



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**"IDENTIFICACIÓN DE FENOTIPOS DE DESREPRESIÓN
CATABÓLICA EN CEPAS DE *Aspergillus niger*
SOBREPRODUCTORAS DE EXOPECTINASAS"**

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Ing. Helue Miriam García Ignacio

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Octavio Loera Corral

ASESORES:

Dr. Gustavo Viniegra González

Dr. Jorge Soriano Santos

México, D. F., febrero 2003.

“La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

México, D.F., febrero del 2003.

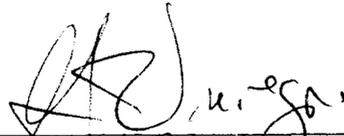
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Iztapalapa) aprobó la tesis: "Identificación de fenotipos de desrepresión catabólica en cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de exopectinasas", que presentó la alumna de la maestría en Biotecnología Helue Miriam García Ignacio.

Director de tesis:



Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana

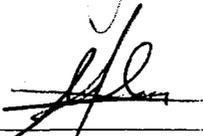
Jurado:



Dr. Gustavo Viniégra González (Asesor)
Universidad Autónoma Metropolitana



Dr. Jorge Soriano Santos (Asesor)
Universidad Autónoma Metropolitana



Dr. Gerardo Díaz Godínez (Sinodal)
Universidad Autónoma de Tlaxcala



M. en I. O. Isabel Membrillo Venegas (Sinodal)
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

Agradezco a Dios:

Por haberme otorgado el don invaluable de la vida y porque en cada momento de ella he conocido su grandeza y su gran amor hacia mí.

A Iván:

Por su amor incondicional, porque desde que estoy junto a él he aprendido mucho y soy cada vez mejor persona; por estar conmigo en todo momento, por ser mi mejor amigo, y por apoyar mis decisiones.

A Ivancito:

Por ser la razón de mi existencia y la personita que más quiero.

A mis padres:

Por apoyarme, ayudarme y sentirse orgullosos de mí, porque tuve la suerte de tenerlos y aprender mucho de ellos, pero sobre todo les agradezco el haberme dado las herramientas para salir adelante. Los quiero mucho.

A mis familiares y amigos:

Por el privilegio de compartir la vida con ellos, por todos los momentos lindos e inolvidables que hemos vivido juntos y por compartir conmigo este gran momento. Agradezco especialmente a mi Mamá Cata por su inmenso cariño, a quien aunque ya no pueda ver siempre estará conmigo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana:

Por ser una Institución de reconocido prestigio tanto nacional como internacional.

A CONACyT:

Por el apoyo y financiamiento para la realización de este trabajo de investigación y de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Octavio Loera Corral:

Por la acertada asesoría y dirección de esta tesis, así como su experiencia, dedicación e interés en este proyecto. Por compartirme todos sus conocimientos Por su valiosa aportación a mi formación como investigador. Por su apoyo y gran calidad humana. Muchas gracias.

Al Dr. Gustavo Viniegra González:

Por su invaluable aportación a mi formación como investigador. Por la inmensa cantidad de conocimientos con los que cuenta y nos transmite de manera clara, interesante y amena. Por transmitirnos su visión de investigación-aplicación de la Biotecnología. Por su permanente actualización. Por el gran apoyo y recursos que nos brinda a los alumnos que trabajamos en su laboratorio de Biología Molecular. Pero sobre todo por la gran calidad humana que lo caracteriza. Muchas gracias.

Al Dr. Jorge Soriano Santos:

Por todas las atenciones prestadas para la realización de esta tesis. Por sus valiosas aportaciones y asesoría para la culminación de este proyecto. Muchas gracias.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez y a la M. en I. Q. Isabel Membrillo Venegas:

Por sus acertados comentarios y por todas las atenciones prestadas en la revisión de la presente tesis. Muchas gracias.

Al Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec:

Por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de posgrado, en especial a la M. en C. Judith Cervantes Ruiz y al M. en C. Uriel Cervera Castro. Muchas gracias.

Y a todos los profesores de la Maestría en Biotecnología que contribuyeron a mi formación.

Muchas gracias.

Helue Miriam.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | i |
| I. MARCO TEÓRICO | 1 |
| I.1. HONGOS FILAMENTOSOS..... | 1 |
| I.1.1. <i>Aspergillus niger</i> | 1 |
| I.2. CICLO PARASEXUAL | 3 |
| I.3. INDUCCIÓN Y REPRESIÓN CATABÓLICA | 6 |
| I.4. PECTINASAS..... | 10 |
| I.4.1. Clasificación de las Pectinasas | 11 |
| I.4.1.1. Pectinesterasas | 11 |
| I.4.1.2. Poligalacturonasas | 12 |
| I.4.1.3. Pectin y Pectato Liasas | 13 |
| I.4.2. Producción e importancia industrial de las Pectinasas | 14 |
| I.4.2.1. Clarificación de zumos | 15 |
| I.4.2.2. Maceración de frutas | 16 |
| I.4.2.3. Extracción del zumo | 16 |
| I.4.2.4. Licuefacción de zumos | 17 |
| I.4.3. Ventajas de la utilización de las Pectinasas..... | 17 |
| II. ANTECEDENTES | 20 |
| II.1. MUTACIONES | 20 |
| II.2. OBTENCIÓN DE CEPAS SOBREPDUCTORAS DE PECTINASAS..... | 21 |
| II.3. REPRESIÓN CATABÓLICA EN MEDIO LÍQUIDO..... | 24 |
| II.4. RELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA A LA 2-DESOXIGLUCOSA Y CEPAS DESREPRIMIDAS | 25 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| IV. HIPÓTESIS | 28 |
| V. OBJETIVOS | 29 |
| V.1. Objetivo General..... | 29 |
| V.2. Objetivos particulares | 29 |

| | |
|---|-----------|
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| VI.1. MICROORGANISMOS | 32 |
| VI.1.1. Aislamiento de la cepa Aw99iii arg ⁻ | 32 |
| VI.2. CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER..... | 32 |
| VI.3. MEDIO DE CULTIVO | 33 |
| VI.4. FERMENTACIÓN EN ESTADO LÍQUIDO (FEL) | 34 |
| VI.5. CINÉTICA DE pH | 35 |
| VI.6. CINÉTICA DE BIOMASA..... | 35 |
| VI.6.1. Cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento μ , $X_{m\acute{a}x}$ y $Y_{X/S}$ para todas las cepas analizadas..... | 35 |
| VI.7. ENSAYO ENZIMÁTICO (ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA)..... | 37 |
| VI.7.1. Preparación del extracto crudo enzimático..... | 37 |
| VI.7.2. Medición de la actividad volumétrica | 37 |
| VI.8. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO $Y_{E/X}$ | 38 |
| VI.9. ESTIMACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE Y CÁLCULO DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA..... | 38 |
| VI.10. CURVA DE SOBREVIVENCIA | 40 |
| VI.11. MUTAGÉNESIS..... | 42 |
| VI.11.1. Proceso de enriquecimiento..... | 42 |
| VI.11.2. Prueba de auxotrofia..... | 43 |
| VI.12. AISLAMIENTO DEL DIPLOIDE DAR3 | 45 |
| VI.12.1. Cruza parasexual..... | 45 |
| VI.12.2. Prueba de diploidía..... | 46 |
| VI.13. ANÁLISIS DE RESISTENCIA A LA 2-DESOXIGLUCOSA..... | 47 |
| VII. RESULTADOS..... | 48 |
| VII.1. AISLAMIENTO DEL AUXÓTROFO Aw99iii arg ⁻ Y CRUZA PARASEXUAL PARA LA FORMACIÓN DEL DIPLOIDE DAR3 | 48 |
| VII.1.1. Aislamiento de la cepa Aw99iii arg ⁻ | 49 |
| VII.1.2. Obtención del diploide DAR3..... | 50 |
| VII.2. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS FERMENTACIONES (pH, $X_{m\acute{a}x}$, μ y $Y_{X/S}$)..... | 50 |
| VII.2.1. Cinética de pH..... | 50 |
| VII.2.2. Cinética de Biomasa y comparación de los parámetros cinéticos: $X_{m\acute{a}x}$, $Y_{X/S}$ y μ , para todas las cepas analizadas | 53 |

| | |
|---|------------|
| VII.3. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DEL MICELIO DE LAS CEPAS C28B25 Y D4..... | 58 |
| VII.3.1. Observación al microscopio electrónico del micelio de la cepa haploide C28B25. | 59 |
| VII.3.1.1. FEL de la cepa C28B25 con Pectina 1%..... | 59 |
| VII.3.1.2. FEL de la cepa C28B25 con Pectina 1% + Glucosa 0.5%..... | 60 |
| VII.3.1. Observación al microscopio electrónico del micelio de la cepa haploide C28B25. | 61 |
| VII.3.1.1. FEL de la cepa D4 con Pectina 1%..... | 61 |
| VII.3.1.2. FEL de la cepa D4 con Pectina 1% + Glucosa 0.5% | 62 |
| VII.4. RESISTENCIA A 2DG PARA TODAS LAS CEPAS ANALIZADAS..... | 63 |
| VII.5. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS ENTRE LOS DIPLOIDES Y LAS CEPAS HAPLOIDES PROGENITORAS..... | 67 |
| VII.5.1. Comparación de los diploides D4, DAR2 y DAR3 con las cepas haploides progenitoras y la cepa silvestre C28B25..... | 67 |
| IV.5.2. Rendimiento $Y_{E/X}$ y Grado de represión..... | 76 |
| VIII. DISCUSIÓN | 88 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 92 |
| X. APÉNDICE | 94 |
| X.1. CURVA PATRÓN DE DNS..... | 94 |
| X.2. CURVA PATRÓN DE BIURET..... | 96 |
| X.3. PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS | 98 |
| XI. BIBLIOGRAFÍA..... | 100 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla I.1.- Efecto y aplicación de las pectinasas en los procesos de clarificación, maceración, extracción y licuefacción de los jugos de frutas | 15 |
| Tabla VI.1.- Composición del medio de cultivo empleado en la FEL (Antier et al., 1993)..... | 33 |
| Tabla VII.1.- Símbolos utilizados para distinguir a las cepas analizadas en la presente tesis. Los símbolos vacíos corresponden a un medio sin glucosa, y los símbolos rellenos a un medio con glucosa. | 48 |
| Tabla VII.2.- Valores de $Y_{X/S}$ (gX/gC) para todas las cepas analizadas en los dos diferentes medios..... | 57 |
| Tabla VII.3.- Valores de μ (h^{-1}) para todas las cepas analizadas en los dos diferentes medios..... | 57 |
| Tabla VII.4.- Comparación de los valores observados de μ para los diploides con respecto a los promedios de μ para las cepas progenitoras en los dos diferentes medios. | 58 |
| Tabla VII.5.- Relación entre la resistencia o sensibilidad a 2DG (valores máximos tolerados) para todas las cepas analizadas y los patrones de recesividad, dominancia o complementación para los diploides. ... | 66 |
| Tabla VII.6.- Valores de productividad para los tres diploides, en los dos diferentes medios..... | 76 |
| Tabla VII.7.- Cálculo del rendimiento $Y_{E/X}$ (UI de enzima/g de Biomasa) y porcentaje de cambios para todas las cepas analizadas en los dos diferentes medios (ver Figura VI.1). | 77 |
| Tabla VII.8.- Patrones de represión catabólica para todas las cepas analizadas..... | 78 |
| Tabla VII.9.- Comparación de los valores observados de $Y_{E/X}$ para los diploides con respecto a los promedios de $Y_{E/X}$ para las cepas progenitoras en los dos diferentes medios..... | 79 |
| Tabla VIII.1.- Relación entre los patrones de resistencia a 2DG (valores máximos tolerados) y represión catabólica (porcentaje de cambios) para todas las cepas analizadas..... | 90 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura I.1.- Ciclo de vida de <i>Aspergillus niger</i> | 3 |
| Figura I.2.- Ciclo parasexual..... | 4 |
| Figura I.3.- Estructura química de la pectina | 10 |
| Figura I.4.- Acción de las pectinesterasas..... | 12 |
| Figura I.5.- Acción de las poligalacturonasas..... | 13 |
| Figura I.6.- Acción de las pectato liasas..... | 14 |
| Figura II.1. Selección de cepas mutantes sobreproductoras de pectinasas (dgrAw99 y dgrAw96) a partir de la cepa silvestre C28B25. Del lado derecho se muestra la producción de pectinasas tanto en FES (pulpa de café, $a_w=0.96$), como en FEL ($a_w=0.99$) (Loera, 1994)..... | 23 |
| Figura III.1.- Esquema que muestra los mecanismos de complementación genética, así como la dominancia del fenotipo de una cepa progenitora. | 27 |
| Figura VI.1 Diagrama que muestra la metodología general para lograr los objetivos de esta tesis..... | 31 |
| Figura VI.2.- Diagrama de flujo que muestra el proceso para obtener la curva de sobrevivencia para la cepa Aw99iii. | 41 |
| Figura VI.3.- Diagrama de flujo que muestra el proceso de obtención de la cepa auxótrofa Aw99iii arg ... | 44 |
| Figura VII.1.- Curva de sobrevivencia para la cepa Aw99iii de <i>Aspergillus niger</i> . —◇— $\lambda = 254$ nm, Intensidad: $310 \mu W/cm^2$, distancia: 15 cm. | 49 |
| Figura VII.2.- Cinética de pH para la cepa C28B25 en los dos medios de fermentación..... | 51 |
| Figura VII.3.- Cinética de pH para la cepa Aw96-4 en los dos medios de fermentación..... | 51 |
| Figura VII.4.- Cinética de pH para la cepa Aw99iii en los dos medios de fermentación..... | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura VII.5.- Cinética de pH para la cepa D4 en los dos medios de fermentación..... | 52 |
| Figura VII.6.- Cinética de Biomasa para la cepa C28B25 en los dos medios de fermentación..... | 54 |
| Figura VII.7.- Cinética de Biomasa para la cepa Aw96-4 en los dos medios de fermentación..... | 54 |
| Figura VII.8.- Cinética de Biomasa para la cepa Aw99iii en los dos medios de fermentación..... | 55 |
| Figura VII.9.- Cinética de Biomasa para la cepa D4 en los dos medios de fermentación..... | 56 |
| Figura VII.10. Observación de las pelotitas de micelio de la cepa C28B25 a 22X. El tamaño promedio es D=2.2mm. | 59 |
| Figura VII.11. Observación al ME de las hifas de la cepa C28B25 a 750X. El largo de la hifa se encuentra alrededor de 60 μm | 59 |
| Figura VII.12. Observación del diámetro del conidióforo de la cepa C28B25 al ME a 750X ($D_{\text{promedio}} = 11.2 \mu\text{m}$). | 59 |
| Figura VII.13. Observación de la hifa de la cepa C28B25 al ME. El diámetro de la hifa es de 2.7 μm). | 59 |
| Figura VII.14. Observación de las pelotitas de micelio de la cepa C28B25 al ME a 22X. El tamaño promedio del diámetro es 2.7 mm. | 60 |
| Figura VII.15. Observación al ME de la cepa C28B25 a 750X. Largo $_{\text{hifa}} = 75.4 \mu\text{m}$ y diámetro $_{\text{conidióforo}} = 14.4 \mu\text{m}$ | 60 |
| Figura VII.16. Observación al ME a 2000X de la cepa C28B25. Diámetro $_{\text{hifa}} = 2.9 \mu\text{m}$ | 60 |
| Figura VII.17. Observación de las pelotitas de micelio de la cepa D4 a 20X. El tamaño promedio es D = 2.8mm. | 61 |
| Figura VII.18. Estructura del micelio de la cepa D4 en la superficie. Observación al ME a 120X. | 61 |
| Figura VII.19. Observación al ME de la cepa D4 a 750X. Largo de la hifa=75.4 μm y diámetro $_{\text{conidióforo}} = 16.4 \mu\text{m}$ | 61 |
| Figura VII.20. Observación al ME del diámetro de la hifa (2.6 μm) de la cepa D4 a 2000X. | 61 |
| Figura VII.21. Observación al ME de las pelotitas de micelio de la cepa D4 a 22X. Diámetro $_{\text{promedio}} = 2.19 \text{ mm}$ | 62 |
| Figura VII.22. Observación al ME de la cepa D4 a 750X. Largo total de la hifa=80.4 μm | 62 |
| Figura VII.23. Observación de la hifa de la cepa D4 al ME (4000X). El diámetro de la hifa se encuentra alrededor de 1.6 μm | 62 |
| Figura VII.24.- Prueba de sensibilidad a 2DG para la cepa haploide Aw99iii y su auxótrofo Aw99iii arg ⁻ | 63 |
| Figura VII.25.- Prueba de sensibilidad a 2DG para el diploide D4 y las cepas que le dieron origen (Aw96-4 y Aw99iii), así como la cepa silvestre C28B25. | 64 |
| Figura VII.26.- Prueba de sensibilidad a 2DG para el diploide DAR2 y las cepas que le dieron origen (Aw96-4 y Aw96-3), así como la cepa silvestre C28B25. | 64 |
| Figura VII.27.- Prueba de sensibilidad a 2DG para el diploide DAR3 y las cepas que le dieron origen (Aw96-3 y Aw99iii), así como la cepa silvestre C28B25. | 65 |
| Figura VII.28.- Cinética de pectinasas sin glucosa para los haploides Aw96-4, Aw99iii y el diploide al que dieron origen D4. | 68 |
| Figura VII.29.- Cinética de pectinasas con glucosa para los haploides Aw96-4, Aw99iii y el diploide al que dieron origen D4. | 68 |
| Figura VII.30.- Cinética de pectinasas sin glucosa para los haploides Aw96-4, Aw96-3 y el diploide al que dieron origen DAR2. | 69 |
| Figura VII.31.- Cinética de pectinasas con glucosa para los haploides Aw96-4, Aw96-3 y el diploide al que dieron origen DAR2. | 70 |
| Figura VII.32.- Cinética de pectinasas sin glucosa para los haploides Aw96-3, Aw99iii y el diploide al que dieron origen DAR3. | 71 |
| Figura VII.33.- Cinética de pectinasas con glucosa para los haploides Aw96-3, Aw99iii y el diploide al que dieron origen DAR3. | 72 |
| Figura VII.34.- Producción de pectinasas a las 72 h para las cepas C28B25, Aw96-4, Aw99iii y D4 sin glucosa, y a las 84 h con glucosa. | 73 |
| Figura VII.35.- Producción de pectinasas a las 24 h Para las cepas C28B25, Aw96-4, Aw96-3 y DAR2, en presencia y ausencia de glucosa. | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura VII.36.- Producción de pectinasas a las 24 h Para las cepas C28B25, Aw96-3, Aw99iii y DAR3, en presencia y ausencia de glucosa..... | 75 |
| Figura VII.37.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa C28B25 sin glucosa..... | 80 |
| Figura VII.38.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa C28B25 con glucosa..... | 80 |
| Figura VII.39.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw96-3 sin glucosa..... | 80 |
| Figura VII.40.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw96-3 con glucosa..... | 80 |
| Figura VII.41.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw96-4 sin glucosa..... | 81 |
| Figura VII.42.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw96-4 con glucosa..... | 81 |
| Figura VII.43.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw99iii sin glucosa..... | 81 |
| Figura VII.44.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw99iii con glucosa..... | 81 |
| Figura VII.45.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa D4 sin glucosa..... | 82 |
| Figura VII.46.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa D4 con glucosa..... | 82 |
| Figura VII.47.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa DAR2 sin glucosa..... | 82 |
| Figura VII.48.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa DAR2 con glucosa..... | 82 |
| Figura VII.49.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa DAR3 sin glucosa..... | 83 |
| Figura VII.50.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa DAR3 con glucosa..... | 83 |
| Figura VII.51.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para las cepas haploides: C28B25, Aw99iii, Aw96-4 y Aw96-3 en ausencia de glucosa..... | 83 |
| Figura VII.52.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para las cepas haploides: C28B25, Aw99iii, Aw96-4 y Aw96-3 en presencia de glucosa..... | 84 |
| Figura VII.53.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para las cepas diploides: D4, DAR2 y DAR3 en ausencia de glucosa..... | 84 |
| Figura VII.54.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para las cepas diploides: D4, DAR2 y DAR3 en presencia de glucosa..... | 85 |
| Figura VII.55.- Gráfica del Rendimiento $Y_{E/X}$ vs μ para todas las cepas en ausencia de glucosa..... | 86 |
| Figura VII.56.- Gráfica del Rendimiento $Y_{E/X}$ vs μ para todas las cepas en presencia de glucosa..... | 87 |
| Figura X.1.- Curva patrón de DNS..... | 95 |
| Figura X.2.- Curva patrón de Biuret..... | 97 |

RESUMEN

La utilización de enzimas en la industria de alimentos ha crecido considerablemente, debido a que presenta una serie de ventajas, además de las de índole económica o tecnológica. La gran especificidad de acción que tienen las enzimas hace que no se produzcan reacciones laterales imprevistas.

En la actualidad existe un gran número de microorganismos industriales, que producen enzimas. Un grupo de enzimas de gran importancia para la industria alimenticia son las pectinasas, empleadas para disminuir la viscosidad de los jugos de frutas y facilitar así su extracción, maceración, licuefacción y clarificación. Entre los microorganismos industriales productores de pectinasas se encuentra *Aspergillus niger*. Es conveniente el mejoramiento de cepas de este hongo, con el fin de aumentar la productividad de la enzima.

En un trabajo previo se aislaron mutantes a partir de la cepa silvestre de *A. niger*. C28B25, lo que permitió un incremento de hasta 300% en la producción de pectinasas, en las mejores mutantes con respecto a la cepa silvestre. Estas cepas mutantes se aislaron como resistentes al análogo tóxico 2-desoxiglucosa (2DG).

Posteriormente, a través de la recombinación parasexual de estas dos cepas mutantes de *A. niger* (Aw96-4 y Aw99iii), sobreproductoras de pectinasas, Loera *et al.*, (1994) crearon un diploide (D4), que sobreproduce pectinasas con respecto a la cepa silvestre, y a las cepas progenitoras (20% más que la cepa Aw99iii).

De este modo, recientemente fue obtenido otro diploide (DAR2), a partir de la cruce parasexual de las cepas mutantes mejoradas Aw96-3 y Aw96-4 por Montiel (2000). Este diploide presentó un nivel de sobreproducción de invertasa de hasta dos órdenes de magnitud mayor que las cepas progenitoras.

Anteriormente se ha demostrado que la glucosa reprime la síntesis de pectinasas en medio líquido. Sin embargo, aún quedan abiertas muchas cuestiones sobre los fenotipos mejorados, y en particular, sobre la fisiología de inducción y represión de las cepas mejoradas, lo cual corresponde a la razón de ser de esta tesis.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo es obtener un nuevo diploide (DAR3) mediante la cruce parasexual de las cepas Aw99iii y Aw96-3 (mutantes mejoradas) y evaluar la sobreproducción de pectinasas en los diploides D4, DAR2 y DAR3, en las cepas progenitoras de cada diploide y en la cepa silvestre (C28B25), con el fin de determinar si existe algún patrón de desrepresión dominante o recesivo.

Otro de los objetivos de esta tesis fue realizar un análisis cuantitativo del rendimiento $Y_{E/X}$ para cada cepa, utilizando pectina como fuente de carbono, en presencia y ausencia de glucosa como azúcar represor y determinar si existe relación entre la resistencia a la 2-desoxiglucosa y la desrepresión catabólica.

En ausencia de glucosa, el diploide D4 sobreprodujo pectinasas, en un 14% y 74% con respecto a la cepa Aw99iii y Aw96-4, respectivamente. En presencia de glucosa, la producción de pectinasas por el diploide D4 fue mucho mayor que las cepas progenitoras (93% mayor que la cepa Aw96-4 y 134% mayor que la cepa Aw99iii).

En un medio sin glucosa, la cepa Aw96-4 sobreprodujo pectinasas hasta 85.7% más que la cepa Aw96-3 y 105.3% más que el diploide DAR2. Sin embargo, en presencia de glucosa, el diploide DAR2 sobreprodujo pectinasas con respecto a las cepas progenitoras (31.4% con respecto a la cepa Aw96-4 y de 500% sobre la cepa Aw96-3).

En ausencia de glucosa, el diploide DAR 3 mostró un incremento de 328% en la producción de pectinasas con respecto a la cepa Aw96-3 y del 33% con respecto a la cepa Aw99iii. En presencia de glucosa, la cepa Aw99iii sobreprodujo pectinasas con un incremento del 94 % sobre la cepa DAR3 y del 391% sobre la cepa Aw96-3.

La cepa Aw99iii está desreprimida catabólicamente, al igual que el diploide D4, por lo cual esta cepa mostró un patrón dominante en el Diploide D4, esto coincide con lo reportado por Loera *et al.*, (1999).

Las cepas Aw96-4 y Aw96-3 son sensibles a la represión catabólica, sin embargo, el diploide al que dieron origen (DAR2) se encontró desreprimido, puesto que en un medio con glucosa se observó que la cepa DAR2 sobreprodujo pectinasas, en comparación con las cepas que le dieron origen (Aw96-4 y Aw96-3).

La cepa Aw96-3 mostró un patrón dominante en el diploide DAR3, en cuanto a la represión catabólica, es decir, ambos se encuentran reprimidos.

En cuanto a los patrones de resistencia a 2DG, el diploide D4 resultó sensible a 2DG, al igual que la cepa silvestre, lo cual indica que hubo una complementación de la información entre las cepas progenitoras (Aw96-4 y Aw99iii), ambas resistentes a 2DG.

La cepa Aw96-3 mostró ser sensible a 2DG, por el contrario, la cepa Aw96-4 fue resistente y el diploide DAR2 resultó poco tolerante a 2DG, lo cual indica la codominancia de ambas cepas en el diploide. La cepa Aw96-3 muestra un patrón dominante de resistencia a 2DG en el diploide DAR3, ya que ambas cepas son sensibles a 2DG, a diferencia de la cepa Aw99iii que es resistente a 2DG. Otro resultado interesante de este trabajo es que la resistencia a 2DG no es un fenotipo necesario para la sobreproducción de pectinasas.

I. MARCO TEÓRICO

I.1. HONGOS FILAMENTOSOS

Los hongos filamentosos son eucariontes, ya que presentan asociación del DNA con proteína y varios cromosomas lineales dentro de una membrana nuclear y división nuclear por mitosis o meiosis. Estos hongos tienen una rápida velocidad de crecimiento, morfología característica de las colonias en medio sólido y se propagan asexualmente por medio de esporas (Ward, 1991; Taragano *et al.*, 1997; Madigan *et al.*, 1998).

Los hongos filamentosos del género *Aspergillus* son capaces de utilizar un amplio rango de materiales como sustrato, por lo cual un medio simple puede servir para su crecimiento, y un gran número de diferentes fuentes de nitrógeno y carbono pueden ser sustituidas para ser utilizadas por estos hongos. Como consecuencia, pueden existir muchas vías metabólicas bioquímicas para la asimilación de los diferentes catabolitos (Ward, 1991).

La producción de enzimas requeridas para estas vías está bajo regulación genética, asegurando que sólo son sintetizadas las enzimas requeridas para el crecimiento bajo las condiciones que prevalecen en el medio (Ward, 1991; Madigan *et al.*, 1998).

I.1.1. Aspergillus niger

Aspergillus niger es un hongo filamentosos, aerobio estricto, deuteromiceto (por lo cual tiene reproducción asexual), y protótrofo. Tiene una amplia versatilidad metabólica, ya que puede utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono. Debido a esto, es utilizado en la industria para la producción de ácidos como: el gálico, el cítrico y el glucónico, y enzimas como: amilasas, glucoamilasas, celulasas, hemicelulasas, **pectinasas**, glucosa oxidasa y catalasa. (Debets, 1990; Suzuki *et al.*, 1996).

Aspergillus niger crece como una red de filamentos ramificados o hifas, los cuales en conjunto forman el micelio. Una hifa consiste de una pared celular compuesta por microfilamentos de polisacárido cubriendo la membrana exterior de célula. Internamente muchos núcleos residen en un citoplasma común y, aunque las hifas son septadas para dividir el citoplasma en compartimentos, estos contienen poros suficientes para permitir el paso de organelos, por lo cual esto le da continuidad al citoplasma a lo largo de la hifa (Ward, 1991; Madigan *et al.*, 1998).

La reproducción asexual de *A. niger* es por medio de conidiosporas. Las cuales nacen sobre hifas aéreas (conidióforas). Las esporas están arregladas en largas cadenas paralelas y tienen un color negro en la cepa silvestre. Todas las esporas en una cadena son derivadas de la división de un simple núcleo en células especializadas que producen las conidias en la base de la cadena llamadas fiálides (Debets, 1990; Ward, 1991) (Figura I.1).

La característica producción de pigmento en *Aspergillus niger* está profundamente influenciada por la presencia o ausencia de cantidades pequeñas de cobre en el sustrato, y esta característica ha sido empleada para estimar las concentraciones de cobre en el suelo (Debets, 1990).

El ciclo de crecimiento de *A. niger* consiste en la secuencia: hifa → conidióforos → conidiosporas → hifa. El núcleo vegetativo es haploide y cada espora contiene un núcleo haploide. Las fiálides cubren la superficie de la vesícula, que es el final crecido del conidióforo. En algunas especies, las fiálides se sostienen directamente de la vesícula (uniseriada), mientras que en las especies biseriadas las fiálides se sostienen sobre células intermedias las cuales están adjuntas a la vesícula. *A. niger* muestra una mezcla de ambas (uniseriadas y biseriadas). En cultivos sumergidos con agitación y temperatura elevada, *A. niger* puede mostrar microciclos de esporulación. Es decir la formación de esporas seguida de su germinación y nueva esporulación (Debets, 1990; Madigan *et al.*, 1998).

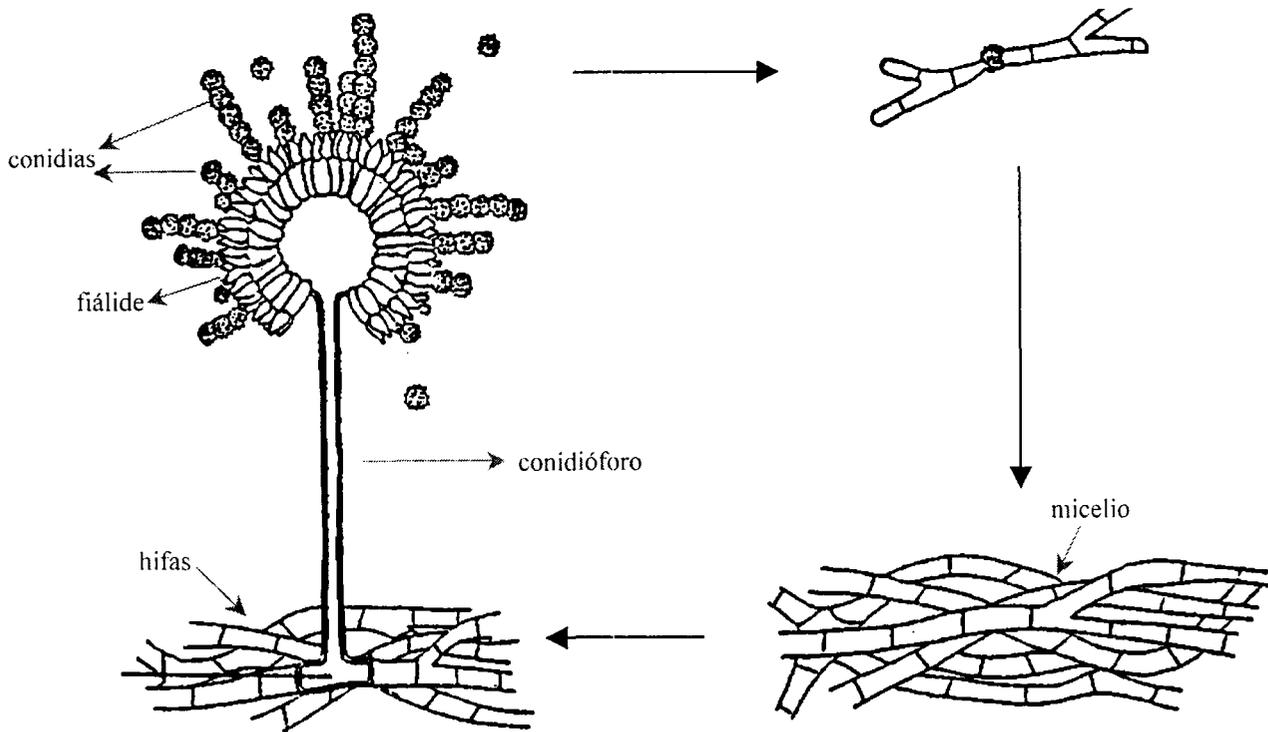


Figura I.1.- Ciclo de vida de *Aspergillus niger*

I.2. CICLO PARASEXUAL

Los microorganismos industriales son especialistas metabólicos capaces de producir específicamente determinados metabolitos y con gran rendimiento. Con el fin de lograr esta elevada especialización, las cepas industriales están modificadas genéticamente, por mutación o por recombinación parasexual. La recombinación sin involucrar el ciclo sexual de los hongos fue descubierta por Pontecorvo *et al.*, en 1953 en *Aspergillus nidulans*, y fue llamada recombinación parasexual. La recombinación parasexual ha sido observada en muchos hongos de importancia industrial, como *A. niger*, *A. soyae*, *A. oryzae* y *Penicillium chrysogenum* (Debets, 1990).

Durante el ciclo parasexual, las hifas de dos cepas de *A. niger* que crecen juntas, se fusionan en un proceso conocido como plasmogamia para formar micelio que contiene los núcleos de ambas cepas progenitoras (micelio heterocarión). El ciclo parasexual es un proceso por el cual dos cepas de *A. niger* pueden ser cruzadas experimentalmente, para dar progenie recombinada sin requerir un ciclo sexual de división nuclear meiótica (ver Figura I.2).

