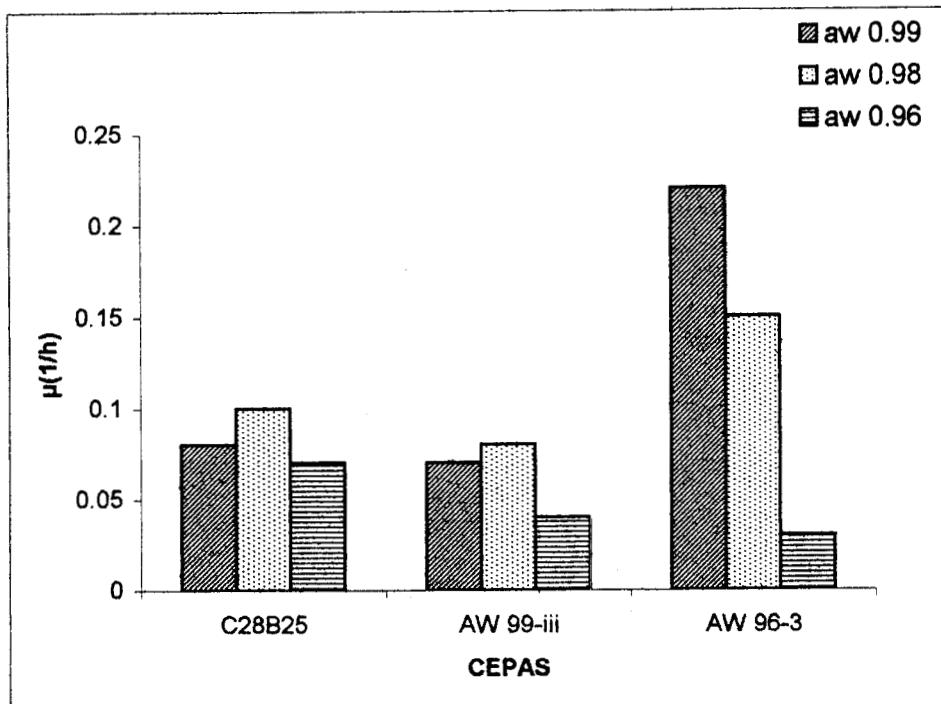


Figura 8. Velocidad específica de crecimiento en *A. niger* utilizando como sustrato glucosa

## 6.2.2. PRODUCCION DE LA INVERTASA

La producción de la invertasa también fue afectada por la actividad de agua en cada una de las cepas. En la figura 9 se observan los resultados de la actividad de la invertasa. En este caso en el cual se utilizó como única fuente de carbono la glucosa, la cual se sabe, tiene una alta capacidad de ejercer la represión catabólica en hongos filamentosos (Mac Kenzie, 1993; Arst y Bailey, 1977 ;Ronne, 1995), como resultado principal de este experimento se observó que la cepa silvestre C28B25 no presentó producción de invertasa debido a la represión catabólica por la presencia de glucosa y que en las cepas mutantes AW 99-iii y AW 96-3 si se produjo esta enzima, lo cual nos indica que estas cepas están desreprimidas para la formación de invertasas. La cepa mutante que manifestó mayor actividad enzimática fue la cepa AW 99-iii en comparación a la cepa AW 96-3 (tabla 9)

Según Minjares y col. (1997), aparentemente el fenotipo *dgr* está asociado con estados fisiológicos desreprimidos los cuales permanecen como tal, cuando se pierde la resistencia al análogo de la glucosa, es decir, la desrepresión fisiológica puede estar relacionada a diferentes *locus* que codifican para la resistencia a la desoxiglucosa.

Tabla 9

Actividad enzimática máxima (UI/L) de la invertasa en *A.niger* en glucosa

$a_w$	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	4665 ± 211 <sup>a</sup>	2419 ± 350 <sup>a,t,g</sup>
0.98	3849 ± 144 <sup>b</sup>	2237 ± 185 <sup>d,f,h</sup>
0.96	1399 ± 250 <sup>c,d,e</sup>	1840 ± 150 <sup>e,g,h</sup>

Cifras con superíndices son significativamente diferentes entre si con una  $p \leq 0.05$

Algunos investigadores han observado que las mutantes resistentes a la desoxiglucosa parecen tener alteraciones reguladoras pleiotrópicas en la actividad de enzimas hidrolíticas (Zimmermann y col., 1977; Entian, 1981; Allen, 1989; Antier, 1993; Romero, 1996).

Antier y col. (1993) aislaron las cepas AW 96-3 y AW 99-iii como mutantes sobreproductoras de pectinasas y ahora se demuestra un caso similar para la producción de

invertasa, es razonable suponer que estas son mutantes pleiotrópicas que tienen afectada la regulación de la síntesis de diversas enzimas a la vez.

En la relación de  $\mu$  (fig. 8) con el rendimiento enzimático ( $Y_{p/x}$ ) (fig. 10-a) observamos que en el caso de la cepa AW 96-3 el mayor rendimiento se obtuvo a baja actividad de agua (0.98) y que la velocidad específica de crecimiento es menor en esta  $a_w$ . En general podemos advertir que existe una relación inversa entre  $\mu$  y rendimiento, cuando incrementa la velocidad de crecimiento, disminuye la producción de la invertasa y viceversa. El rendimiento máximo que se obtuvo en la cepa AW 96-3 en  $a_w$  0.98 (tabla 10) fue menor al obtenido por Romero y col.(datos no publicados) en la cepa C28B25 ( $Y_{p/x}= 6670$  UI/gX) al utilizar sacarosa como sustrato en alta actividad de agua, y menor que el que se obtuvo con sacarosa en este mismo trabajo en la cepa AW 96-3 en  $a_w$  0.98 (ver tabla 5)

Tabla 10  
Rendimiento  $Y_{p/x}$  ( UI/gX) en *A. niger* en glucosa

$a_w$	AW 99-iii		AW 96-3	
	$Y_{p/x}$	$R^2$	$Y_{p/x}$	$R^2$
0.99	1162	0.97	2047	0.98
0.98	1450	0.98	2262	0.98
0.96	1412	0.96	1527	0.96

$R^2$  es el coeficiente de la regresión  $E= Y_{p/x} (X) + b$  (sección 5.6)

En cuanto a la productividad específica ( $q_p = UigX^{-1}h^{-1}$ ) (fig 10-b) podemos observar que las cepas mutantes fueron también afectadas por la disminución de la actividad de agua (Tabla 11)

