

**Obtención de una cepa hiperproductora de  
mananasa por mutación con luz UV de  
*Aspergillus niger* GS1**

**Tesis**

**Especialidad en Biotecnología**

**Presenta:**

**I.B.Q Ma. Soledad De Nicolás Santiago**

**Director de tesis:**

**Dr. Sergio Huerta Ochoa**

**Asesores:**

**Dr. Carlos Regalado González**

**Dr. Francisco José Fernández Perrino**

**Noviembre, 2002**

**Resumen**

Las mananastas presentan un amplio mercado en la Industria Alimentaria y Biotecnológica. Estudios previos muestran que la cepa *Aspergillus niger* GS1, aislada de pasta de copra, presenta un potencial industrial interesante para la producción de mananastas, aunque sería necesario incrementar su producción.

El objetivo general de esta tesis fue obtener una cepa con mayor actividad mananasa que la cepa *Aspergillus niger* GS1 por mutación con luz UV.

El tiempo de exposición a la radiación UV para la cepa de *A. niger* GS1 se obtuvo determinando la dosis letal 50, el cual fue de tres minutos. Las cepas mutantes fueron sometidas a una doble selección. La primera selección se realizó mediante la formación de halos de hidrólisis en un medio selectivo ML1, seleccionando siete cepas. Estas cepas fueron sometidas a una segunda selección, realizando una fermentación en medio sólido sobre pasta de copra como sustrato. A los extractos obtenidos se les determinó la actividad enzimática mananasa, seleccionándose dos cepas, GS1-S059 y GS1-S067, con mayor actividad enzimática con respecto a la cepa parental (3.27 y 2.86 veces más, respectivamente).

De los resultados más relevantes de los estudios fisiológicos se observó que sólo la cepa GS1-S067 mostró diferencia significativa en el crecimiento radial con respecto a la cepa parental, (1.17 veces superior). El tiempo de esporulación de GS1-S067 se incrementó en 48 h, lo cual podría ser atractivo para el proceso de producción de mananasa. El perfil enzimático de celulasas para las cepas GS1-S059 y GS1-S067 mostró también un incremento con respecto a la cepa parental de 3.70 y 2.65 veces. El de xilanasas también se incrementó, en 6.19 y 4.82 veces, respectivamente.

Los estudios morfológicos realizados mostraron que el diámetro del esporangio en las cepas mutantes GS1-S059 y GS1-S067 se incrementó 1.2 y 1.42 veces, respectivamente. También se observó un incremento de 1.13 veces en el diámetro de las esporas de la cepa GS1-S067 con respecto a la cepa parental. Por último, la longitud de las hifas en la cepa GS1-S059 se incrementó 2 veces con respecto a la cepa parental.

**Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo:**

**Dr. Sergio Huerta Ochoa por la dirección de este trabajo, por su confianza, apoyo y amistad.**

**Dr. Carlos Regalado González por la asesoría de este trabajo, por su apoyo, orientación y comentarios.**

**Dr. Francisco José Fernández Perrino por la asesoría de este trabajo, por su apoyo, orientación, comentarios y amistad.**

**Dr. Ernesto Favela Torres y Dr. Arely Prado Barragán por su apoyo y orientación.**

**Dr. José David Sepulveda Sánchez, Laboratorio de Microscopia Electrónica CENICA**

**MC. Luis Lartundo Rojas Laboratorio de Microscopia Electronica  
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa**

**A mis amigos: Rosa Isela, Doña Mary, Juan H., Juan Manuel, Blanca, Ana, Octavio H., Lizbeth, Inés, María de Jesús.**

| <b>Contenido</b>                                                                                  | <b>Página</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Resumen</b>                                                                                    | <b>i</b>      |
| <b>Agradecimientos</b>                                                                            | <b>ii</b>     |
| <b>Contenido</b>                                                                                  | <b>iii</b>    |
| <b>Índice de tablas</b>                                                                           | <b>vi</b>     |
| <b>Índice de figuras</b>                                                                          | <b>vii</b>    |
| <b>1 Introducción</b>                                                                             | <b>1</b>      |
| <b>2 Revisión bibliográfica</b>                                                                   | <b>3</b>      |
| <b>2.1 Hemicelulosas</b>                                                                          | <b>3</b>      |
| <b>2.2 Hemicelulasas</b>                                                                          | <b>4</b>      |
| <b>2.3 Modo de acción de la <math>\beta</math>-D-mananasa</b>                                     | <b>5</b>      |
| <b>2.4 Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas relacionadas con la degradación del manano</b> | <b>6</b>      |
| <b>2.5 Producción de enzimas</b>                                                                  | <b>6</b>      |
| <b>2.6 Mejoramiento de cepas</b>                                                                  | <b>7</b>      |
| <b>2.7 Mutación</b>                                                                               | <b>8</b>      |
| <b>2.7.1 Inducción de la mutación</b>                                                             | <b>8</b>      |
| <b>2.7.2 Mecanismos de reparación de las mutaciones causadas por luz UV</b>                       | <b>9</b>      |
| <b>2.7.3 Selección de mutantes mejorados</b>                                                      | <b>10</b>     |
| <b>3 Antecedentes</b>                                                                             | <b>12</b>     |
| <b>4 Justificación</b>                                                                            | <b>14</b>     |
| <b>5 Objetivo</b>                                                                                 | <b>15</b>     |
| <b>5.1 Objetivos específicos</b>                                                                  | <b>15</b>     |
| <b>6 Materiales y métodos</b>                                                                     | <b>16</b>     |
| <b>6.1 Microorganismo utilizado</b>                                                               | <b>16</b>     |
| <b>6.1.1 propagación de la cepa</b>                                                               | <b>16</b>     |
| <b>6.2 Medio selectivo</b>                                                                        | <b>17</b>     |
| <b>6.3 Estrategia experimental</b>                                                                | <b>17</b>     |