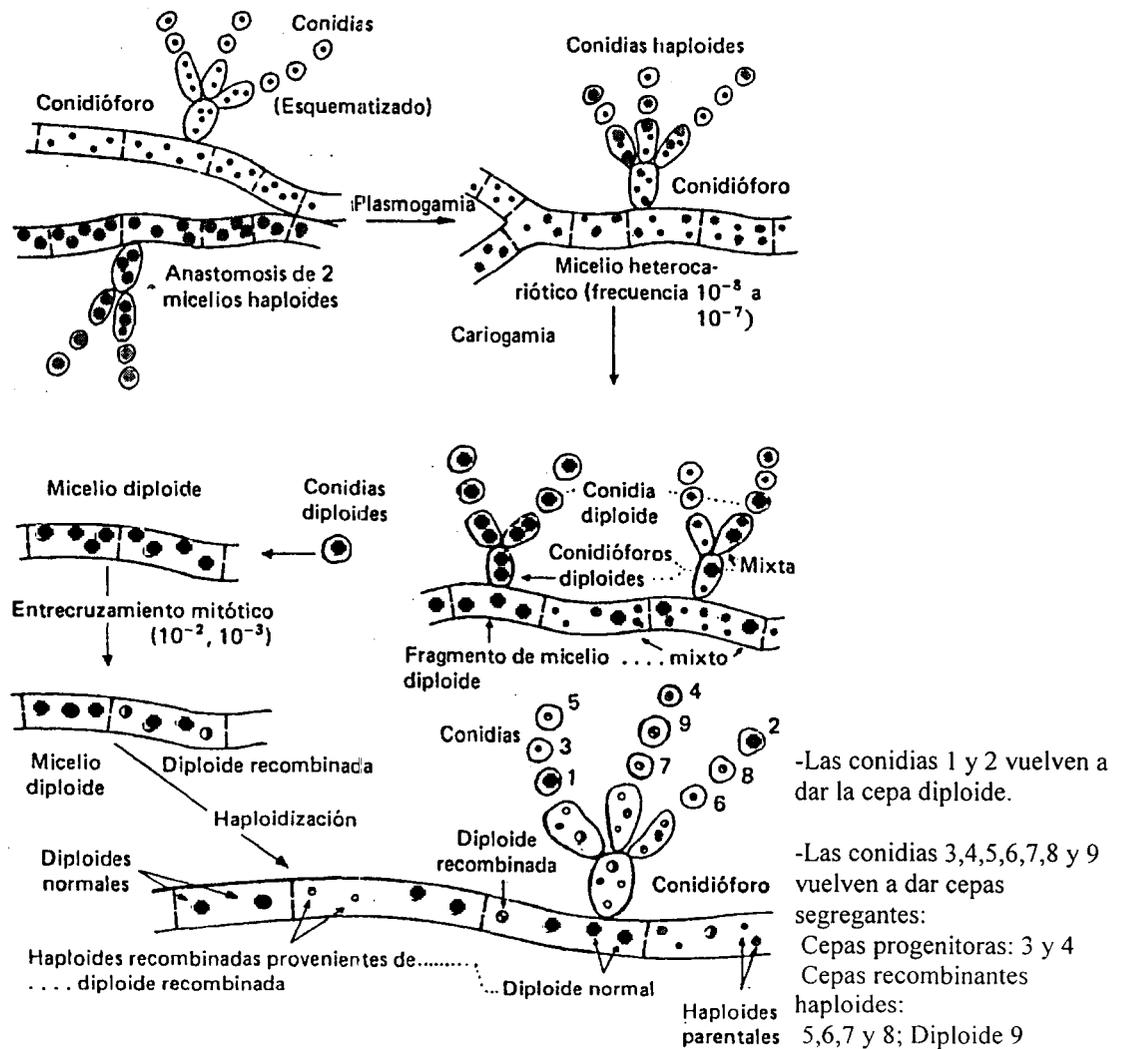


Figura I.2.- Ciclo parasexual

Debido a que el ciclo parasexual ocurre en la naturaleza a muy bajas frecuencias, se requiere un método especial para aumentar la frecuencia de cepas recombinantes en condiciones de laboratorio. El orden de magnitud de la frecuencia para la obtención de micelio heterocarión en la naturaleza es de 10^{-8} a 10^{-7} . El orden de magnitud de la frecuencia deseada para que se obtengan resultados prácticos en un tiempo breve a nivel laboratorio es de 10^{-1} , de ahí la necesidad de desarrollar una técnica basada en un proceso natural como lo es el ciclo parasexual. Esta técnica consiste en lo siguiente:

- a) Obtención de auxótrofos potencialmente complementarios. Este paso consiste en inducir una mutación a dos cepas haploides, para obtener auxótrofos a algún compuesto orgánico como puede ser algún aminoácido. Los auxótrofos deben tener distintas mutaciones para que el diploide que formen sea estable (por complementación) y pueda crecer en medio mínimo.
- b) Selección de recombinantes prototrófos, es decir cepas que no requieren de ningún compuesto orgánico para crecer, es decir que son capaces de crecer en medio mínimo, a diferencia de las cepas haploides auxótrofas. Por ejemplo, si tenemos un auxótrofo a arginina y otro a alanina, el micelio heterocarión formado puede crecer en medio mínimo sin requerir de arginina o alanina.
- c) Caracterización y selección de los recombinantes estables con el fenotipo deseable. Por ejemplo, el fenotipo deseable para el diploide formado, de acuerdo al inciso anterior, es que sea capaz de crecer en medio mínimo, sin requerir de algún aminoácido, pero además para los objetivos de esta tesis, también lo es la sobreproducción de pectinasas y desrepresión catabólica.

La recombinación parasexual ha sido aprovechada para el desarrollo de cepas (Bodie *et al.*, 1994). Este método tiene muchas ventajas sobre el uso de otros métodos. Por ejemplo: el aislamiento de los diploides se puede hacer basado en la pérdida gradual de sus cromosomas, seguido del regreso al estado haploide. Este proceso se puede acelerar mediante el uso de dosis subletales de *p*-fluorofenilalanina. Los haploides resultantes pueden ser caracterizados fenotípicamente utilizando un ensayo rápido (Loera, 1994).

La importancia de este ciclo, es que ha sido utilizado para obtener altos rendimientos de productos metabólicos de importancia industrial en algunas cepas de hongos, mediante la heterocariosis y formación de diploides, entre ellos el ácido cítrico (Kirimura *et al.*, 1988; Sarangbin *et al.*, 1994), las pectinasas (Loera *et al.*, 1999), invertasa (Montiel-González *et al.*, 2002) y xilanasas (Loera y Córdova, 2002).

I.3. INDUCCIÓN Y REPRESIÓN CATABÓLICA

Muchos microorganismos se desarrollan mejor con fuentes de carbono fácilmente metabolizables, sobre fuentes de carbono alternas más complejas. Esto corresponde a un mecanismo que reprime la síntesis de enzimas relacionadas con el catabolismo de la fuente de carbono alternativa, asegurando la utilización preferente de la fuente de carbono presente que sea más favorecida. Este mecanismo se conoce como represión catabólica (Ruijter y Visser, 1997). Por ejemplo: la glucosa reprime normalmente la expresión de enzimas como las pectinasas en *A. niger* (Antier *et al.*, 1993). Desde el punto de vista de la fisiología celular esto es benéfico por dos razones: la primera, es que se utiliza la fuente de carbono más favorable energéticamente, y la segunda es que no se desperdicia energía en la síntesis de otros sistemas catabólicos (Ruijter y Visser, 1997). En la represión catabólica, únicamente cuando ya se ha agotado el primer sustrato se sintetizan las enzimas necesarias para la utilización del siguiente.

Un método para incrementar la síntesis de una enzima es el de inducción. Cada enzima tiene su huella genética en la secuencia de una molécula de ADN. A esta secuencia se le denomina gene estructural. Los genes estructurales con la información para la síntesis de una enzima están normalmente inactivos en ausencia del sustrato para dicha enzima. Por lo tanto, se dice que está reprimida la producción de la enzima y solamente cuando se agrega el sustrato requerido, o un análogo, el gene estructural es activado y dicha enzima es sintetizada, proceso al que se denomina desrepresión o inducción, y a las enzimas que responden se les llama inducibles, para distinguirlas de las que no son afectadas por la presencia del sustrato y que se denominan constitutivas. Las enzimas constitutivas se producen estén presentes o no los sustratos, por ejemplo: las enzimas involucradas en la glucólisis.

El control de actividad de las enzimas ocurre generalmente por “encendido” o “apagado” de las enzimas y está asociado con enzimas alostéricas durante la inhibición causada por el incremento de los productos en una vía, lo cual produce que ellos mismos inhiban la producción de la primera enzima de la vía y cierran la síntesis de los productos finales e intermedios. En este caso, el gen regulador sintetiza un represor inactivo. Si hay poca cantidad de producto final el represor inactivo no se une al operador y permite la transcripción del mRNA. Si el producto final es abundante se une al represor inactivo que se activa y el represor activo se une al operador y previene la transcripción del mRNA.

Sin embargo, también puede darse un control de la síntesis de enzimas a nivel genético (operón). En este caso, durante la inducción o desrepresión catabólica, el gen regulador sintetiza un represor activo. En ausencia de sustrato (inductor), el represor activo se une al operador e impide a la ARN polimerasa unirse al promotor para la transcripción del mRNA. Si el sustrato está presente se une al represor activo que se inactiva y permite la transcripción del mRNA.

El mecanismo a través del cual las proteínas represoras de la expresión génica controlan la transcripción comienza cuando la proteína represora y la enzima RNA polimerasa se unen fuertemente a diferentes secuencias específicas de nucleótidos del DNA, que reciben el nombre de región operadora y región promotora. Si está presente la proteína represora, la RNA polimerasa no puede actuar, y no se lleva a cabo la transcripción. Si no está presente la proteína represora, la RNA polimerasa se une, produciéndose la transcripción. Esta proteína represora reconoce un ligando específico y esta unión activa la transcripción al disminuir la afinidad de la proteína represora por su secuencia de DNA específica. Este caso de regulación en el que el gen en condiciones normales está reprimido se llama inducción negativa.

Una alternativa de la regulación negativa, es la regulación por medio de proteínas activadoras de la expresión génica. En este caso la proteína facilita la unión de la RNA polimerasa. Al igual que las proteínas represoras, éstas proteínas activadoras se unen a ligandos específicos (inductor) pero en este caso se incrementa la afinidad de la proteína activadora por el DNA con lo que se activa la transcripción. Si la proteína activadora se encuentra presente, la RNA polimerasa se une y tiene lugar la transcripción. Si por el contrario la proteína activadora no se encuentra presente, la RNA polimerasa no puede unirse y no tiene lugar la transcripción. Este tipo de control génico recibe el nombre de inducción positiva.

La transcripción también se puede manipular por mutación del gen regulador (el que codifica para la proteína represora) inactivando la proteína represora, o bien por mutación del operador con lo que la proteína represora no presentará afinidad por él. Y lógicamente evitando el uso de fuentes de carbono represoras en el medio de cultivo se puede lograr un incremento en la producción de enzimas sensibles a la represión catabólica. Por ejemplo, utilizando manosa en el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens var. cellulosa* se produce 1500 veces más celulasa que en presencia de galactosa.

La represión puede ser producida por varias fuentes de carbono, pero la glucosa es probablemente la más represiva (Antier *et al.*, 1993; Solís-Pereira *et al.*, 1993). La represión por carbono se puede cuantificar al determinar que la actividad de una enzima es menor después del crecimiento en una mezcla de una fuente de carbono inductora más una fuente de carbono represora, en comparación con el crecimiento con sólo la fuente de carbono inductora.

En *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger* la proteína represora CREA juega un papel muy importante en la represión catabólica. Ya que el producto del gen *creA*, llamado CREA es un represor que inhibe la transcripción de muchos genes blanco por la unión a secuencias específicas en el promotor de estos genes (Ruijter y Visser, 1997).

Además del gen *creA* se han descrito cerca de una decena más de genes que intervienen en la represión catabólica (Fillinger *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1995; Ruijter y Visser, 1997; Shroff *et al.*, 1997). Sin embargo, la secuencia completa del genoma de *A. niger* aún no es del dominio público, pues esta secuencia, que fue desarrollada en el Instituto Max Planck de Munich, es propiedad intelectual de la empresa DSM de Holanda (<http://www.dsm.nl>).

No obstante, se puede suponer que muchas de las cepas llamadas “superiores” para la producción de enzimas de *A. niger*, son cepas multigénicas que tienen modificados algunos genes represores como *creA* y por ello pueden producir y excretar títulos de enzimas 100 o 1000 veces superiores a los observados por las cepas silvestres. De ahí que resulte importante el desarrollo de técnicas de recombinación con cepas que ya tienen alto nivel de producción silvestre o mejorada, por medio del proceso de recombinación parasexual descrito anteriormente. Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron cepas haploides previamente mejoradas (sobreproductoras de pectinasas), por lo que esto aumenta la posibilidad de encontrar diploides también mejorados.

I.4. PECTINASAS

Las pectinasas son un conjunto de enzimas capaces de hidrolizar a la pectina, la cual es un polisacárido heterogéneo y complejo formado principalmente por unidades de ácido D-galacturónico (Figura I.3).

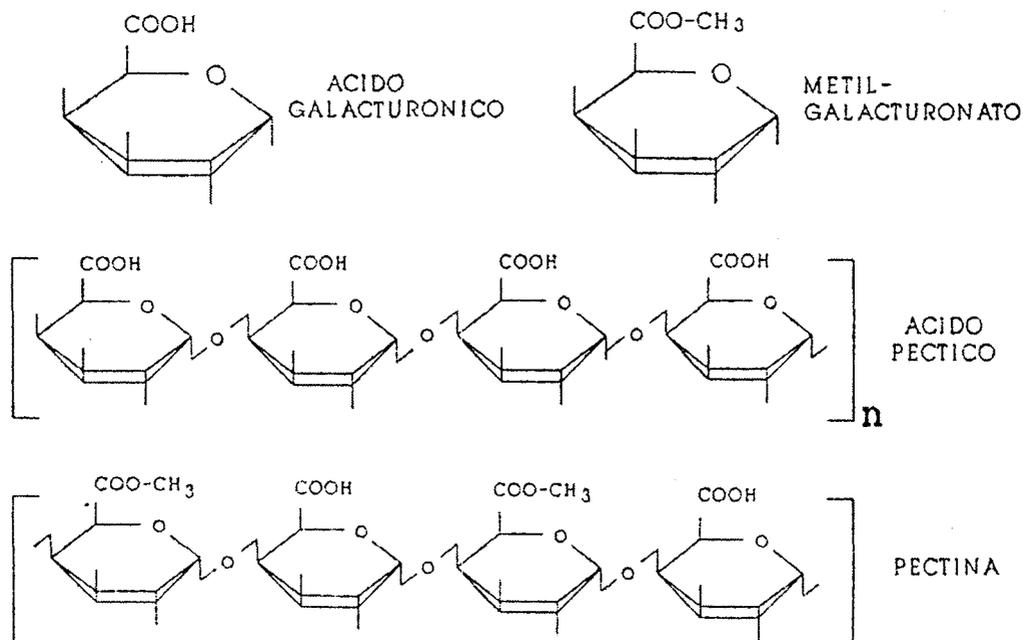


Figura I.3.- Estructura química de la pectina

Las pectinasas son utilizadas en la industria alimentaria para adicionarlas a los jugos de fruta, o bien a las frutas trituradas antes de su prensado, los cuales contienen sustancias pécticas, con el fin de realizar la hidrólisis de la pectina, proceso conocido como despectinización (Szaniawski and Garth, 1996). Las sustancias pécticas (Figura I.3) comprenden un grupo extenso de polisacáridos vegetales cuya estructura básica consta de moléculas de ácido D-galacturónico unido por enlaces glucosídicos α-D-(1,4), en la que algunos de los carboxilos pueden estar esterificados con metilos o en forma de sales.

Entre las sustancias pécticas se pueden distinguir dos clases principales: los ácidos pectínicos, que tienen parte de sus ácidos galacturónicos como ésteres metílicos y, los ácidos pécticos, que sólo contienen moléculas del ácido sin esterificación. Por definición las pectinas son ácidos pectínicos con diferentes grados de esterificación (Díaz, 1997).

I.4.1. Clasificación de las Pectinasas

Las pectinasas se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a su forma de actuar sobre el polisacárido (Taragano *et al.*, 1997):

- Pectinesterasas
- Poligalacturonasas (endo y exo)
- Pectin y pectato liasas

Es necesaria la acción combinada de las pectinesterasas y de las poligalacturonasas para degradar a las sustancias pécticas. En cambio, las enzimas pectinliasas son las únicas capaces de despolimerizar la molécula de la pectina sin la acción previa de las otras enzimas por el mecanismo de la β -eliminación. Las pectinesterasas y poligalacturonasas pueden ser de origen vegetal o microbiano, mientras que las pectin y pectato liasas son sintetizadas por microorganismos. En la industria las pectinasas son comúnmente producidas por fermentación empleando cepas de *Aspergillus niger* (Taragano *et al.*, 1997).

I.4.1.1. Pectinesterasas

Las pectinesterasas transforman a la pectina metoxilada en pectina de bajo metoxilo o pectato (Figura I.4). Al actuar producen metanol a partir de los grupos carboxilos esterificados. Lo anterior ocurre en muchas plantas y se presentan frecuentemente en cítricos y tomates, pero también son producidas en gran cantidad por hongos y bacterias.

Las pectinesterasas producidas por los hongos tienen un pH óptimo alrededor de 4.5 mientras que el de las enzimas de plantas y bacterias se encuentra cerca de la neutralidad. Todas las pectinesterasas son altamente específicas sobre el metil éster del ácido poligalacturónico, ya que no son hidrolizados los enlaces éster metílicos de otros compuestos (Díaz, 1997).

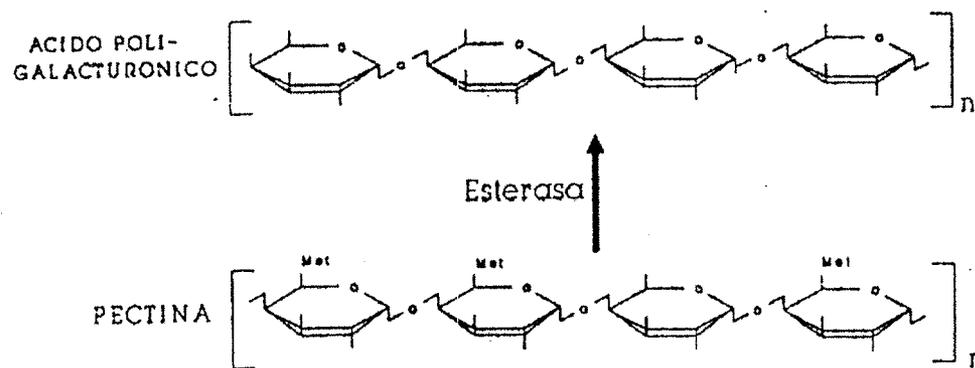


Figura I.4.- Acción de las pectinesterasas

1.4.1.2. Poligalacturonasas

Las poligalacturonasas son enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico contiguo al grupo carboxilo libre, en consecuencia, las pectinas de alto metoxilo se hidrolizan muy lentamente, mientras que las de bajo metoxilo son un buen sustrato (Figura I.5). Las poligalacturonasas son producidas por la mayoría de los hongos, por levaduras y también por algunas bacterias. Su pH óptimo se encuentra entre 4.0 y 5.5 (Díaz, 1997).

Existen endo y exo poligalacturonasas. Las endopoligalacturonasas atacan a la cadena pectica en su interior. Si esta enzima produce un pequeño incremento en los grupos reductores, se produce un fuerte descenso de la viscosidad de la solución que contiene el sustrato. Las exopoligalacturonasas atacan del lado no reductor del polímero formando mono ó dímeros, teniendo por lo tanto una muy lenta disminución de la viscosidad (Díaz 1997, Taragano *et al.*, 1997).

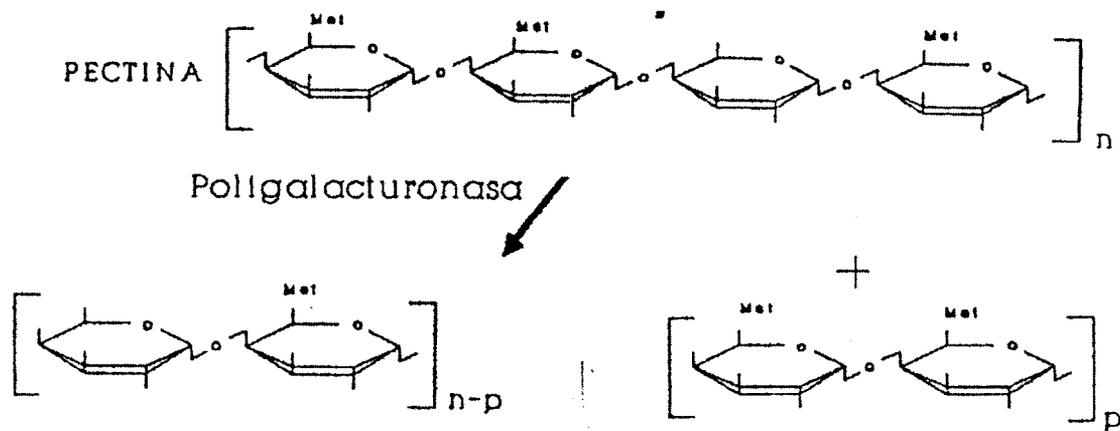


Figura I.5.- Acción de las poligalacturonasas

I.4.1.3. Pectin y Pectato Liasas

Las pectato liasas rompen el enlace glucosídico por β -eliminación, su acción produce dobles ligaduras entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido D-galacturónico (Figura I.6). Al igual que las poligalacturonasas, éstas actúan del lado donde se encuentra más cercano el grupo carboxilo libre, y también se encuentran endo y exopectatoliasas. Para las tipo exo, el pectato es el mejor sustrato y generalmente se obtienen dímeros insaturados a partir del grupo reductor terminal. Para las endo, las pectinas de bajo metoxilo son el mejor sustrato. Su pH óptimo está al rededor de 8-9.5 y por esta razón son de baja importancia para el procesamiento de frutas.

Las pectin liasas rompen el enlace glucosídico cercano al grupo metil éster por vía de la β -oxidación, su acción es similar a la de las pectatoliasas. El mejor sustrato para estas enzimas (de las que solo se conocen de tipo endo), es la pectina altamente esterificada; su pH óptimo está entre 5-6, pero con la adición de iones calcio se puede presentar un segundo pH óptimo en 8 (Díaz, 1997).

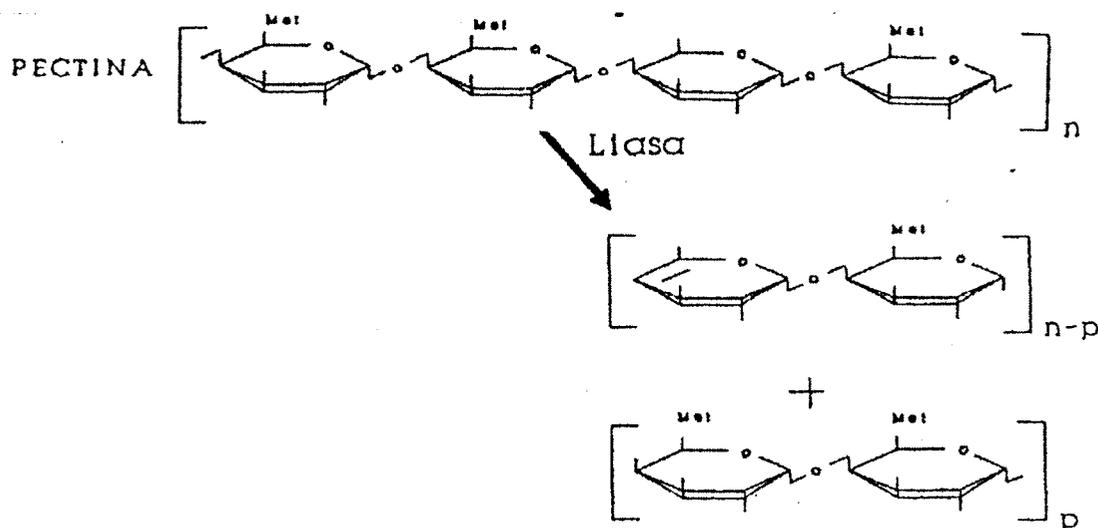


Figura I.6.- Acción de las pectato liasas

I.4.2. Producción e importancia industrial de las Pectinasas

Actualmente las pectinasas son producidas industrialmente por *Aspergillus niger*, *A. wentii* y *Sclerotinia libertina*, pero además de estas enzimas también existen otras de interés comercial, como: amilasas (*Bacillus* y *Aspergillus*), 2-galactosidasas (*Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis* y *C. pseudotropicalis*), invertasas (*Saccharomyces cerevisiae* y *S. Carbergensis*), glucosaisomerasas (*Streptomyces olivaceos*, *Bacillus coagulans* y *Actinoplanes missouriensis*), proteasas (*Bacillus amyloliquefacien*, *B. lichemfurmis*, *B. pumillus*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae* y *A. flavus*), lipasas (*Aspergillus* y *Rhizobium*) y diacetilreductasa (*Enterobacter aerogenes*).

En los extractos comerciales de **pectinasas** usados para la fabricación de jugos de frutas coexisten tres enzimas: la pectinliasa, la poligalacturonasa y la pectinesterasa. Estas enzimas en combinación hidrolizan a la pectina, que como se vió en la sección anterior, es un polisacárido constituido principalmente de ácido galacturónico parcialmente metoxilado.

I. MARCO TEÓRICO

De tal manera que las pectinliasas actúan sobre la pectina; las pectinesterasas eliminan los grupos metoxilo, y la poligalacturonasa actúa sobre la pectina una vez que ésta ha sido desmetilada. Por esta razón, las preparaciones comerciales de pectinasas están constituidas por una mezcla de enzimas pécticas. Las pectinasas comerciales han revolucionado considerablemente los procesos de las frutas en la industria de alimentos (Tabla I.1). Estos procesos se explican en la siguiente sección.

Tabla I.1.- Efecto y aplicación de las pectinasas en los procesos de clarificación, maceración, extracción y licuefacción de los jugos de frutas

| Proceso | Efecto / Aplicación | Enzimas |
|---------------|--|-------------------|
| Clarificación | Reducción de la viscosidad, eliminación de turbidez. | Pectinesterasa |
| | Zumo de manzana. | Pectinliasa |
| | Sidra | Pectinliasa |
| Maceración | Separación de células sin alterar sus paredes. | Poligalacturonasa |
| | Purés, néctares, alimentos. | Pectinliasa |
| | Productos lácteos | Pectinliasa |
| Extracción | Reducción de la viscosidad. | Pectinesterasa |
| | Mejora del rendimiento. | Poligalacturonasa |
| | Mejora del color | Pectinliasa |
| Licuefacción | Degradación de las paredes celulares: | Pectinasas |
| | zumos clarificados, turbios o pulposos | Celulasas |

1.4.2.1. Clarificación de zumos

La clarificación de los zumos, que se define como la reducción de la viscosidad y la eliminación del material enturbiantes, está principalmente aplicada a la producción de zumo de manzana y se desarrolla mediante la actuación enzimática del complejo pectinesterasa-endopoligalacturonasa o por la actividad exclusiva de la pectinliasa.

I.4.2.4. Licuefacción de zumos

A través de la utilización de enzimas pécticas, hemicelulolíticas y celulolíticas, las paredes celulares de los purés de frutas tropicales y verduras pueden ser degradadas hasta conseguir una total licuefacción. De esta forma se pueden lograr rendimientos superiores al 90 % en la obtención de zumo. Además, debido a la solubilización de los polisacáridos de la pared celular, el peso seco de los zumos se ve fuertemente aumentado. Dependiendo de la accesibilidad que los componentes de la pared celular presentan a las enzimas, se consigue obtener zumos clarificados (papaya), turbios (melocotón) o pulposos (zanahoria). Tras el tratamiento enzimático se puede separar el zumo por centrifugación o filtrado, y clarificar el zumo resultante.

I.4.3. Ventajas de la utilización de las Pectinasas

1. Las pectinasas se emplean para disminuir la viscosidad de los jugos de frutas y facilitar su extracción, maceración, licuefacción y clarificación (Solís-Pereira *et al.*, 1993; Solís *et al.*, 1997; Castilho, *et al.*, 2000). Además pueden estar inmovilizadas en membranas, para disminuir la presión necesaria para realizar los procesos de microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa de los jugos de fruta (Szaniawski and Garth, 1996).
2. Un jugo con pectina presenta propiedades de suspensión coloidal y al hidrolizar este polisacárido se producen cambios esencialmente fisicoquímicos, debido a que el jugo pierde las características de suspensión coloidal. Además, los productos de la despolimerización enriquecen al jugo, ya que no se eliminan por filtración (Díaz, 1997).
3. La molécula de pectina es muy grande (peso molecular entre 150 y 300 KDa.). Su tamaño rebasa el límite inferior de las partículas coloidales, por lo que constituyen verdaderas micelas, las cuales están cargadas negativamente.

El tamaño, estructura y carga de estas micelas, hacen posible que se presenten fenómenos de adsorción. Así, todas las partículas insolubles que están presentes en los jugos se diseminan al igual que dichas unidades coloidales. El resultado es una turbiedad. Cuando las pectinasas (principalmente las de tipo endo) entran en acción, convierten a las micelas en materiales solubles. El soporte que mantenía dispersas a las otras partículas no solubles es eliminado, éstas se precipitan al fondo y el líquido se clarifica (Díaz, 1997).

4. Como las pectinasas rompen las uniones de las células, el líquido solvente puede llegar a establecer más rápido e íntimo contacto con los pigmentos y se produce una mejor extracción del color.
5. La despectinización libera monómeros o dímeros de ácido D-galacturónico principalmente por las exopectinasas, proceso que presenta una influencia sobre el tiempo de la fermentación. Cuando los mostos se enriquecen con materiales fermentables (como son las unidades del ácido galacturónico, o bien los polímeros de él no muy grandes), éstos son asimilados más fácilmente por los microorganismos, y por lo tanto, realizan la fermentación en forma más rápida (Madigan *et al.*, 1998).
6. Aún cuando el contenido en pectina no es muy elevado en las frutas (1 a 3% dependiendo del tipo de fruta, variedad, etc.), cada molécula de pectina, puede rendir unas 1500 moléculas de ácido galacturónico (P.M. 194), de ahí que el tratamiento con pectinasas produzca un aumento considerable de materiales fermentables. La reducción de la viscosidad del mosto también facilita la tarea de los microorganismos y la expulsión más fácil del bióxido de carbono producido. El enriquecimiento de los mostos con materiales fermentables provenientes de la hidrólisis de la pectina da lugar a una mayor producción de alcohol, de ésteres y de materiales que comunican el aroma y el bouquet característico al producto final (Díaz, 1997).

7. Al existir mayores rendimientos en la obtención de jugos y mostos por la adición de pectinasas, se logran mayores ingresos económicos, reducción de gastos por materiales filtrantes y clarificantes, así como de mano de obra, ganancia de tiempo en fermentaciones, mayor producción de alcohol, mejor calidad del producto final y simplificación de las labores industriales (Szaniawski and Garth, 1996).
8. Las pectinasas son útiles en la naturaleza porque participan en la degradación de la pared celular para la colonización de plantas por hongos fitopatógenos (Loera, 1994).

En resumen:

- ❑ Las enzimas pectinasas son catalizadores biológicos de interés industrial y comercial, que se producen principalmente por cultivos de hongos del género *Aspergillus*.
- ❑ Las cepas industriales tienen una productividad de pectinasas cien a mil veces mayor a comparación de las cepas silvestres y por lo tanto es de gran interés práctico caracterizar los fenotipos de cepas previamente mejoradas por técnicas de mutación aleatoria y recombinación parasexual. Tema que será examinado más ampliamente en la sección de Antecedentes.

II. ANTECEDENTES

II.1. MUTACIONES

Las mutaciones surgen en forma aleatoria en las células porque se originan cambios en la secuencia de bases del material genético, durante el proceso natural de la replicación genética. En muchos casos, las mutaciones originan cambios fenotípicos en el organismo; en la mayor parte de los casos estos cambios son perjudiciales, pero ocasionalmente ocurren también cambios que son beneficiosos, por ejemplo, para ciertos procesos en los que es importante incrementar la producción de metabolitos usando las cepas mutadas (Madigan *et al.*, 1998).

Las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas. Las mutaciones espontáneas pueden ocurrir como consecuencia de la acción de la radiación natural que alteran la estructura de las bases del DNA. Durante la replicación también ocurren mutaciones espontáneas por error en el apareamiento de bases, originando cambios en el DNA replicado, tales errores ocurren con una frecuencia de 10^{-7} - 10^{-11} por par de bases durante una ronda replicativa. De ahí que si el genoma de *Aspergillus niger* tiene 34.5 millones de pares de bases, se requiere caracterizar a 10^7 o 10^{11} mutantes para encontrar una mutante espontánea específica de una base determinada.

Una gran variedad de agentes químicos y físicos pueden inducir mutaciones. Algunas formas de radiación son altamente mutagénicas, este tipo de radiación se clasifica en dos categorías: ionizantes (por ejemplo los rayos X) y no ionizantes (por ejemplo los rayos UV). La más usada en genética microbiana es la radiación UV (no ionizante). Las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos absorben intensamente la radiación ultravioleta (UV), con un máximo de absorción para el DNA y el RNA a 260 nm. Las proteínas también absorben radiación UV pero presentan el máximo a 280 nm debido a la absorción de los aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina, tirosina) (Madigan *et al.*, 1998).

La radiación UV es muy útil en el aislamiento de mutantes de cultivos bacterianos. Esta radiación es muy efectiva como agente letal, la muerte de las células por radiación UV se debe a su acción sobre el DNA, debido a que provoca entre otros efectos, la inducción de dímeros de pirimidina en el DNA, es decir, la unión covalente de dos bases pirimidínicas adyacentes, de tal modo que incrementa enormemente la probabilidad de que durante la replicación del DNA, la DNA polimerasa inserte un nucleótido incorrecto en tal posición (Madigan *et al.*, 1998). El tipo más frecuente de fuente de radiación UV que se usa para mutagénesis es la lámpara microbicida que emite grandes dosis de radiación UV en la región de 260 nm. Se suele utilizar una dosis de radiación UV que produce un 90-95 % de muerte de la población y se buscan después mutantes entre los sobrevivientes (Madigan *et al.*, 1998).

Sin embargo, el uso de dosis bajas del mutágeno favorece el aislamiento de cepas sin alteraciones debidas a mutaciones múltiples o rearrreglos cromosómicos que dificultan un posterior análisis genético (Bos, 1987). Cuando se usan dosis bajas de mutágeno, el número relativamente bajo de cepas mutantes viables obtenidas, se debe compensar a través de un proceso de enriquecimiento que permita aislar las cepas mutantes deseadas. Si se usan dosis más fuertes de radiación, el número de células viables descenderá a niveles demasiado bajos, mientras que si se usan dosis menores se inducirán menos daños en el DNA.

II.2. OBTENCIÓN DE CEPAS SOBREPDUCTORAS DE PECTINASAS

Como ya se mencionó en la sección I.4.2, las pectinasas, al igual que otras enzimas se producen en la industria principalmente por *A. niger*. Las cepas silvestres de *A. niger* tienen títulos menores a 1,000 UI/L (Antier *et al.*, 1993; Friedrich *et al.*, 1990; Levin y Forchiassin, 1998; Panda y Naidu, 2000), las cepas mejoradas por mutación aleatoria pueden alcanzar hasta 3,000 U/L (Cui *et al.*, 1987; Leuchtenberger y Mayer, 1991 y 1992; Kavitha y Umesh, 2000), y las mejoradas por recombinación parasexual llegan a alcanzar hasta 20,000 U/L (Montiel, 2000). Sin embargo faltan estudios de optimización para mejorar los rendimientos, porque la adecuación de los medios de fermentación puede mejorar los rendimientos por un factor de 2 o 3, como ya ha sido reportado por Díaz (1997).