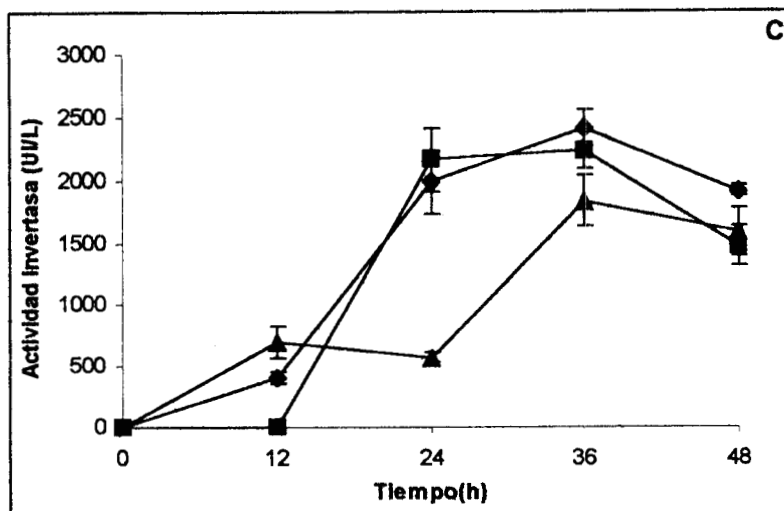
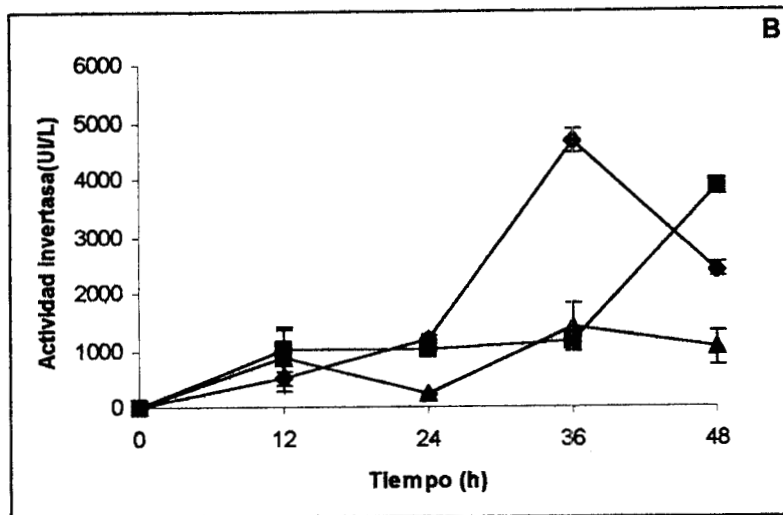
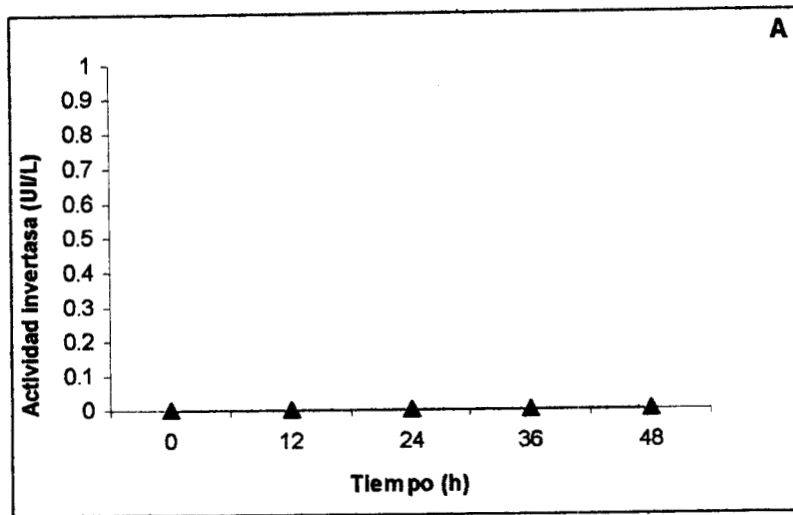
La productividad específica ( $q_p$ ) fue mayor en la cepa AW 96-3 en alta actividad de agua aproximadamente cinco veces mayor que en AW 99-iii y mayor a la obtenida por Romero y col. (1999) en la cepa C28B25 en  $a_w$  0.99 ( $338.5$  UIg $^{-1}h^{-1}$ ). Sin embargo fue menor a la productividad obtenida en el experimento que se realizó con sacarosa en este mismo documento(ver tabla 6)

Tabla 11

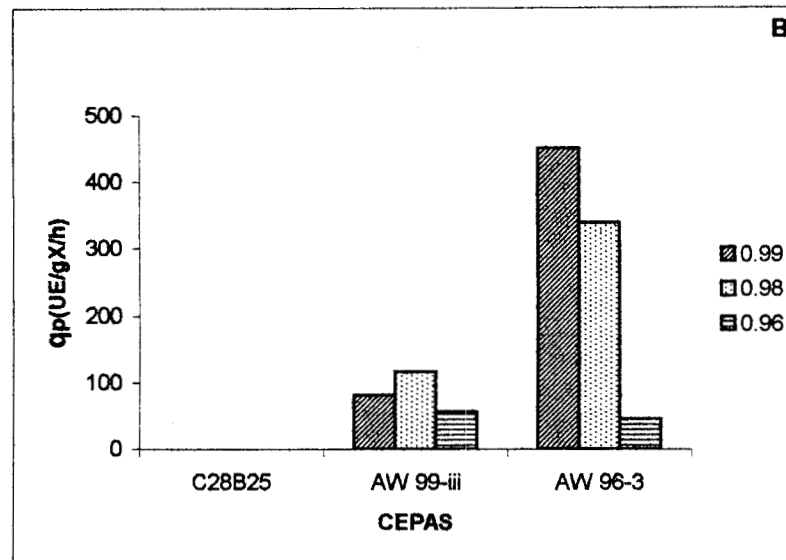
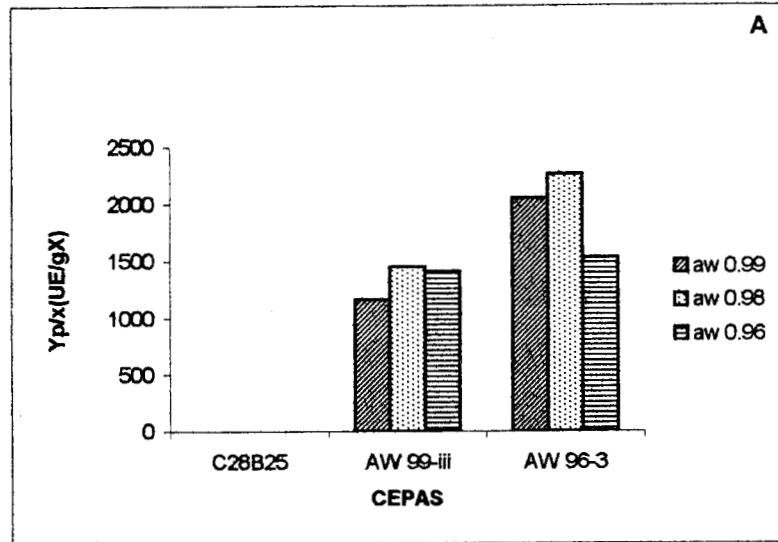
Productividad específica  $q_p$  ( $UlgX^{-1}h^{-1}$ ) de *A. niger* en glucosa