|                                                                                                        | Contenido |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6.4 Mutagénesis y selección</b>                                                                     | <b>18</b> |
| 6.4.1 Curva de dosis letal 50                                                                          | 18        |
| 6.4.2 Mutación y selección de las mutantes<br>hiperporductoras                                         | 19        |
| <b>6.5 Determinación de actividad mananasa</b>                                                         | <b>20</b> |
| <b>6.6 Cuantificación de actividad enzimática</b>                                                      | <b>21</b> |
| 6.6.1 Método de Nelson-Somogyi                                                                         | 21        |
| <b>6.7 Velocidad de crecimiento radial</b>                                                             | <b>22</b> |
| <b>6.8 Densidad de la colonia</b>                                                                      | <b>23</b> |
| <b>6.9 Nivel de esporulación</b>                                                                       | <b>23</b> |
| <b>6.10 Fermentación sólida</b>                                                                        | <b>24</b> |
| 6.10.1 Obtención del extracto enzimático                                                               | 25        |
| <b>6.11 Fermentación sumergida</b>                                                                     | <b>25</b> |
| 6.11.1 Obtención del extracto enzimático                                                               | 26        |
| <b>6.12 Fermentación sobre espuma de poliuretano (puf)</b>                                             | <b>26</b> |
| 6.12.1 Obtención del extracto enzimático                                                               | 26        |
| <b>6.13 Estudios morfológicos</b>                                                                      | <b>27</b> |
| 6.13.1 Preparación de las muestras para microscopía<br>electrónica de barrido                          | 27        |
| 6.13.2 Deshidratado                                                                                    | 27        |
| 6.13.3 Montaje de las muestras                                                                         | 27        |
| 6.13.4 Secado al punto crítico                                                                         | 27        |
| 6.13.5 cobertura con carbón y oro                                                                      | 27        |
| <b>6.14 Análisis estadístico</b>                                                                       | <b>28</b> |
| 6.14.1 Prueba de intervalos múltiples                                                                  | 28        |
| 6.14.2 Correlación simple de Pearson                                                                   | 29        |
| <b>7 Resultados y discusiones</b>                                                                      | <b>30</b> |
| 7.1 Dosis letal 50                                                                                     | 30        |
| 7.2 Elección del papel celofán                                                                         | 31        |
| 7.3 Primera selección: Determinación de halos de actividad<br>enzimática y crecimiento de las colonias | 32        |
| 7.4 Recta patrón de actividad mananasa                                                                 | 33        |

|                                                                   | Contenido |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>7.5 Segunda selección: Determinación de actividad mananasa</b> | <b>34</b> |
| <b>7.6 Estudios Fisiológicos</b>                                  | <b>35</b> |
| 7.6.1 Velocidad de crecimiento radial (o apical)                  | 35        |
| 7.6.2 Nivel de esporulación                                       | 37        |
| 7.6.3 Nivel de actividad mananasa                                 | 38        |
| 7.6.4 Perfil Enzimático                                           | 39        |
| <b>7.7 Estudios morfológicos</b>                                  | <b>41</b> |
| 7.7.1 Diámetro de los esporangios                                 | 41        |
| 7.7.2 Diámetro de las esporas                                     | 44        |
| 7.7.3 Longitud de las hifas                                       | 46        |
| <b>8 Conclusiones</b>                                             | <b>50</b> |
| <b>9 Bibliografía</b>                                             | <b>51</b> |
| <b>10. Apéndice</b>                                               | <b>55</b> |
| <b>10.1 Correlación de PEARSON</b>                                | <b>55</b> |

---

**Índice de tablas**

| <b>Tabla</b> |                                                                                            | <b>Página</b> |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1</b>     | <b>Actividad mananasa de liofilizados comerciales y de <i>A. niger</i> GS1</b>             | <b>12</b>     |
| <b>2</b>     | <b>Composición del medio de cultivo ML1 (Kusakabe y Takahashi, 1988)</b>                   | <b>17</b>     |
| <b>3</b>     | <b>Elección del papel celofán usado en la determinación de halos de actividad mananasa</b> | <b>32</b>     |
| <b>4</b>     | <b>Halos de actividad mananasa y crecimiento de colonias (primera selección)</b>           | <b>33</b>     |
| <b>5</b>     | <b>Determinación de actividad enzimática (segunda selección)</b>                           | <b>35</b>     |
| <b>6</b>     | <b>Crecimiento de la colonia</b>                                                           | <b>36</b>     |
| <b>7</b>     | <b>Nivel de esporulación de las cepas y viabilidad de las esporas</b>                      | <b>37</b>     |
| <b>8</b>     | <b>Nivel de actividad y crecimiento de las cepas seleccionadas</b>                         | <b>38</b>     |
| <b>9</b>     | <b>Perfil enzimático de las cepas seleccionadas</b>                                        | <b>39</b>     |
| <b>10</b>    | <b>Diámetro de los esporangios de la cepa silvestre y las mutantes</b>                     | <b>43</b>     |
| <b>11</b>    | <b>Diámetro de las esporas de cepa silvestre y mutantes</b>                                | <b>46</b>     |
| <b>12</b>    | <b>Longitud y diámetro de las hifas de la cepa silvestre y las mutantes</b>                | <b>48</b>     |

## Índice de figuras

| <b>Figura</b> |                                                                                                                                                             | <b>Página</b> |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1             | Diagrama de propagación de esporas para la mutación de la cepa silvestre <i>Aspergillus niger</i> GS1                                                       | 16            |
| 2             | Estrategia experimental                                                                                                                                     | 18            |
| 3             | Diagrama de mutagénesis y selección de cepas hiperproductoras                                                                                               | 20            |
| 4             | Determinación de actividad mananasa por el método de Downie <i>et al.</i> (1994)                                                                            | 21            |
| 5             | Método de Nelson-Somogyi para la cuantificación de actividad enzimática. Los sustratos empleados fueron carboximetil celulosa, goma de algarrobo, y xilano. | 22            |
| 6             | Crecimiento radial                                                                                                                                          | 22            |
| 7             | Diagrama para determinación del crecimiento de la colonia                                                                                                   | 23            |
| 8             | Columna de fermentación (Tomado de Raimbault y Alazard, 1980)                                                                                               | 24            |
| 9             | Sistema de fermentación (Raimbault y Alazard, 1980)                                                                                                         | 25            |
| 10            | Diagrama para la preparación de muestras y observación al microscopio electrónico de barrido                                                                | 28            |
| 11            | Curva de dosis letal 50 para <i>Aspergillus niger</i> GS1 con exposición a la luz UV a una longitud de 254 nm                                               | 31            |
| 12            | Curva estándar de actividad mananasa (50 °C, 30 min)                                                                                                        | 34            |
| 13            | Gráfica de crecimiento radial contra tiempo                                                                                                                 | 36            |
| 14            | Esporangio <i>Aspergillus niger</i> GS1. Distancia de trabajo 13 mm, voltaje 5kv, amplificación 2000 X ancho de imagen 44.64 $\mu\text{m}$                  | 41            |
| 15            | Esporangio <i>Aspergillus niger</i> GS1-S059. Distancia de trabajo 6mm, voltaje 5 km, ampliacion 1900 X, ancho de imagen 47.3 $\mu\text{m}$                 | 42            |
| 16            | Esporangio <i>Aspergillus niger</i> GS1-S067. Distancia de trabajo 6mm, voltaje 5 kv, amplificación 1000 X, ancho de imagen 90 $\mu\text{m}$                | 43            |