II. ANTECEDENTES

En 1993 Antier *et al.*, seleccionaron de entre varias cepas silvestres de *Aspergillus niger* (248) la que tenía mayor actividad pectinolítica en fermentación en estado sólido (FES) utilizando como soporte pulpa de café, y como resultado obtuvieron a la cepa **C28B25**. Estos investigadores utilizaron esta cepa para obtener mutantes sobreproductoras de pectinasas. Antier *et al.*, emplearon rayos UV para irradiar a la cepa C28B25 y utilizaron 2 medios selectivos, uno con baja actividad de agua ($a_w = 0.96$), 2-desoxiglucosa (2DG) (0.1 g l^{-1}) y pectina (10 g l^{-1}) para seleccionar cepas mutantes sobreproductoras de pectinasas en un medio con un valor bajo de a_w , y otro con un alto nivel de a_w (0.99), 2DG (0.01 g l^{-1}) y pectina (10 g l^{-1}) para seleccionar cepas mutantes sobreproductoras de pectinasas en un medio con un valor alto de a_w . Al final obtuvieron 2 clases de mutantes: dgrAw99 (resistente a 2DG en un valor alto de a_w) y dgrAw96 (resistente a 2DG en un valor bajo de a_w), entre las cuales encontraron cepas sobreproductoras de pectinasas en estado líquido (FEL) y en FES sobre pulpa de café ($a_w=0.96$), respectivamente, esto se puede observar en la Figura II.1.

Como se observa en la Figura II.1, las cepas mutantes dgrAw96 producen altos niveles de actividad en FES sobre la pulpa de café, especialmente la mutante dgrAw96-3, que produce 221 U g^{-1} peso seco de sustrato. Las cepas Aw96-4 y Aw96-3 sobreproducen pectinasas con respecto a la cepa silvestre en un 25 % y 60% respectivamente. En la misma Figura del lado derecho no se muestran las abreviaturas dgr por falta de espacio, sin embargo, tanto las cepas Aw96, como Aw99 mostraron ser resistentes a este análogo de la glucosa.

Las cepas mutantes dgrAw99 tienen un incremento importante en la producción de pectinasa en FEL con sólo pectina como fuente de carbono. La cepa mutante dgrAw99-iii sobreproduce pectinasas con respecto a la cepa progenitora (300% de incremento de la producción de pectinasas en medio líquido).

En resumen, las cepas mutantes dgrAw99 tienen una producción de pectinasa baja en FES sobre pulpa de café, y ésta se incrementa en medio líquido. Las cepas mutantes dgrAw96 están relacionadas con un incremento de la actividad en medio sólido.

II. ANTECEDENTES

Las mutantes dgrAw96-3 y dgrAw99-iii fueron las mejores productoras de enzima en pulpa de café y FEL, respectivamente. Posteriormente Loera *et al.*, en 1999 obtuvieron un diploide (D4) mediante la cruce parasexual de las cepas Aw99iii y Aw96-4, mostrando un incremento en la sobreproducción de pectinasas en FEL con respecto a la cepa silvestre y a sus progenitoras, inclusive en un 20 % más que la cepa Aw99iii.

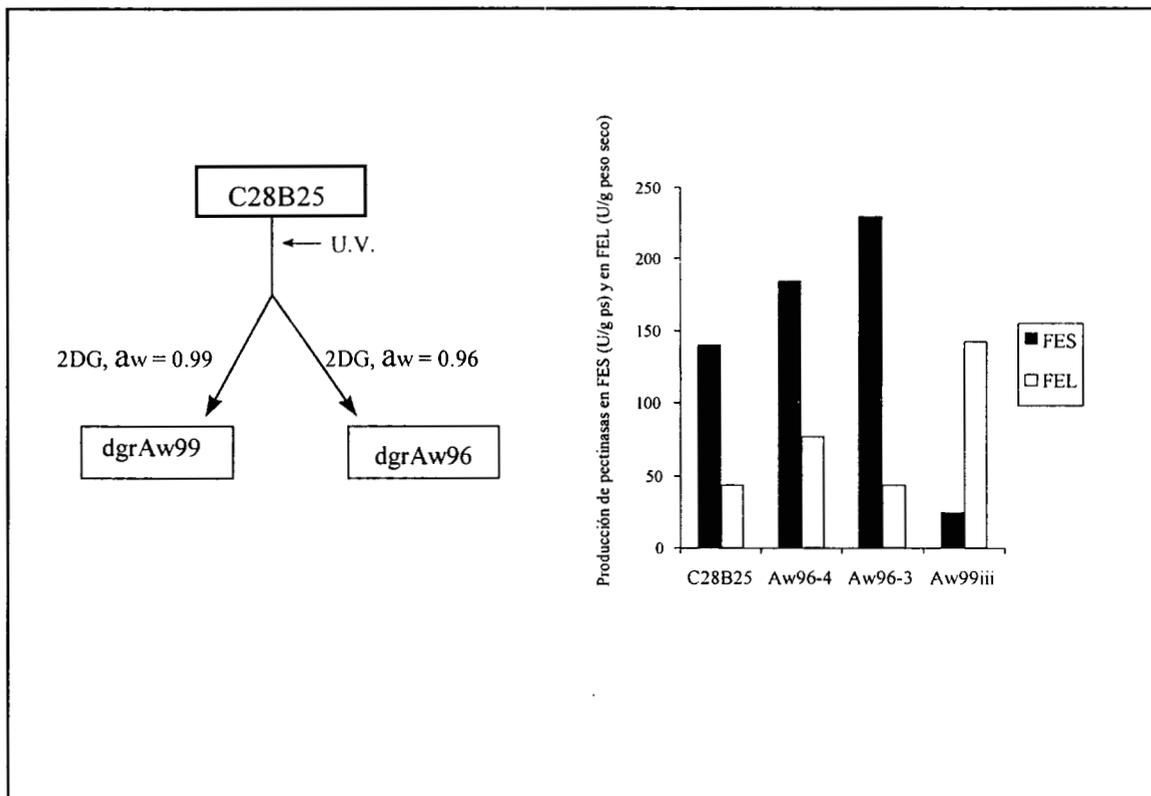


Figura II.1. Selección de cepas mutantes sobreproductoras de pectinasas (dgrAw99 y dgrAw96) a partir de la cepa silvestre C28B25. Del lado derecho se muestra la producción de pectinasas tanto en FES (pulpa de café, $a_w = 0.96$), como en FEL ($a_w = 0.99$) (Loera, 1994).

Recientemente, Montiel (2000) obtuvo una cepa diploide (DAR2) mediante la cruce parasexual de las cepas Aw96-3 ala^- y Aw96-4 arg^- . Este diploide mostró un fenotipo de sobreproducción de invertasa de hasta dos órdenes de magnitud mayor con respecto a las cepas progenitoras, en medio sólido y con a_w de 0.96 y 0.99.

Estos antecedentes mostraron que el efecto combinado de la mutación aleatoria inducida con la selección de la resistencia a 2DG y además, con la cruce parasexual de las mejores mutantes, puede producir mejoras en los títulos de pectinasas hasta de un orden de magnitud con respecto a la cepa silvestre (C28B25). Pero aún dejan abiertas muchas cuestiones sobre los fenotipos mejorados, y en particular, sobre la fisiología de inducción y represión de las cepas mejoradas lo cual corresponde a la razón de ser de esta tesis.

II.3. REPRESIÓN CATABÓLICA EN MEDIO LÍQUIDO

En 1993 Solís-Pereira *et al.*, estudiaron los efectos de diferentes fuentes de carbono en la síntesis de pectinasas por *A. niger* tanto en fermentación líquida, como sólida, y observaron que la producción de pectinasas en medio líquido disminuye cuando se añade glucosa, sacarosa o ácido galacturónico (3% p/v) al medio de cultivo con pectina (3%), esto es debido a que la fuente de carbono adicional causa un efecto inhibitorio (represión) en la producción de pectinasas a las concentraciones de las fuentes de carbono evaluadas, mientras que en FES encontraron que al adicionar glucosa, sacarosa o ácido galacturónico (3.5, 5.5 y 10%) la producción de pectinasas no disminuye, es decir no existe represión, al menos a estas concentraciones. Además, ha sido demostrado que con la FES se tiene una alta productividad de pectinasas en comparación con la FEL (Solís-Pereira *et al.*, 1993; Antier *et al.*, 1993), esto es debido a que en la fermentación sólida se obtienen altos rendimientos de enzima en tiempos cortos de fermentación (Díaz-Godínez *et al.*, 2001; Romero-Gómez *et al.*, 2000).

Antier *et al.* en 1993, evaluaron la producción de pectinasas por *A. niger* (C28B25), en FEL utilizando pectina como única fuente de carbono, y pectina más glucosa o sacarosa, y observaron que al adicionar glucosa al medio de cultivo (entre 5 y 10 g l⁻¹), existe represión catabólica, debido a que las actividades volumétrica y específica disminuyen en comparación con la utilización de pectina como única fuente de carbono; sin embargo la adición de pequeñas cantidades de azúcar (1 g l⁻¹) producen un incremento en la producción de pectinasas.

II.4. RELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA A LA 2-DESOXIGLUCOSA Y CEPAS DESREPRIMIDAS

La 2-desoxiglucosa es un análogo tóxico de la glucosa que causa daño a la célula, impidiendo la síntesis de pared celular y causando la desintegración del citoplasma (El-Ghaouth *et al.*, 1997). La resistencia a la 2DG se ha utilizado como criterio de selección para la obtención de cepas sobreproductoras de enzimas y de otros metabolitos de interés, por ejemplo, se ha empleado como un criterio de selección de mutantes desreprimidas catabólicamente y sobreproductoras de pectinasas (Antier *et al.*, 1993; Minjares Carranco *et al.*, 1997), de ácido cítrico y amilasas (Suzuki *et al.*, 1996) y de celulasas (Parvez *et al.*, 1998). La resistencia a la 2DG también se ha relacionado con la desrepresión de varias enzimas en cepas que resultan resistentes a este análogo tóxico (Allen *et al.*, 1989).

Entre los resultados obtenidos por Antier *et al.*, en 1993, se muestra que para todas las cepas mutantes dgr obtenidas, con excepción de la cepa dgrAw96-3 (que revirtió al fenotipo silvestre), la resistencia a 2DG es una mutación muy estable. Sin embargo, no todas las cepas silvestres de *A. niger* son sensibles a 2DG, por ejemplo, la cepa silvestre CH4 es naturalmente resistente a 2DG (Antier *et al.*, 1993). La resistencia a 2DG es interesante, porque muchas cepas mutantes dgr tienen alteraciones en algunas enzimas que se encuentran normalmente reprimidas por glucosa (Bodie *et al.*, 1994).

Se ha reportado que existen varios *loci* involucrados en la resistencia a 2DG, por ejemplo, en el caso de *Neurospora crassa* se han identificado al menos 4 *loci* participantes en la resistencia a 2DG (Allen *et al.*, 1989). Por otro lado, Loera *et al.*, en 1999 reportaron que en *A. niger* hay al menos 2 *loci* distintos que causan la resistencia en estas cepas, ya que el *locus* que confiere resistencia en la cepa Aw99iii es distinto al *locus* que confiere dicha resistencia a la cepa Aw96-4, puesto que la recombinación parasexual (Aw99iii*Aw96-4) resultó ser sensible a 2DG.

II. ANTECEDENTES

Sin embargo, aún no se tienen estudios de desrepresión en el diploide D4, obtenido por Loera *et al.*, en 1999, para su comparación con respecto a las cepas que le dieron origen, esto con el fin de determinar si existe algún patrón de desrepresión dominante o recesivo en estos casos. Muchas cepas mutantes resistentes a 2DG parecen tener alteraciones regulatorias pleiotrópicas en la actividad de algunas enzimas como la amilasa e invertasa (Allen *et al.*, 1989).

En 1997 Minjares-Carranco *et al.*, realizaron una comparación entre estas cepas mutantes sobreproductoras de pectinasas y estudiaron los patrones de esporulación sobre placas de agar con glucosa y 2DG, obteniendo que las cepas Aw99 tienen un porcentaje mayor de área esporulada que las cepas Aw96 y que la cepa silvestre. También concluyeron que las pectinasas producidas por la cepa Aw96-3 muestran un incremento de estabilidad térmica en comparación con las pectinasas producidas por la cepa Aw99iii, tanto en medio líquido como sólido.

Los resultados anteriores se deben a que *A. niger* produce isoenzimas con diferencias en las propiedades de las pectinasas, dependiendo de la técnica de cultivo (FEL o FES) y de la cepa usada (silvestre, Aw96 o Aw99). Estos resultados sugieren la presencia de mutaciones pleiotrópicas de diferentes tipos (Aw96 y Aw99) que afectan simultáneamente la esporulación y patrones enzimáticos de cada clase de mutantes (Minjares-Carranco *et al.*, 1997).

III. JUSTIFICACIÓN

La presente tesis está basada en el interés de conocer si los diploides D4 (Loera *et al.*, 1999), DAR2 (Montiel, 2000) y DAR3 (obtenido en este trabajo) tendrán una mayor producción de pectinasas y menor represión catabólica que las cepas que le dieron origen, por una posible complementación genética, o si habrá dominancia de alguna cepa progenitora (Figura III.1).

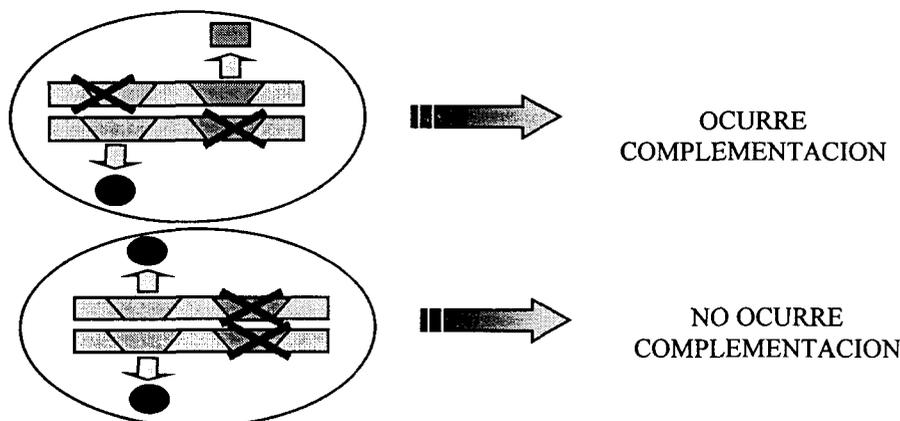


Figura III.1.- Esquema que muestra los mecanismos de complementación genética, así como la dominancia del fenotipo de una cepa progenitora.

Además, esta tesis se encuentra sustentada bajo los puntos antes discutidos:

- Importancia industrial de las pectinasas (ver sección I.4).
- Las cepas desreprimidas son de gran interés, tienen mayor producción de pectinasas, y al estar desreprimidas se puede utilizar una mezcla de carbohidratos y no sólo pectina como fuente de carbono.
- Los diploides obtenidos podrían producir una mayor cantidad de enzima en comparación con las cepas progenitoras.
- La obtención y análisis de los fenotipos de los diploides podrán servir para estudios posteriores. Particularmente con trabajos de optimización del medio de cultivo para las cepas mejoradas.

IV. HIPÓTESIS

1. Los diploides podrán presentar patrones de complementación que den lugar a mayor desrepresión de la síntesis de pectinasas en presencia de glucosa.
2. Los diploides DAR2 y DAR3 producirán una mayor cantidad de exopectinasas en comparación con las cepas progenitoras, debido a mecanismos de complementación genética o a nuevas mutaciones creadas por el proceso de recombinación parasexual.
3. Es posible relacionar los fenotipos de desrepresión catabólica (dominantes y recesivos) con la resistencia a 2-desoxiglucosa (2DG) entre cepas mutantes de *Aspergillus niger*, a través de la construcción de diploides por el ciclo parasexual.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Identificar los patrones de desrepresión catabólica en cepas haploides y diploides de *A. niger* y su relación con la resistencia a 2DG.

V.2. Objetivos particulares

1. Crear una cepa auxótrofa de arginina a partir de la cepa Aw99iii (Aw99iii arg⁻).
2. Obtener un diploide (DAR3), mediante la cruce parasexual de las cepas Aw99iii arg⁻ y Aw96-3 ala⁻ (ver sección VII.1.2).
3. Identificar patrones de recesividad y dominancia en la resistencia a 2DG entre las cepas estudiadas (C28B25, Aw96-3, Aw96-4, Aw99iii, Aw99iii arg⁻, D4, DAR2 y DAR3).
4. Estudiar los patrones de represión catabólica en los diploides para identificar posibles fenotipos dominantes, recesivos o de codominancia entre los pares de cepas estudiados.
5. Garantizar la conservación de las cepas mutantes obtenidas, para su posterior disponibilidad.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general empleada para cumplir con los objetivos de esta tesis se muestra a continuación y se resume en la Figura VI.1:

1. Se obtuvo un auxótrofo a partir de la cepa Aw99iii (Aw99iii arg⁻), mediante mutagénesis con rayos UV, hasta obtener entre 50 y 60 % de sobrevivencia. Posteriormente, se realizó un proceso de enriquecimiento con el fin de aumentar el número bajo de mutantes obtenidas después de la irradiación. La auxotrofia a arginina se realizó con el fin de la obtención de una mutante auxótrofa para arginina, para realizar la cruce parasexual de esta cepa (Aw99iii arg⁻) con otra auxótrofa de alanina (Aw96-3 ala⁻) y así poder identificar algún diploide formado entre ellas, mediante su crecimiento sin necesidad de la presencia de estos dos aminoácidos.
2. Se utilizó el auxótrofo ya existente de la cepa Aw96-3 (Aw96-3 ala⁻), así como las cepas Aw96-3, Aw96-4, Aw99iiii, el diploide D4 obtenido por Loera *et al.*, (1999), el diploide DAR2 obtenido por Montiel-González *et al.*, (2002), obtenido a partir de la cruce parasexual de las cepas Aw96-3 y Aw96-4, y la cepa silvestre C28B25 (ver Figura VI.I).
3. Mediante la cruce parasexual de los auxótrofos de las cepas Aw99iii y Aw96-3 (Aw99iii arg⁻ y Aw96-3 ala⁻ respectivamente) se obtuvo el diploide DAR3 (ver Figura VI.I).
4. Se trabajó con las cepas haploides Aw96-3, Aw96-4, Aw99iii, con los tres diploides D4, DAR2 y DAR3 y la cepa silvestre C28B25 para realizar pruebas de represión catabólica midiendo la producción de pectinasas en fermentación en estado líquido con dos diferentes medios: el primero con 10 g/L de pectina y el segundo con 10 g/L de pectina más 5 g/L de glucosa. También se midió la cantidad de proteína extracelular para calcular la actividad específica, se realizaron cálculos de μ a través de las cinéticas de biomasa, se estimó el rendimiento $Y_{E/X}$ y se siguieron cinéticas de pH.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

5. Posteriormente se evaluó la resistencia a la 2DG para todas las cepas analizadas, midiendo la velocidad de crecimiento radial en cajas Petri, con diferentes concentraciones de 2DG (0-0.5 g/L) (Loera y Viniestra, 1998).
6. Finalmente se conservaron todas las cepas analizadas en sílica gel (Perkins 1977; Loera *et al.*, 1999).

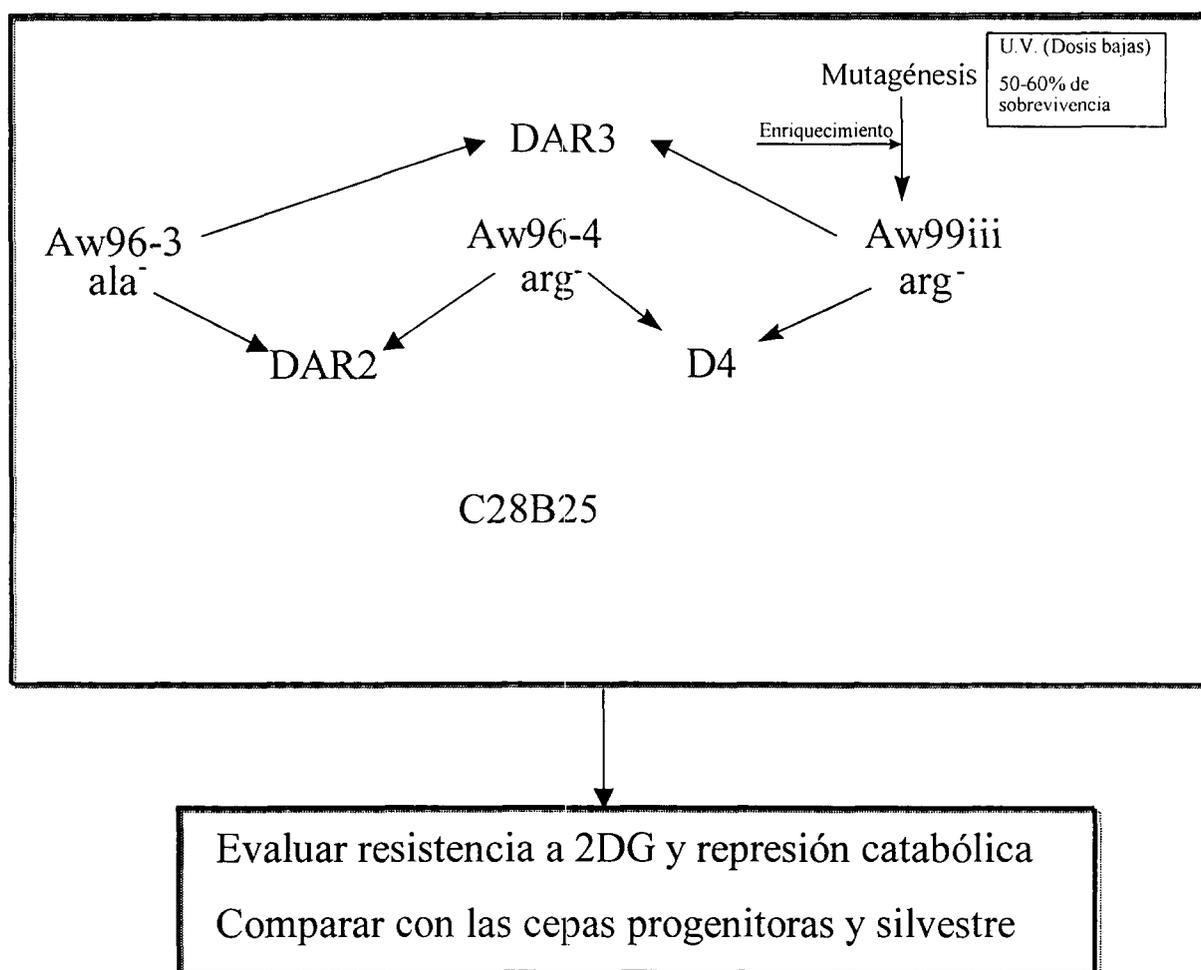


Figura VI.1 Diagrama que muestra la metodología general para lograr los objetivos de esta tesis.

VI.1. MICROORGANISMOS

Se utilizaron las siguientes cepas haploides: C28B25, Aw96-3, Aw96-4 y Aw99iii obtenidas por Antier *et al.* (1993); Aw96-3 ala⁻ obtenida por Montiel (2000) y Aw99iii arg⁻ obtenida mediante mutagénesis en este trabajo (ver sección VI.1.1). Las cepas diploides empleadas fueron: D4 (Loera, 1994), DAR2 (Montiel, 2000) y DAR3 (obtenida en este trabajo). Todas las cepas fueron propagadas en medio mínimo (ver sección VI.2) con glucosa (10 g/L) y agar (15g/L) en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Para las cepas auxótrofas se utilizaron alanina y arginina 2 mM como suplemento en los medios. Las cepas se mantuvieron a 30°C durante 4 días. Posteriormente se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

VI.1.1. Aislamiento de la cepa Aw99iii arg⁻

Para obtener la cepa auxótrofa a arginina (Aw99iii arg⁻) a partir de la cepa Aw99iii se llevó a cabo un proceso de mutagénesis, empleando dosis bajas de rayos UV, hasta obtener entre 50 y 60 % de sobrevivencia, (Bos, 1987). Con el fin de determinar el tiempo de exposición de las esporas de la cepa Aw99iii a los rayos de luz UV, para lograr el porcentaje de sobrevivencia mencionado, se realizó una curva de sobrevivencia, previo al aislamiento del auxótrofo.

VI.2. CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER

Se prepararon 50 mL de una solución de Tween 80 al 0.05% y se esterilizó junto con un agitador magnético, se vació el Tween con el agitador, a uno de los matraces inoculado con cada cepa, luego se agitó en una parrilla para despegar las esporas, una vez hecho esto se vació a otro matraz y al final se obtuvo el inóculo para la fermentación.

Se realizó el conteo de esporas/mL para cada inóculo, con el objetivo de inocular con la misma cantidad de esporas a los matraces de la fermentación, y así poder comparar la actividad de las pectinasas. El conteo de las esporas / mL se realizó con el microscopio y la cámara de Neubauer.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Cantidad de esporas

$$N = n * F * 1/D$$

donde:

N = número de esporas / mL de suspensión de esporas.

n = promedio del número de esporas por cuadro, contadas en la cámara de Neubauer

F = factor de la cámara empleada (25×10^4)

D = dilución empleada para el conteo, expresada como fracción (Ejemplo: 1/10).

Nota: El intervalo de conteo de esporas debe ser de 5 a 50 por cuadro.

VI.3. MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo empleado para la fermentación (MM = Medio mínimo) fue el reportado por Antier *et al.*, en 1993. El pH se ajustó a 5.5 con una solución 0.1M de NaOH.

Tabla VI.1.- Composición del medio de cultivo empleado en la FEL (Antier et al., 1993).

| Compuesto | g/L |
|---|------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 1.3 |
| Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O | 1.03 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.75 |
| Urea | 0.25 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.3 |
| CaCl ₂ | 0.3 |
| Pectina | 10 |
| Glucosa * | 5 |
| Solución de oligoelementos: ** | 1mL / L de medio |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 2.24 mg/L; |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 1.56 mg/L; |
| ZnCl ₂ | 1.00 mg/L; |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 1.11 mg/L |

*La glucosa es opcional, si el medio contiene glucosa se denomina MMG (Medio Mínimo con glucosa). ** Esta solución se prepara 1000 veces más concentrada.

VI.4. FERMENTACIÓN EN ESTADO LÍQUIDO (FEL)

Para cada cepa las fermentaciones se llevaron a cabo con dos tipos de medio:

- Medio mínimo con Pectina al 1%
- Medio mínimo con Pectina al 1% + Glucosa 0.5%

Para evaluar la represión catabólica se realizaron fermentaciones líquidas a pH inicial de 5.5, temperatura de 30°C, y agitación de 180 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio.

Las fermentaciones se realizaron en un agitador orbital con control de temperatura. Cada matraz se inoculó con 5×10^4 esporas / mL. Se tomaron muestras a diferentes tiempos por duplicado, es decir 2 matraces para cada tiempo.

Las variables medidas fueron:

- pH (cinética).
- Biomasa (cinética, cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento: μ , $X_{m\acute{a}x}$ y $Y_{X/S}$).
- Actividad volumétrica de pectinasas (cinética).
- Rendimiento $Y_{E/X}$.
- Proteína soluble (cinética) y cálculo de actividad específica (cinética).

Las técnicas empleadas para cada determinación se explican en la siguiente sección.

VI.5. CINÉTICA DE pH

Después de separar el ECE de la biomasa, se midió el pH al extracto crudo enzimático en cada tiempo de la fermentación, por duplicado.

VI.6. CINÉTICA DE BIOMASA

Para realizar la cinética de biomasa se filtró el ECE con la ayuda de una bomba de vacío, empleando papel Whatman No. 1 previamente a peso constante. La biomasa retenida en el papel fue secada a peso constante y calculada por diferencia de pesos.

VI.6.1. Cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento μ , $X_{m\acute{a}x}$ y $Y_{X/S}$ para todas las cepas analizadas.

Para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ) se utilizó la ecuación logística:

$$dX/dt = \mu (1 - X / X_{m\acute{a}x})X$$

donde:

$X_{m\acute{a}x}$ = máxima biomasa producida cuando $dX/dt = 0$ para $X > 0$

μ = velocidad específica de crecimiento

La solución de la ecuación anterior es:

$$X = X_{m\acute{a}x} / (1 + ce^{-\mu t})$$

para calcular la biomasa la ecuación queda de la siguiente forma:

$$X_{\text{calculada}} = X_{\text{máx}} / (1 + ce^{-\mu t})$$

donde:

$$c = (X_{\text{máx}} - X_0) / X_0.$$

X_0 = valor inicial de la biomasa

Después se calculó la sumatoria de errores al cuadrado con la fórmula:

$$\Sigma \text{ errores} = (X_{\text{observada}} - X_{\text{calculada}})^2$$

Y mediante el uso de Solver (Excel) se minimizó la $\Sigma \text{ errores}$, ajustando por iteraciones los valores de μ , X_0 y $X_{\text{máx}}$ obteniendo así los valores que más se ajustaban a la curva de crecimiento de cada cepa. La bondad de ajuste se evaluó mediante el valor R^2 de la correlación $X_{\text{calculada}}$ contra $X_{\text{observada}}$.

Para calcular el valor del rendimiento $Y_{X/S}$ (gX / gC) se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y_{X/S} = X_{\text{máx}} / S_0$$

donde:

$X_{\text{máx}}$ = máxima biomasa producida (gX/L)

S_0 = cantidad de sustrato inicial (gC/L)

$$S_0 \text{ sin glucosa} = (10 \text{ g pectina/L} * 0.4 \text{ g C/g pectina}) = 2 \text{ g C/L}$$

$$S_0 \text{ con glucosa} = (10 \text{ g pectina/L} * 0.4 \text{ g C/g pectina}) + (5 \text{ g glucosa/L} * 0.4 \text{ g C/g glucosa}) = 6 \text{ g C/L}$$

VI.7. ENSAYO ENZIMÁTICO (ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA)

La actividad enzimática de las pectinasas se determinó por el método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), para evaluar el incremento en los azúcares reductores.

VI.7.1. Preparación del extracto crudo enzimático

La biomasa producida se separó por filtración al vacío, utilizando un papel Whatman No. 1, obteniendo así el extracto crudo enzimático (ECE). El sobrenadante fue inmediatamente congelado hasta realizar las pruebas de actividad enzimática.

VI.7.2. Medición de la actividad volumétrica

Para medir la actividad volumétrica de las muestras se utilizaron tubos de ensayo de 10 mL, en cada tubo se colocaron: 500 μ L de sustrato (ácido poligalacturónico al 1%), 400 μ L de solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 4.5 y 100 μ L del ECE centrifugado y diluido con buffer de acetatos (1:10), se agitaron los tubos, se incubaron a 45 °C durante 15 min., y al término de este tiempo se agregaron 2 mL de DNS.

Para cada muestra se preparó un blanco, al cual se le agregaron: 500 μ L de sustrato y 400 μ L de solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 4.5, después de lo cual se incubaron a las mismas condiciones que las muestras, y después de agregarle el DNS se le adicionaron 100 μ L del ECE diluido 1:10, esto es con el fin de evaluar sólo la actividad debida a la enzima.

Además se preparó un blanco general, el cual contenía: 500 μ L de sustrato y 500 μ L de solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 4.5, el cual también se incubó bajo las condiciones anteriores.

Posteriormente todos los tubos se introdujeron en un baño María en ebullición durante 5 min. para desarrollar el color, al final de este tiempo se enfriaron con hielo y se leyó la absorbancia a 575 nm. en un espectrofotómetro Beckman Du-600.

Se preparó una curva de calibración de 0 a 500 $\mu\text{g/mL}$ de ácido galacturónico, el cual es el producto de la reacción (ácido poligalacturónico + ECE), debido a que las pectinasas forman grupos reductores provenientes de la despolimerización del ácido poligalacturónico (ver sección X.1).

Finalmente se calcularon las Unidades Internacionales de pectinasa producidas por mL. Una unidad internacional de pectinasa (UI) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de ácido galacturónico por minuto (Díaz-Godínez *et al.*, 2001).

VI.8. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO $Y_{E/X}$

Con el fin de poder evaluar correctamente el rendimiento $Y_{E/X}$, se tomaron varias muestras al inicio de cada fermentación (cada 4 horas). Para el cálculo del rendimiento $Y_{E/X}$, (Unidades de enzima por gramo de biomasa) se realizó la gráfica de actividad volumétrica contra biomasa. Posteriormente se calculó la pendiente inicial de la curva y con este valor se obtuvo el rendimiento $Y_{E/X}$ (Unidades de enzima por gramo de Biomasa) de cada fermentación.

VI.9. ESTIMACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE Y CÁLCULO DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA

La proteína soluble en el ECE se midió por el método de Biuret. Este método se basa en el hecho de que el amoníaco y sus derivados forman iones complejos con Cu^{+2} y otros iones metálicos.

El ion de cobre y amonio $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{+2}$ es el ejemplo más elemental de complejos de este tipo. Además de estos complejos simples de Cu con ácidos aminados, existen iones complejos más complicados, a base de Cu^{+2} y péptidos o proteínas, en los cuales el ion Cu^{+2} se une con varios grupos del péptido. Estos complejos aparecen de manera especial en las soluciones alcalinas, y muestran un color rosa o violeta muy distinto de los complejos azules simples de tipo amonio y cobre.

Todas las moléculas que contengan dos o más uniones peptídicas, por lo tanto todas las proteínas y todos los péptidos no menores de 3 unidades, dan positiva la reacción de Biuret, por lo que se pueden identificar alcalinizando una solución de la sustancia y añadiendo pequeñas cantidades de Cu^{+2} . La aparición de un color rosa o violeta se considera como positivo (Gornall *et al.*, 1949; Lendblad, 2000).

El nombre de la prueba de Biuret se debe al compuesto biurea ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) el cual es el que da positiva la prueba. Esta reacción nos sirve para diferenciar las proteínas y los péptidos de los aminoácidos y su utilidad principal es la de seguir el proceso de hidrólisis proteica, la reacción será negativa cuando la hidrólisis sea completa (Lendblad, 2000).

Para realizar el análisis se mezclaron 1 mL del ECE y 3 mL del Reactivo de Biuret. La mezcla de reacción se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos, después de lo cual se leyó la absorbancia a 540 nm (ver sección X.2).

La actividad específica se calculó mediante la división de la actividad volumétrica de pectinasas UI/mL entre la cantidad de proteína en el medio de fermentación (mg de proteína/mL), con lo cual se obtienen las unidades de UI/mg de proteína, correspondientes a la actividad específica. Estos valores se graficaron con respecto al tiempo para obtener la cinética de actividad específica.

VI.10. CURVA DE SOBREVIVENCIA

Inicialmente se propagaron las esporas de la cepa Aw99iii, en PDA y se incubaron a 30° C por 72 horas, hasta que la superficie del matraz se encontraba completamente esporulada, después de lo cual se le adicionaron 50 mL de una solución de Tween 80 al 0.05% estéril, se despegaron las esporas y posteriormente se realizó un conteo de esporas en la Cámara de Neubauer (ver sección VI.1.1), con el fin de conocer el número de esporas por mL en la suspensión. Manteniendo condiciones estériles, se colocaron 20 mL de la suspensión de esporas en una caja de Petri estéril, la cual se encontraba sobre una parrilla y se mantuvo en agitación con una barra magnética estéril durante todo el experimento. La lámpara de rayos UV ($\lambda=254$ nm) se mantuvo a una distancia de 15 cm por arriba de la caja Petri con la suspensión de esporas, lo que produce una intensidad de $310 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, según especificaciones del fabricante.