$a_w$	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	81	410
0.98	116	226
0.96	57	46





**Figura 9.** Influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ) en la actividad enzimática de *Aspergillus niger* en glucosa, donde ◆  $a_w = 0.99$ , ■  $a_w = 0.98$ , ▲  $a_w = 0.96$  A) C28B25, B) AW 99-iii, C) AW 96-3



**Fig. 10** Rendimiento ( $Y_{p/x}$ )-A y Productividad específica( $q_p$ )-B en *A. niger* utilizando como sustrato glucosa

### 6.3. INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD DE AGUA UTILIZANDO GLUCOSA Y SACAROSA COMO FUENTES DE CARBONO EN *Aspergillus niger*.

En cada una de las cepas de estudio (C28B25, AW 99-iii y AW 96-3) se estudió la evolución de la producción de invertasa durante 48 horas y se tomaron muestras cada 12 horas. Se midió la producción de biomasa y la producción de la enzima en cada uno de los cinco tiempos. Para este experimento se utilizaron matraces de 125 ml Erlenmeyer y 10 g/L de la mezcla glucosa y sacarosa.

#### 6.3.1. PRODUCCION DE BIOMASA.

El efecto de la actividad de agua en el crecimiento de *A. niger* utilizando como sustrato glucosa y sacarosa se puede observar en la figura 11. La disminución en la disponibilidad del agua en el medio afectó el crecimiento de biomasa en las cepas C28B25 y AW 99-iii en las cuales se pudo observar un descenso gradual en el crecimiento según se disminuyó la  $a_w$ , mientras que en la cepa mutante Aw96-3 se pudo observar que la aminoración de la actividad del agua no influyó notablemente en el crecimiento. La cepa silvestre C28B25 fue la que mayor crecimiento presentó en comparación a las cepas mutantes AW 99-iii y AW 96-3 (tabla 12).

Tabla 12  
Crecimiento máximo,  $X_m$  (g/L) de *A. niger* en sacarosa + glucosa\*

$a_w$	C28B25	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	3 ± 0.3	2 ± 0.05	2 ± 0.03
0.98	2 ± 0	1 ± 0.04	2 ± 0.02
0.96	1 ± 0.01	0.6 ± 0.01	1 ± 0.06

\* Los intervalos ± fueron estimados como la mitad de las diferencias entre los duplicados.

El análisis del ajuste de los datos de las mediciones de la producción de biomasa con los datos teóricos se llevó a cabo minimizando la suma de los residuos de los mínimos cuadrados ( $S_r$ ), utilizando un modelo matemático para el crecimiento (sección 5.4)

222867

En cuanto al efecto sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) (figura 12) podemos observar que la cepa silvestre C28B25 presentó una  $\mu$  más elevada que las dos cepas mutantes en  $a_w$  0.99, pero la cepa mutante AW 96-3 fue menos afectada por las bajas actividades de agua y manifestó mayor velocidad de crecimiento a bajas actividades de agua que las otras dos cepas. La cepa AW 99-iii fue la que menor velocidad de crecimiento manifestó de las tres cepas de estudio (tabla 13)

Tabla 13

Velocidad específica de crecimiento ( $\mu = h^{-1}$ ) de *A. niger* en glucosa más sacarosa

$a_w$	C28B25		AW 99-iii		AW 96-3	
	$\mu$	$R^2$	$\mu$	$R^2$	$\mu$	$R^2$
0.99	0.08	0.99	0.05	0.99	0.06	0.99
0.98	0.04	0.99	0.03	0.95	0.06	0.99
0.96	0.03	0.98	0.02	0.96	0.04	0.99

$R^2$  es el coeficiente de la regresión  $\ln(X) = \mu \ln t + c$   
(sección 5.4)

También la cepa C28B25 presentó una  $\mu$  mayor que la obtenida por Romero y col. (datos no publicados), los cuales obtuvieron una  $\mu$  de 0.05 utilizando solamente sacarosa como sustrato. Aunque la máxima velocidad específica de crecimiento obtenida en este experimento fue menor a la obtenida cuando se utilizó sacarosa como único sustrato (ver tabla 3)

Las diferencias en los resultados obtenidos se deben principalmente a que las condiciones de cultivo que se manejaron fueron diferentes para cada experimento.