|    |                                                                                                                                                        |           |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 17 | <b>Esporas <i>Aspergillus niger</i> GS1. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5 kv, amplificación 10000 X, ancho de imagen 9 <math>\mu</math>m</b>       | <b>44</b> |
| 18 | <b>Esporas <i>Aspergillus niger</i> GS1-S059. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5 kv, amplificación 10000 X ancho de imagen 9 <math>\mu</math>m</b>   | <b>45</b> |
| 19 | <b>Esporas <i>Aspergillus niger</i> GS1-S067. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5kv, amplificación 5000X, ancho de imagen 17.92 <math>\mu</math>m</b> | <b>45</b> |
| 20 | <b>Micelio <i>Aspergillus niger</i> GS1. Distancia de trabajo 7 mm, voltaje 5kv, amplificación 100 X, ancho de imagen 900 <math>\mu</math>m</b>        | <b>47</b> |
| 21 | <b>Micelio <i>Aspergillus niger</i> GS1-S059. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5 kv, amplificación 80 X, ancho de imagen 1125 <math>\mu</math>m</b>  | <b>47</b> |
| 22 | <b>Micelio <i>Aspergillus niger</i> GS1-S067. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5 kv, amplificación 200 X, ancho de imagen 450 <math>\mu</math>m</b>  | <b>48</b> |

## 1 Introducción

En los últimos años se han publicado un gran número de artículos donde se reportan estudios de producción, purificación, manipulación genética y uso de mananasas. Entre las aplicaciones descritas destaca la utilización de mananasas en el biopulpeo de pulpas Kraft y en el proceso de producción de café soluble. Por ejemplo varias compañías multinacionales han mostrado su interés por dichas enzimas: Recientemente, Novo-Nordisk publicó en su revista un artículo donde se menciona la aplicación de las mananasas en la alimentación de animales (cerdos y algunas aves) que no son capaces de degradar alimentos ricos en mananos y galactomananos. Esta compañía registró en 1995 la patente titulada "Removal of printing paste thickener and excess dye after textile printing", en este proceso se utiliza un coctel enzimático que incluye a la  $\beta$ -D-Mananasa. Otra patente de ese mismo año, de la compañía Chemgen Corporation, lleva por título "Hemicellulase supplement to improve the energy efficiency of hemicellulose-containing animal feed", en la que la adición de mananasas mejora la eficiencia energética de los forrajes. UNILEVER, por su parte, también se ha interesado en la aplicación de las mananasas.

Por otro lado, trabajos recientes han mostrado un interés particular por utilizar desechos de la industria del café con el fin de darles un valor agregado en biotecnología. Por ejemplo, Sirvastava (1993) utilizó los desechos industriales del proceso de café para la producción de enzimas hemicelulolíticas. Y recientemente, se ha reportado la producción de mananasas obtenidas por fermentación sólida, utilizando bagazo de café y pasta de copra (Venegas, 1998; Téllez, 1998; Regalado *et al.*, 2000).

Las técnicas de mejoramiento de cepas han dado lugar al aumento en la producción de un gran número de compuestos de aplicación industrial. Las enzimas son productos directos de genes, son buenas candidatas para mejorar su producción a través de la ingeniería genética. Entre los beneficios que se espera obtener por esta metodología en los procesos de utilidad comercial se incluyen:

- a) Menores costos en la producción de enzimas.

- b) La producción de enzimas en organismos considerados generalmente como seguros (GRAS), aptos para ser utilizados en la industria alimentaria.
- c) Modificaciones específicas realizadas al nivel del ADN para mejorar determinadas propiedades de las enzimas, como la estabilidad térmica, hidrofobicidad y otras características particulares.

Consiste en la expresión de enzimas útiles obtenidas a partir de nuevas fuentes en los organismos clave actualmente utilizados en la industria *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*, etc. Las barreras que impiden la manipulación de organismos recombinantes para producir y secretar cantidades altas de proteínas heterólogas es un requerimiento esencial para que la tecnología de ADN recombinante pueda aplicarse a la producción de diversos productos proteicos, incluyendo enzimas industriales.

El presente trabajo consta de nueve capítulos: tras la introducción, capítulo 1, el capítulo dos presenta la revisión bibliográfica, donde se mencionan las principales características de las hemicelulosas, las aplicaciones de las enzimas relacionadas con la degradación del manano, la importancia de las técnicas para el mejoramiento de cepas, mutación y selección de mutantes. En el tercer capítulo se presentan los antecedentes correspondientes a estudios previos realizados con la cepa de *A. niger* GS1. El cuarto capítulo contiene los objetivos del trabajo. En el capítulo cinco se presenta la justificación de la presente investigación. En el capítulo seis aparecen los materiales y métodos utilizados durante el proceso de mutación, selección de las mutantes hiperproductoras, estudios fisiológicos y morfológicos. En el capítulo siete se presentan los resultados obtenidos así como la discusión de los mismos. En el capítulo ocho se establecen las conclusiones a las cuales se llegaron al final del trabajo experimental. Finalmente, en el capítulo nueve están las referencias bibliográficas consultadas durante el desarrollo del trabajo.

## 2 Revisión bibliográfica

### 2.1 Hemicelulosas

Los compuestos químicos orgánicos de origen vegetal más abundantes en la biósfera, son tres grupos de polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y lignina ordenadas de acuerdo con su abundancia. Las hemicelulosas, después de la celulosa, son el segundo compuesto químico natural en el planeta, (de hecho, algunas maderas blandas contienen hasta el 35% de hemicelulosas). Las hemicelulosas están presentes en todas las capas de la pared celular de las plantas, pero se encuentran en mayor concentración y fuertemente ligadas a la celulosa y a la lignina en las capas primaria y secundaria de dicha pared (Timell, 1967).