Posteriormente se irradiaron las esporas con los rayos UV, durante 20 minutos, tomando muestras de 100 μL a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 18 y 20 min. Estas muestras se mantuvieron en hielo y en ausencia total de luz, durante 30 minutos, con el fin de evitar la reversión de la mutación, debida a la reparación de los daños causados al material genético.

Después de los 30 minutos, se hicieron diluciones de cada muestra con agua estéril, con el fin de ajustar el número de esporas a 200-300 en 100 μL , para poder distinguir las colonias crecidas sobre placas. Una vez hecha la dilución, se realizó una cuenta viable por triplicado para cada muestra (100 μL), en cajas Petri con PDA y desoxicolato de sodio (2g/L). Con los datos provenientes de la cuenta viable se realizó la curva de sobrevivencia para la cepa Aw99iii (% de sobrevivencia contra tiempo).

En la Figura VI.2 se resume el proceso para obtener la curva de sobrevivencia para la cepa Aw99iii.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

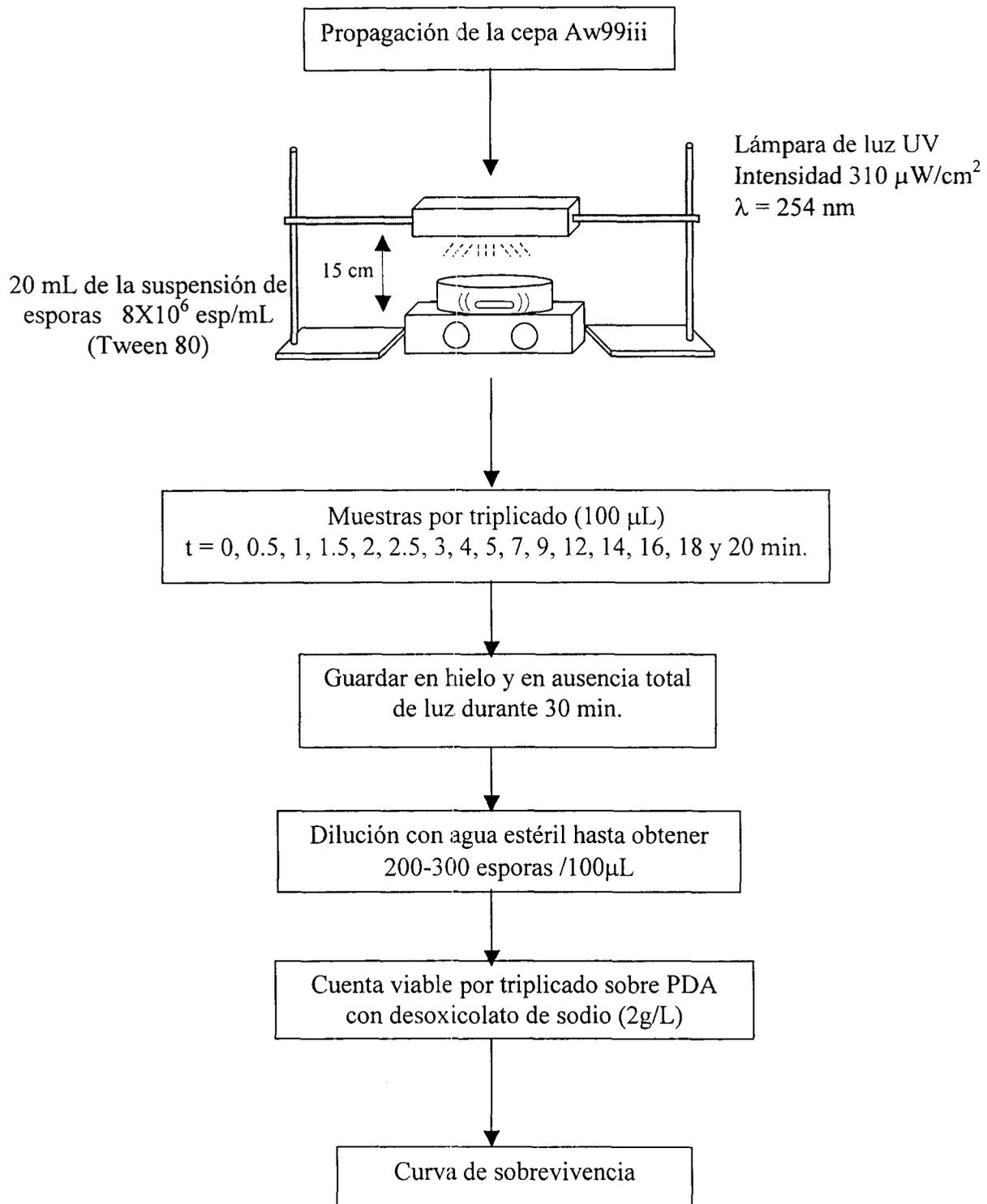


Figura VI.2.- Diagrama de flujo que muestra el proceso para obtener la curva de sobrevivencia para la cepa Aw99iii.

VI.11. MUTAGÉNESIS

Con la curva de sobrevivencia se determinó el tiempo de irradiación, para obtener entre el 50 y 60% de sobrevivencia, que fue de 1 minuto y con este tiempo se realizó el proceso de mutagénesis, irradiando a las esporas de la cepa Aw99iii en las mismas condiciones en las que se construyó la curva de sobrevivencia, es decir, se realizó una segunda mutación, pues ésta era ya una cepa mutante.

Después de este tiempo se propagaron las esporas en matraces Erlenmeyer, con 50 mL de MMG sólido más arginina 2 mM, esto es con el fin de aumentar el número de colonias auxótrofas a arginina.

VI.11.1. Proceso de enriquecimiento

El proceso de enriquecimiento se realiza una vez terminada la mutagénesis, con el fin de compensar la baja frecuencia de cepas mutantes obtenidas con la dosis baja de luz UV y de facilitar el aislamiento de las cepas Aw99iii arg⁻. El proceso de enriquecimiento sirve para eliminar las esporas que no son auxótrofas a arginina, haciéndolas germinar en MMG líquido para luego filtrarlas y así separarlas de las que sí son auxótrofas y que no germinaron en MMG, por lo que no son retenidas mediante la filtración.

Una vez que los matraces con MMG y arginina (ver sección anterior) se cubrieron de esporas, se preparó una suspensión de esporas con tween 80 al 0.05% estéril y se realizó un conteo de esporas (ver sección VI.1.1), con el fin de inocular 5 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio MMG líquido con 2.5×10^5 esp/mL.

Estos matraces se mantuvieron en agitación a 180 rpm y a una temperatura de 30°C durante 12 a 14 horas, después de lo cual fueron filtrados con magitel estéril previamente tratado (lavado durante 2 días con agua destilada), con el fin de retener el micelio de las esporas que germinaron y que no son auxótrofas a arginina, puesto que lograron germinar en MMG sin este aminoácido. El líquido filtrado se vació en tubos para centrifuga estériles de 50 mL y fue centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos.

Enseguida se separó el líquido de las esporas sin germinar mediante decantación, con el fin de recolectar a las esporas que posiblemente son auxótrofas a arginina. Posteriormente mediante el empleo de 2 mL tween 80 al 0.05% y agitación, el sedimento se resuspendió en 3 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de MMG fresco. Una vez hecho esto, los matraces se incubaron en las mismas condiciones que el paso anterior y se repitió el proceso de filtración dos veces más.

El último sedimento de esporas se resuspendió en solución de tween 80 al 0.05%, para inocular 100 mL de esta suspensión en cajas con MMG más arginina 2 mM y desoxicolato de sodio (2 g/L). Estas cajas se incubaron a 30 °C durante 48 horas y las colonias formadas y esporuladas se replicaron sobre cajas con MMG sólido, con desoxicolato de sodio (2 g/L) con la ayuda de un replicador de terciopelo estéril y fueron incubadas bajo las mismas condiciones.

Después de este proceso se compararon los dos tipos de cajas (MMG con arg) y (MMG sin arginina). Las colonias que no crecieron en MMG sin arginina, pero que sí crecieron en MMG con arginina, son probablemente auxótrofas. Estas colonias se inocularon por picadura con palillos estériles en MMG con arginina, formando una caja maestra que se incubó durante 48 horas, después de lo cual se replicó con la ayuda de un cepillo replicador a otra caja maestra con MMG sin arginina. Al final de este proceso se seleccionaron las posibles cepas auxótrofas a arginina de la cepa Aw99iii.

VI.11.2. Prueba de auxotrofia

Una vez seleccionadas las posibles cepas auxótrofas Aw99iii arg⁻, se purificaron por estría con el fin de obtener colonias provenientes de una sola spora y se realizó una prueba de auxotrofia, haciéndolas crecer sobre cajas con MMG con arginina y MMG sin arginina. Finalmente, las cepas que crecieron solo en las cajas que contenían el aminoácido son las verdaderas auxótrofas. En la siguiente página se muestra en la Figura VI.3. el diagrama de flujo para el proceso completo del aislamiento de las cepas auxótrofas Aw99iii arg⁻.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

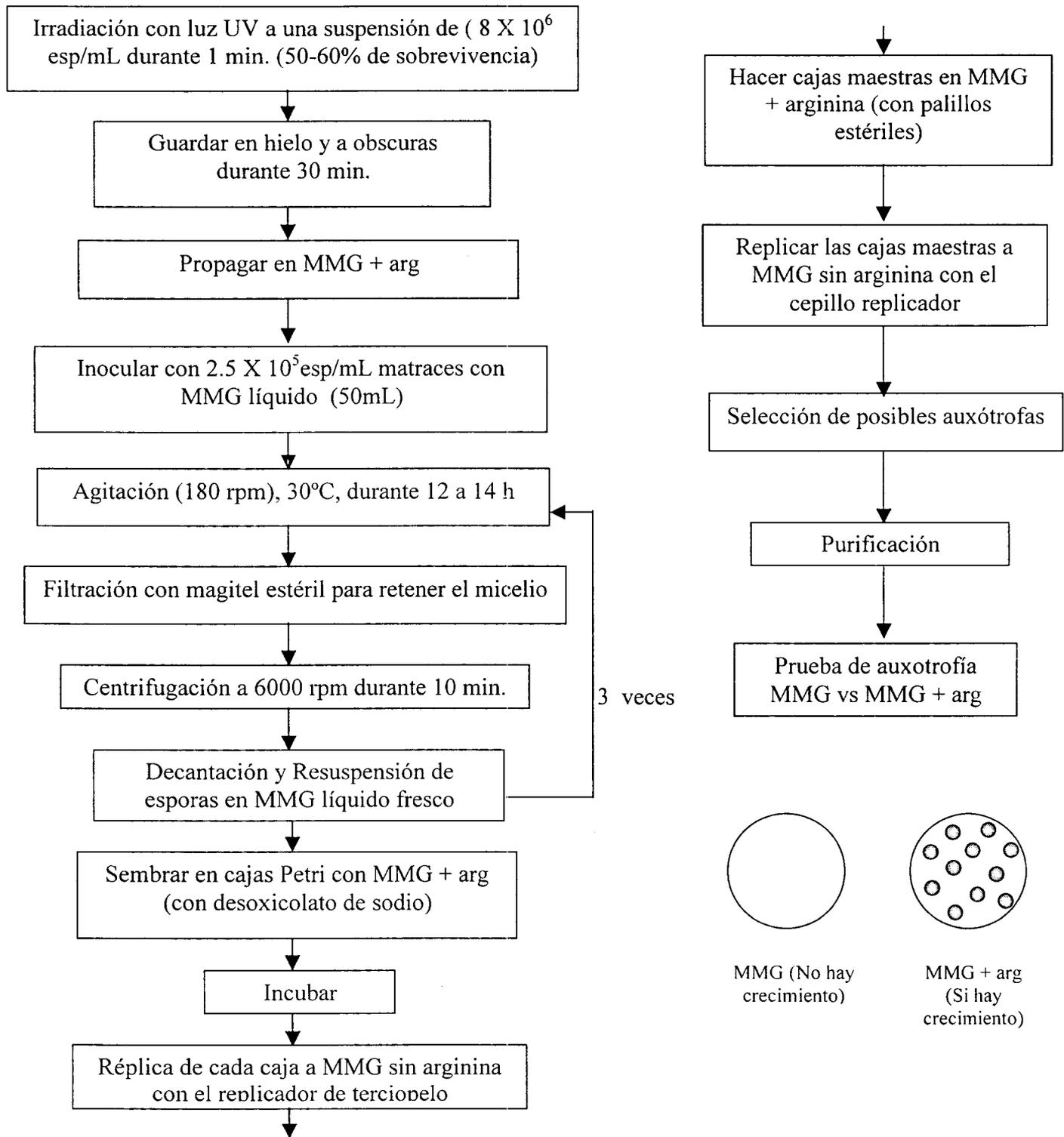


Figura VI.3.- Diagrama de flujo que muestra el proceso de obtención de la cepa auxótrofa Aw99iii arg

VI.12. AISLAMIENTO DEL DIPLOIDE DAR3

En la sección I.2 de esta tesis se explica el ciclo parasexual, en el que las hifas de dos cepas de *A. niger* que crecen juntas, se fusionan para formar micelio que contiene los núcleos de ambas cepas, es decir son cruzadas para dar progenie recombinada sin requerir un ciclo sexual o división nuclear meiótica.

Como se explicó anteriormente en la Figura VI.1, se realizó la cruce parasexual de los auxótrofos de las cepas Aw99iii y Aw96-3, es decir de las cepas Aw99iii arg⁻ y Aw96-3 ala⁻ para obtener el diploide DAR3. A continuación se detallan los pasos para la obtención del Diploide DAR3.

VI.12.1. Cruza parasexual

Primero se propagaron las cepas auxótrofas Aw99iii arg⁻ y Aw96-3 ala⁻, en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio MMG sólido suplementado con arginina 2 mM y alanina 2 mM, respectivamente.

Una vez esporulada totalmente la superficie de los matraces, se prepararon para cada cepa, 6 tubos de ensayo de 20 mL con 10 mL de MMG líquido, suplementado con los dos aminoácidos correspondientes, se esterilizaron y posteriormente se inoculó una asada de las dos cepas, Aw99iii arg⁻ y Aw96-3 ala⁻, en cada tubo.

Los tubos se incubaron a 30 °C durante 48 horas, con el fin de que las esporas de ambas cepas germinaran y formaran así micelio recombinado. Después de este tiempo el micelio formó una biopelícula que creció en la superficie del medio en los tubos. Este micelio fue filtrado con magitel[®] estéril y lavado con solución salina estéril (cloruro de sodio al 0.9%).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante el uso de pinzas estériles se transfirió una parte de este micelio a cajas Petri con MMG y fueron incubadas a 30°C durante 72 horas. Después de este tiempo se observó que un sector del micelio había iniciado su crecimiento, lo cual indica la existencia de un heterocarión.

Consecutivamente se realizó el corte de un pequeño cuadro del heterocarión, inclusive con el agar, para inocularlo nuevamente en cajas de Petri con MMG, manteniéndolas a 30°C hasta que se observó crecimiento sobre toda la superficie.

Finalmente se realizó una suspensión de estas esporas para inocular nuevas cajas de Petri con unas cuantas gotas de la suspensión, después de lo cual se vació MMG con agar a 45°C. Estas cajas se incubaron nuevamente a 30°C y las colonias obtenidas se seleccionaron como las cepas diploides obtenidas de la cruce parasexual entre las cepas Aw99iii arg⁻ y Aw96-3 ala⁻. Los diploides obtenidos se purificaron por estría y se conservaron a 4°C para posteriormente realizar la prueba de diploidía que se explica a continuación.

VI.12.2. Prueba de diploidía

El estado de diploidía de las cepas obtenidas en el proceso anterior se verificó mediante su haploidización con *p*-fluorofenilalanina. Para ello se prepararon cajas de Petri con MMG, alanina, arginina y *p*-fluorofenilalanina a dos concentraciones (60 y 90 mg/L). Estas cajas se inocularon con 4 palillos estériles, realizando 4 picaduras distribuidas en la caja, de la cepa diploide. En total se inocularon 20 cajas y fueron incubadas a 30 ° C durante 5-6 días. Al final de este tiempo se observaron las cajas y se pudo ver el crecimiento de algunos sectores, pero no en todas las picaduras. Posteriormente mediante el uso de palillos estériles se inocularon estos sectores en diferentes medios:

- MMG con alanina, arginina y desoxicolato de sodio (2 g/L)
- MMG con alanina y desoxicolato de sodio (2 g/L)
- MMG con arginina y desoxicolato de sodio (2 g/L)
- MMG con desoxicolato de sodio (2 g/L)

El procedimiento anterior se realizó con el fin de verificar que realmente las cepas seleccionadas fueron diploides.

VI.13. ANÁLISIS DE RESISTENCIA A LA 2-DESOXIGLUCOSA

De acuerdo a lo expuesto en la sección II.2 (Figura II.1) y al inicio de la sección VI (Figura VI.1), todas las cepas empleadas en esta tesis provienen de los dos tipos de cepas aisladas a partir de la mutagénesis con rayos UV de la cepa silvestre C28B25, es decir de las cepas Aw99 y Aw96.

Uno de los criterios de selección para cepas sobreproductoras de pectinasas fue la resistencia a la 2DG. Después de la mutagénesis las cepa Aw96-4 y Aw96-3 resultaron resistentes a la 2DG, sin embargo la cepa Aw96-3 revirtió la mutación, mostrando el fenotipo de la cepa silvestre (sensible a 2DG).

Con base en esto, se realizó el análisis de la resistencia a la 2DG para todas las cepas empleadas en esta tesis, incluyendo la cepa auxótrofa obtenida Aw99iii arg⁻ y el diploide formado DAR3, con el fin de verificar si una segunda mutación con rayos UV, altera o no los patrones de sensibilidad a este tóxico.

Durante este proceso se probaron varias concentraciones de 2DG: 0, 0.01, 0.05, 0.15, 0.3 y 0.5 g/L. La 2DG se añadió al medio mínimo con pectina como fuente de carbono (MMP), suplementado si era necesario con el aminoácido correspondiente. Se esterilizó y se vació en cajas de Petri.

Las cajas (3 para cada cepa) se inocularon por picadura, empleando palillos estériles distintos para cada cepa. El control utilizado fue la cepa silvestre (C28B25). Las cajas se incubaron a 30°C durante 60 horas, después de lo cual se midió el diámetro de cada colonia para cada cepa.

VII. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos durante el trabajo de la presente tesis. Para facilitar el análisis de los resultados así como diferenciar a todas las cepas utilizadas, se utilizarán los siguientes símbolos:

Tabla VII.1.- Símbolos utilizados para distinguir a las cepas analizadas en la presente tesis. Los símbolos vacíos corresponden a un medio sin glucosa, y los símbolos rellenos a un medio con glucosa.

| Cepa | Símbolo |
|-------------|----------------|
| C28B25 | ○ |
| Aw96-3 | □ |
| Aw96-4 | △ |
| Aw99iii | ◇ |
| D4 | × |
| DAR2 | + |
| DAR3 | * |

VII.1. AISLAMIENTO DEL AUXÓTROFO Aw99iii arg⁻ Y CRUZA PARASEXUAL PARA LA FORMACIÓN DEL DIPLOIDE DAR3.

En la siguiente Figura se muestra la curva de sobrevivencia obtenida para la cepa Aw99iii, en la cual se observa que para obtener una sobrevivencia del 50 % es necesario irradiar a esta cepa durante 1 minuto, bajo las condiciones establecidas en la sección VI.10.

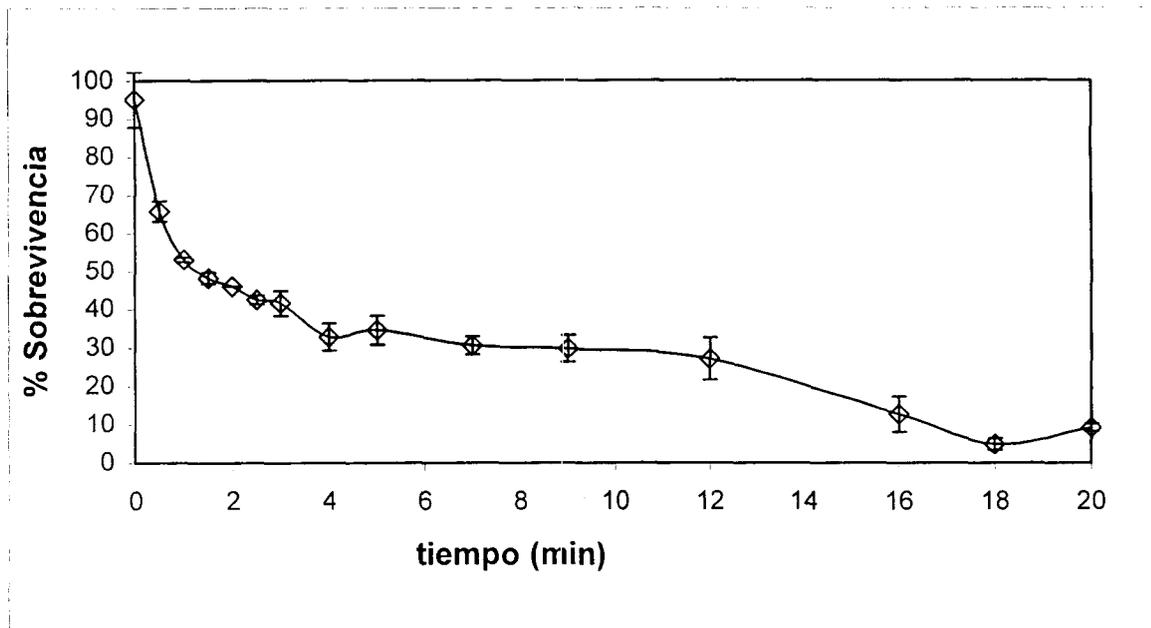


Figura VII.1.- Curva de sobrevivencia para la cepa Aw99iii de *Aspergillus niger*. —◇— $\lambda = 254 \text{ nm}$, Intensidad: $310 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, distancia: 15 cm.

Como se observa en la Figura VII.1 el porcentaje de sobrevivencia disminuye rápidamente en función del tiempo de irradiación con luz UV sobre las esporas, sobre todo al inicio, llegando a una sobrevivencia del 40% en tan sólo 3 minutos, después de lo cual el porcentaje de sobrevivencia disminuye más lentamente.

VII.1.1. Aislamiento de la cepa Aw99iii arg⁻

Una característica importante de las esporas que no germinaron durante el proceso de enriquecimiento (ver sección VI.11.1) fue que la mayoría de ellas no eran auxótrofas, por lo que al final de este proceso se obtuvieron sólo 2 cepas auxótrofas Aw99iii arg⁻, de un total de 150 cepas analizadas. De estas dos cepas se eligió la que presentaba mejor crecimiento en MMG sólido suplementado con arginina.

VII.1.2. Obtención del diploide DAR3

Después de colocar una asada de las cepas auxótrofas Aw99iii arg⁻ y Aw96-3 ala⁻ en MMG líquido suplementado con arginina y alanina (ver sección VI.12.1.), y posteriormente transferir la película de biomasa obtenida a MMG en cajas Petri, se observó que había crecido un sector en algunas cajas, lo cual indica que si se formó el heterocarión

Después de transferir este heterocarión a MMG en cajas, incubarlas y posteriormente sembrar nuevamente una suspensión de esporas sumergidas en MMG se obtuvieron los posibles diploides, a los cuales se les realizó la prueba de diploidía.

Durante la prueba de diploidía hubo formación de sectores haploides al hacer crecer los posibles diploides en MMG suplementado con los aminoácidos a los cuales eran auxótrofas las cepas progenitoras, es decir arginina y alanina, además también se le adicionó el agente haploidizante. También se observó que se pudieron obtener nuevamente cepas auxótrofas, al sembrar cajas maestras con MMG más el aminoácido correspondiente y transferirlas posteriormente a MMG simple, en donde no hubo crecimiento de algunas cepas que si crecieron con el aminoácido correspondiente. Al final de este proceso se obtuvo una cepa diploide (DAR3), cuya nomenclatura es la siguiente: D = diploide, A= alanina, R= arginina y 3= número de cepa. Las letras A y R corresponden a los códigos de una letra para los aminoácidos.

VII.2. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS FERMENTACIONES (pH, X_{máx}, μ y Y_{X/S}).

VII.2.1. Cinética de pH

A continuación se muestran las gráficas obtenidas del perfil de pH para las fermentaciones en los dos tipos de medio, sólo se presentan las curvas para la cepa silvestre C28B25, el diploide D4 y las cepas que le dieron origen: Aw96-4 y Aw99iii, por ser el comportamiento muy similar para las demás cepas (Figuras VII.2, VII.3, VII.4 y VII.5).

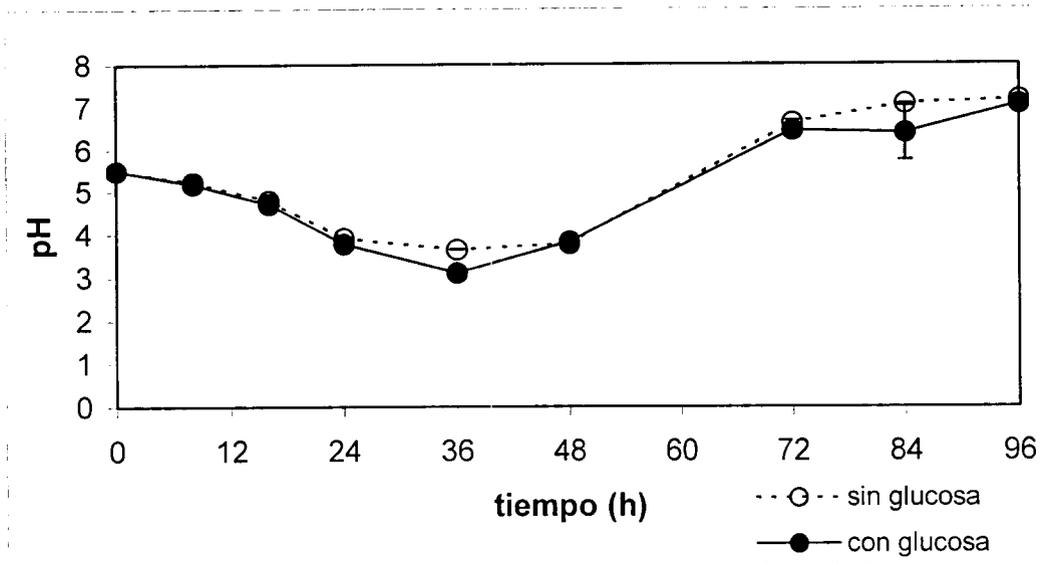


Figura VII.2.- Cinética de pH para la cepa C28B25 en los dos medios de fermentación.

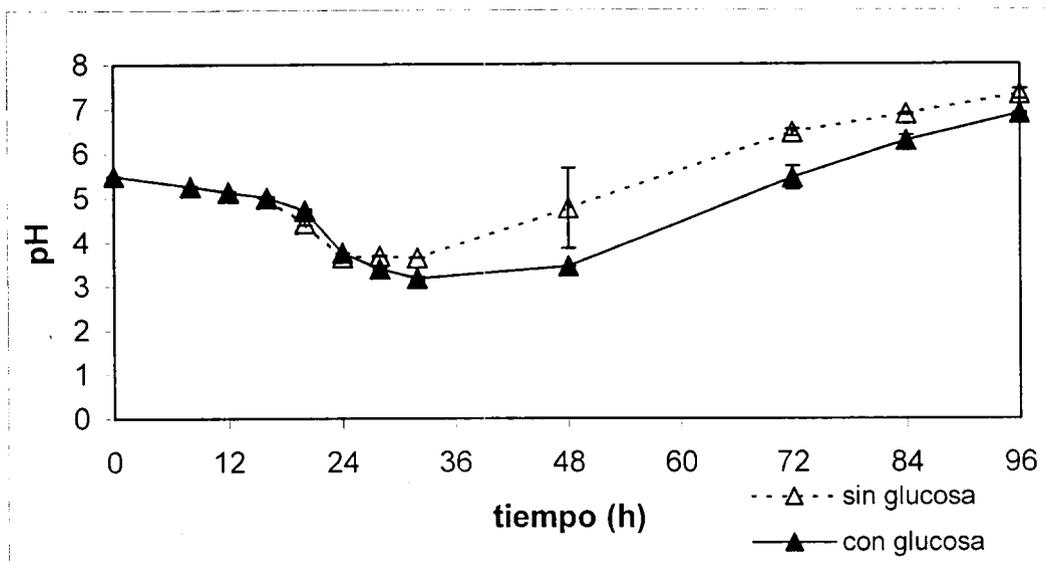


Figura VII.3.- Cinética de pH para la cepa Aw96-4 en los dos medios de fermentación.

VII. RESULTADOS

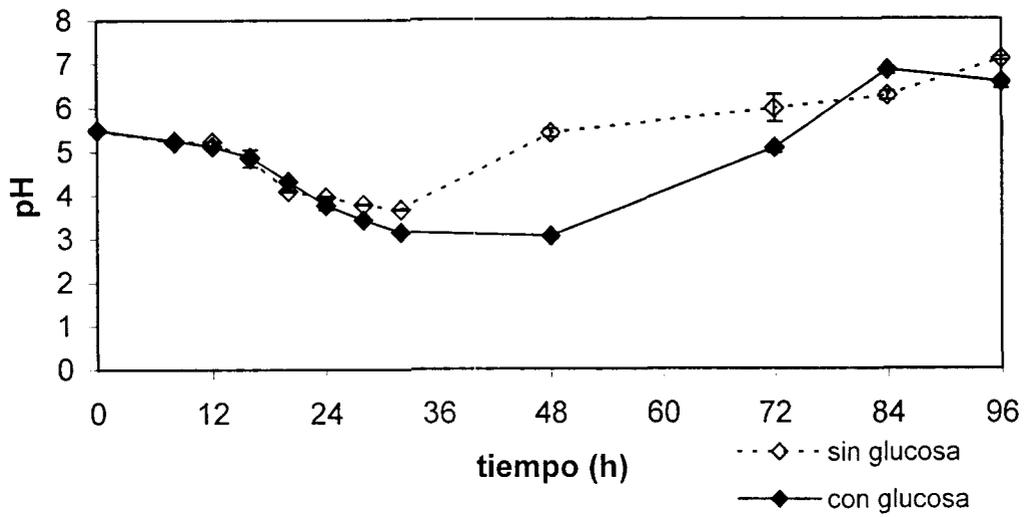


Figura VII.4.- Cinética de pH para la cepa Aw99iii en los dos medios de fermentación.

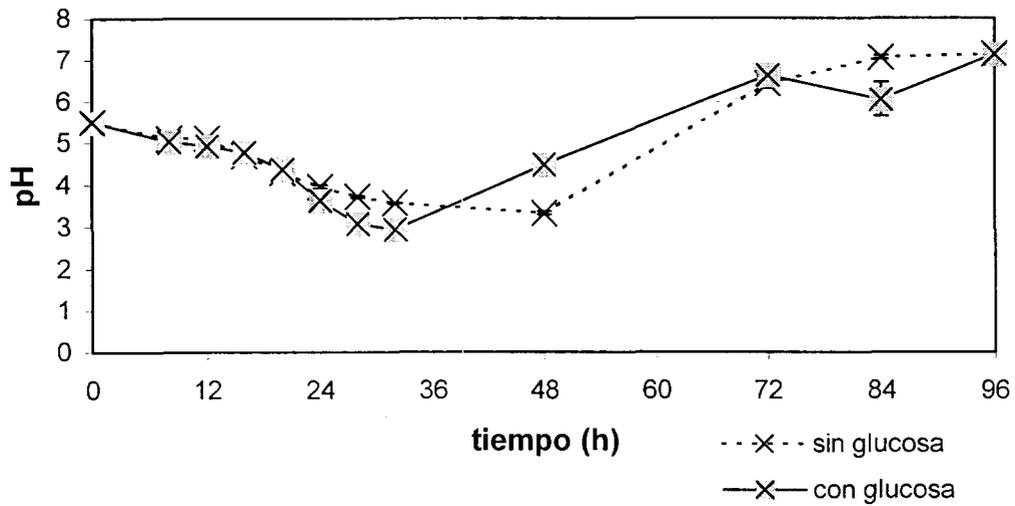


Figura VII.5.- Cinética de pH para la cepa D4 en los dos medios de fermentación.

En las cuatro Figuras anteriores se observa que el comportamiento del pH es muy parecido para todas las cepas con y sin glucosa, ya que el perfil de pH sigue la misma tendencia: primero desciende desde el valor inicial que es de 5.5, presentándose el valor mínimo de 3, aproximadamente a las 32 h y después se incrementa hasta un valor de 7 a las 84 h.

VII.2.2. Cinética de Biomasa y comparación de los parámetros cinéticos: $X_{máx}$, $Y_{X/S}$ y μ , para todas las cepas analizadas

En las siguientes Figuras se muestran las cinéticas de biomasa para las fermentaciones realizadas en ausencia y presencia de glucosa para todas las cepas analizadas. A simple vista se observó que la cantidad de biomasa se incrementó en presencia de este azúcar, además de que el tamaño de las pelotitas de micelio formadas fue mayor que cuando sólo se utilizó pectina como fuente de carbono. Al igual que para el pH, solo se presentan las gráficas para la cepa silvestre C28B25, el diploide D4 y las cepas que le dieron origen: Aw96-4 y Aw99iii (Figuras VII.6, VII.7, VII.8 y VII.9).

En la Figura VII.6 se muestran las cinéticas de biomasa para la cepa silvestre en presencia y ausencia de glucosa. En ausencia de glucosa se observa que el valor experimental de $X_{máx}$ es de 3.5 g/L y se presenta a las 72 h, sin embargo al utilizar el “Solver” de Excel (ver sección VI.6.1) para calcular por iteraciones su valor se obtiene un valor calculado de 3.2 g/L también a las 72 h. En presencia de glucosa el valor experimental de $X_{máx}$ es de 5.6 g/L a las 48 h y el valor calculado es de 5.25 g/L a las 72 h. En esta misma Figura se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento, los cuales corresponden a 0.180 h⁻¹ en un medio sin glucosa y 0.172 h⁻¹ en presencia de glucosa.