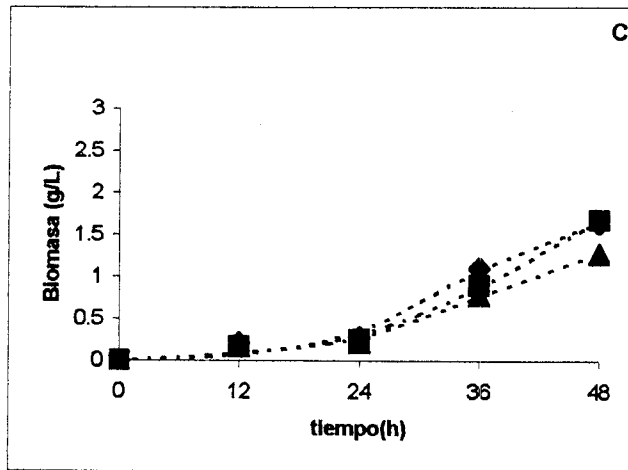
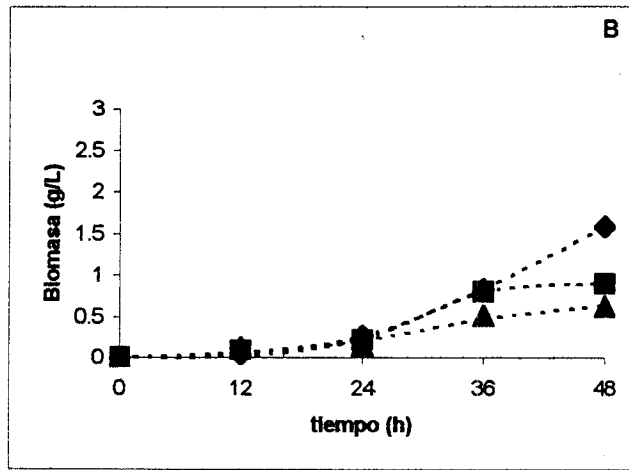
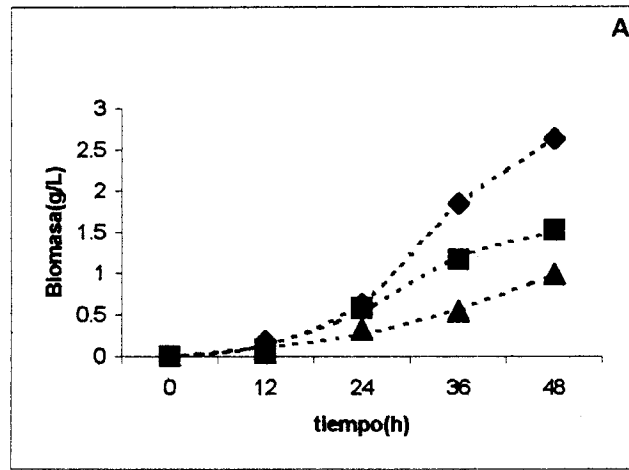


Figura 11. Influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ) en el crecimiento de *A. niger* en sacarosa y glucosa, donde  $\blacklozenge$  0.99,  $\blacksquare$  0.98,  $\blacktriangle$  0.96, ---- datos ajustados a la ecuación logística

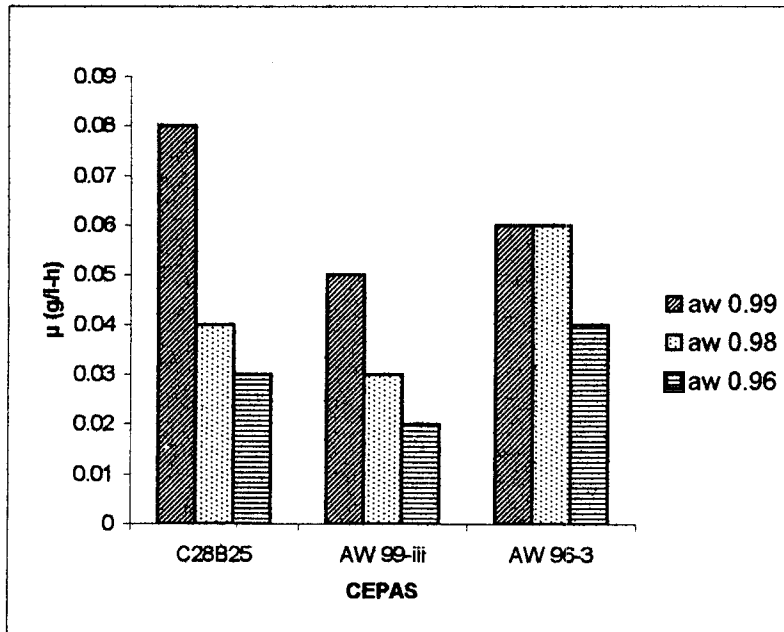


Figura 12. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *Aspergillus niger* utilizando glucosa y sacarosa como sustrato.

### 6.3.2. PRODUCCION DE LA INVERTASA

Las bajas actividades de agua no afectaron la producción enzimática cuando se utilizó sacarosa mas glucosa en la fermentación (figura 13). La cepa silvestre C28B25 exhibió la mayor actividad enzimática en  $a_w$  0.99 en comparación a las cepas mutantes AW 96-3 y AW 99-iii, mientras que la producción mas baja se observó en la cepa mutante AW 96-3 (tabla 14)

Tabla 14

Actividad enzimática máxima (UI/L) de la invertasa en *A. niger* en sacarosa mas glucosa

$a_w$	C28B25	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	3692 ± 300 <sup>a,b,c,d</sup>	3117 ± 250 <sup>e,t,h,j</sup>	1810 ± 62 <sup>l,o,p</sup>
0.98	3379 ± 300 <sup>a,e,f,g</sup>	1360 ± 180 <sup>k,l,m</sup>	2207 ± 370 <sup>d,g,i,j,m,o,q</sup>
0.96	3300 ± 51 <sup>b,e,h,i</sup>	810 ± 150 <sup>k,n</sup>	1543 ± 180 <sup>n,p,q</sup>

Cifras con superíndices son significativamente diferentes entre si con una  $p < 0.05$

La disminución en la actividad del agua tuvo un efecto en el rendimiento ( $Y_{p/x}$ ), ya que como podemos observar en la figura 14-a, el rendimiento fue diferente dependiendo de la actividad del agua. La cepa silvestre C28B25 fue la que mayor rendimiento manifestó a baja actividad de agua (0.96), el cual fue aproximadamente tres veces mayor que en las cepas mutantes AW 99-iii y AW 96-3 (tabla 15)

Tabla 15

Rendimiento  $Y_{p/x}$  (UI/gX) en *A. niger* en sacarosa mas glucosa

$a_w$	C28B25		AW 99-iii		AW 96-3	
	$Y_{p/x}$	$R^2$	$Y_{p/x}$	$R^2$	$Y_{p/x}$	$R^2$
0.99	842	0.98	1903	0.93	1914	0.99
0.98	3100	0.98	1165	0.82	2742	0.97
0.96	6010	0.93	1244	0.95	239	0.99

$R^2$  es el coeficiente de la regresión  $E = Y_{p/x}(X) + b$  (sección 5.6)

Al comparar el efecto de la actividad del agua entre  $\mu$  (fig.12) y el rendimiento ( $Y_{p/x}$ ) (fig. 14a) observamos en el caso de la cepa silvestre que mientras  $\mu$  aumenta, el rendimiento ( $Y_{p/x}$ ) disminuye.

En cuanto a la productividad específica ( $q_p$ ) podemos observar en la figura 14b que la mayor productividad a alta actividad de agua(0.99) se obtuvo en la cepa mutante AW 96-3 y la mayor actividad en  $a_w$  0.96 se observó en la cepa silvestre C28B25.