El término colectivo de hemicelulosa se refiere a un grupo de polisacáridos presentes en las paredes celulares de las plantas y son solubles en álcali. El término fue propuesto por Schulze en 1891, debido a la fuerte asociación de estos polisacáridos con la celulosa, presumiéndose también un posible papel como precursores de ésta. En la actualidad, no se ha comprobado que las hemicelulosas estén involucradas en la síntesis de la celulosa (Hassidd, 1969).

Las hemicelulosas representan diferentes grupos de polisacáridos, clasificados de acuerdo a su composición química y estructural: así el L-arabinano es un polímero compuesto por unidades de L-arabinosa, el D-galactano de unidades de D-galactosa, el D-manano por unidades de D-manosa y el D-xilano por unidades de D-xilosa. En la naturaleza las hemicelulosas no están presentes como homopolisacáridos, es decir, su estructura no se basa en un solo residuo de azúcar. Sino que normalmente se encuentran en forma de heteropolisacáridos, compuestos por dos o hasta cuatro residuos de azúcar diferentes (Aspinall, 1959, 1970; Timell, 1964, 1965). Los D-mananos por ejemplo, presentan estructuras químicas muy variadas.

Dependiendo del método de extracción de las hemicelulosas (ácido o básico), se obtienen dos fracciones con características fisicoquímicas diferentes: la hemicelulosa A tiene un alto peso molecular, es insoluble en agua y tiene bajo contenido de ácido glucurónico y arabinosa. La hemicelulosa B contiene moléculas

fuertemente enlazadas entre sí, de bajo peso molecular, solubles en agua y con una alta concentración de ácido glucurónico y arabinosa.

Los D-mananos se extraen comúnmente por métodos alcalinos, seguidos de lavados y precipitación con alcohol (Shcherbukhin, 1993).

## 2.2 Hemicelulasas

Las enzimas que son capaces de hidrolizar las hemicelulosas son llamadas hemicelulasas y su nomenclatura se basa en el residuo de azúcar dominante del sustrato hemicelulósico con la terminación final –asa.

Las hemicelulasas más comunes son la L-arabinasa, la D-galactanasa, la  $\beta$ -D-mananasa y la D-xilanasa. Cabe señalar que existen hemicelulasas que utilizan como sustrato otras fuentes, como las paredes celulares de microorganismos, o cuyo origen no es vegetal sino bacteriano, (en concreto la  $\alpha$ -D-manasa y la  $\beta$ -D-mananasa). No se incluyen en este grupo ciertas glucosidasas específicas, como la  $\alpha$  y la  $\beta$ -D-galactosidasa, la  $\beta$ -D-manosidasa, la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y la  $\beta$ -D-xilosidasa, debido a que éstas son capaces de hidrolizar glucósidos de bajo peso molecular así como cadenas cortas de polisacáridos o monosacáridos pegados al esqueleto de la hemicelulosa (Dekker y Richards, 1975).

Las hemicelulasas son producidas por una gran variedad de microorganismos tales como bacterias (presentes en el rumen de bovinos y en el tracto digestivo de insectos), protozoos, crustáceos y por las semillas de vegetales en proceso de germinación. Las bacterias que producen hemicelulasas comprenden diferentes especies, como *Bacillus*, *Aeromonas hydrophila*, *Cellulomonas sp.* y *Streptomyces olivochromogenes* (Araujo y Owen, 1990; Mendoza *et al.*, 1994). Estas enzimas no se han encontrado en el tracto digestivo de los vertebrados (incluyendo al hombre), por lo que la asimilación por el organismo de las celulosas que se ingieren depende única y exclusivamente de la flora bacteriana del tracto digestivo.

Las  $\beta$ -D-mananasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-manopiranosil de los D-mananos y los D-galactomananos. Aunque, también se han reportado enzimas producidas por *B. subtilis* y *A. niger* capaces de degradar los D-gluco-D-mananos del Konjak (*Amorphophallus konjac*), produciendo D-

glucosa, D-manosa y una serie de mano y glucomano-oligosacáridos. Se han encontrado dos mecanismos por los cuales la hemicelulosa es degradada enzimáticamente.

En el primer caso el polisacárido es degradado por eliminación sucesiva del azúcar terminal o de unidades de oligosacáridos de la cadena polimérica; las enzimas de tipo exo-hidrolíticas son difíciles de distinguir, debido principalmente a que degradan oligosacáridos de grado de polimerización (dp) mayor a dos. Sólo se ha probado la existencia de una enzima de tipo exo: la exo-L-arabinasa.

En el segundo mecanismo, la cadena del polisacárido es degradada aleatoriamente, liberándose una mezcla de oligosacáridos (por lo que sí se requiere la hidrólisis total del polisacárido será necesario hidrolizarlo sucesivamente en varias etapas). Las hemicelulasas de tipo endo-hidrolítico son más comunes.

La actividad hidrolítica de las mananasas se ve influenciada por la cantidad de galactosa que se encuentra unida al esqueleto del (1→4)-β-D-manano. Se ha demostrado que la presencia en las hemicelulosas de un alto número de galactosas afecta fuertemente a la actividad de la β-D-mananasa; en la goma guar, cuya relación galactosa:manosa es 1:2, y en la alfalfa, cuya relación galactosa:manosa es 1:1, por ejemplo, se reduce sustancialmente la actividad enzimática. En estos casos es necesario un pretratamiento del galactomanano para eliminar la mayor parte de la galactosa y hacer el polisacárido más susceptible al ataque enzimático.