VII. RESULTADOS

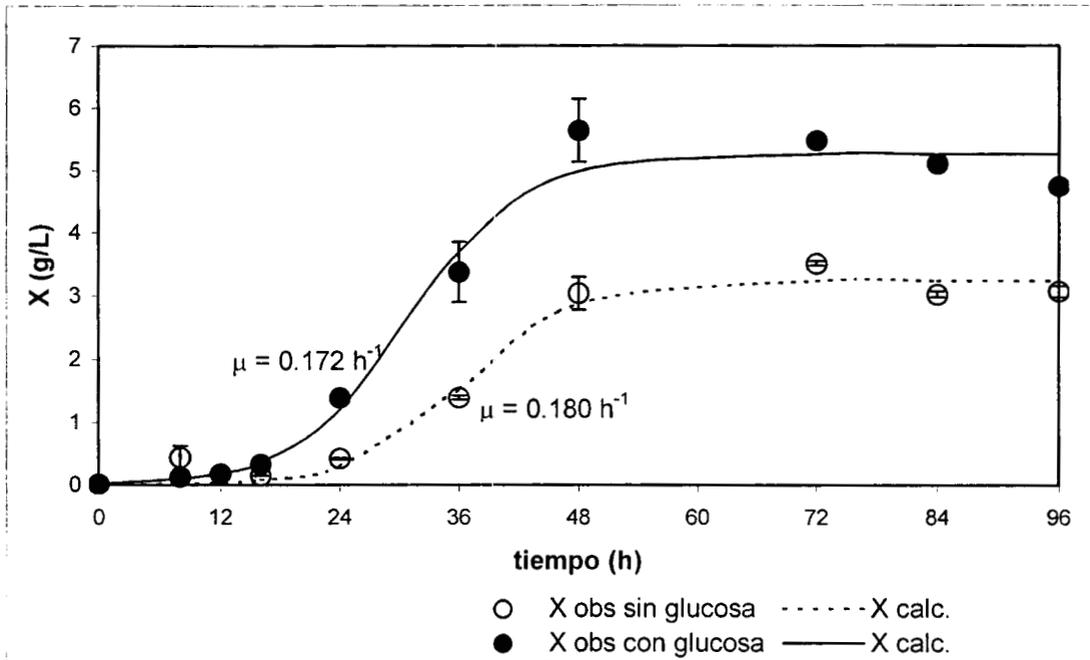


Figura VII.6.- Cinética de Biomasa para la cepa C28B25 en los dos medios de fermentación.

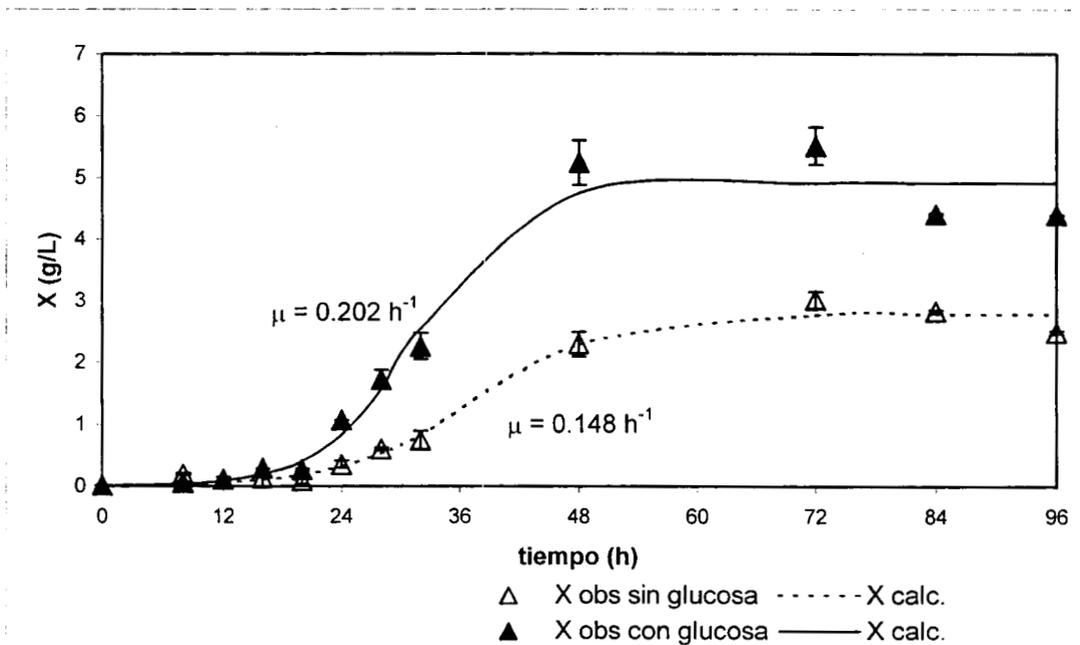


Figura VII.7.- Cinética de Biomasa para la cepa Aw96-4 en los dos medios de fermentación.

VII. RESULTADOS

En la Figura VII.7 se muestran las cinéticas de biomasa para la cepa Aw96-4 en presencia y ausencia de glucosa. En ausencia de glucosa se observa que el valor experimental de $X_{\text{máx}}$ es de 3.0 g/L y se presenta a las 72 h, sin embargo al utilizar el “Solver” de Excel se obtiene un valor calculado de 2.8 g/L también a las 72 h. En presencia de glucosa el valor experimental de $X_{\text{máx}}$ es de 5.5 g/L a las 72 h y el valor calculado es de 4.9 g/L a las 72 h. En esta misma Figura se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento, los cuales corresponden a 0.148 h^{-1} en un medio sin glucosa y 0.202 h^{-1} en presencia de glucosa.

A continuación se presentan en la Figura VII.8 las cinéticas de biomasa para la cepa Aw99iii en presencia y ausencia de glucosa. En ausencia de glucosa se observa que el valor experimental de $X_{\text{máx}}$ es de 3.6 g/L y se presenta a las 72 h, sin embargo al utilizar el “Solver” de Excel se obtiene un valor calculado de 3.2 g/L también a las 72 h. En presencia de glucosa el valor experimental de $X_{\text{máx}}$ es de 5.3 g/L a las 48 h y el valor calculado es de 4.6 g/L a las 48 h. En esta misma Figura se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento, los cuales corresponden a 0.205 h^{-1} en un medio sin glucosa y 0.266 h^{-1} en presencia de glucosa.

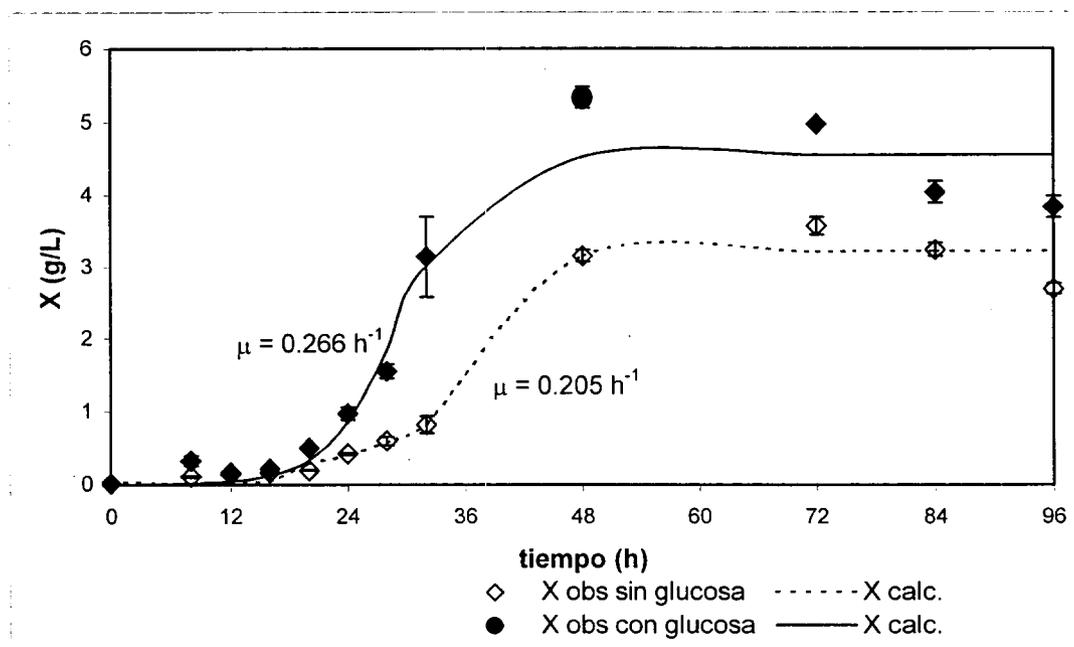


Figura VII.8.- Cinética de Biomasa para la cepa Aw99iii en los dos medios de fermentación

VII. RESULTADOS

Las cinéticas de biomasa para el diploide D4 en presencia y ausencia de glucosa se muestran en la Figura VII.9. En ausencia de glucosa se observa que el valor experimental de $X_{m\acute{a}x}$ es de 5.5 g/L y se presenta a las 84 h, sin embargo al utilizar el “Solver” de Excel se obtiene un valor calculado de 4.0 g/L a las 72 h. En presencia de glucosa el valor experimental de $X_{m\acute{a}x}$ es de 6.0 g/L a las 48 h y el valor calculado es de 5.2 g/L a las 48 h. En esta misma Figura se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento, los cuales corresponden a 0.133 h^{-1} en un medio sin glucosa y 0.227 h^{-1} en presencia de glucosa.

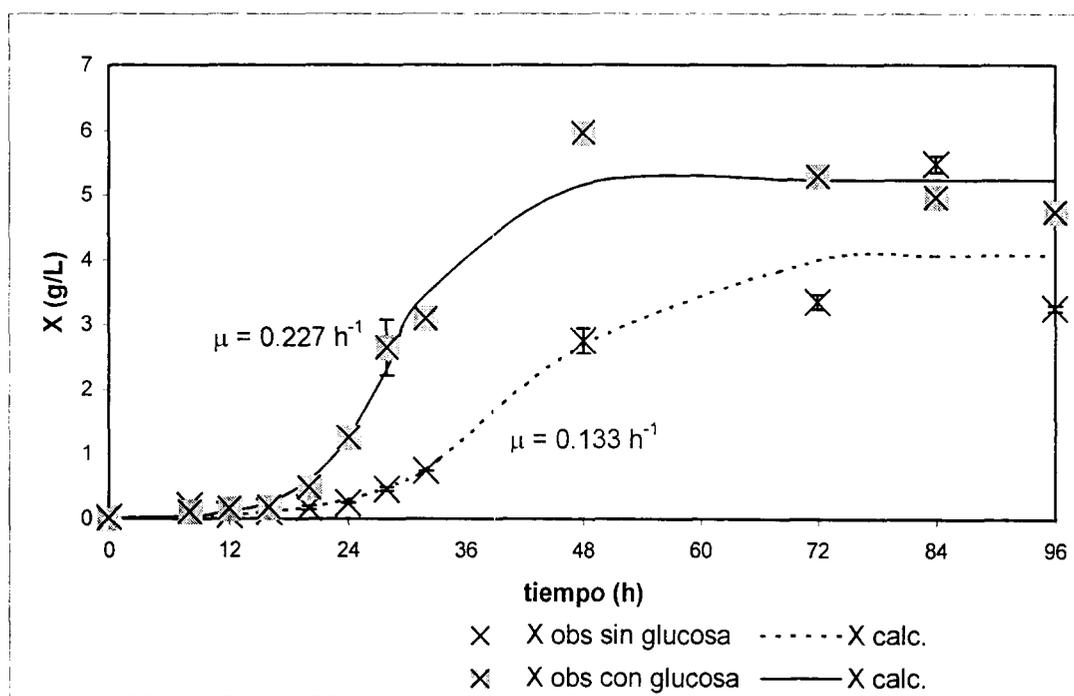


Figura VII.9.- Cinética de Biomasa para la cepa D4 en los dos medios de fermentación.

Las cuatro gráficas anteriores muestran diferencias importantes en el valor de $X_{m\acute{a}x}$, que es siempre mayor en presencia de glucosa para todas las cepas analizadas. Asimismo el valor de la $X_{m\acute{a}x}$ calculada siempre es menor a la $X_{m\acute{a}x}$ experimental. Sin embargo, no se observan diferencias importantes para el valor de $X_{m\acute{a}x}$ entre las cepas analizadas. Esto quiere decir que los mutantes no tienen afectado el crecimiento. Lo anterior es más comprensible si se observan los valores del rendimiento $Y_{X/S}$:

VII. RESULTADOS

Tabla VII.2.- Valores de $Y_{X/S}$ (gX/gC) para todas las cepas analizadas en los dos diferentes medios.

| Cepa: | Sin glucosa | | Con glucosa | |
|-----------------|-------------------|------------|-------------------|-------------|
| | $X_{m\acute{a}x}$ | $Y_{X/S}$ | $X_{m\acute{a}x}$ | $Y_{X/S}$ |
| C28B25 | 3.2 | 1.6 | 5.25 | 0.86 |
| Aw96-3 | 3.2 | 1.6 | 5.3 | 0.88 |
| Aw96-4 | 2.8 | 1.4 | 4.9 | 0.81 |
| Aw99iii | 3.2 | 1.6 | 4.6 | 0.76 |
| D4 | 4.0 | 2.0 | 5.2 | 0.86 |
| DAR2 | 3.2 | 1.6 | 5.0 | 0.83 |
| DAR3 | 3.2 | 1.6 | 5.2 | 0.86 |
| Promedio | 3.26 | 1.6 | 5.06 | 0.83 |

En la tabla anterior se observa que el rendimiento $Y_{X/S}$ es más alto en medio con pectina como única fuente de carbono, que con pectina más glucosa, pero no se encuentran diferencias apreciables entre las cepas. Estos valores de rendimiento $Y_{X/S}$ son similares a los reportados por Romero-Gómez *et al.*, 2000 y Díaz-Godínez *et al.*, 2001).

En la Tabla VII.3 se muestran los valores de μ para todas las cepas analizadas. Como se observa en esta tabla la velocidad específica de crecimiento es mayor en presencia de glucosa para casi todas las cepas, excepto para la C28B25 y la Aw96-3. Sin embargo, aunque estos valores de μ son similares con o sin glucosa, sí se encontraron diferencias notables en la cantidad de biomasa formada (es mayor en presencia de glucosa, ver Figura VII.6). La cepa que presentó la μ mayor fue la Aw99iii tanto en un medio sin glucosa (0.205 h^{-1}), como con glucosa (0.266 h^{-1}). Esto último coincide con observaciones de otros reportes, donde se indica que la cepa Aw99iii presentó mayores velocidades de crecimiento en medio líquido, con respecto a las otras cepas probadas (Loera y Viniegra, 1998).

Tabla VII.3.- Valores de μ (h^{-1}) para todas las cepas analizadas en los dos diferentes medios.

| Cepa / μ (h^{-1}) | Sin glucosa | Con glucosa |
|----------------------------------|-------------|-------------|
| C28B25 | 0.180 | 0.172 |
| Aw96-3 | 0.197 | 0.193 |
| Aw96-4 | 0.148 | 0.202 |
| Aw99iii | 0.205 | 0.266 |
| D4 | 0.133 | 0.227 |
| DAR2 | 0.158 | 0.161 |
| DAR3 | 0.148 | 0.202 |

VII. RESULTADOS

Tabla VII.4.- Comparación de los valores observados de μ para los diploides con respecto a los promedios de μ para las cepas progenitoras en los dos diferentes medios.

| Diploide | μ promedio sin glucosa | μ observada sin glucosa | μ promedio con glucosa | μ observada con glucosa |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| D4 (Aw96-4*Aw99iii) | $(0.148 + 0.205)/2 =$ 0.176 | 0.133 | $(0.202 + 0.266) =$ 0.234 | 0.227 |
| DAR2 (Aw96-3*Aw96-4) | $(0.197 + 0.148)/2 =$ 0.172 | 0.158 | $(0.193 + 0.202) =$ 0.197 | 0.161 |
| DAR3 (Aw96-3*Aw99iii) | $(0.197 + 0.205)/2 =$ 0.201 | 0.148 | $(0.193 + 0.266) =$ 0.229 | 0.202 |

La tabla VII.4 muestra que los valores promedio de μ para los diploides (el promedio de los valores de μ para las cepas progenitoras) son más altos que los valores de μ observados, esto significa que μ no es una propiedad aditiva, sino de interacciones complejas del sistema de regulación del ciclo de crecimiento de *Aspergillus niger*, lo cual se nota más claramente en ausencia de glucosa. Esto también significa que la μ no está relacionada directamente con la productividad de las pectinasas.

VII.3. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DEL MICELIO DE LAS CEPAS C28B25 Y D4.

Con la finalidad de observar si existen diferencias en la morfología de cepas haploides y diploides de *Aspergillus niger*, así como diferencias cuando éstas se hacen crecer con diferentes sustratos, se observó el micelio obtenido de la fermentación (pelotitas), a las 48 horas, en el microscopio electrónico (ME). Se utilizaron dos cepas representativas: C28B25 (cepa silvestre, haploide) y D4 (diploide), y los dos medios de fermentación probados en esta tesis (pectina al 1%, y pectina al 1% más glucosa al 0.5%). A continuación se muestran los resultados obtenidos, aunque no se realizó un análisis estadístico de las dimensiones de las estructuras celulares, se sugiere un estudio posterior a detalle en el analizador de imágenes, debido a que las observaciones en el microscopio electrónico muestran datos interesantes con respecto a las diferencias encontradas en el tamaño de las pelotitas de micelio en ausencia y presencia de glucosa, así como entre cepas haploides y diploides.

VII. RESULTADOS

VII.3.1. Observación al microscopio electrónico del micelio de la cepa haploide C28B25.

VII.3.1.1. FEL de la cepa C28B25 con Pectina 1%

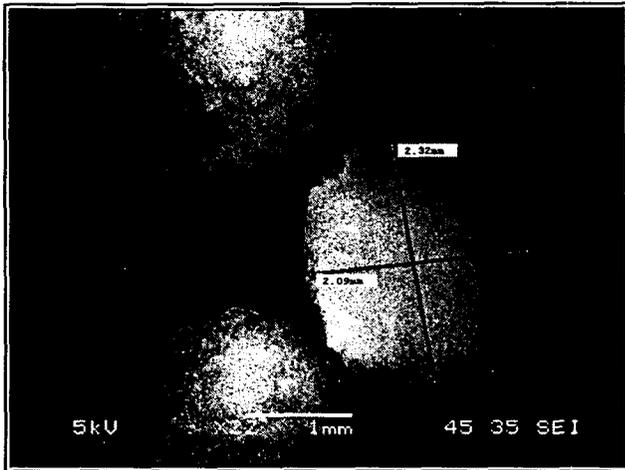


Figura VII.10. Observación de las pelotitas de micelio de la cepa C28B25 a 22X. El tamaño promedio es $D=2.2\text{mm}$.

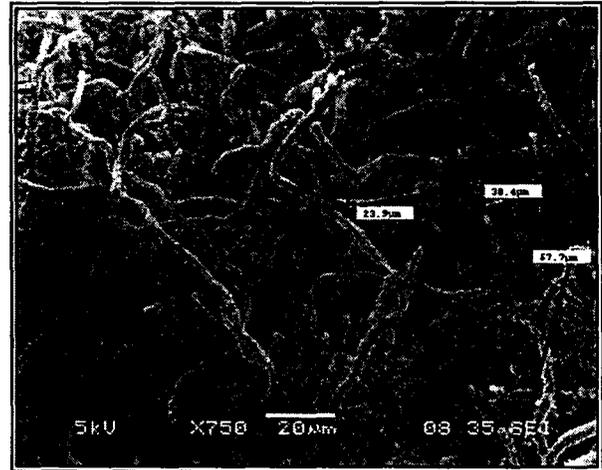


Figura VII.11. Observación al ME de las hifas de la cepa C28B25 a 750X. El largo de la hifa se encuentra alrededor de 60 µm.

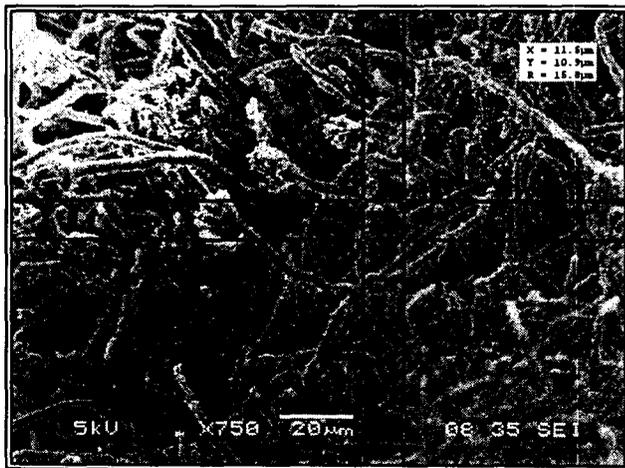


Figura VII.12. Observación del diámetro del conidióforo de la cepa C28B25 al ME a 750X ($D_{\text{promedio}} = 11.2\ \mu\text{m}$).

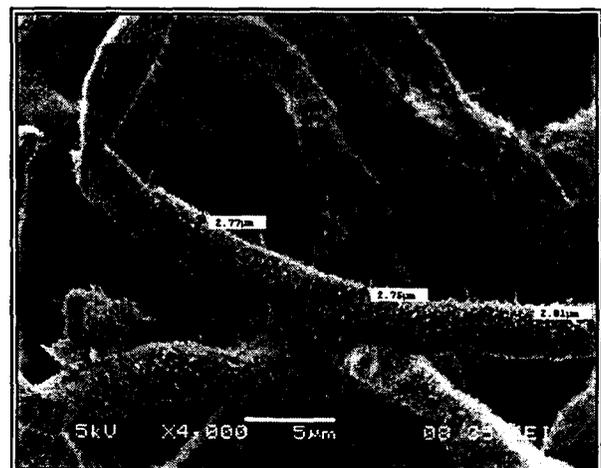


Figura VII.13. Observación de la hifa de la cepa C28B25 al ME. El diámetro de la hifa es de 2.7 µm).

VII.3.1.2. FEL de la cepa C28B25 con Pectina 1% + Glucosa 0.5%

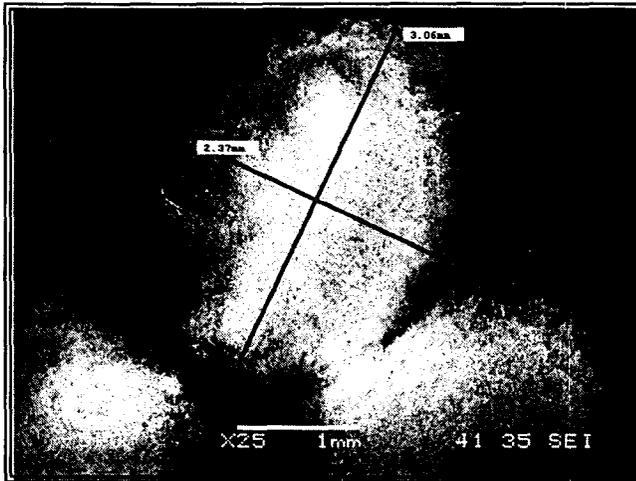


Figura VII.14. Observación de las pelotitas de micelio de la cepa C28B25 al ME a 22X. El tamaño promedio del diámetro es 2.7 mm.

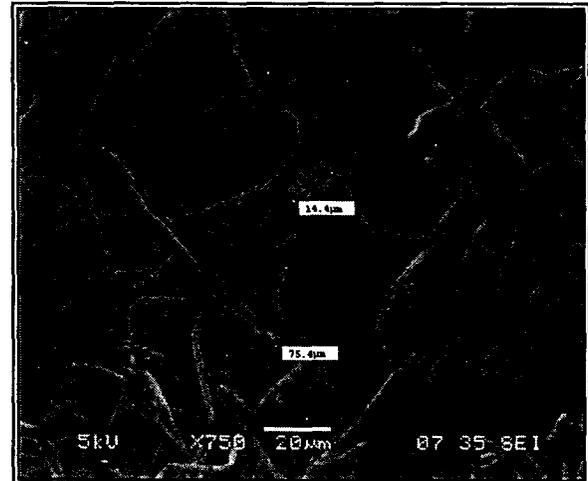


Figura VII.15. Observación al ME de la cepa C28B25 a 750X. Largo $_{\text{hifa}} = 75.4 \mu\text{m}$ y diámetro $_{\text{conidióforo}} = 14.4 \mu\text{m}$.

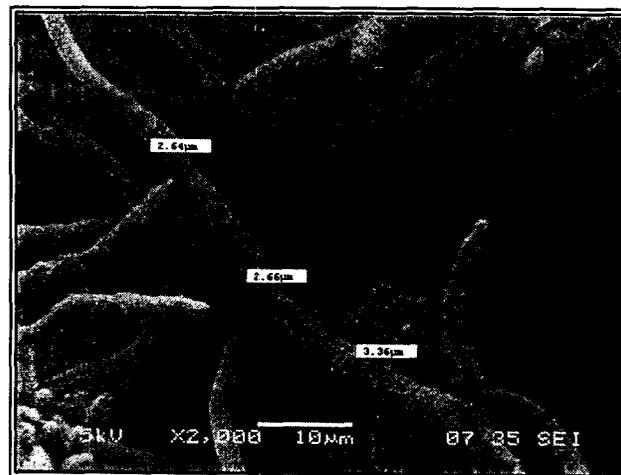


Figura VII.16. Observación al ME a 2000X de la cepa C28B25. Diámetro $_{\text{hifa}} = 2.9 \mu\text{m}$.

VII. RESULTADOS

VII.3.1. Observación al microscopio electrónico del micelio de la cepa haploide C28B25.

VII.3.1.1. FEL de la cepa D4 con Pectina 1%

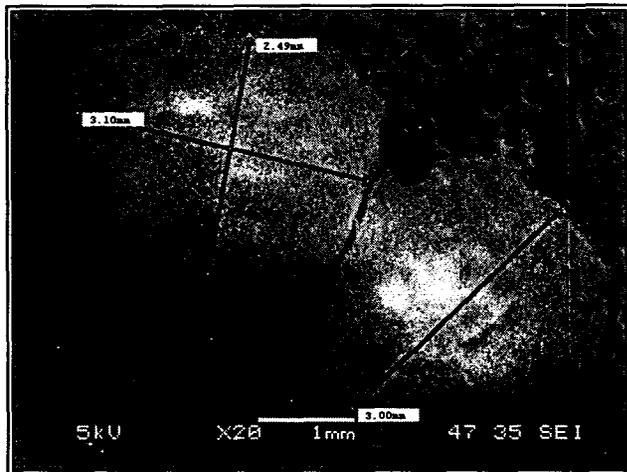


Figura VII.17. Observación de las pelotitas de micelio de la cepa D4 a 20X. El tamaño promedio es $D = 2.8\text{mm}$.

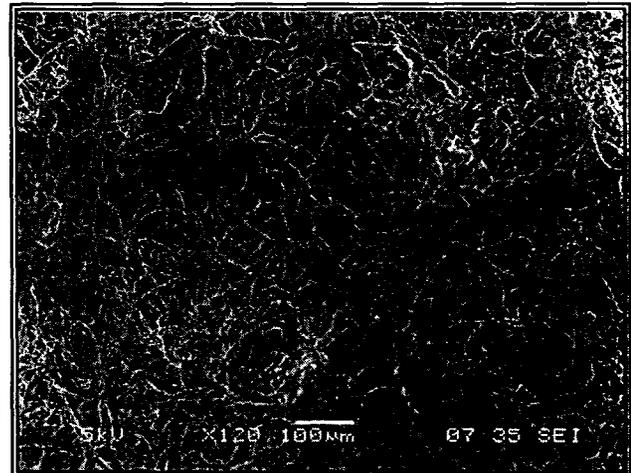


Figura VII.18. Estructura del micelio de la cepa D4 en la superficie. Observación al ME a 120X.

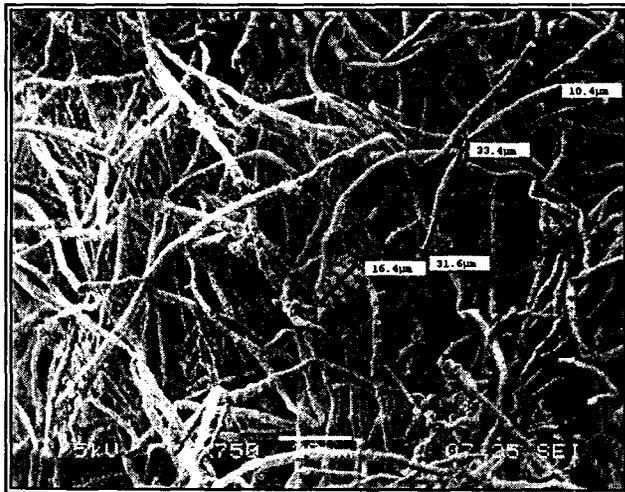


Figura VII.19. Observación al ME de la cepa D4 a 750X. Largo de la hifa= $75.4\ \mu\text{m}$ y diámetro conidióforo= $16.4\ \mu\text{m}$.

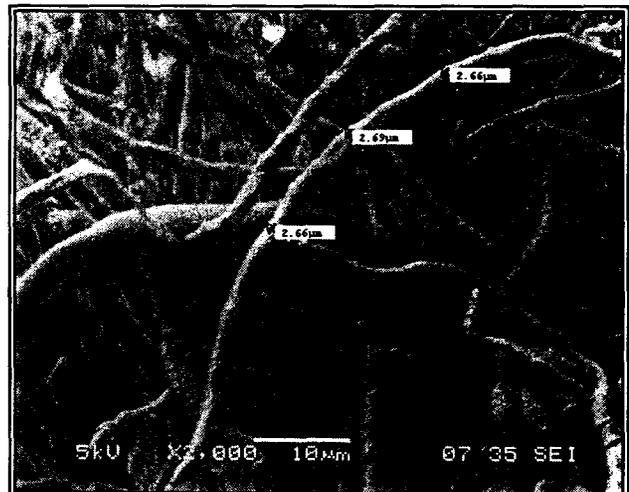


Figura VII.20. Observación al ME del diámetro de la hifa ($2.6\ \mu\text{m}$) de la cepa D4 a 2000X.

VII.3.1.2. FEL de la cepa D4 con Pectina 1% + Glucosa 0.5%

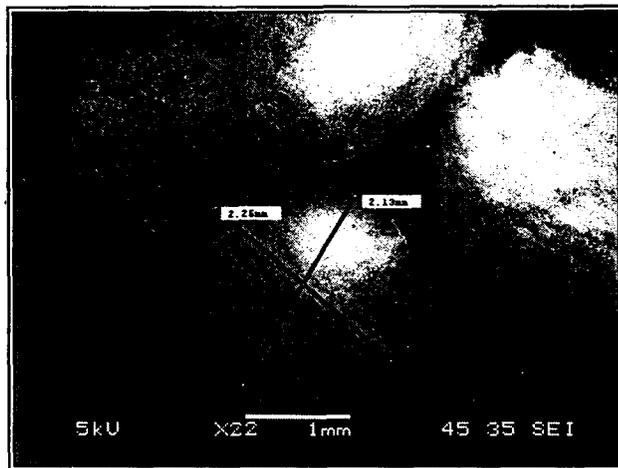


Figura VII.21. Observación al ME de las pelotitas de micelio de la cepa D4 a 22X. Diámetro promedio = 2.19 mm.

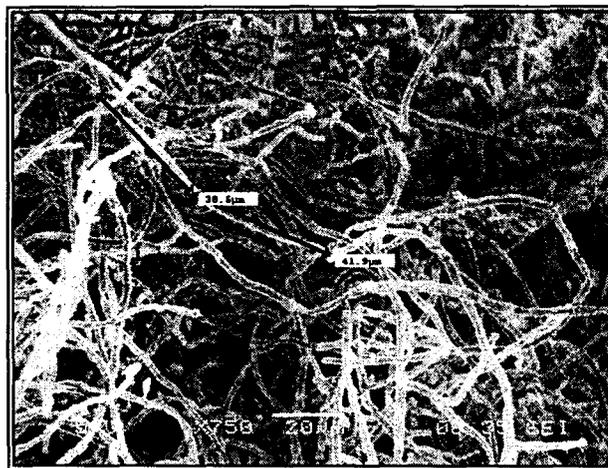


Figura VII.22. Observación al ME de la cepa D4 a 750X. Largo total de la hifa=80.4µm.

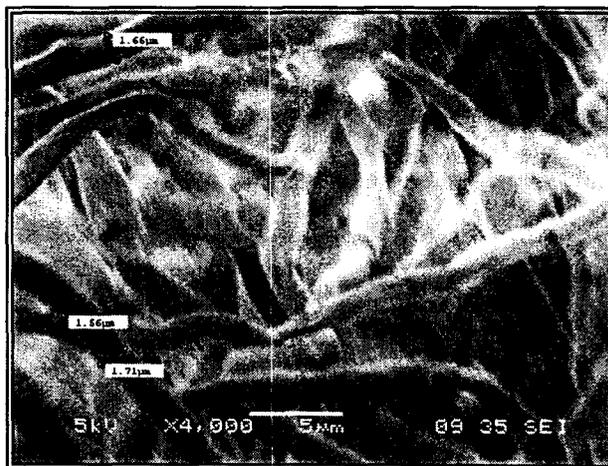


Figura VII.23. Observación de la hifa de la cepa D4 al ME (4000X). El diámetro de la hifa se encuentra alrededor de 1.6 µm.

Como se observa en las gráficas de esta sección el micelio es muy denso, pero permite la difusión de oxígeno y sustrato hacia su interior. Sin embargo, como se menciona al principio de esta sección se sugiere un posterior y extenso estudio sobre la morfología del micelio de *A. niger*.

VII.4. RESISTENCIA A 2DG PARA TODAS LAS CEPAS ANALIZADAS.

Como se menciona en el objetivo general de esta tesis, se desea observar si los patrones de sobreproducción de pectinasas tienen relación con la resistencia a la 2DG en las cepas seleccionadas, debido a esto se utilizaron diferentes concentraciones de 2DG (ver sección VI.13) disuelta en MMP y agar. Los resultados para las cepas haploides y sus respectivos diploides se muestran a continuación. En primer lugar, para demostrar que la sensibilidad a la 2DG no varió en el único auxótrofo que se creó durante esta tesis (Aw99iii arg⁻), en comparación con la cepa original (Aw99iii), se realizó la prueba de sensibilidad a la 2DG para estas dos cepas. En la Figura VII.24 se observa que estas dos cepas muestran un patrón de sensibilidad a 2DG muy parecido, por lo que se puede pensar que la segunda mutación de esta cepa no afectó el patrón de resistencia a este análogo tóxico.

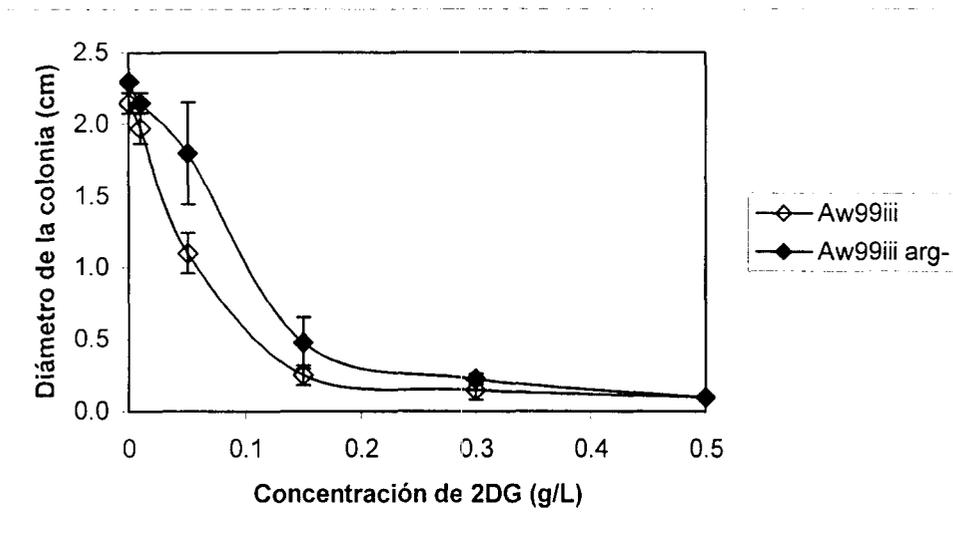


Figura VII.24.- Prueba de sensibilidad a 2DG para la cepa haploide Aw99iii y su auxótrofo Aw99iii arg⁻

La Figura VII.25 muestra que el diploide D4 tiene el mismo patrón que la cepa silvestre, es decir ambas cepas son sensibles a 2DG, lo cual indica que hubo una complementación de la información entre las cepas progenitoras (Aw96-4 y Aw99iii), las cuales mostraron ser resistentes.