La velocidad de producción de la invertasa por *A. niger* asociada al crecimiento en la cepa C28B25 en  $a_w$  0.99 (tabla 16) , fue menor a la reportada por Romero y col.(datos no publicados) en la cepa silvestre ( $q_p= 338.5$  UI/gX/h) y menor que la reportada en este trabajo cuando se utilizó sacarosa como única fuente de carbono (ver tabla 6)

Tabla 16

Productividad específica  $q_p$  (UI/gXh) de *A. niger* en sacarosa mas glucosa

$a_w$	C28B25	AW 99-iii	AW 96-3
0.99	67	95	115
0.98	124	35	165
0.96	180	25	10



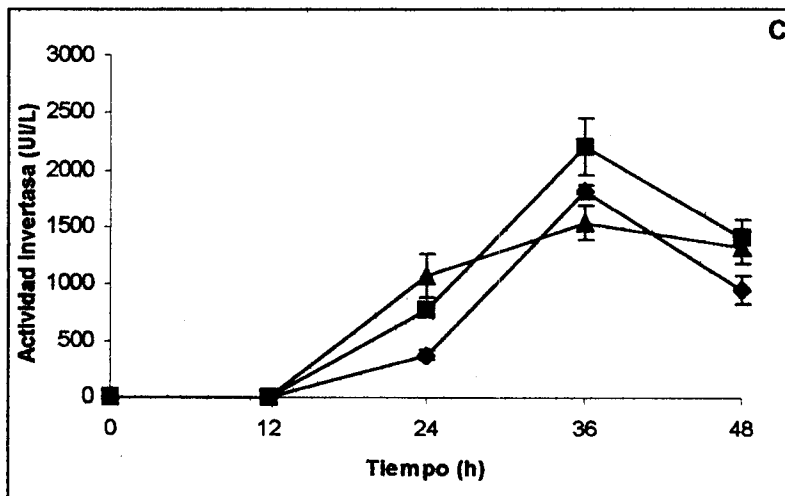
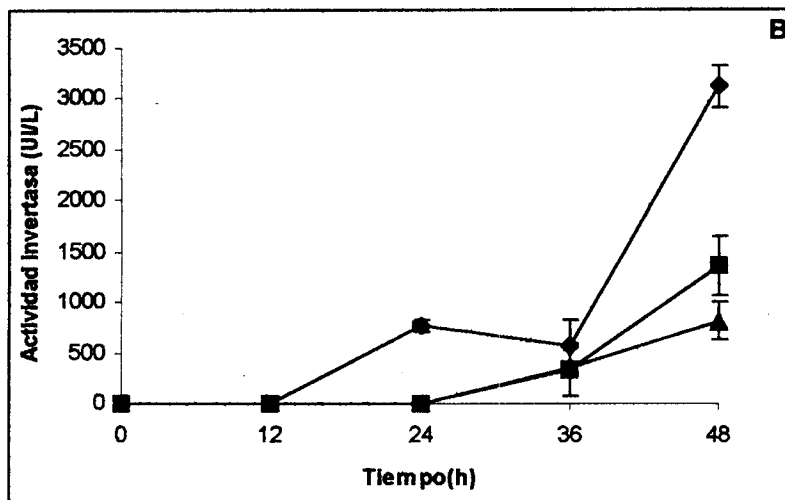
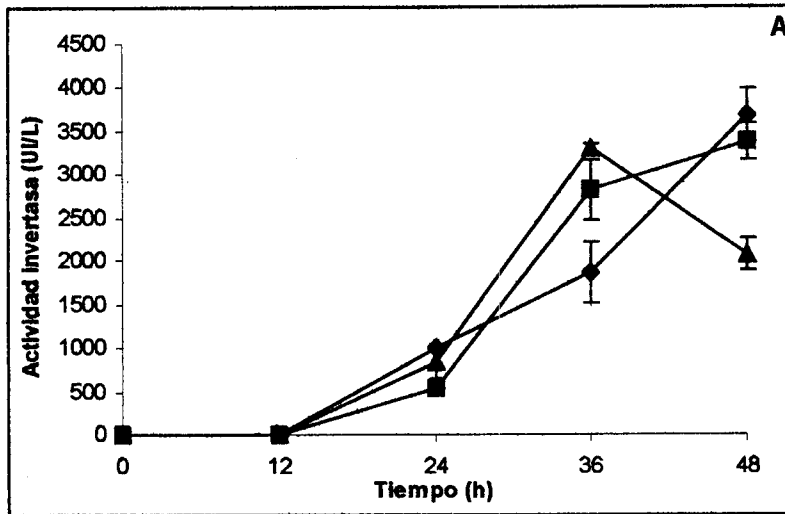
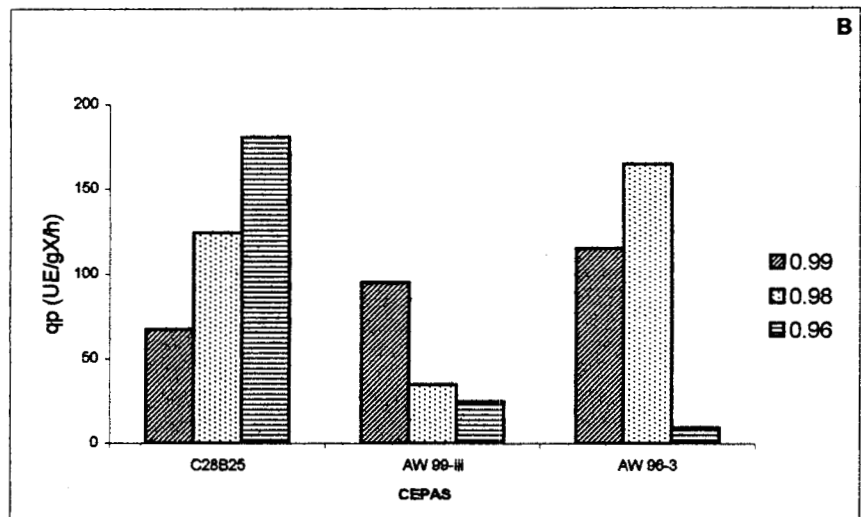
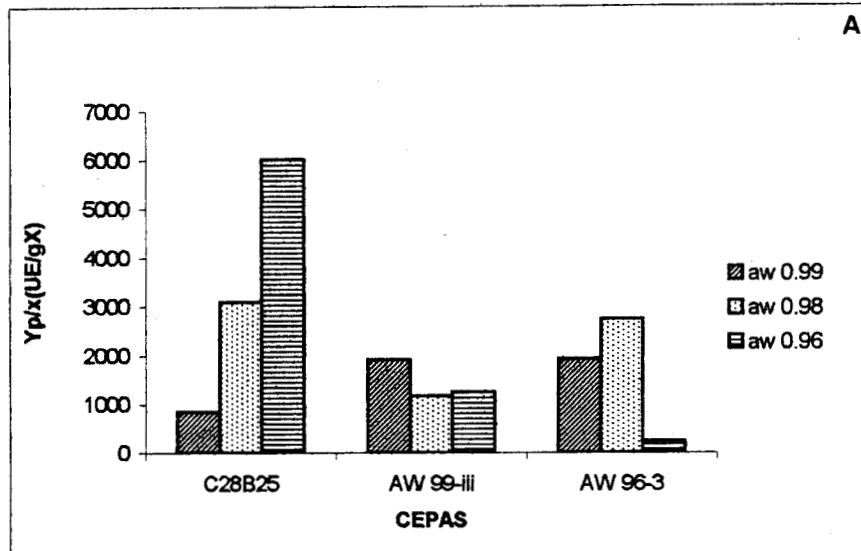