### **2.3 Modo de acción de la β-D-mananasa**

Las β-D-mananasas de origen fúngico degradan el D-manano en forma aleatoria y son de tipo endo. En general, los D-mananos son degradados produciendo una mezcla de mano-oligosacáridos con grados de polimerización (dp) ≥ 2 y mezclas de D-manosa con oligosacáridos que contienen D-galactosa (galactomananos) o D-glucosa (glucomananos). Algunas β-D-mananasas de *Aspergillus niger* (Eriksson y Reedowski, 1969) degradan mano-oligosacáridos con un dp ≥ 3, liberando D-manosa y manobiosas, manotriosas, manotetrosas y manopentosas, y una mezcla de oligosacáridos con un dp ≥ 7. Las características de las enzimas

capaces de degradar mano-oligosacáridos con un  $dp \geq 5$  parecen indicar que el número de sitios de enlace, y por lo tanto los sitios activos de la enzima, deben ser mayores a 5 para la formación efectiva del complejo enzima-sustrato y para una hidrólisis efectiva.

## **2.4 Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas relacionadas con la degradación de mananos**

Aunque el estudio de las mananasas se puede enfocar desde un punto de vista básico, como lo es la elucidación del papel que desempeñan estas enzimas en la degradación de la lignocelulosa, cabe destacar su enorme potencial biotecnológico en procesos tan diversos como:

- a) Bioblanqueo, es decir, eliminación del color de la pasta de papel procedente de maderas de gimnospermas (maderas blandas) ricas en galactoglucomananos. La sustitución de los métodos químicos que actualmente se utilizan por métodos biológicos reduciría en gran medida el impacto ambiental causado por las industrias papeleras (Ratto y Poutanen, 1988; Buchert *et al.*, 1992).
- b) En la industria alimentaria, en el procesamiento del café instantáneo, al reducir la viscosidad del mismo por la hidrólisis de los galactomananos presentes en el mucílago del café (Wong y Sadler, 1993).
- c) En la producción de piensos para animales, ya que un pretratamiento de los mismos con mananasas provoca un incremento de la digestibilidad del material vegetal (Wong y Sadler, 1993).
- d) En procesos de gelificación de materiales, así como en la fabricación de espesantes a partir de mananos. Es de destacar la aplicación de acetil manano esterasas, ya que al eliminar los grupos acetilo, se produce una disminución en la solubilidad del polímero (Puls *et al.*, 1992).

## **2.5 Producción de enzimas**

Las enzimas microbianas se obtienen por fermentación en cultivos líquido, semisólido y sólido en condiciones controladas, de cepas de alto rendimiento. Las

células excretan las enzimas extracelulares al medio. Los organismos más importantes utilizados en la producción de enzimas industriales extracelulares pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Aspergillus*, (en conjunto, producen del 80 al 85% del mercado de enzimas extracelulares). *Trichoderma reesei*, por su parte es actualmente el principal productor de celulasas industriales. Las enzimas extracelulares inducibles como las mananasas (Talbot y Sygusch, 1990; Torrier *et al.*, 1990) tienden a sintetizarse a velocidades basales bajas en ausencia de sustrato, aunque mediante inducción la velocidad de síntesis puede incrementarse varios miles de veces.

La síntesis de enzimas extracelulares está usualmente asociada con la fase de crecimiento exponencial o post-exponencial. Se ha postulado que cuando las enzimas se producen en esta fase la des-represión se debe a la modificación de la especificidad de la ARN polimerasa, a través de la modulación de una pequeña molécula efectora o mediante cambios en la composición de la ARN polimerasa asociados a veces con sucesos tales como la esporulación (Ward, 1989)

## **2.6 Mejoramiento de cepas**

Normalmente, las cepas silvestres de microorganismos tienen una capacidad limitada para la producción de altas concentraciones de metabolitos, lo que las hace poco interesantes desde el punto de vista industrial. Es por ello que desde el inicio de la microbiología industrial se ha buscado mejorar la productividad de los microorganismos a través de los programas de mejora de cepas. Este aspecto incluye no sólo la mejora de la productividad, sino también la adquisición de nuevas características que permitan, por ejemplo, la utilización de sustratos distintos, el crecimiento a una temperatura diferente o la producción de una sustancia completamente nueva, ajena a la célula original.

La aplicación de los conocimientos microbiológicos y de ingeniería bioquímica permite la optimización de las condiciones que envuelven al proceso de fermentación, pero tiene como límite la dotación genética de cada microorganismo y su expresión en las condiciones de fermentación.

La manipulación genética de microorganismos y células permite modificar el genoma, con el objeto de proporcionar esas nuevas características. Esta

modificación puede conseguirse de tres formas 1.- por los métodos clásicos de mutación y selección, 2.- a través de la recombinación genética y 3.- por medio de los métodos de recombinación *in vitro*, clonación de genes o tecnología del ADN recombinante (Ward, 1989). Nos centraremos en el primero de los métodos a lo largo del presente trabajo.

## **2.7 Mutación**

La mutación es un cambio hereditario en la secuencia de bases del ADN de un organismo. Las mutaciones ocurren espontáneamente, pero también se pueden inducir por la acción de agentes mutágenos con el objetivo de incrementar la baja frecuencia de mutación espontánea (entre  $10^{-5}$  y  $10^{-10}$  por generación y gen). La obtención de mutantes por inducción con agentes mutágenos es un procedimiento relativamente sencillo, que no requiere un gran conocimiento de las vías metabólicas, ni de la genética del organismo. Sin embargo, presenta el problema de la distribución al azar de las mutaciones: no se puede predecir cuál va a ser el gen mutado ni el resultado de la mutación. Es por ello que el punto más importante de este método lo constituye la selección, o identificación de las cepas mutantes que poseen el fenotipo buscado. A pesar de estas dificultades, los métodos empíricos de mutación y selección fueron ampliamente utilizados hasta el tercer cuarto del siglo pasado y proporcionaron importantes éxitos a la industria de fermentación (Ward, 1989). Siguen constituyendo, no obstante, una estrategia válida para el desarrollo inicial de cepas sobreproductoras.

### **2.7.1 Inducción de la mutación**

Las mutaciones pueden verse aumentadas en frecuencia por el uso de una serie de agentes mutagénicos o mutágenos. Entre estos agentes se incluyen las radiaciones (ionizantes y no ionizantes) y muchas sustancias químicas de varios tipos. La luz UV, ampliamente utilizada en la inducción de mutaciones, es también un agente natural, por lo que al menos parte de las mutaciones espontáneas que se observan pueden ser debidas a este agente. El efecto de la luz UV es de los más conocidos y consiste esencialmente en una excitación de los electrones en

las bases nitrogenadas que forman parte del ADN, lo que puede dar lugar a dos tipos de consecuencias:

- a) Cambio de una base por su forma tautomérica.
- b) Formación de dímeros de timina, por reacción de dos timinas adyacentes.