VII. RESULTADOS

La cepa que muestra una mayor resistencia a la 2DG es la Aw96-4, puesto que aún a una concentración de 0.5 g/L el diámetro de la colonia es de aproximadamente 0.5 cm y la pendiente del perfil de resistencia a 2DG para esta cepa es mayor que para la cepa Aw99iii, el diploide D4 y la cepa silvestre C28B25. Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por Antier *et al.*, en 1993 y Loera *et al.*, en 1999 (ver sección II.4).

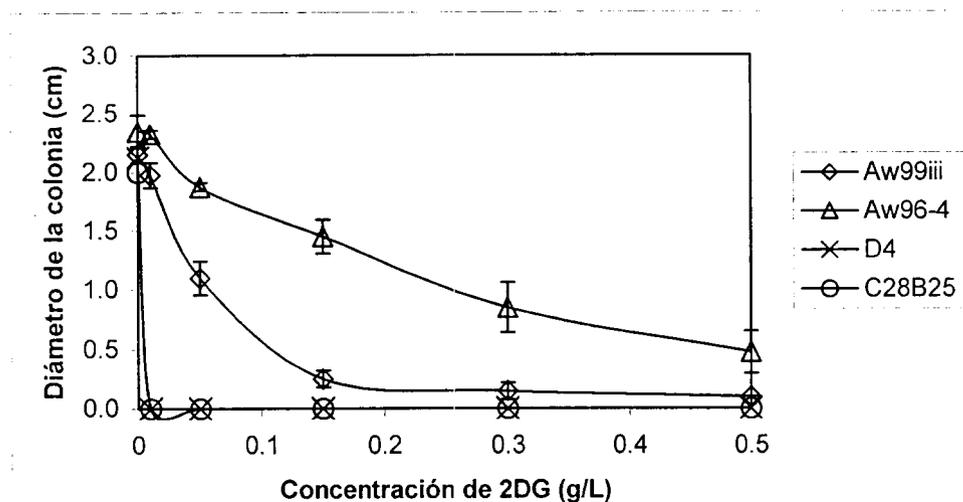


Figura VII.25.- Prueba de sensibilidad a 2DG para el diploide D4 y las cepas que le dieron origen (Aw96-4 y Aw99iii), así como la cepa silvestre C28B25.

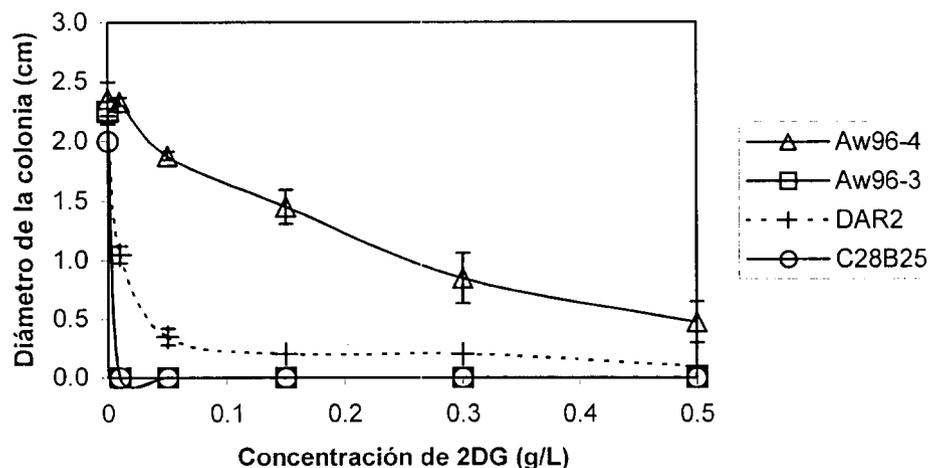


Figura VII.26.- Prueba de sensibilidad a 2DG para el diploide DAR2 y las cepas que le dieron origen (Aw96-4 y Aw96-3), así como la cepa silvestre C28B25.

La Figura VII.26 muestra que la cepa Aw96-3 revirtió al fenotipo silvestre, es decir es sensible a la 2DG, al igual que la cepa C28B25, esto concuerda con lo reportado por Antier *et al.*, en 1993 (ver sección II.4). En contraste, la cepa Aw96-4 fue resistente y el diploide DAR2 resultó poco tolerante a la 2DG, ya que desde una concentración de 0.05 g/L el diámetro de la colonia disminuye hasta 0.35 cm. y después disminuye gradualmente hasta casi cero. En este caso el comportamiento del diploide DAR2 es más parecido al de la cepa haploide Aw96-3, en comparación con la cepa Aw96-4 (cepas progenitoras).

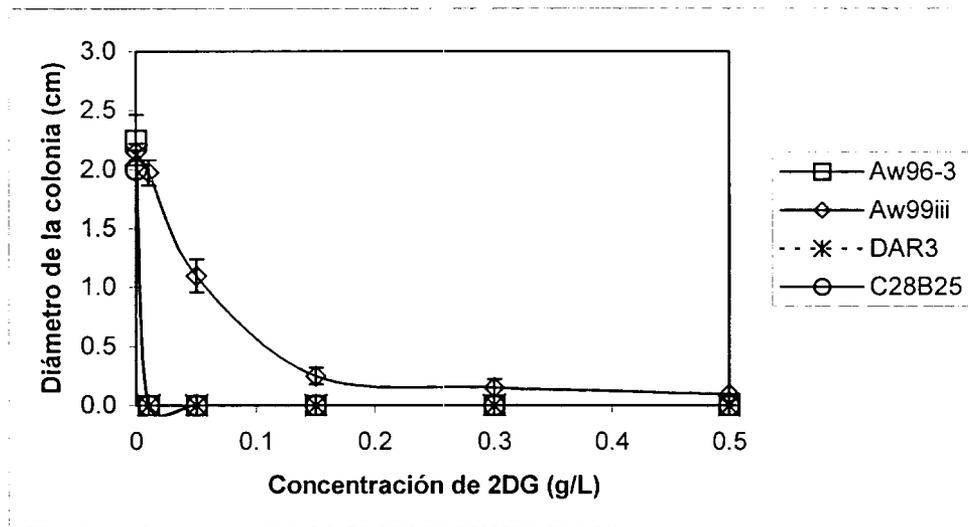


Figura VII.27.- Prueba de sensibilidad a 2DG para el diploide DAR3 y las cepas que le dieron origen (Aw96-3 y Aw99iii), así como la cepa silvestre C28B25.

En la Figura anterior (Figura VII.27) se observa que el diploide DAR3 muestra un patrón de sensibilidad a 2DG muy parecido al de la cepa silvestre C28B25 y al de la cepa Aw96-3, es decir la cepa Aw96-3 muestra un patrón dominante en el diploide DAR3. La cepa Aw9iii muestra cierta resistencia a este análogo tóxico, pero a medida que aumenta la concentración de 2DG disminuye el diámetro de la colonia llegando hasta cero a 0.5 g/L de 2DG.

VII. RESULTADOS

Como se observa en las dos Figuras anteriores (VII.26 y VII.27), la cepa Aw96-3 tiene un fenotipo dominante, pero esto depende de la cepa con la que esté formando el diploide (Aw96-4 o Aw99iii), debido a que se tienen perfiles de resistencia a 2DG diferentes. Lo anterior confirma que las cepas Aw96-4 y Aw99iii tienen *loci* distintos afectados, que les dan la resistencia a 2DG, esto concuerda con lo reportado en 1999 por Loera *et al.*

En resumen, la siguiente tabla indica la resistencia o sensibilidad a 2DG para todas las cepas analizadas (valores máximos tolerados de 2DG), así como los patrones de recesividad, dominancia o complementación en relación con la resistencia a 2DG para los diploides.

Tabla VII.5.- Relación entre la resistencia o sensibilidad a 2DG (valores máximos tolerados) para todas las cepas analizadas y los patrones de recesividad, dominancia o complementación para los diploides.

| Cepa | RESISTENCIA O SENSIBILIDAD A 2DG | PATRÓN DE RESISTENCIA A 2DG |
|-----------------------|---|---|
| C28B25 | Sensible (0 g/L) | Cepa silvestre |
| Aw96-3 | Sensible (0 g/L) | Cepa haploide dominante en el diploide DAR3 y codominante en el diploide DAR2 |
| Aw96-4 | Resistente (0.5 g/L) | Cepa haploide complementaria en el diploide D4 |
| Aw99iii | Resistente (0.5 g/L) | Cepa haploide complementaria en el diploide D4 y recesiva en el diploide DAR3 |
| D4 (Aw96-4*Aw99iii) | Sensible (0 g/L) | Complementación de las cepas progenitoras |
| DAR2 (Aw96-3*Aw96-4) | Resistente (0.5 g/L) | Codominancia de las cepas progenitoras |
| DAR3 (Aw96-3*Aw99iii) | Sensible (0 g/L) | Dominancia de la cepa Aw96-3 |

La tabla VII.5 indica que el diploide D4 resultó sensible a 2DG, al igual que la cepa silvestre, lo cual indica que hubo una complementación de la información entre las cepas progenitoras (Aw96-4 y Aw99iii), ambas resistentes a 2DG (Figura VII.25).

La cepa Aw96-3 mostró ser sensible a 2DG, por el contrario, la cepa Aw96-4 fue resistente y el diploide DAR2 fue poco tolerante a 2DG (Figura VII.26), lo cual indica una codominancia de ambas cepas en el diploide. La cepa Aw96-3 muestra un patrón dominante de resistencia a 2DG en el diploide DAR3, ya que ambas cepas son sensibles a 2DG, a diferencia de la cepa Aw99iii que es resistente a 2DG (Figura VII.27).

VII.5. COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS ENTRE LOS DIPLOIDES Y LAS CEPAS HAPLOIDES PROGENITORAS.

VII.5.1. Comparación de los diploides D4, DAR2 y DAR3 con las cepas haploides progenitoras y la cepa silvestre C28B25.

A continuación se muestran las Figuras que relacionan la producción de pectinasas (actividad volumétrica) en UI/mL para las cepas progenitoras y el diploide correspondiente.

En la Figura VII.28 se observa que en un medio sin glucosa el diploide D4 sobreproduce pectinasas, en comparación con las cepas progenitoras, de acuerdo a lo ya reportado (Loera y Viniegra-González, 1998). Los valores máximos obtenidos fueron de 1.35, 1.18 y 0.78 UI/mL para las cepas D4, Aw99iii y Aw96-4, respectivamente. Los mayores títulos de enzima se detectaron a las 72, 96 y 48 h para las mismas cepas, respectivamente.

VII. RESULTADOS

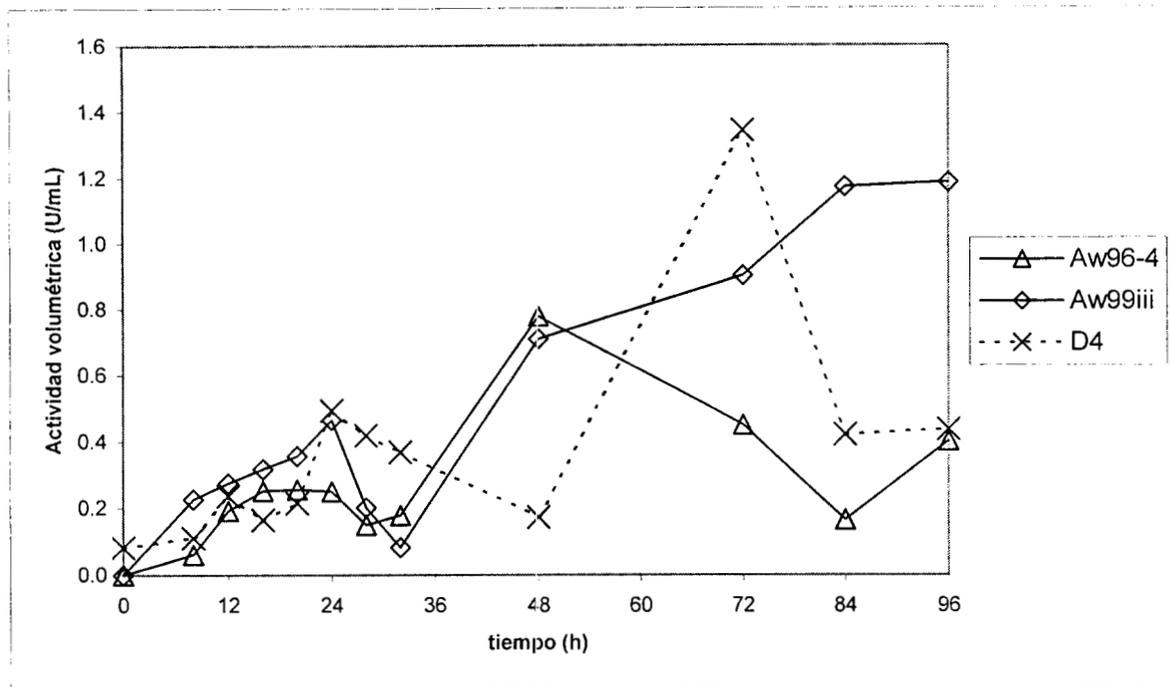


Figura VII.28.- Cinética de pectinasas sin glucosa para los haploides Aw96-4, Aw99iii y el diploide al que dieron origen D4.

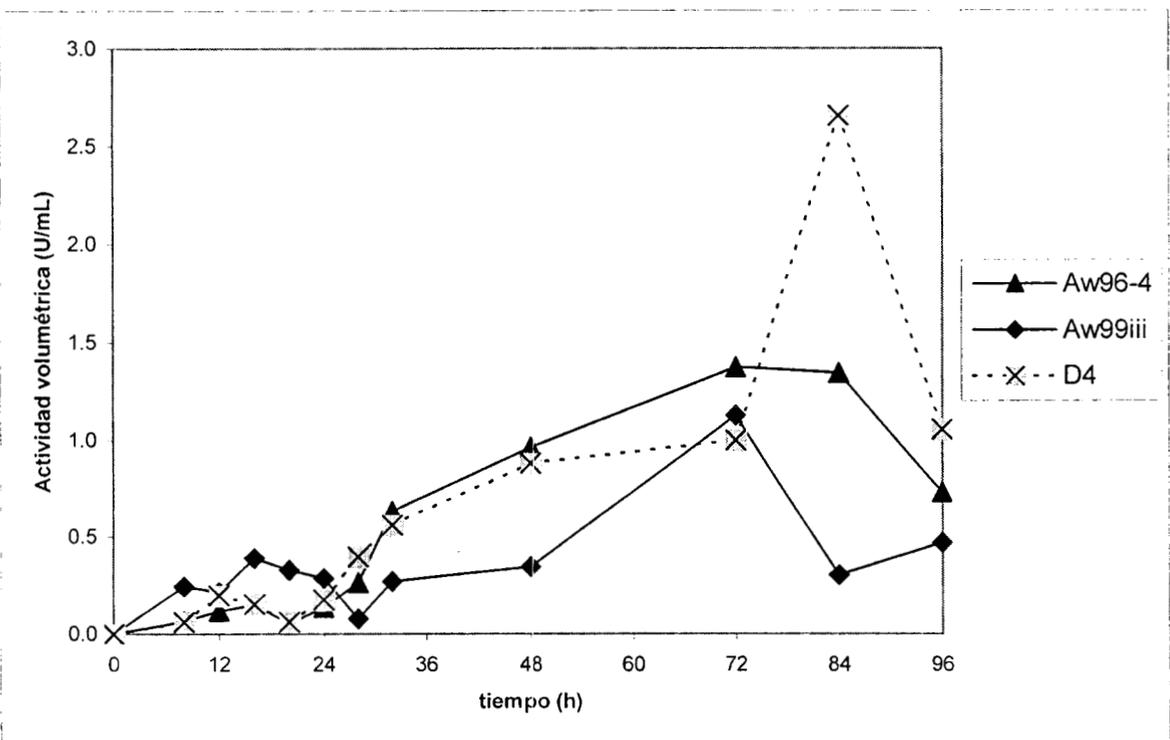


Figura VII.29.- Cinética de pectinasas con glucosa para los haploides Aw96-4, Aw99iii y el diploide al que dieron origen D4.

VII. RESULTADOS

En presencia de glucosa se observa que el D4 sobreproduce pectinasas, teniendo su máximo nivel de producción a las 84 h, de 2.65 UI/mL, en comparación con la cepa Aw96-4, con máxima producción a las 72 h de 1.37 UI/mL y la cepa Aw99iii de 1.13 UI/mL, también a las 72 h (Figura VII.29). Como se observa, la producción de pectinasas por el diploide es mucho mayor que las cepas progenitoras, en particular es 93% mayor que la cepa Aw96-4 y 134% mayor que la cepa Aw99iii.

La Figura VII.30 muestra que los valores de producción máxima de pectinasas se tuvieron a las 48 h para las 3 cepas analizadas en ausencia de glucosa, alcanzando valores de 0.78, 0.42 y 0.38 UI/mL para las cepas Aw96-4, Aw96-3 y DAR2, respectivamente. Es decir, la cepa Aw96-4 sobreproduce pectinasas 85.7% más que la cepa Aw96-3 y 105.3% más que el diploide DAR2.

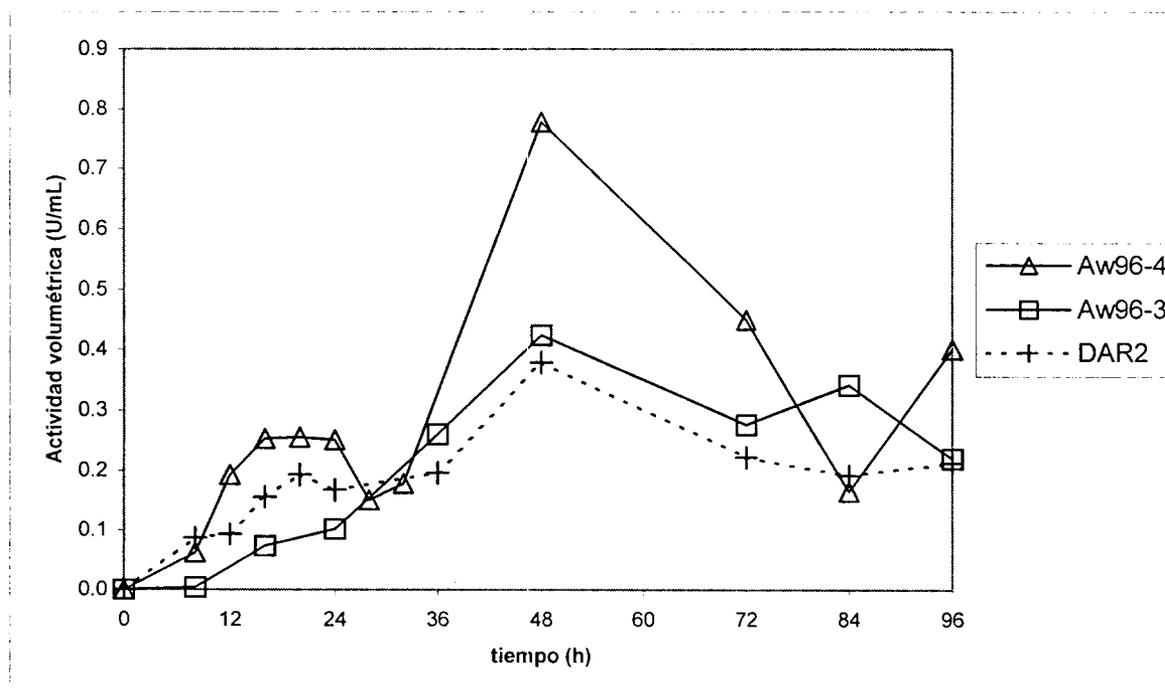


Figura VII.30 .- Cinética de pectinasas sin glucosa para los haploides Aw96-4, Aw96-3 y el diploide al que dieron origen DAR2.

VII. RESULTADOS

A diferencia de la Figura VII.30, en la Figura VII.31 se observa que en presencia de glucosa el diploide DAR2 sobreproduce pectinasas con respecto a las cepas progenitoras Aw96-4 y Aw96-3. La producción máxima para el diploide DAR2 fue de 1.80 UI/mL a las 24 h, mientras que para la cepa Aw96-4 fue de 1.37 UI/mL a las 72 h y para la cepa Aw96-3 fue de 0.30 UI/mL a las 96 h. Esto nos indica un incremento en la producción de pectinasas del diploide DAR2 del 31.4% con respecto a la cepa Aw96-4 y de 500% sobre la cepa Aw96-3.

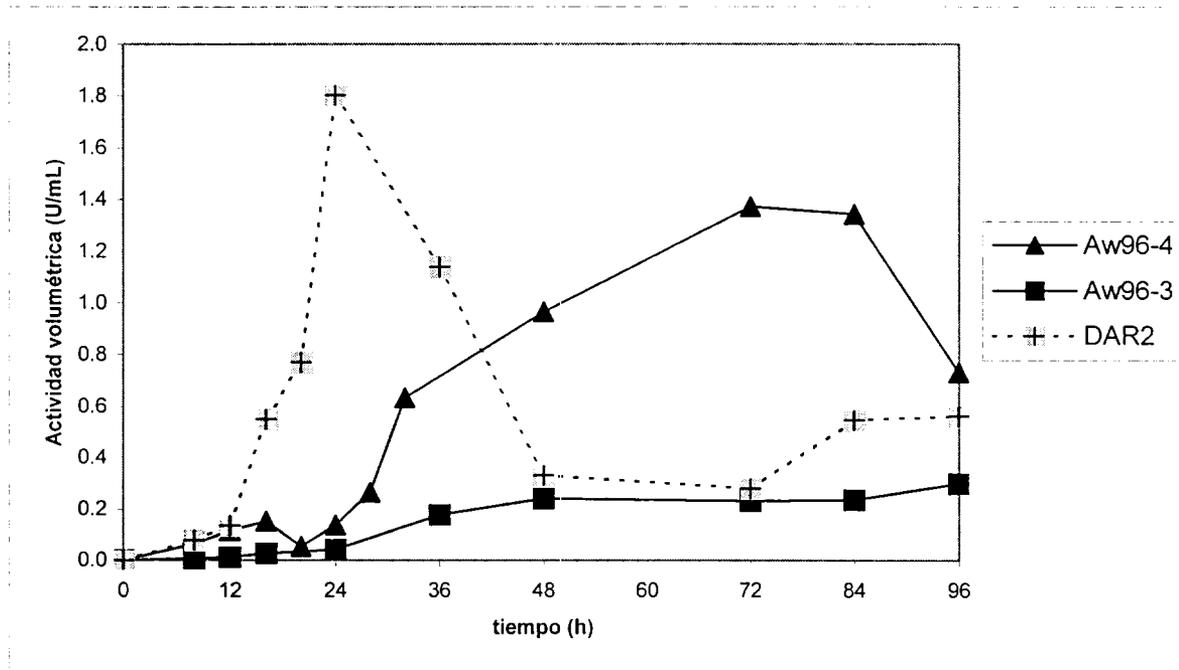


Figura VII.31.- Cinética de pectinasas con glucosa para los haploides Aw96-4, Aw96-3 y el diploide al que dieron origen DAR2.

En la Figura VII.32 se observa el patrón de producción de pectinasas, en un medio sin glucosa para las cepas haploides Aw96-3 y Aw99iii, así como del diploide al que dieron origen. En esta Figura se muestra que la cepa con mayor actividad volumétrica a las 28 horas es el diploide DAR3, con una producción de pectinasas de 0.73 UI/mL.

VII. RESULTADOS

Esta cepa muestra un segundo pico de producción a las 72 horas con una actividad volumétrica de 1.2 UI/mL, mientras que para la cepa Aw96-3 la producción de pectinasas es de 0.1 UI/mL a las 24 horas y de 0.28 UI/mL a las 72 horas. La producción de pectinasas para la cepa Aw99iii es de 0.2 UI/mL a las 28 horas y de 0.9 UI/mL a las 72 horas.

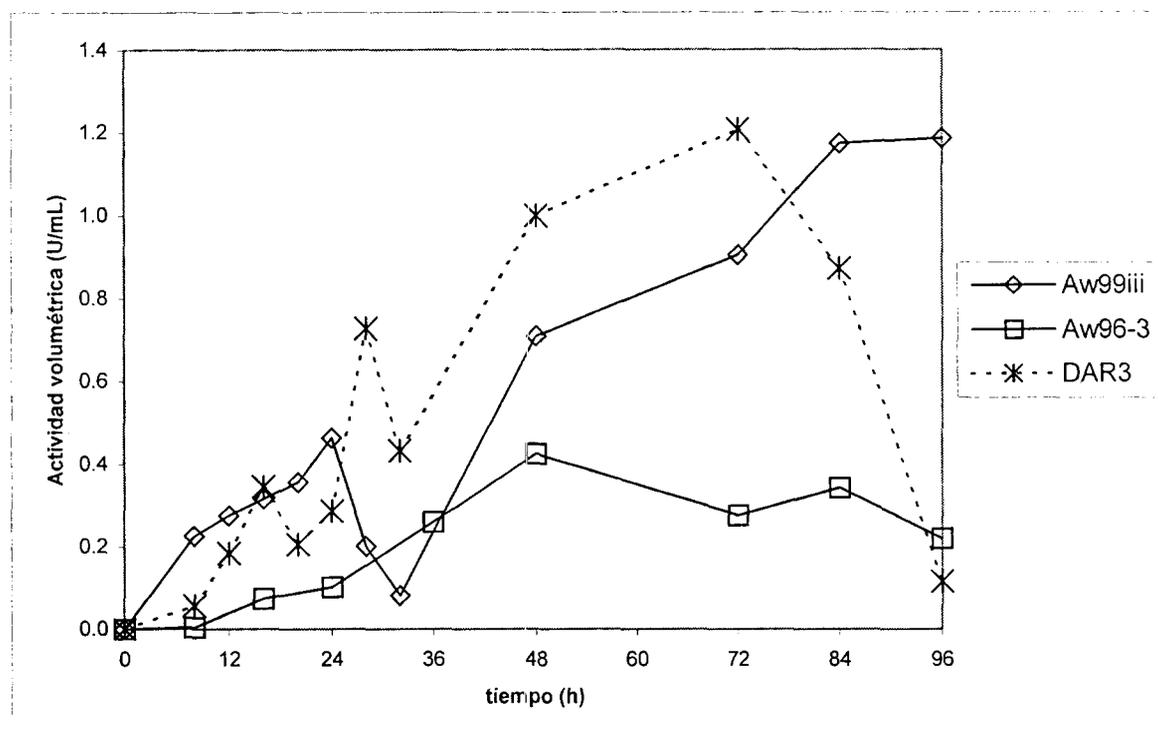


Figura VII.32.- Cinética de pectinasas sin glucosa para los haploides Aw96-3, Aw99iii y el diploide al que dieron origen DAR3.

De acuerdo a los resultados anteriores, el diploide DAR 3 muestra un incremento del 328% en la producción de pectinasas con respecto a la cepa Aw96-3 y del 33% con respecto a la cepa Aw99iii a las 72 horas. Por otro lado, el máximo pico de producción para la cepa Aw96-3 es de 0.42 UI/mL a las 48 horas y para la cepa Aw99iii es de 1.18 UI/mL a las 96 horas.

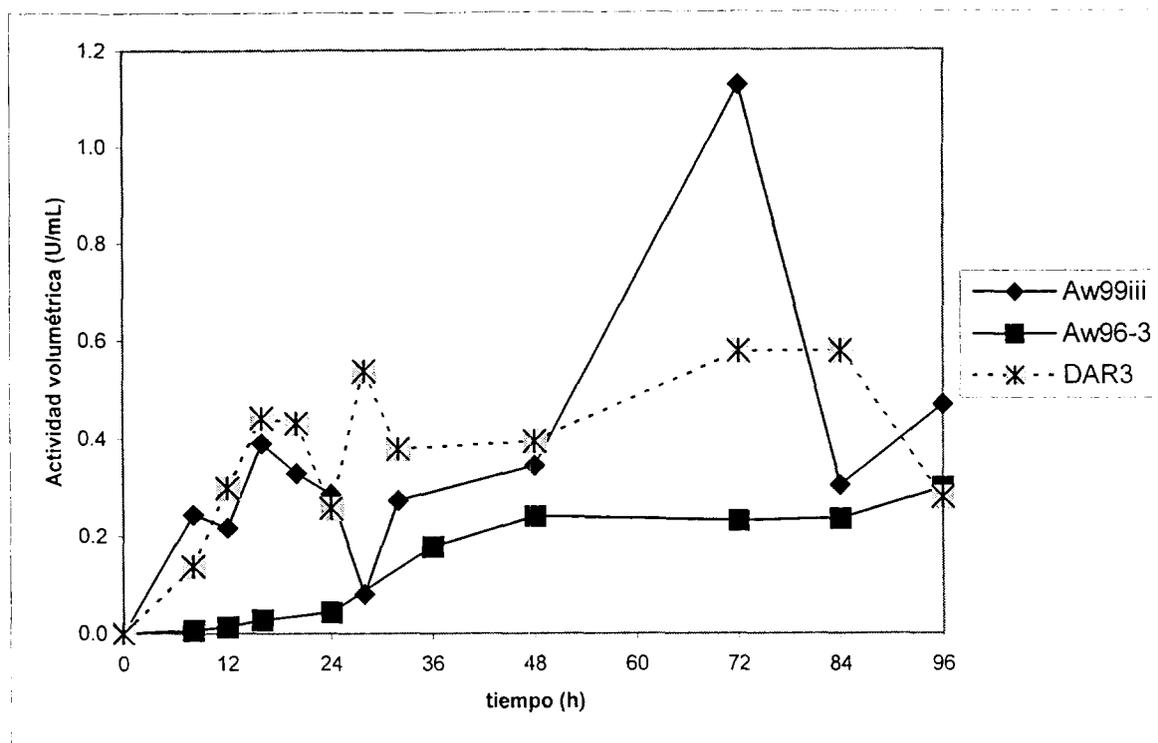


Figura VII.33.- Cinética de pectinasas con glucosa para los haploides Aw96-3, Aw99iii y el diploide al que dieron origen DAR3.

En la Figura VII.33 se observa que en presencia de glucosa la cepa que más produce pectinasas es la Aw99iii a las 72 horas con una producción de 1.13 UI/mL, mientras que en el mismo periodo de tiempo la cepa Aw96-3 produce 0.23 UI/mL y el diploide DAR3 produce 0.58 UI/mL. De acuerdo a esto, la cepa Aw99iii sobreproduce pectinasas con un incremento del 94 % sobre la cepa DAR3 y del 391% sobre la cepa Aw96-3. El pico de producción para el diploide DAR3 es de 0.58 UI/mL a las 72 horas y para la cepa Aw96-3 es de 0.3 UI/mL a las 96 horas.

Las siguientes 3 gráficas (Figuras VII.34. VII.35 y VII.36) resumen la comparación en la producción de pectinasas para los 3 diploides analizados, en comparación con la cepa silvestre y las cepas haploides que los originaron.

VII. RESULTADOS

En la Figura VII.34 se observa la producción de pectinasas a las 72 h para las cepas C28B25 (silvestre), Aw96-4, Aw99iii y el diploide (D4) correspondiente a la cruce de estas dos últimas cepas, en un medio sin glucosa y a las 84 horas en un medio con glucosa. En esta misma Figura se muestra que la producción de pectinasas a las 72 h en ausencia de glucosa (barras blancas) es mayor para el diploide D4, en comparación con las cepas progenitoras y la cepa silvestre. El diploide D4 tiene una actividad de 1.34 UI/mL, es decir, 2 veces mayor que la cepa silvestre, 3 veces mayor que la cepa Aw96-4 y 1.5 veces mayor que la cepa Aw99iii. En presencia de glucosa (barras oscuras) la producción de pectinasas a las 84 h es mayor para el diploide D4, obteniendo una actividad de 2.66UI/mL, esta actividad es 2.5 veces mayor que la cepa silvestre, 2 veces mayor que la cepa Aw96-4 y 8.7 veces mayor que la cepa Aw99iii.

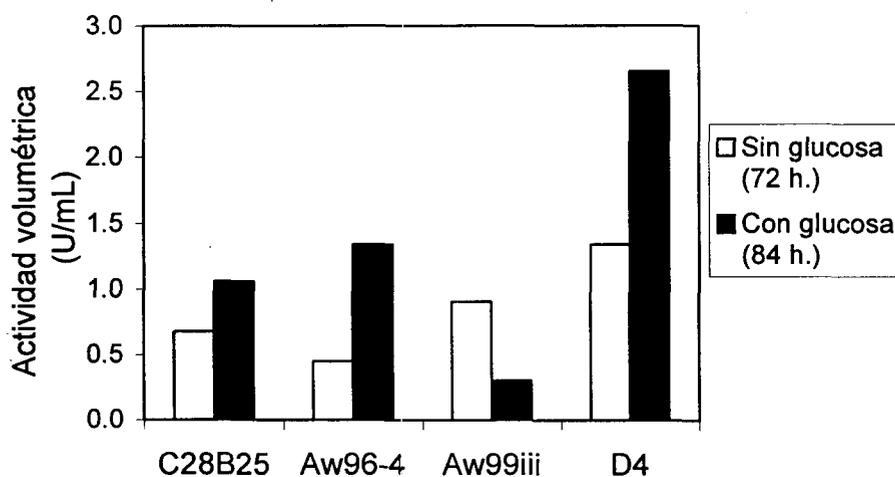


Figura VII.34.- Producción de pectinasas a las 72 h para las cepas C28B25, Aw96-4, Aw99iii y D4 sin glucosa, y a las 84 h con glucosa.

En la Figura VII.35 se observa la producción de pectinasas a las 24 h para las cepas C28B25 (silvestre), Aw96-4, Aw96-3 y el diploide correspondiente a la cruce de estas dos últimas cepas (DAR2), tanto en un medio sin glucosa, como con glucosa.