Figura 13. Influencia de la  $a_w$  en la actividad de la invertasa en *A. niger* en sacarosa y glucosa, donde  $\blacklozenge$   $a_w = 0.99$ ,  $\blacksquare$   $a_w = 0.98$ ,  $\blacktriangle$   $a_w = 0.96$ . A) C28B25, B) AW 99-iii, C) AW 96-3



**Figura 14. Rendimiento ( $Y_{p/x}$ )- A Productividad específica ( $q_p$ )-B en *A. niger* utilizando como sustrato glucosa y sacarosa**

## DISCUSION FINAL

Como resultados principales obtuvimos que la producción de las invertasas es regulada por la presencia de la glucosa, ejerciendo un efecto de represión catabólica. Las cepas mutantes resistentes a 2DG, *dgrAW* 99-iii y *dgrAW* 96-3, mostraron estar parcialmente desreprimidas, ya que en presencia de glucosa produjeron invertasas. El fenotipo *dgr* está asociado con la desrepresión de síntesis de hidrolasas en *Saccharomyces cerevisiae* (Zimmerman, 1977), *Neurospora crassa* (Allen y col. 1989) y *Aspergillus niger* (Antier y col. 1993).

Las dos cepas mutantes de este estudio (AW 99-iii y AW 96-3) fueron originalmente aisladas por Antier y col. (1993) para producir pectinasas, y en este trabajo hemos encontrado que estas cepas también producen invertasas, lo cual sugiere que probablemente estas cepas tienen un sistema de regulación pleiotrópica, lo cual ya ha sido observado en otros microorganismos (Zimmerman y col. 1977; Entian, 1981; Allen y col. 1989). En *Aspergillus nidulans* se encontraron tres genes involucrados en la represión del catabolito *CreA*, *CreB* y *CreC*, de los cuales *CreA* probablemente sea un gene de regulación peliotrópica (Chen y col. 1995)

Se han descubierto una serie de genes relacionados con la represión por glucosa. Dos genes importantes son los que se han encontrado en *Saccharomyces cerevisiae*, el gene estructural *hck2* que codifica para una hexocinasa y el gene *snf1* que codifica para una proteína cinasa (Entian, 1981). Es de particular interés el gene *hck2* ya que las mutaciones en este gene provocan que enzimas represibles por glucosa puedan producirse. Es muy probable que este mismo mecanismo se lleve a cabo también en hongos filamentosos, por lo cual sería de especial interés estudiar el gene que codifica para esta enzima en un futuro.

Aparentemente las mutaciones involucradas en la resistencia a 2DG están localizadas en diferentes *locus* (Allen y col. 1989; Loera y Viniegra, 1998). Recientemente se encontró que las mutantes de las series AW 99 y AW 96 aisladas por Antier y col. (1993) parecen ser independientes para la resistencia a la 2-DG y el fenotipo de sobreproducción de pectinasas (Loera, no publicado), ya que el diploide (D4) se encontró ser sensible a 2DG aunque fue obtenido a partir de dos haploides resistentes (AW 99-iii2 y AW 96-4).

Finalmente pudimos observar que el efecto de la actividad del agua sobre la producción de invertasas depende de la naturaleza del sustrato ( glucosa o sacarosa) ya que los perfiles de producción fueron diferentes al cultivar las cepas con cada uno de los sustratos mencionados.

Cuando se utilizó glucosa y sacarosa cada una por separado como único sustrato, se observó a la cepa mutante AW 96-3 como la mejor productora de invertasas. La cepa AW 99-iii tuvo una producción mayor que la cepa nativa C28B25 en estas mismas condiciones. Cuando se utilizó la mezcla sacarosa-glucosa la cepa nativa C28B25 fue la mejor productora, aunque en general pudimos observar que en éste caso no existieron diferencias estadísticamente significativas en la producción en las tres cepas.

## 7. CONCLUSIONES

1. La producción de invertasas en la cepa silvestre C28B25 es inhibida por represión catabólica cuando se utiliza glucosa como sustrato y las cepas mutantes AW 96-3 y AW 99-iii tienen una represión parcial por glucosa.
2. Es probable que las cepas mutantes AW 99-iii y AW 96-3 estén reguladas por un gen pleiotrópico ya que producen pectinasas (Antier y col. 1993) e invertasas.
3. La cepa mutante AW 96- 3 presentó una mayor producción de invertasas en baja actividad de agua que la cepa mutante AW 99-iii y la cepa silvestre C28B25 cuando se utilizó sacarosa como sustrato.
4. La cepa mutante AW 99-iii presentó una mayor actividad de invertasas que la cepa AW 96-3 en glucosa, pero la cepa AW 96-3 presentó una mayor productividad específica que la cepa AW 99-iii al utilizar glucosa como sustrato.
5. La cepa silvestre C28B25 presentó una mayor producción de invertasas que las cepas mutantes AW 99-iii y AW 96-3 cuando se utilizó la mezcla de sacarosa y glucosa como sustrato.