La formación de dímeros de timina distorsiona la estructura de doble hélice del ADN, pudiendo producir roturas en la cadena complementaria. La distorsión puede ser reparada, pero también puede conducir a la sustitución de bases y, consecuentemente, a la aparición de transiciones y/o transversiones.

La radiación UV puede también causar mutaciones más severas y afectar no a pequeñas zonas de unos pocos pares de bases del ADN, sino a regiones más largas de las moléculas, e incluso dar lugar a cambios estructurales cromosómicos.

### **2.7.2 Mecanismos de reparación de las mutaciones causadas por la luz UV**

Un primer mecanismo es la reparación o eliminación de los dímeros de timina ocasionados por la radiación UV. El descubrimiento de este mecanismo de reparación fue llevado a cabo por Kelner, cuando observó un aumento en la tasa de supervivencia de bacterias irradiadas con luz UV que eran expuestas después del tratamiento mutagénico a un foco intenso de luz azul.

El mecanismo de reparación a nivel molecular implica la actuación de una enzima fotorreactivada que interacciona con los dímeros de timina (T-T). La unión específica de esta enzima a los dímeros se realiza en la oscuridad, pero la enzima precisa de la absorción de un fotón de luz visible como fuente energética necesaria para el proceso de separación de los dímeros.

Un segundo mecanismo lo constituye la reparación por escisión. La detección de este mecanismo de reparación parte de un descubrimiento de Hollander y Claus (1936), quienes observaron niveles elevados de supervivencia de esporas de hongos tratadas con luz UV y mantenidas en la oscuridad, en una solución tampón, antes de su cultivo en agar nutritivo. Más concluyente, respecto a la existencia de mecanismos de reparación en la oscuridad, ha sido el

descubrimiento de determinados mutantes de *Escherichia coli* defectuosos en otra enzima (la ADN-polimerasa 1). Incapaces de tapar los huecos que se producen por la escisión de los dímeros de timina u otras lesiones. La principal diferencia respecto al mecanismo de fotorreactivación enzimática radica en el hecho de que no se trata simplemente de una enzima que desdobla los dímeros de timina, sino que además utiliza como molde la cadena intacta del ADN para restaurar la cadena dañada y así recuperar la información genética alterada.

La Reparación post-replicación es el tercer mecanismo alternativo de reparación. A priori, puede considerarse como un mecanismo de seguridad que actuaría cuando, tras los dos mecanismos anteriormente citados, aun quedan lesiones en un ADN que ha de comenzar su replicación. El aparato de replicación semiconservativa salta al llegar a tales lesiones y deja en la cadena que se sintetiza *de novo* el hueco correspondiente a las lesiones de la cadena molde, continuando de nuevo su actividad donde terminan las mismas (los espacios pueden llegar a ser de 103 bases). A continuación se llena el hueco por mecanismos diversos. La adición de bases complementarias a una cadena lesionada se realiza mediante otra enzima de síntesis de ADN que no requiere de ADN molde para su actividad, la desoxinucleotidiltransferasa terminal, que simplemente actúa añadiendo bases en el extremo 3' de la cadena nueva portadora de huecos.

Como consecuencia de este mecanismo de reparación, las nuevas moléculas de ADN sintetizadas pueden incorporar mensajes genéticos variantes, es decir, pueden presentar mutaciones del tipo transición, transgresión, delección o adición de bases, (aunque se repare un ADN lesionado, su mensaje puede verse alterado). Este tipo de mecanismo es el que parece provocarse por las alteraciones de algunas radiaciones (UV, y X) y de ciertos mutágenos químicos, tales como los agentes alquilantes que inducen lesiones que son reparadas post-replicación sin complementación de bases posible.

### **2.7.3 Selección de mutantes mejorados**

La selección de mutantes es el paso crucial de cualquier tipo de mejoramiento de cepas. Si no se dispone de un método de selección hay que realizar una tediosa

búsqueda al azar con el fin de localizar entre las supervivientes, cepas que expresen en condiciones de fermentación semejantes a las de la cepa silvestre o parental la nueva característica. Cada cepa seleccionada puede volver a utilizarse en un nuevo ciclo de mutación y selección.

En otros casos la selección se basa en la utilización de alguna característica propia de las mutantes que pueda servir de ayuda durante la búsqueda. Así, puede utilizarse la resistencia a antibióticos para la selección de cepas más productoras de antibióticos o la resistencia a antimetabolitos para seleccionar mutantes con una regulación defectuosa. El aislamiento de mutantes auxótrofas es decir, bloqueadas en una determinada vía de síntesis, y la selección posterior de las revertantes protótrofas también puede servir para la selección de cepas superproductoras de un metabolito (Ward, 1989).

### 3 Antecedentes

*Aspergillus niger* GS1 es un microorganismo que fue aislado de pasta de copra en la Universidad Autónoma Metropolitana en la Planta Piloto 4 del Departamento de Biotecnología. Posiblemente, este microorganismo forma parte de la flora nativa de la pasta de copra (Flores y García, 1995). Esta cepa ha sido utilizada para la producción de  $\beta$ -mananasas a partir de pasta de copra y borra de café, por fermentación en medio sólido (Regalado *et al.*, 2000), obteniéndose una actividad mananasas de 113 U mg<sup>-1</sup> después de 2.5 días de fermentación sobre pasta de copra y de 20.4 U mg<sup>-1</sup> sobre borra de café. Posteriormente se usó esta cepa en la producción de mananasas empleando un reactor de charolas sobre pasta de copra. El extracto obtenido se liofilizó y se comparó con extractos comerciales liofilizados (ver Tabla 1)

**Tabla 1. Actividad mananasa de liofilizados comerciales y de *A. niger* GS1**

| Liofilizado                            | Actividad mananasa (U/g) |
|----------------------------------------|--------------------------|
| <b>DP497</b>                           | <b>1614.30</b>           |
| <b>DP374</b>                           | <b>379.4</b>             |
| <b><i>A. niger</i> GS1<sup>1</sup></b> | <b>80.77</b>             |