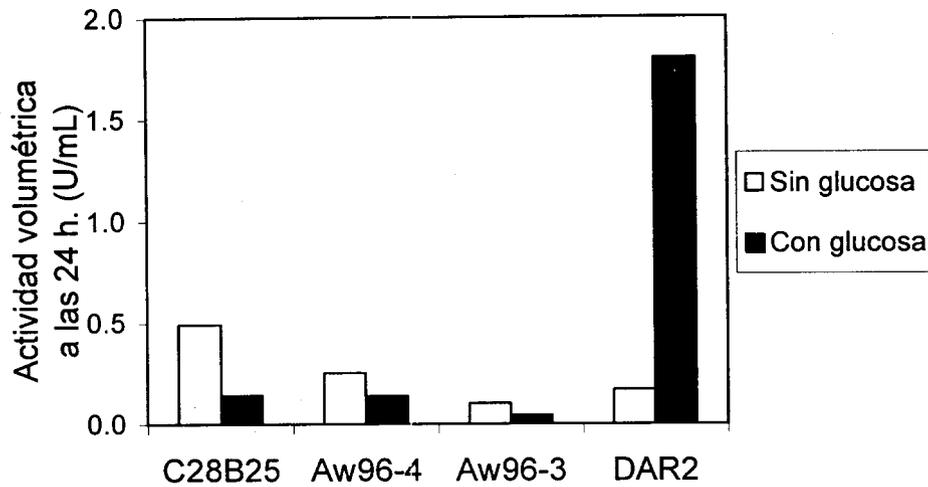


Figura VII.35.- Producción de pectinasas a las 24 h Para las cepas C28B25, Aw96-4, Aw96-3 y DAR2, en presencia y ausencia de glucosa.

Como se observa en la Figura anterior, la producción de pectinasas disminuye en presencia de glucosa para todas las cepas estudiadas a las 24 h, excepto para el diploide DAR2, en el cual la actividad es 10 veces mayor en presencia este azúcar, además es 7 y 17 veces mayor que las cepas que le dieron origen (Aw96-4 y Aw96-3, respectivamente) y 3 veces más grande que la cepa silvestre.

En la Figura VII.36 se muestra la producción de pectinasas a las 24 h para las cepas C28B25 (silvestre), Aw96-3, Aw99iii y el diploide correspondiente a la cruce de estas dos últimas cepas (DAR3), tanto en un medio sin glucosa, como con glucosa. En esta misma Figura se observa que la producción de pectinasas disminuye en presencia de glucosa para todas las cepas estudiadas, sin embargo, para el diploide DAR3 el cambio no es muy grande, en comparación con la cepa silvestre C28B25, para la cual el porcentaje de cambio es muy grande.

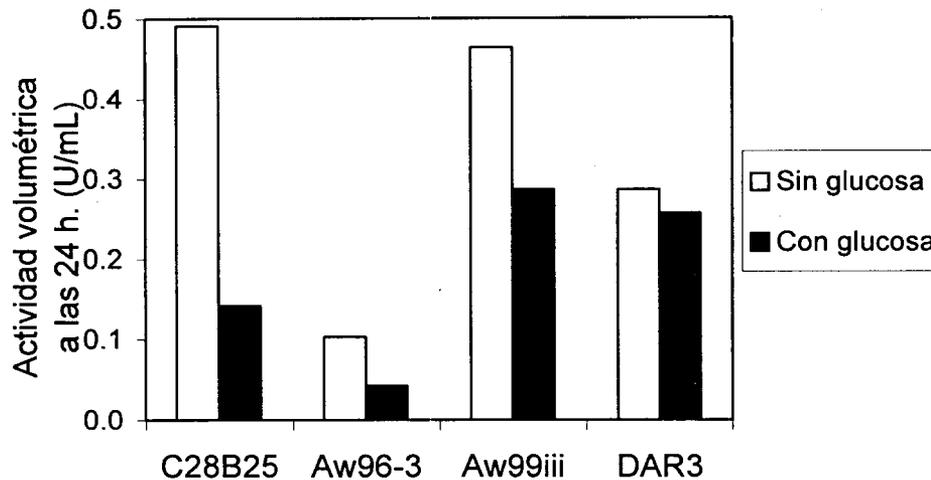


Figura VII.36.- Producción de pectinasas a las 24 h Para las cepas C28B25, Aw96-3, Aw99iii y DAR3, en presencia y ausencia de glucosa.

Finalmente, de acuerdo a las gráficas anteriores, podemos decir que en un medio sin glucosa (Pectina 1% como única fuente de carbono) la cepa que tiene la mayor actividad volumétrica es el diploide D4, a las 72 h (1.34 UE / mL), pero también la cepa Aw99iii presenta una alta actividad volumétrica a las 84 h (1.17 UE / mL). Con respecto a los diploides DAR2 y DAR3, el máximo título de enzima se obtuvo a las 48 h (0.38 UI/mL) y 72 h (1.2 UI/mL), respectivamente.

En un medio con glucosa (Pectina 1% + Glucosa 0.5% como fuentes de carbono) la cepa que presentó la mayor actividad volumétrica es también el diploide D4 a las 84 h (2.66 UE / mL), sin embargo, el diploide DAR2 presentó una elevada actividad volumétrica en tan solo 24 h (1.8 UE / mL), siendo la cepa con mayor actividad en este tiempo. Con respecto al diploide DAR3, el máximo título de enzima se presentó a las 72 h (0.58 UI/mL), sin embargo el primer pico de producción de enzima ocurrió a las 28 h y la actividad volumétrica fue muy parecida (0.54 UI/mL), por lo que este último dato se utilizó para calcular la productividad.

Al calcular la productividad de los tres diploides se obtuvieron los siguientes datos:

VII. RESULTADOS

Tabla VII.7.- Cálculo del rendimiento $Y_{E/X}$ (UI de enzima/g de Biomasa) y porcentaje de cambios para todas las cepas analizadas en los dos diferentes medios (ver Figura VI.1).

| Cepa | $Y_{E/X}$ Sin glucosa (A) | $Y_{E/X}$ Con glucosa (B) | Cambios % ((B-A)/A)*100 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| C28B25 | 1638 | 121 | - 93 |
| Aw96-3 | 632 | 74 | - 88 |
| Aw96-4 | 2562 | 614 | - 76 |
| Aw99iii | 1916 | 3405 | +78 |
| D4 (Aw99iii*Aw96-4) | 1619 | 1793 | +11 |
| DAR2 (Aw96-3*Aw96-4) | 543 | 987 | +82 |
| DAR3 (Aw96-3*Aw99iii) | 2447 | 1362 | - 44 |

Los resultados anteriores muestran que la cepa más reprimida fue la cepa silvestre C28B25 (grado de represión de - 93 %) y la más desreprimida fue la cepa DAR2 (grado de represión de + 82 %). Sin embargo, las cepas que presentan el mayor rendimiento $Y_{E/X}$ son la Aw96-4 en un medio sin glucosa (2562 UE/gX), y la Aw99iii en un medio con glucosa (3405 UE/gX).

Las cepas Aw99iii, D4 y DAR2 se encuentran desreprimidas catabólicamente, ya que su porcentaje de cambio es positivo, lo cual significa que el rendimiento de enzima por gramo de biomasa ($Y_{E/X}$) en un medio con glucosa es mayor al rendimiento en un medio sin glucosa, en los tiempos iniciales de la fermentación. Las cepas C28B25, Aw96-4, Aw96-3 y DAR3, tienen un porcentaje de cambio negativo, debido a que el rendimiento de pectinasas disminuye considerablemente en un medio con glucosa, con respecto al valor obtenido con sólo pectina, por lo que estas cepas se encuentran fuertemente reprimidas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Romero-Gómez *et al.*, (2000) y Díaz-Godínez *et al.*, (2001) acerca de que en FEL existe represión catabólica.

Las cepas Aw99iii y D4 están desreprimidas catabólicamente, lo cual muestra un patrón dominante de la cepa Aw99iii en el diploide D4, esto coincide con lo reportado por Loera *et al.*, (1999), además este tipo de cepas son interesantes, por los niveles altos de enzima producida aún en presencia de azúcares más fácilmente asimilables y más económicos, como la glucosa.

VII. RESULTADOS

Las cepas Aw96-4 y Aw96-3 son sensibles a la represión catabólica, sin embargo, el diploide al que dieron origen (DAR2) se encuentra desreprimido, puesto que en un medio con glucosa (Pectina 1% + Glucosa 0.5%) se observa que la cepa DAR2 sobreproduce pectinasas, en comparación con las cepas que le dieron origen (Aw96-4 y Aw96-3).

El diploide DAR3, obtenido de la cruce parasexual de la cepa Aw96-3 (reprimida) y Aw99iii (desreprimida) mostró un patrón dominante de la cepa Aw96-3, en cuanto a represión catabólica, es decir se encuentra reprimido.

Los resultados anteriores se resumen en la tabla VII.8, la cual muestra los patrones de represión catabólica en los diploides y las cepas que tienen un patrón dominante o recesivo en los mismos. Para el caso del diploide DAR2, los mecanismos de represión catabólica son más complejos, y no pueden entenderse mediante el análisis del porcentaje de cambios, mostrado en la tabla VII.7.

Tabla VII.8.- Patrones de represión catabólica para todas las cepas analizadas.

| Cepa | PATRÓN DE REPRESIÓN CATABÓLICA |
|-----------------------|---|
| C28B25 | Reprimida (- 93%). |
| Aw96-3 | Reprimida (- 88%). Patrón dominante en el diploide DAR3. |
| Aw96-4 | Reprimida (- 76%). Patrón recesivo en el diploide D4. |
| Aw99iii | Desreprimida (+78%). Patrón dominante en el diploide D4. Patrón recesivo en el diploide DAR3. |
| D4 (Aw96-4*Aw99iii) | Desreprimida (+11%) |
| DAR2 (Aw96-3*Aw96-4) | Desreprimida (+82%) |
| DAR3 (Aw96-3*Aw99iii) | Reprimida (- 44%) |

En la tabla VII.9 se muestra que los valores promedio de $Y_{E/X}$ (el promedio de los valores de $Y_{E/X}$ para las cepas progenitoras) para los diploides D4 y DAR2 son más altos que los valores observados para los diploides, en ausencia de glucosa.

VII. RESULTADOS

Tabla VII.9.- Comparación de los valores observados de $Y_{E/X}$ para los diploides con respecto a los promedios de $Y_{E/X}$ para las cepas progenitoras en los dos diferentes medios.

| Diploide | $Y_{E/X}$ promedio sin glucosa | $Y_{E/X}$ observada sin glucosa | $Y_{E/X}$ promedio Con glucosa | $Y_{E/X}$ observada con glucosa |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| D4 (Aw96-4*Aw99iii) | $(2562 + 1916)/2 =$ 2239 | 1619 | $(614 + 3405) =$ 2009 | 1793 |
| DAR2 (Aw96-3*Aw96-4) | $(632 + 2562)/2 =$ 1597 | 543 | $(74 + 614) =$ 344 | 987 |
| DAR3 (Aw96-3*Aw99iii) | $(632 + 1916)/2 =$ 1274 | 2447 | $(74 + 3405) =$ 1739 | 1362 |

La tabla anterior muestra que en presencia de glucosa, los valores promedio de $Y_{E/X}$ son mayores que los observados para los diploides D4 y DAR3. Sin embargo, para los diploides DAR3 y DAR2 los valores promedio de $Y_{E/X}$ son menores que los valores observados, en ausencia y presencia de glucosa respectivamente. Esto significa que $Y_{E/X}$ no es una propiedad aditiva, sino de mecanismos complejos de la regulación genética a nivel molecular.

En esta misma tabla se observa que en ausencia de glucosa, la cepa haploide más débil (menor valor de $Y_{E/X}$) es la Aw96-3 (632 UI/gX), y la más fuerte (mayor valor de $Y_{E/X}$) es la Aw96-4 (2562 UI/gX). El diploide más débil es el DAR2 (543 UI/gX) y el diploide más fuerte es el DAR3 (2447 UI/gX). Por lo tanto, el diploide DAR2, obtenido por la cruce parasexual de las cepas Aw96-3 y Aw96-4), es decir la más débil con la más fuerte, no siempre se obtienen los mismos resultados. Esto quiere decir que los mecanismos son complejos y no se pueden entender a partir del fenotipo $Y_{E/X}$, sino que se requiere entender la regulación genética a nivel molecular.

A continuación se muestran las gráficas obtenidas para el análisis del rendimiento $Y_{E/X}$ para todas las cepas analizadas, en presencia y ausencia de glucosa. En las mismas gráficas se puede observar la pendiente, es decir el valor del rendimiento en unidades internacionales de enzima por gramo de biomasa (UI/gX). También se muestra el coeficiente R^2 para cada caso.

VII. RESULTADOS

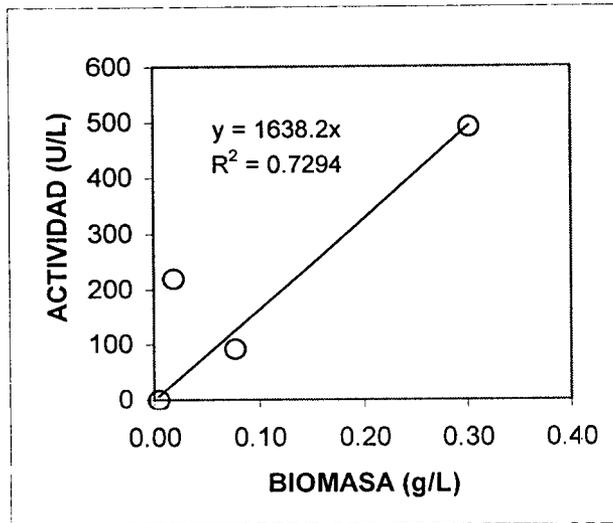


Figura VII.37.- Rendimiento Y_{EX} para la cepa C28B25 sin glucosa.

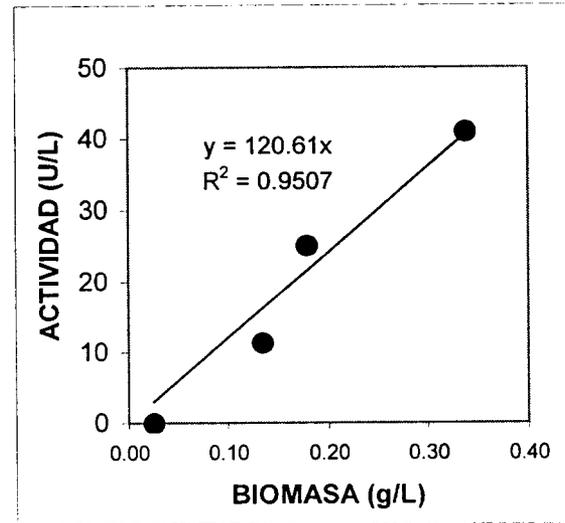


Figura VII.38.- Rendimiento Y_{EX} para la cepa C28B25 con glucosa.

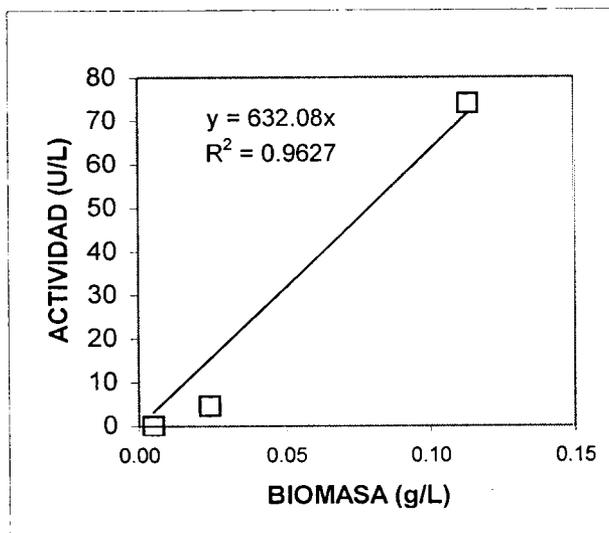


Figura VII.39.- Rendimiento Y_{EX} para la cepa Aw96-3 sin glucosa.

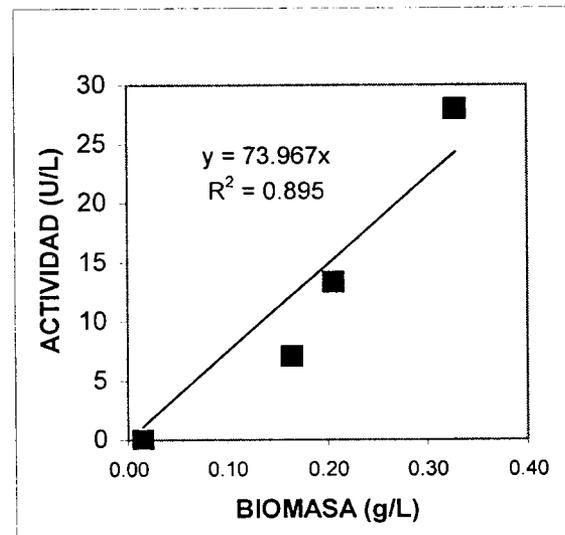


Figura VII.40.- Rendimiento Y_{EX} para la cepa Aw96-3 con glucosa.

VII. RESULTADOS

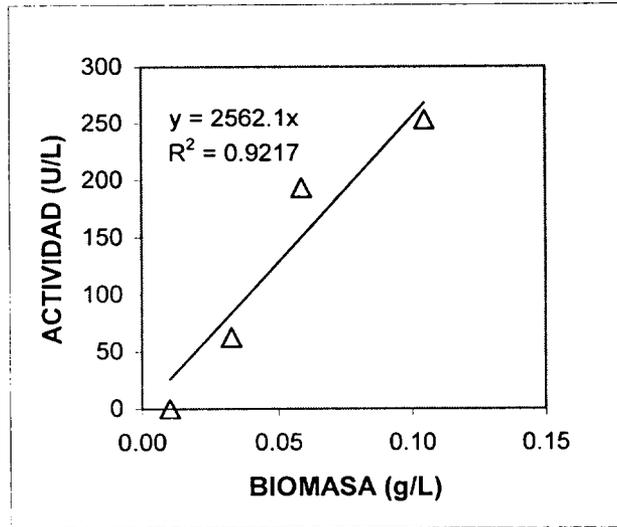


Figura VII.41.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw96-4 sin glucosa.

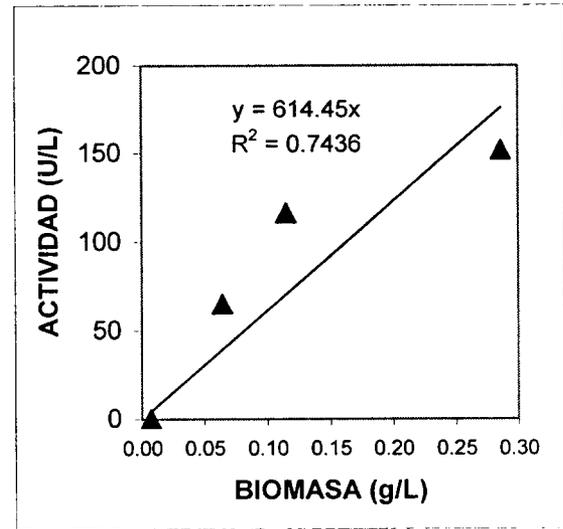


Figura VII.42.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw96-4 con glucosa.

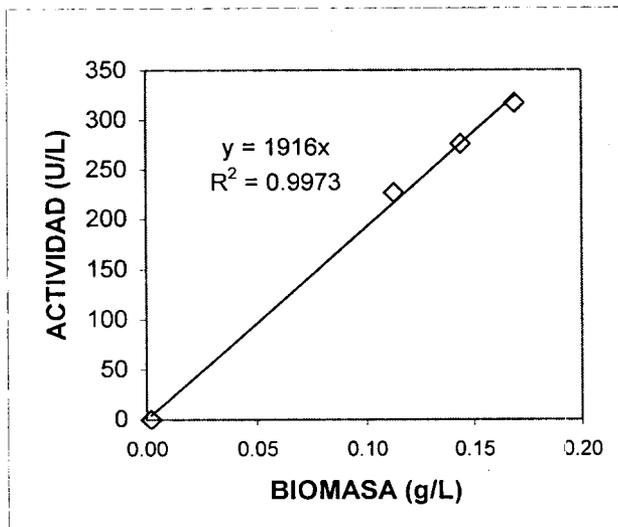


Figura VII.43.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw99iii sin glucosa.

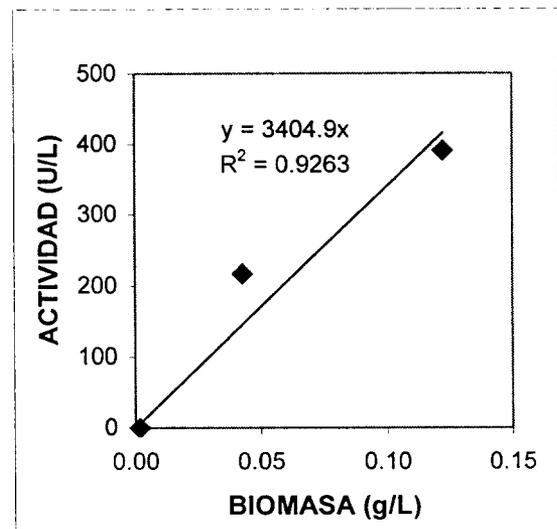


Figura VII.44.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa Aw99iii con glucosa.

VII. RESULTADOS

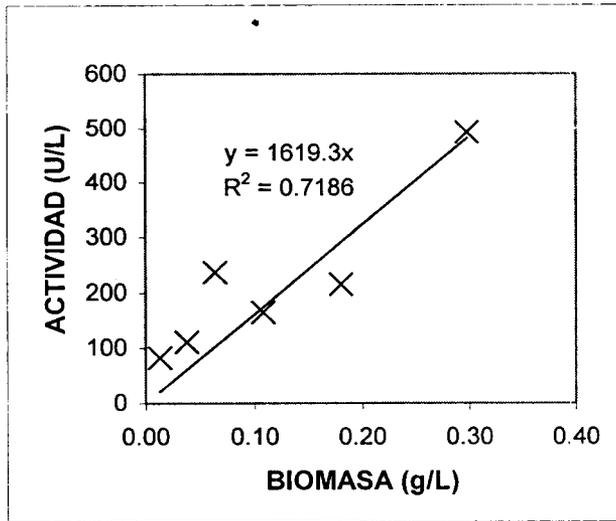


Figura VII.45.- Rendimiento Y_{EX} para la cepa D4 sin glucosa.

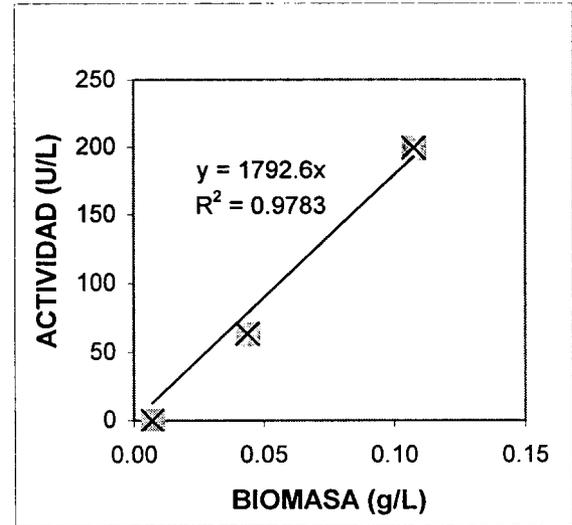


Figura VII.46.- Rendimiento Y_{EX} para la cepa D4 con glucosa.

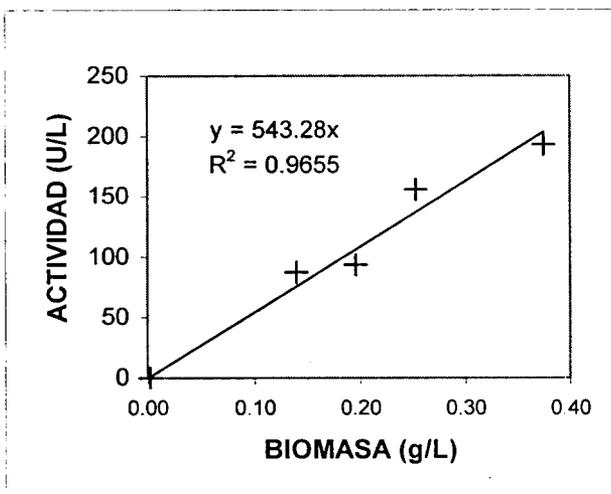


Figura VII.47.- Rendimiento Y_{EX} para la cepa DAR2 sin glucosa.

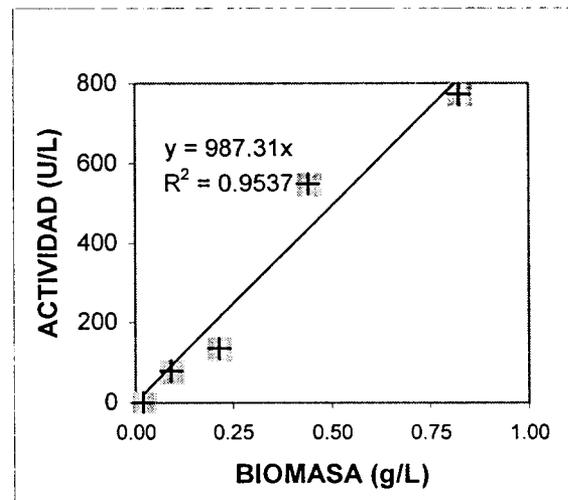


Figura VII.48.- Rendimiento Y_{EX} para la cepa DAR2 con glucosa.

VII. RESULTADOS

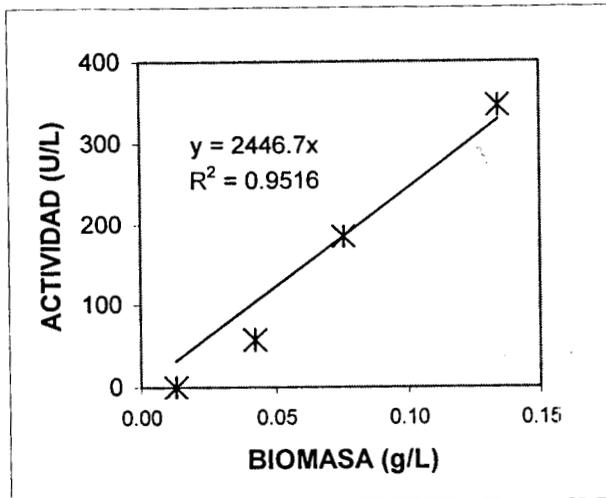


Figura VII.49.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa DAR3 sin glucosa.

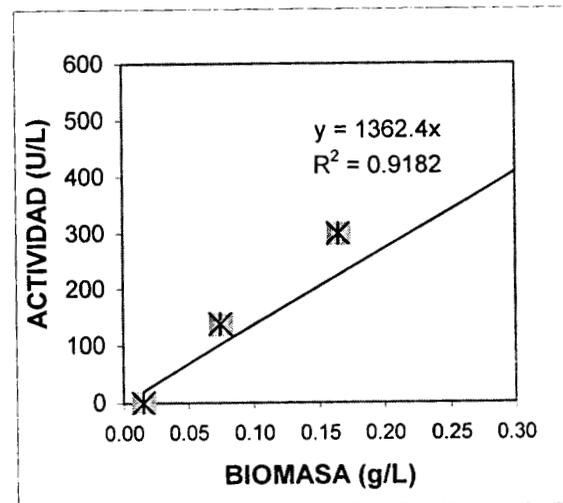


Figura VII.50.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para la cepa DAR3 con glucosa.

Para poder comparar el rendimiento $Y_{E/X}$ de las cepas haploides con los diploides, las gráficas anteriores se agruparon en las 4 siguientes figuras:

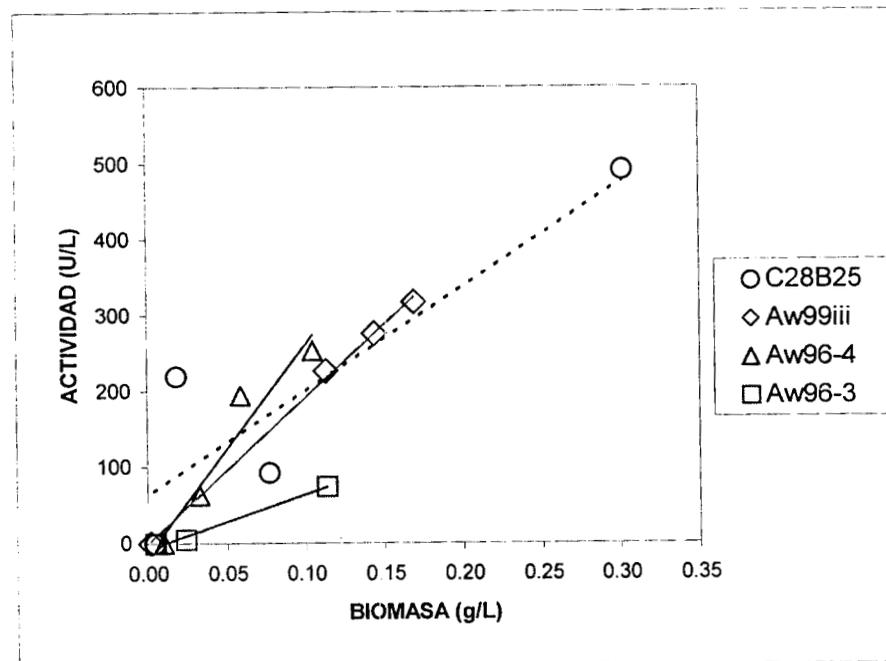


Figura VII.51.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para las cepas haploides: C28B25, Aw99iii, Aw96-4 y Aw96-3 en ausencia de glucosa.

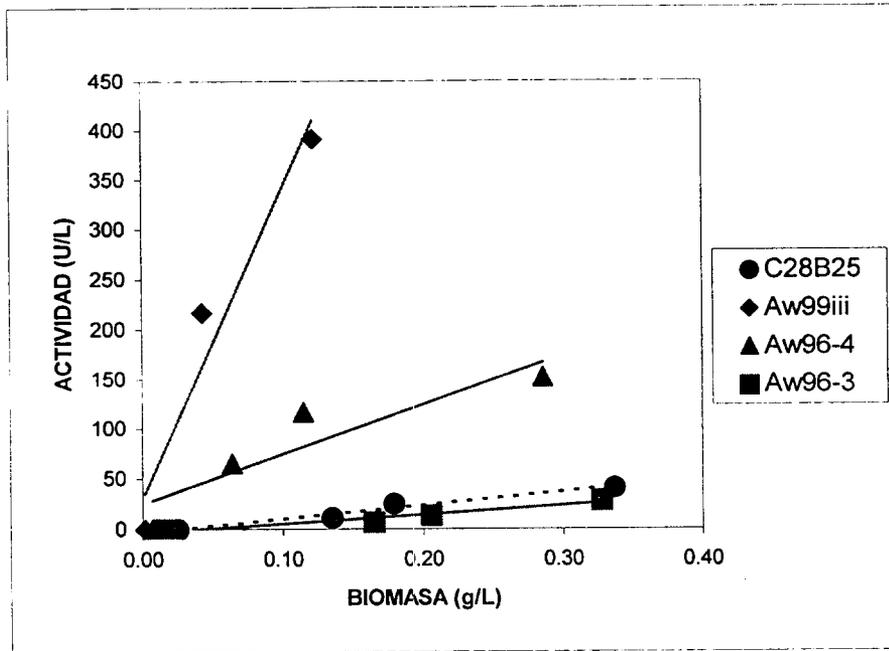


Figura VII.52.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para las cepas haploides: C28B25, Aw99iii, Aw96-4 y Aw96-3 en presencia de glucosa.

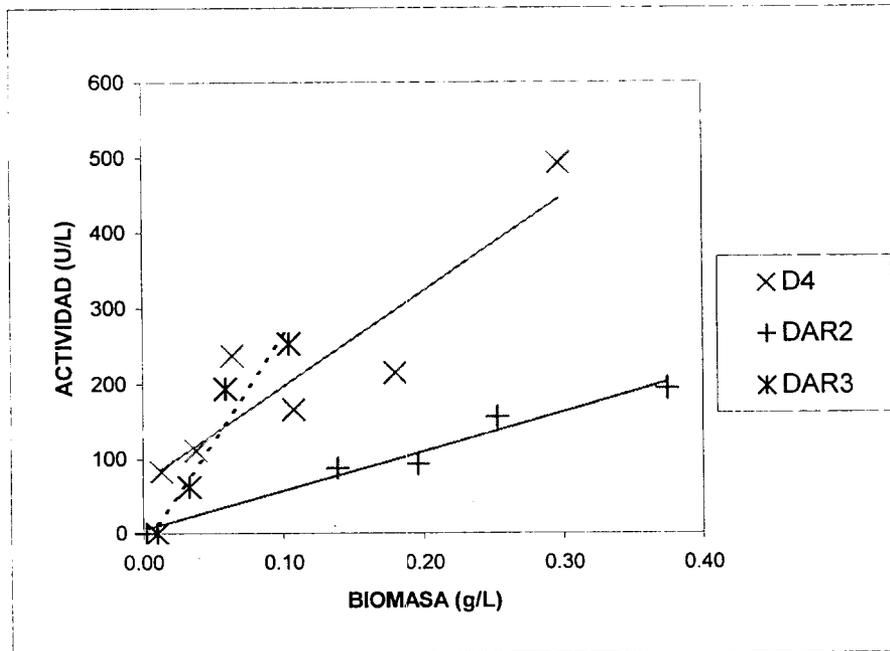


Figura VII.53.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para las cepas diploides: D4, DAR2 y DAR3 en ausencia de glucosa.

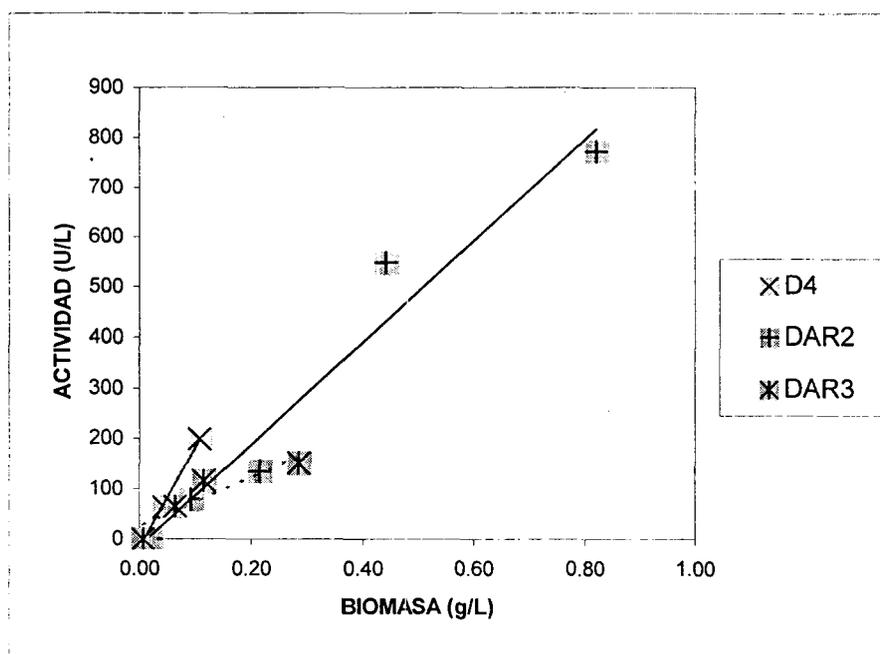


Figura VII.54.- Rendimiento $Y_{E/X}$ para las cepas diploides: D4, DAR2 y DAR3 en presencia de glucosa.