222867

## **8. PROPUESTAS**

1. Realizar el mismo experimento en medio sólido para poder valorar las diferencias en la producción de las invertasas en ambos medios.
2. Caracterizar genéticamente las cepas mutantes AW 99-iii y AW 96-3 como productoras de invertasas.
3. Caracterizar los genes reguladores que codifican para las hexocinasas en las cepas mutantes resistentes a 2DG, AW 99-iii y AW 96-3, mediante técnicas de Biología Molecular.
4. Analizar las cepas mutantes como huéspedes potenciales para la producción de proteínas heterólogas.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Acuña-Arguelles, M.E., Viniestra- González, G., Gutiérrez- Rojas, M., y Favela-Torres, E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentations. *Appl. Microbiol. Technol.* 1995, **43**, 808-814.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff Martin, Roberts, K. y Watson, D.J. 1993. *Molecular Biology of the cell*. 3ª. ed., Garland Publishing, USA, pp. 417-432
3. Allen, K.E., MacNally, M.T., Lowendorf, H.S., Slayman, C.W., Free, S.J. 1989. Deoxyglucose-Resistance Mutants of *Neurospora crassa*; Isolation, Mapping and Biochemical Characterisation. *J. Bacteriol.* **171**(1): 53-58
4. Antier, P., Minjares, A., Roussos, S., Raimbault, M. y Viniestra, G.G. 1993. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 254-259
5. Antier, P., Minjares, A., Roussos, S. y Viniestra, G.G. 1993b. New approach for selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation. *Biotech. Adv.* **11**: 429-440
6. Arbige, M.V. y Pitcher, W.H. 1989. Industrial enzymology: look towards the future. *Tibtech*, **7**:330-334
7. Archer, D.B., MacKenzie, D.A. y Ridout, M.J. 1995. Heterologous protein secretion by *Aspergillus niger* growing in submerged culture as dispersed or aggregated mycelia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**:157-160
8. Arst, H.N. 1981. Aspects of the control of gene expression in fungi: In *Genetics as a tool in Microbiology* (Eds. S.W. Glover and D.A. Hopwood) Symposium Society for General Microbiology, **31**, pp. 131-160. Cambridge University Press.

9. Arst, H.N. y Bailey, C.R. 1977. The regulation of carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*. En: *Genetics and Physiology of Aspergillus nidulans* (J.E. Smith and J.A. Pateman, Eds.) Academic Press, London, pp. 131-146
10. Berges, T., Barreau, Ch., Peberdy, J.F. y Boddy, L.M. 1993. Cloning of an *Aspergillus niger* invertase gene by expression in *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.*
11. Bedford y col. 1997. Enzyme feed additive and animal feed. Genecor. USA patent 5612055
12. Berka, R.M., Kodama, K.H., Rey, M.W., Wilson, L.J. y Ward, M. 1991. The development of *Aspergillus niger* var. *Awamori* as host for the expression and secretion of heterologous gene products. *Food Biotechnology*, **19**:681-685
13. Berka y col. 1997. *Aspergillus* expression system. Novo Nordisk, USA patent 5667990
14. Berka y col. 1994. Production of *Aspergillus niger* catalase-R. Genecor, USA patent 5360732
15. Boddy, L.M., Berges, T., Barreau, C., Vainstein, M.H., Dobson, M.J., Ballance, D.J. y Peberdy, J.F. 1993. Purification and characterisation of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Curr. Genet.* **24**: 60-66
16. Bojinova, D., Velkova, R., Grancharov, I. y Zhelev, S. 1997. The bioconservation of tunisian phosphorite using *Aspergillus niger*. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. **47**: 227-232
17. Bradford, M., 1976. A quick and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254



18. Carlson, M. 1987. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* Species. **169:4873-4877**
19. Carrez, D., Janssens W, Degrave, P., van den Hondel, C.A.M.J.J., Kinghorn, J.R., Fiers, W. y Contreras, R. 1990. Heterologous gene expression by filamentous fungi: secretion of human interleukin-6 by *Aspergillus nidulans*. *Gene*, **94:147-154**
20. Carter, B.L.A. y Bull, A.T. 1969. Studies of fungal growth and intermediary carbon metabolism under steady and non-steady state conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, **11:785-804**
21. Carter, B.L.A., Bull, A.T., Pirst, S.J. y Rowley, B.I. 1971. Relationship between energy substrate utilization and specific growth rate in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, **108:309-313**
22. Chen, H.M., Whitehead, M.P., Cleveland, T.E. y Dean, R.A. 1995. Sequence analysis of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase *pel A* gene and evidence for binding of promoter regions to CREA, a regulator of carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* **27: 142-149.**
23. Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S.B., Hjorstshoej, K., Thim, L. Y Hansen, T.M. 1988. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology*, **6:1419-1422**
24. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, **28:350-356**
25. Elorza, M.V. y Arst, H.N. 1971. Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, **111:185-193**

26. Entian, K.D. 1981. A carbon catabolite repression mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with elevated hexocinase activity: evidence for regulatory control of hexocinase PII synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 278-282
27. Friedrich, J., Cimerman, A. y Steiner, W. 1989. Submerged production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: Effect of different aeration/agitation regimes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:490-494
28. Gascon, S., y Lampen, J.O. 1968. Purification of the internal invertase of yeast. *J. Biol. Chem.* **243**, 1567-1572.
29. Gouka, R.J., Punt, P.J., Hensing, J.G.M. y van den Hondel, C.A.M. 1996. Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Applied and environmental microbiology.* **62**: 1951-1957
30. Hahn-Hagerdal, B. 1986. Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes.
31. Kelly, J.M. 1994. Carbon catabolite repression. En: *Aspergillus*, 50 years on (Martinelli, S.D. y Kinghorn eds.) Elsevier Science, Holanda, pp: 355-367
32. Kofod, y col. 1999. Enzyme with xylanase activity. Novo Nordisk, USA patent 5885819
33. Lehmbeck, 1999. Host cells expressing reduced levels of a metalloprotease and methods using the host cell in protein production. Novo Nordisk, USA patent 5861280
34. Loera, O. y Viniegra-González. 1998. Identification of growth phenotypes in *Aspergillus niger* pectinase over-producing mutants using image analysis procedures. *Biotechnology Techniques.* **12**: 801-804