1 U = micromoles de manosa liberados / min (40 °C, 10 min)

Tiempo de fermentación para obtener el extracto UAM = 48 horas

(1): Extracto con aproximadamente un 2% (w/v) de sólidos disueltos; el extracto fue liofilizado agregando un 3% de maltodextrina

El extracto enzimático liofilizado obtenido de *A. niger* GS1 tiene una actividad enzimática 20 veces menor que el denominado DP497. Cabe mencionar que el medio de cultivo utilizado para crecer *A. niger* GS1 (pasta de copra) no estaba optimizado. Estudios recientes realizados con *Aspergillus niger* GS1, y un medio de cultivo optimizado, a base de borra de café y otros nutrientes, consiguieron producir una actividad mananasa similar a la obtenida en el extracto DP497 (datos no publicados). Es decir, se puede optimizar un medio de cultivo para incrementar

la actividad mananasa del extracto. Por otro lado, el uso de maltodextrina al realizar la liofilización del extracto enzimático puede interferir en la actividad enzimática, disminuyendo la misma. Por tal motivo se recomienda el uso de una mezcla lactosa-glicerol al 10% y 50%, respectivamente.

De modo complementario, puede recurrirse a los diferentes métodos de mejoramiento de cepas para incrementar la actividad enzimática. Los métodos de mejoramiento de cepas pueden ser de tres tipos: físicos, químicos o biológicos. Dentro de los físicos se encuentran, el uso de radiaciones ionizantes (rayos X y radiación  $\gamma$ ) y radiaciones no ionizantes (luz UV). Los químicos comprenden la adición de análogos de bases, agentes alquilantes y agentes intercalantes. En los biológicos, por su parte se incluyen el uso de fagos, plásmidos y transposones de ADN.

El mejoramiento de cepas por mutación con luz ultravioleta tiene un nivel medio de efectividad, logrando incrementos en la actividad enzimática en rangos variables. Además, es un método clásico de mutación, de fácil manejo y que no requiere de equipo sofisticado. Es seguro y se puede implementar con buenos resultados en el mejoramiento de cepas.

## 4 Justificación

Las mananasas poseen un amplio mercado en la industria alimentaria y biotecnológica, dado que intervienen en procesos de biopulpeo de pulpas kraft, procesamiento del café soluble, producción de piensos para consumo animal, procesos de gelificación de materiales y fabricación de espesantes, entre otros. En extractos crudos liofilizados de *A. niger* GS1, obtenidos de fermentación en medio sólido de pasta de copra (medio no optimizado), se ha observado que la actividad mananasa se encuentra solamente 20 veces por debajo de la actividad enzimática de algunos extractos comerciales. La producción enzimática de *A. niger* GS1 podría alcanzar niveles mayores de actividad mananasa ajustando el medio de cultivo y optimizando la cepa por alguno de los métodos de mejoramiento de cepas. La mutagénesis de *A. niger* GS1 por irradiación con luz UV, como etapa previa a la modificación genética, es una técnica sencilla que permitirá incrementar la producción de actividad mananasa. Investigaciones posteriores al mejoramiento de la cepa estarán enfocadas a la optimización del medio de cultivo y a las etapas de separación y purificación hasta el nivel deseado.

## **5 Objetivo**

Obtener una cepa con mayor actividad mananasa que la cepa silvestre *Aspergillus niger* GS1.

### **5.1 Objetivos específicos**

Mutar la cepa *Aspergillus niger* GS1 y seleccionar mutantes hiperproductoras.

Comparar fisiológicamente la cepa *A. niger* GS1 y la(s) obtenida(s) por mutación con luz UV, tomando en cuenta los siguientes parámetros: velocidad de crecimiento, crecimiento radial, densidad de la colonia, nivel de esporulación, nivel de producción de mananasas y perfil enzimático

Comparar morfológicamente la cepa *A. niger* GS1 y la(s) obtenida(s) por mutación con luz UV comparando diámetro de las hifas, número de ramificaciones y forma de las esporas

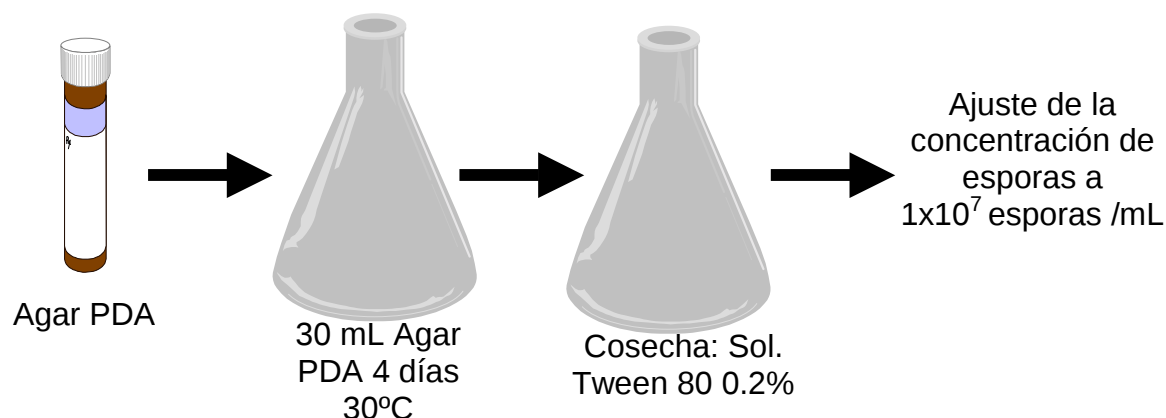
## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Microorganismo utilizado

El microorganismo utilizado fue *Aspergillus niger* GS1, de la colección de cepas de la planta piloto 4 del Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa. El microorganismo se conservó en tubos de agar PDA inclinado.