Las Figuras VII.51, VII.52, VII.53 y VII.54 muestran claras diferencias en la forma de las curvas. Por ejemplo, en la Figura VII.51 (en ausencia de glucosa) se observa claramente que la cepa con menor pendiente y por lo tanto con menor rendimiento es la Aw96-3 y la de mayor pendiente es la Aw96-4. En presencia de glucosa (Figura VII.52), las diferencias entre las pendientes son más notables. La cepa que muestra una menor pendiente es la Aw96-3 y la de mayor pendiente es la Aw99iii.

Para los diploides es a la inversa, la diferencia es más notable en ausencia de glucosa, siendo el diploide DAR2 el de menor pendiente y el diploide DAR3 el de pendiente mayor. En presencia de glucosa, la pendiente menor la muestra el diploide DAR3 y la mayor el diploide D4. Es decir, existen diferencias notables en el comportamiento de los valores del rendimiento $Y_{E/X}$ entre las cepas haploides y los diploides.

VII. RESULTADOS

A continuación se presentan las Figuras VII. 55 y VII.56, las cuales muestran las gráficas que establecen la correlación entre el rendimiento $Y_{E/X}$ vs μ , para todas las cepas analizadas en ausencia y presencia de glucosa. En presencia de glucosa (Figura VII.56) se observa claramente como las cepas haploides forman grupos distintos de los diploides, estos grupos se encuentran marcados con elipses, aunque la cepa Aw99iii queda fuera del grupo de las haploides. Sin embargo, se observa que para esta cepa el crecimiento es más rápido, es decir tiene una μ mayor, al igual que un mayor rendimiento $Y_{E/X}$ a comparación de las demás cepas. En esta misma gráfica se observa que las cepas con mayor rendimiento $Y_{E/X}$ son todas las cepas diploides y la cepa haploide Aw99iii.

En un medio sin glucosa la diferencia no es muy clara, sin embargo si existen grupos entre diploides (a la izquierda en la gráfica) y los diploides (a la derecha en la gráfica). En este caso, las cepas con mayor rendimiento $Y_{E/X}$ son la Aw96-4 y el diploide DAR3.

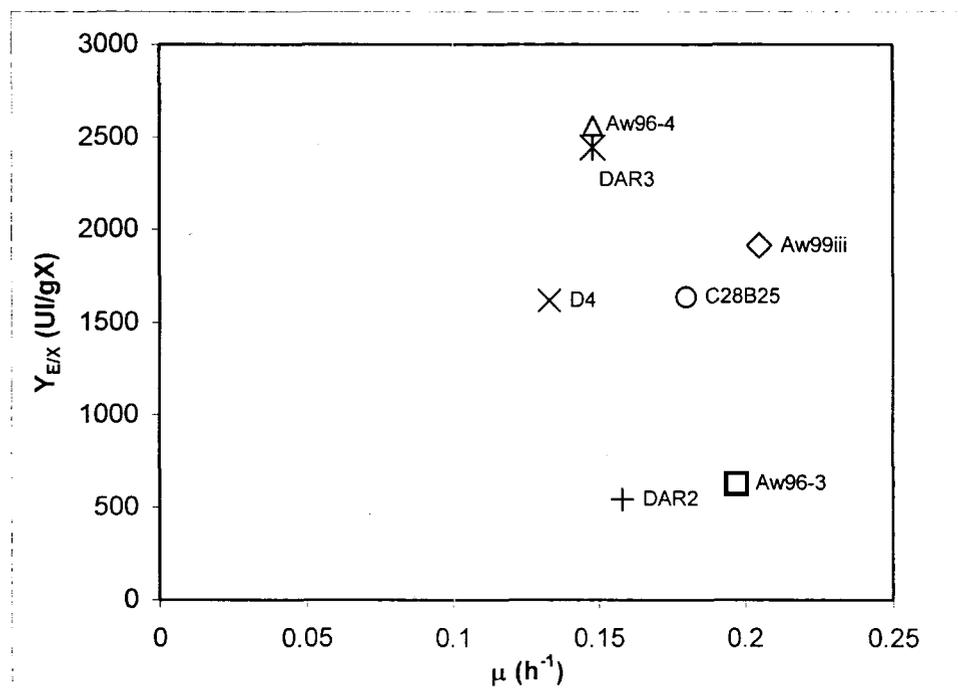


Figura VII.55.- Gráfica del Rendimiento $Y_{E/X}$ vs μ para todas las cepas en ausencia de glucosa.

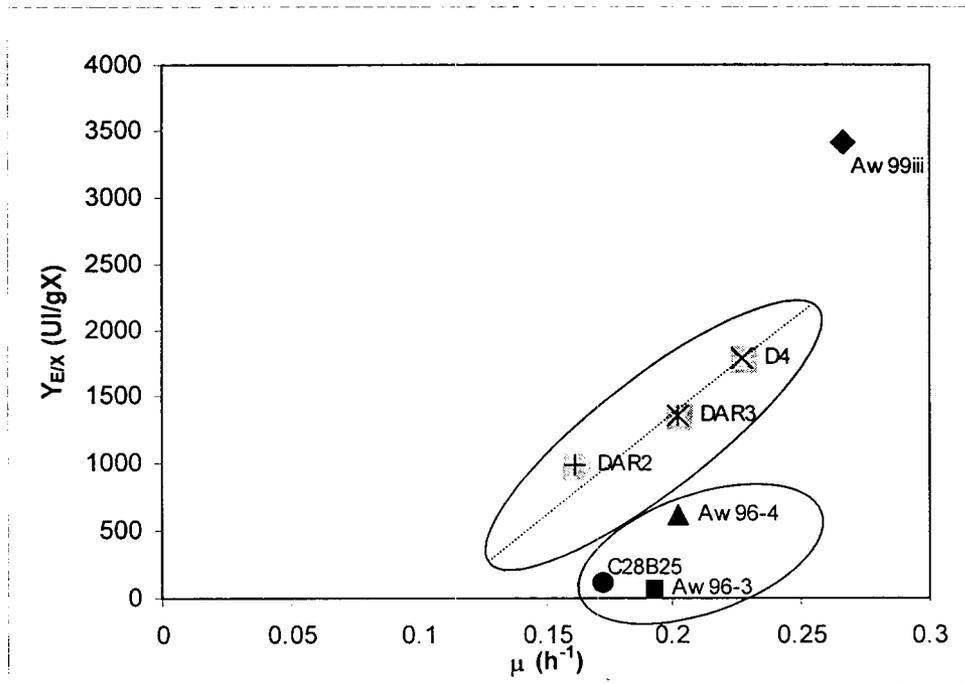


Figura VII.56.- Gráfica del Rendimiento Y_{EX} vs μ para todas las cepas en presencia de glucosa.

En el siguiente capítulo se discutirán los resultados presentados en esta sección.

VIII. DISCUSIÓN

A continuación se discuten los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis. De acuerdo a la sección IV, se cumplieron todos los objetivos, uno de los cuales fue crear una cepa auxótrofa a arginina a partir de la cepa Aw99iii, la cual se obtuvo mediante la mutagénesis con luz UV, seguida de un proceso de enriquecimiento y una prueba de auxotrofia (ver sección VII.1.1). Asimismo se logró obtener un diploide (DAR3) a partir de la cruce parasexual de las cepas Aw99iii y Aw96-3 (ver sección VII.1.2).

Con respecto a la obtención del auxótrofo a arginina Aw99iiiarg⁻, el proceso de enriquecimiento es un método adecuado para seleccionar auxótrofos, debido a que al adicionarle arginina al medio se facilita la selección de mutantes auxótrofos y la filtración es un buen método para la separación de las esporas que no son auxótrofas a arginina.

La sensibilidad a la 2DG no varió para el auxótrofo Aw99iii arg⁻, en comparación con la cepa original (Aw99iii), es decir, la segunda mutación no afectó el patrón de sensibilidad a 2DG (Figura VII.24).

En lo que se refiere a las fermentaciones, en ausencia de glucosa, se observó que la viscosidad del medio (por inspección visual) disminuía en forma directamente proporcional con el tiempo, lo que coincide con la producción de pectinasas. De acuerdo a los resultados mostrados en la sección VII.3.1. la pectina es un buen inductor para la producción de pectinasas. Sin embargo, la mejoría genética de las cepas resulta ser el factor más importante, como lo demuestra la cepa D4 en relación con las cepas haploides que lo originaron.

La presente tesis contó con muchos antecedentes sobre la producción de pectinasas para algunas cepas como la C28B25, Aw96-4, Aw99iii y D4, sin embargo no se habían realizado estudios de represión catabólica en este diploide para su comparación con respecto a las cepas que lo originaron, y en el presente trabajo se realizó este análisis, para determinar si existe algún patrón de desrepresión dominante o recesivo, por lo que a continuación se discuten estos resultados.

La cepa Aw99iii (haploide) mostró un patrón dominante de desrepresión catabólica en el diploide D4, lo cual coincide con lo reportado por Loera *et al.*, (1999). Sin embargo, al analizar el fenotipo del diploide D4 con respecto a la resistencia a 2DG, este diploide muestra el mismo patrón de la cepa silvestre, lo cual indica que hubo una complementación de la información entre las cepas progenitoras (Aw96-4 y Aw99iii), ambas resistentes a 2DG. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Antier *et al.*, (1993) y Loera *et al.*, (1999). Por lo anterior, para el diploide D4 no existe relación entre la desrepresión catabólica y la resistencia a 2DG.

La cepa Aw96-3 mostró ser sensible a 2DG, esto concuerda con lo reportado por Antier *et al.*, (1993), por el contrario, la cepa Aw96-4 fue resistente, y aunque en la tabla VIII.1 se muestra que el diploide DAR2 fue resistente a 2DG, pues el valor máximo tolerado fue de 0.5 g/L, a esta concentración el diámetro de la colonia fue muy pequeño (0.2 cm), por lo que en realidad el diploide DAR2 resultó poco tolerante a 2DG (Figura VII.26), lo cual indica la codominancia de ambas cepas en el diploide DAR2, con respecto a la resistencia a 2DG. Sin embargo, tanto la cepa Aw96-3 como la Aw96-4 mostraron estar reprimidas catabólicamente, y el diploide DAR2 mostró estar desreprimido, por lo que puede decirse en este diploide existen *loci* distintos que confieren la resistencia a 2DG y la desrepresión catabólica, es decir no existe un patrón claramente definido en cuanto a la relación entre la desrepresión catabólica y la resistencia a 2DG.

La cepa Aw96-3 muestra un patrón dominante tanto de resistencia a 2DG, como de represión catabólica en el diploide DAR3, ya que ambas cepas son sensibles a 2DG y están reprimidas, a diferencia de la cepa Aw99iii que está desreprimida y es resistente a 2DG.

Los datos anteriores muestran que no todas las cepas desreprimidas son resistentes o sensibles a 2DG. En la tabla VIII.1 se resumen estos resultados.

Tabla VIII.1.- Relación entre los patrones de resistencia a 2DG (valores máximos tolerados) y represión catabólica (porcentaje de cambios) para todas las cepas analizadas.

| Cepa | PATRÓN DE RESISTENCIA A 2DG | PATRÓN DE REPRESIÓN CATABÓLICA |
|---------|-----------------------------|--------------------------------|
| C28B25 | Sensible (0 g/L) | Reprimida (- 93%) |
| Aw96-3 | Sensible (0 g/L) | Reprimida (- 88%) |
| Aw96-4 | Resistente (0.5 g/L) | Reprimida (- 76%) |
| Aw99iii | Resistente (0.5 g/L) | Desreprimida (+78%) |
| D4 | Sensible (0 g/L) | Desreprimida (+11%) |
| DAR2 | Resistente (0.5 g/L) | Desreprimida (+82%) |
| DAR3 | Sensible (0 g/L) | Reprimida (- 44%) |

De acuerdo a los resultados anteriores se observa que la cepa Aw96-3 tiene un fenotipo dominante, pero esto depende de la cepa con la que esté formando el diploide (Aw96-4 o Aw99iii), debido a que se tienen perfiles de resistencia a 2DG diferentes para los diploides DAR2 y DAR3. Lo anterior confirma que las cepas Aw96-4 y Aw99iii tienen *loci* distintos afectados, que les dan la resistencia a 2DG, esto concuerda con lo reportado por Loera *et al.*, (1999).

En un medio que contiene pectina más glucosa como fuentes de carbono, la cantidad obtenida de biomasa fue mayor y en algunas ocasiones la producción de pectinasas también. La cepa Aw99iii tuvo los valores más grandes de μ , tanto en ausencia y presencia de glucosa en el medio.

El resultado obtenido para la cepa DAR2 en presencia de glucosa (Figura VII.31), sugiere que puede ser factible modificar las condiciones de cultivo para evitar la destrucción de la enzima producida después de las 24 h, de manera que se obtengan condiciones de producción sostenida de pectinasas.

La mutagénesis aplicada sobre la cepa silvestre C28B25 para la obtención de los haploides Aw99-iii, Aw96-4 y Aw96-3 fue al azar, por lo que una posible explicación para la sobreproducción de pectinasas en los diploides D4 y DAR2 con respecto a las cepas haploides que los originaron puede ser el hecho de que los diploides contienen el doble de información que las cepas haploides, con lo cual los genes involucrados en la síntesis enzimática se encuentran también duplicados, incluyendo factores positivos de transcripción y posiblemente los reguladores negativos han sido eliminados o modificados. Estos patrones de sobreproducción han sido observados en estos diploides para diferentes enzimas tales como xilanasas (Loera y Córdova, 2003), pectinasas (Loera *et al.*, 1999) e invertasa (Montiel-González *et al.*, 2002).

La importancia de este tipo de estudio radica principalmente en la obtención de cepas mejoradas, ya que como lo expresa Parekh *et al.*, (2000), este es el factor de mayor impacto en la optimización de procesos de producción. Lo anterior se debe a que con las mismas materias primas se obtienen más altos rendimientos si se utilizan cepas mejoradas.

IX. CONCLUSIONES

1. Se pudo obtener una cepa auxótrofa a arginina a partir de la cepa Aw99iii mediante mutagénesis con luz UV. Asimismo fue posible aislar el diploide DAR3 a partir de la cruce parasexual de las cepas Aw99iii y Aw96-3.
2. La segunda mutación con respecto a la cepa silvestre C28B25 no afectó el patrón de sensibilidad a 2DG para el auxótrofo Aw99iii arg⁻.
3. En ausencia de glucosa, el diploide D4 sobreprodujo pectinasas, en un 14% y 74% con respecto a la cepa Aw99iii y Aw96-4, respectivamente. En presencia de glucosa, la producción de pectinasas por el diploide D4 fue mucho mayor que las cepas progenitoras (93% mayor que la cepa Aw96-4 y 134% mayor que la cepa Aw99iii).
4. En un medio sin glucosa, la cepa Aw96-4 sobreprodujo pectinasas hasta 85.7% más que la cepa Aw96-3 y 105.3% más que el diploide DAR2. Sin embargo, en presencia de glucosa, el diploide DAR2 sobreprodujo pectinasas con respecto a las cepas progenitoras (31.4% con respecto a la cepa Aw96-4 y de 500% sobre la cepa Aw96-3).
5. En ausencia de glucosa, el diploide DAR 3 mostró un incremento de 328% en la producción de pectinasas con respecto a la cepa Aw96-3 y del 33% con respecto a la cepa Aw99iii. En presencia de glucosa, la cepa Aw99iii sobreprodujo pectinasas con un incremento del 94 % sobre la cepa DAR3 y del 391% sobre la cepa Aw96-3.
6. La cepa Aw99iii se encuentra desreprimida catabólicamente, al igual que el diploide D4, lo cual muestra un patrón dominante de esta cepa en el Diploide D4, esto coincide con lo reportado por Loera *et al.*, (1999).

7. Las cepas Aw96-4 y Aw96-3 se encuentran reprimidas catabólicamente, sin embargo, el diploide al que dieron origen (DAR2) no presenta este fenotipo ya que se encuentra desreprimido.
8. La cepa Aw96-3 mostró un patrón dominante en el diploide DAR3, en cuanto a la represión catabólica, es decir, ambos se encuentran reprimidos.
9. A partir de la mutación con rayos UV y mediante la cruce parasexual de cepas previamente mejoradas, se pueden obtener diploides sobreproductores de pectinasas. Estos patrones de sobreproducción también han sido observados para otro tipo de enzimas como xilanasas, invertasa y amilasas en estudios recientes de laboratorio con estas cepas (Loera y Córdova, 2003; Montiel-González *et al*, 2002).
10. En cuanto a los patrones de resistencia a 2DG, el diploide D4 resultó sensible a 2DG, al igual que la cepa silvestre, lo cual indica que hubo una complementación de la información entre las cepas progenitoras (Aw96-4 y Aw99iii), ambas resistentes a 2DG.
11. La cepa Aw96-3 mostró ser sensible a 2DG, por el contrario, la cepa Aw96-4 fue resistente y el diploide DAR2 resultó poco tolerante a 2DG, lo cual indica la codominancia de ambas cepas en el diploide. La cepa Aw96-3 muestra un patrón dominante de resistencia a 2DG en el diploide DAR3, ya que ambas cepas son sensibles a 2DG, a diferencia de la cepa Aw99iii que es resistente a 2DG.
12. La resistencia a 2DG no es un fenotipo necesario para la sobreproducción de pectinasas.

X. APÉNDICE**X.1. CURVA PATRÓN DE DNS**● *COMPOSICIÓN DEL REACTIVO DE DNS*

| | |
|---------------------------------|---------|
| DNS | 10 g/L |
| Fenol | 2 g/L |
| Na ₂ SO ₃ | 0.5 g/L |
| NaOH | 10 g/L |

● *CURVA PATRÓN*

Preparar una solución de ácido galacturónico (1 mg/mL) y realizar por triplicado la siguiente serie de tubos:

| Tubo | Ácidogalacturónico, μ L | Agua, μ L | DNS, mL | Concentración de ácido galacturónico, mg/mL |
|------|-----------------------------|---------------|---------|---|
| 0 | 0 | 1000 | 2 | 0 |
| 1 | 100 | 900 | 2 | 0.1 |
| 2 | 200 | 800 | 2 | 0.2 |
| 3 | 300 | 700 | 2 | 0.3 |
| 4 | 400 | 600 | 2 | 0.4 |
| 5 | 500 | 500 | 2 | 0.5 |

Agitar los tubos, poner en ebullición durante 5 minutos, enfriar con hielo y leer la absorbancia a 575 nm.

Nota: Realizar la curva patrón cada vez que se prepare un nuevo reactivo de DNS.

A continuación se presenta una curva patrón de DNS empleada en el análisis de la producción de pectinasas.

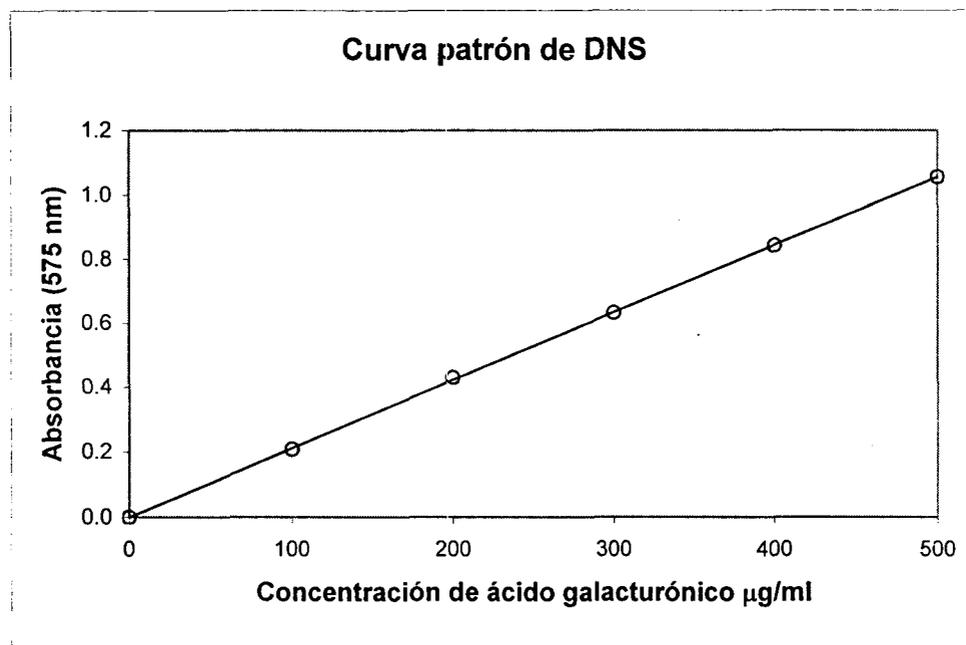


Figura X.1.- Curva patrón de DNS

La ecuación obtenida y la bondad de ajuste de la correlación x vs y , a partir de los datos experimentales de esta curva fueron:

$$y = 0.00211 x + 0.000003$$

$$R^2 = 0.9998$$

X.2. CURVA PATRÓN DE BIURET

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE BIURET

Pesar 1.5 g de Sulfato cúprico pentahidratado más 6 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y disolverlos en 500 mL de agua.

Por separado, preparar 300 mL de hidróxido de sodio al 10%, adicionarlos a la solución anterior y aforar a 1 litro. Una vez preparado el Reactivo de Biuret se debe guardar en un frasco ámbar.

CURVA PATRÓN

Preparar una solución de seroalbúmina bovina a una concentración de 10 mg/mL y realizar por triplicado la siguiente serie de tubos:

| Tubo | Agua, mL | Solución de Seroalbúmina, mL | Reactivo de Biuret, mL | Proteína, mg/mL |
|------|----------|------------------------------|------------------------|-----------------|
| 0 | 1.0 | 0.0 | 3 | 0 |
| 1 | 0.9 | 0.1 | 3 | 1 |
| 2 | 0.8 | 0.2 | 3 | 2 |
| 3 | 0.7 | 0.3 | 3 | 3 |
| 4 | 0.6 | 0.4 | 3 | 4 |
| 5 | 0.5 | 0.5 | 3 | 5 |
| 6 | 0.4 | 0.6 | 3 | 6 |
| 7 | 0.3 | 0.7 | 3 | 7 |
| 8 | 0.2 | 0.8 | 3 | 8 |
| 9 | 0.1 | 0.9 | 3 | 9 |
| 10 | 0.0 | 1.0 | 3 | 10 |

Agitar los tubos, dejar en reposo durante 30 minutos y leer la absorbancia a 540 nm.

A continuación se presenta una curva patrón de Biuret empleada en el análisis de la cantidad de proteína extracelular presente en el Extracto Crudo Enzimático.

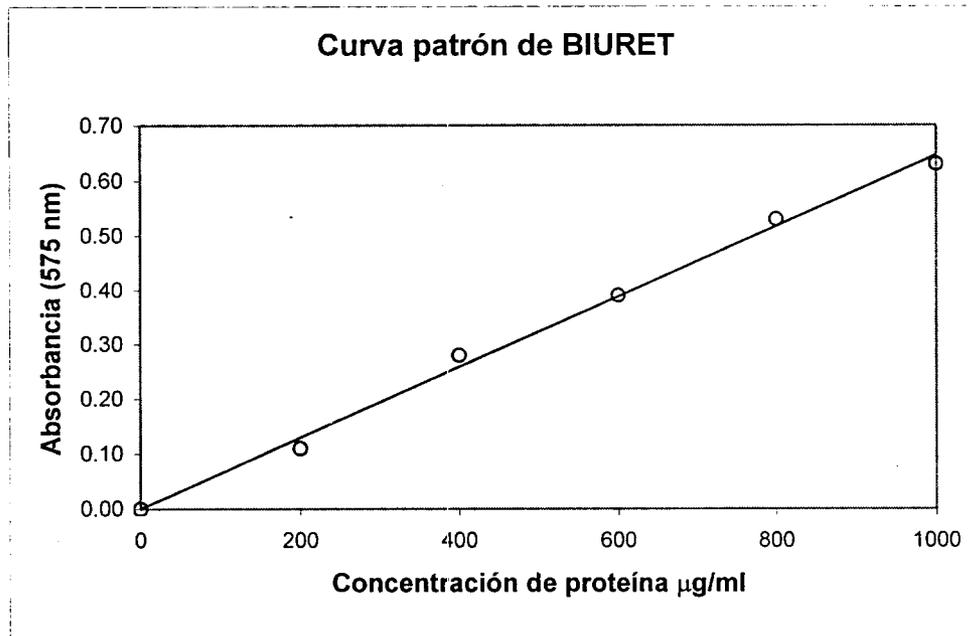


Figura X.2.- Curva patrón de Biuret

La ecuación obtenida y la bondad de ajuste de la correlación x vs y , a partir de los datos experimentales de esta curva fueron:

$$y = 0.00065 x + 0.00004$$

$$R^2 = 0.9978$$

X.3. PROTOCOLO PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS

Uno de los objetivos de esta tesis es la conservación de cepas a largo plazo, con el fin de poder ser utilizadas en el laboratorio de Biología Molecular de esta Universidad, para posteriores estudios. Debido a lo anterior, se empleó la siguiente metodología para conservar esporas de todas las cepas analizadas en sílica gel (Perkins, 1971 y Loera *et al.*, 1999).

METODOLOGÍA:

1. Propagar en medio para esporulación, con el compuesto requerido si sus cepas son auxótrofas. Si se trata de diploides usar medio mínimo. Preparar al menos 2 matraces de 250 ml con 50 ml de medio y agar.
2. Cosechar las esporas para lograr una concentración entre 5 a 10 millones de esporas por mililitro, usando Tween 80 (al 0.05%) disuelto en una solución de leche descremada al 3%. La solución de leche descremada con Tween debe esterilizarse por 20 min a 10 PSI pues de lo contrario se pueden caramelizar los carbohidratos y acomplejarse con las proteínas.
3. Previamente preparar los viales de vidrio de 3cm con sílica gel (Mesh 60-200) hasta la mitad de su volumen. Esterilizar por calor seco o por autoclave todo el grupo de viales.
4. Secar los viales con sílica ya estériles (ligeramente destapados) en una estufa a 70 grados por 24h
5. Transportar los viales inmediatamente a un desecador con conexión al vacío para que lleguen a temperatura ambiente (aprox. 1h). Este desecador debe contener sílica activa en el fondo del recipiente para que absorba el exceso de humedad desde los viales.

6. Con material estéril adicionar 100 microlitros de la suspensión de esporas del paso 2 a cada vial. Homogenizar en un vórtex para distribuir las esporas en todos los granos de sílica gel. Hacer un control negativo, poniendo 100 microlitros (sin esporas) en un vial extra (Ver paso 11) y tratarlo como los demás.
7. Regresar los viales inoculados y etiquetados al desecador con vacío (con la tapa ligeramente abierta). Mantenerlos así por 12h sin destapar el desecador.
8. Tapar rápidamente cada vial y ponerle una capa de parafilm en la tapa.
9. Guardar el grupo de viales en otro desecador (de preferencia con vacío) a temperatura ambiente.
10. Hacer el control de viabilidad para cada cepa a los 10 días de haberlos conservado. Para ello se siembran unos cuantos granos de los viales seleccionados en cajas de Petri con el medio apropiado. El vial destapado ya no puede ser cerrado y tiene que ser propagado en su totalidad, de ahí la importancia de hacer entre 5 a 10 viales por cepa. Cada vial alcanza para un total de 5 cajas de Petri.
11. Realizar un control negativo (100 microlitros de leche descremada sin esporas) en la misma prueba de viabilidad, con ello descartamos cualquier posible contaminación arrastrada en la solución con la que cosechamos las esporas.
12. Las cepas pueden ser conservadas hasta por 3 a 5 años como máximo. Se recomienda etiquetar bien cada vial para que el tiempo no borre ninguna marca. Si la prueba de viabilidad sale negativa a los 10 días o si la suspensión de leche descremada con tween tiene contaminación, se descarta todo el lote.
13. Es recomendable la resiembra de cada cepa una vez al año, que es cuando se practica otra prueba de viabilidad y se generan nuevas esporas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Allen K., McNally M., Lowendorf H. Slayman C. and Free S., (1989) “Deoxyglucose resistant mutants of *Neurospora crassa*: Isolation, mapping and biochemical characterization”, *Journal of Bacteriology*, **171**: 53-58.
- Antier P., Minjares A., Roussos S., Raimbault M. and Viniegra-González G., (1993), “Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp”, *Enzyme and Microbial Technology*, **15**: 254-260.
- Bodie E., Armstrong G. and Dunn-Coleman N., (1994), “Strain improvement of chymosin producing strains of *Aspergillus niger* var. *awamori* using parasexual recombination”, *Enzyme and Microbial Technology*, **16**: 376-381.
- Bos C., (1987), “Induction and isolation of mutants in fungi at low mutagen dose”, *Current Genetics*, **12**: 471-474.
- Castilho L., Medronho R. and Alves T., (2000), “Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*”, *Bioresource Technology*, **71**: 45-50.
- Cui F-M., Liu H. and Zhang S. H., (1987), “Mutation and selection of pectinase production strain CP-85211 and its liquid fermentation conditions”, *Acta Microbiológica*, **27** (1): 37-44.
- Debets F., (1990), “Genetic Analysis of *Aspergillus niger*” PhD Thesis, University of Wageningen, Holland.
- Díaz G., (1997), “Producción de exopoligalacturonasas de *Aspergillus niger* por fermentación en medio sólido utilizando como soporte espuma de poliuretano”, Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.
- Díaz G., Soriano-Santos J., Augur C. and Viniegra-González G. (2001), “Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **26**: 271-275.
- El-Ghaouth A., Wilson C. and Wisniewski M., (1997), “Antifungal activity of 2-Deoxy-D-Glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*: ultrastructural and cytochemical aspects”, *Biochemical and Cell Biology*, **87** (7): 772-779.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Fillinger S., Panozzo C., Mathieu M. and Felenbok B., (1995), “The basal level of transcription of the ale genes in the ethanol regulon in *Aspergillus nidulans* is controlled both by the specific transactivator *AlcR* and the general carbon catabolite repressor *CreA*”, Federation of European Biochemical Societies, 547-550.
- Friedrich J., Cimerman A. and Steiner W., (1990), “Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of inoculum size and potassium hexacyanoferrate II-trihydrate”, Applied Microbiology and Biotechnology, **33** (4): 377-381.
- Gornall A.G., Bardawill C.J., and David M.M., (1949), “Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction”, Journal of Biological Chemistry, **177**:751.
- Kavitha R. and Umesh-Kumar S. (2000), “Genetic improvement of *Aspergillus carbonariusniger* for pectinase overproduction during solid state growth”, Biotechnology and Bioengineering, **67** (1): 121-125.
- Kirimura K, Lee S.P., Nakajima I., Kawabe S. and Usami S. (1988), “Improvement in citric acid production by haploidization of *Aspergillus niger* diploid strains”, Journal of Fermentation Technology, **66** (4):375-382.
- Lendblad R. (2000), “Techniques in Protein Modification”, Ed. CRC Press Incorporation, U.S.A.
- Leuchtenberger, A. and Mayer, G. (1991), “Synthesis of different pectinases by filamentous growing *Aspergillus niger* mutants”, Folia Microbiological, **36** (4):362-366.
- Leuchtenberger, A. and Mayer, G. (1992), “Changed pectinase synthesis by aggregated mycelium of some *Aspergillus niger* mutants”, Enzyme and Microbial Technology, **14** (1):23-27.
- Levin L., and Forchiassin F. (1998), “Culture conditions for the production of pectinolytic enzymes by the white-rot fungus *Trametes trogii* on a laboratory scale”, Biotechnology Letters, **18** (2):157-166.
- Loera O. (1994), “Caracterización de mutantes de *Aspergillus niger* sobreproductoras de pectinasas”, Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

- Loera O. and Viniegra-González G., (1998), "Identification of growth phenotypes in *Aspergillus niger* pectinase over-producing mutants using image analysis procedures", *Biotechnology Techniques*, **12** (11):801-804.
- Loera O., Aguirre J. and Viniegra-González G., (1999), "Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants", *Enzyme and Microbial Technology*, **25** (1-2):103-108.
- Loera O. and Córdova J., (2003), "Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains". *Brazilian Archives of Biology and Technology*. In Press.
- Madigan M., Martinko J., y Parker J., (1998), "Brock Biología de los microorganismos", Prentice Hall, España.
- Minjares-Carranco A., Trejo-Aguilar B., Aguilar G. and Viniegra-González G., (1997), "Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation", *Enzyme and Microbial Technology*, **21**: 25-31.
- Montiel M., (2000), "Evaluación de la recombinación parasexual en cepas de *Aspergillus niger* para mejorar la producción de enzimas en cultivo en estado sólido", Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.
- Montiel-González A., Fernández F., Viniegra-González G. and Loera O., (2002), "Invertase production on solid state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination", *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **(102-103)**: 63-70.
- Panda T. and Naidu GSN., (2000), "Rotating simplex method of optimization of physical parameters for higher production of extracellular pectinases in bioreactor", *Bioprocess Engineering*, **23** (1):47-49.
- Parekh S., Vinci V.A. and Strobel R.J., (2000), "Improvement of microbial strains and fermentation processes", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54**: 287-301.
- Parvez S., Rajoka M., Ahmed M. Latif F. Shahid R. and Malik K., (1998), "Citric acid production from sugar cane molasses by 2-Deoxyglucose-Resistant mutant strain of *Aspergillus niger*", *Folia Microbiology*, **43** (1): 59-62.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Perkins D., (1977), "Details for preparing silica gel stocks", *Neurospora Newslett*, **24**:16-17.
- Romero-Gómez S.J., Augur C. and Viniegra-González G. (2000), "Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation", *Biotechnology Letters*, **22**: 1255-1258.
- Ruijter G. and Visser J. (1997), "Carbon repression in *Aspergilli*", *FEMS Microbiology Letters*", **151**: 103-114.
- Sarangbin S., Morikawa S., Kirimura K. and Usami S., (1994), "Formation of autodiploid strains in *Aspergillus niger* and their application to citric acid production from starch", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **77**: (5) 474-478.
- Shroff R., O'Connor S., Hynes M. Lockington R. and Kelly J., (1997), "Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*", *Fungal Genetics and Biology*, **22**: 28-38.
- Solís-Pereira S., Favela-Torres E., Viniegra-González G. and Gutiérrez-Rojas M., (1993), "Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **39**: 36-41.
- Solís S., Flores M. and Huitrón C., (1997), "Improvement of pectinase production by interspecific hybrids of *Aspergillus* strains", *Letters in Applied Microbiology*, **24**:77-81.
- Suzuki A., Sarangbin S., Kirimura K. and Usami S., (1996), "Direct production of citric acid from starch by a 2-deoxyglucose resistant mutant strain of *Aspergillus niger*", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **81** (4): 320-323.
- Szaniawski A. and Garth H., (1996), "Effects of Pectin concentration and Crossflow Velocity on Permeability in the microfiltration of dilute pectine solutions by macroporous Titania membranes containing immobilized pectinase", *Biotechnology Progress*, **12** (3), 403-405.
- Taragano V., Sánchez V.E., and Pilosof A.M.F., (1997), "Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*", *Biotechnology Letters*, **19** (3): 233-236.
- Ward M., (1991), "*Aspergillus nidulans* and Other Filamentous Fungi as Genetic Systems", *Modern Microbial Genetics*, pp 455-496.