35. Lowe, D.A. 1993. Enzymes fungal. Enzyme Engineering (R.M. Lafferty, ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 681-705
36. MacKenzie, D.A., Jeenes, D.J., Belshaw, N.J. y Archer, D.B. 1993. Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. *Journal of Gen. Microbiol.* **139**:2295-2307
37. Manzanares, P.; de Graff, L.H. y Visser, J. 1998. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ - galactosidase activity. *Enz. Microb. Technol.* **22**:383-390
38. Mark, C.G. y Romano, A.H. 1971. Properties of the hexoses transport systems of *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **249**:216-226
39. Meng-Chen Ho, Whitehead, M.P., Cleveland, T.E. y Dean, R.A. 1995. Sequence analysis of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase *pel A* gene and evidence for binding of promoter regions to CREA, a regulator of carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* **27**: 142-149
40. Mildenhall, J.P., Prior, B.A. y Trollope, L.A. 1981. Water relations of *Erwinia chrysanthemi*: Growth and extracellular pectic acid lyase production. *Journ. Gen. Microbiol.* **127**:27-34
41. Miller, L.G. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, **31**: 426-428
42. Minjares, C.A., Trejo, A.B.A., Aguilar, G. y Viniestra, G.G. 1997. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **20**:

43. Mischak, H., Kubicek, C.P. y Rohr, M. 1984. Citrate inhibition of glucose uptake in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, **6**:425-430
44. Mwesygye, P.K. y Barford, J.P. 1996. Mechanism of sucrose utilization by *saccharomyces cerevisiae*. **42**:297-306
45. Neumann, N. P. Y Lampen, J.O. 1967. Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry*, **6**: 468-475
46. Peberdy, J.F. 1994. Protein secretion in filamentous fungi trying to understand a highly productive black box. *Trends in Biochemistry*. **12**: 50-57.
47. Oriol, E., Raimbault, M., Roussous, S. y Viniestra, G.G. 1988b. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**:498-503
48. Oriol, E., Schettino, B., Viniestra, G.G. y Raimbault, M. 1988. Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *J. Ferment. Technol.* **66**:57-62
49. Pandey, A. 1992. Recent process developments in solid- state fermentation. *Process Biochemistry*. **27**:109-117
50. Peberdy, J.F. 1994. Protein secretion in filamentous fungi trying to understand a highly productive black box. *Trends in biochemistry*. **12**: 50-57
51. Pontecorvo, G., Roper, J.A., Forbes, E. (1953) Genetic Recombination without Sexual Reproduction in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* **8**:198- 210.
52. Punt, P.J., Kramer, C., Kuyvenhoven, A., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C A.M.J.J.1992. An upstream activating sequence from the *Aspergillus nidulans gpd A* gene. *Gene*, **120**: 67-73

53. Rohr, M., Kubicek, C.P. Zehentgruber, O.y Orthofer, R. 1987. Accumulation and partial re-consumption of polyols during citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **27**:235-239
54. Romano, A.H. y Kornberg, H.L.1986. Regulation of sugar utilization by *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **158**:491-493
55. Romero-Gómez, S.J. 1996. Caracterización genética demutantes de *Aspergillus niger* resistentes a 2-desoxiglucosa y sobreproductoras de pectinasas. Tesis, México, UAM-I, 69pp.
56. Romero- Gómez, S.J., Augur,C.; Gunasekaran, P.; Viniegra, G.G. Invertase production by *Aspergillus niger* C28B25 in solid and submerged fermentation. (Sin publicar)
57. Ronne, H. 1995. Glucose repression in fungi. *TIG*, **11**:12-17
58. Rose, M., Albig, W. y Entian, D-K. 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI y PII. *Eur. J. Biochem.* **199**: 511-518
59. Sayer, J.A. y Gadd, G.M.1997. Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal coumpounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. *Mycological Research* **101**:653-661
60. Schneider, R.P. y Wiley, W.R. 1971. Regulation of sugar transport in *neurospora crassa*. *J.Bacteriol.* **106**:487-492
61. Solís- Pereira, S., Favela, T. E., Viniegra, G.G. y Gutiérrez, R.M. 1992. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl.Microbiol. Biotechnol.* **39**: 36-41

62. Stephanopoulos, G. y Vallino, J.J. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Nature*, 1675-1678.
63. Traon, M.M.P. y Pellerin, P. 1998. Purification and characterization of two  $\beta$ -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. *Enzyme and Microbial Technol.* **22**:374-382
64. Trumbly, R.J. 1992. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**:15-21
65. Van Brunt, J. 1986. Fungi: the perfect hosts?. *Biotechnology.* **4**:1057-1062
66. van Gemeren, I.A., Beijersbergen, A., Musters, W., Gouka, R.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. y Verrips, C.T. 1996. The effect of pre and pro-sequences and multicopy integration on heterologous expression of the *Fusarium solani pisi* cutinase gene in *Aspergillus awamori*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**:755-763
67. Vainstein, M.H. y Peberdy, J.F. 1990. Solubilization of a cell wall invertase in *Aspergillus nidulans*. *FEMS, Microbiology letters.* **71**: 265-270
68. Voet, D. Y Judith G.V. 1995. *Biochemistry.* 2<sup>a</sup>.ed., Ed. Wiley, U.S.A. 1361 pp.
69. Wallis, G.L.F., Hemming, F.W. y Peberdy, J.F. 1997. Secretion of two  $\beta$ -fructuronidases by *Aspergillus niger* growing in sucrose. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **345**(2): 214-222
70. Walsh, M.C., Scholte, M., Valkier, J., Smits, V.H. y van Dam Karel. 1996. Glucose sensing and signalling properties in *Saccharomyces cerevisiae* require the presence of

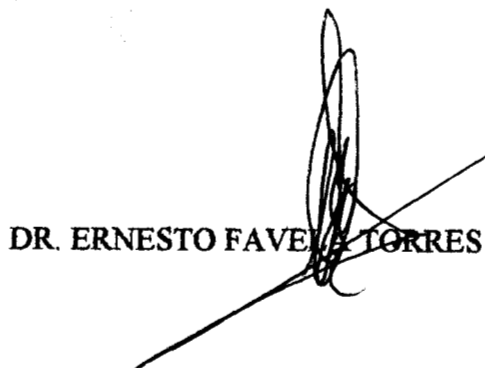
at least two members of the glucose transporter family. *Journal of Bacteriology*. **178**:  
2593-2597

71. Wang, D.I.C., Cooney, Ch.L., Demain, A.L., dunnill, P., Humphrey, A.E. y Lilly, M.D. 1978. *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley & sons, U.S.A., 46-55.
72. Zimmermann, F.K. y Scheel, I. 1977. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. *Molec. Gen. Genet.* **154**:75-82

LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADOS POR LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA, APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DÍA 22 DE JULIO DE 1999.



DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ



DR. ERNESTO FAVELA TORRES



DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

---