#### 6.1.1 Propagación de la cepa

Para llevar a cabo la propagación de la cepa a mutagenizar, se tomó una perla de porcelana y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 30 mL de Agar Papa Dextrosa (PDA) a 30°C durante 4 días. Posteriormente, se cosecharon las esporas con 50 mL de una solución de Tween 80 al 0.2% y se realizó el conteo de las esporas en una cámara de Neubauer. Para la propagación de las esporas utilizadas en la fermentación, se propagaron las cepas correspondientes en matraces Erlenmeyer con 30 mL de medio ML1, adicionando 250  $\mu$ L de una suspensión de esporas obtenida de un tubo inclinado. Se incubaron a 30°C durante 96 horas y se cosecharon las esporas con 50 mL de Tween 80 al 0.2%. Se procedió a inocular los sustratos con la concentración de esporas requerida (Ver Figura 1)



**Figura 1. Diagrama de propagación de esporas para la mutación de la cepa silvestre *Aspergillus niger* GS1.**

## 6.2 Medio selectivo

Para seleccionar las cepas productoras con actividad mananasa se utilizó un medio específico denominado ML1. La composición del medio ML1 se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Composición del medio de cultivo  
ML1 (Kusakabe y Takahashi, 1988)**

| Compuesto                            | g/L |
|--------------------------------------|-----|
| Goma de algarrobo                    | 6   |
| Extracto de levadura                 | 0.5 |
| Peptona de caseína                   | 1   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1   |
| (NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>   | 1   |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0.5 |
| Agar                                 | 7   |

## 6.3 Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos planteados se propone la estrategia experimental esquematizada en la Figura 2, dividida en tres etapas. La primera etapa, corresponde a la mutagénesis de la cepa parental con luz UV, para posteriormente realizar una selección de cepas hiperproductoras mediante el análisis del diámetro de los halos de hidrólisis sobre medio ML1, por el método de rojo Congo de acuerdo con el método descrito en la sección 6.5. A continuación, se realiza una fermentación en medio sólido sobre pasta de copra, con la finalidad de obtener extractos enzimáticos y determinar la actividad mananasa por el método de Nelson-Somogyi y rojo Congo sobre medio MLI (lo que constituye la segunda selección). La segunda etapa corresponde a estudios fisiológicos, comparando las cepas mutantes con la cepa parental en cuanto a la velocidad de crecimiento (velocidad de crecimiento radial y densidad de la colonia), nivel de esporulación, nivel de producción de mananasas y perfil enzimático.

En la tercera y última etapa, se realizaron estudios morfológicos de la cepa parental y sus mutantes, donde se midió y observó el diámetro de las hifas, número de ramificaciones y forma de las esporas mediante microscopía electrónica de barrido.



**Figura 2. Estrategia experimental**

## **6.4 Mutagénesis y selección**

Para realizar la mutagénesis y posteriormente seleccionar las mutantes hiperproductoras se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

### **6.4.1 Curva de dosis letal 50**

La cepa *Aspergillus niger* GS1 se propagó en agar PDA, se cosecharon las esporas, ajustándose su concentración a  $1 \times 10^7$  esporas/mL como se describió anteriormente. Posteriormente, se tomaron 15 mL de la suspensión de esporas y se colocaron en una caja de Petri estéril. La suspensión se mantuvo en agitación, con una barra magnética, durante todo el procedimiento. Se procedió a mutagenizarlas colocando la fuente emisora de la radiación UV a 15 cm de altura (medidos a partir de la superficie de la suspensión de esporas).

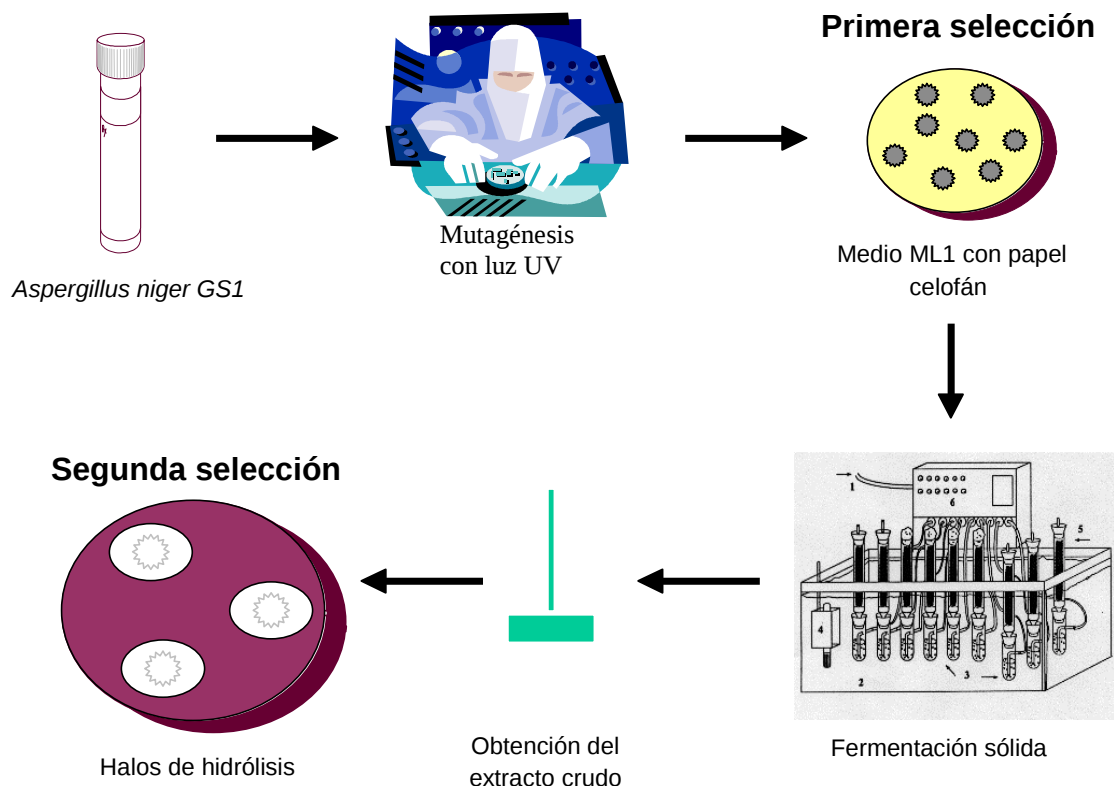
Se tomaron muestras de 1 mL de la suspensión de esporas cada minuto y se colocaron en un baño de hielo. Las muestras se guardaron en la oscuridad durante 30 minutos y posteriormente se efectuaron diluciones hasta obtener una

concentración de  $10^4$  esporas/mL. De esta dilución se sembraron 100  $\mu$ L en cajas de Petri con medio ML1, se incubaron a 30°C durante 48 h y se efectuó el conteo de las colonias. Posteriormente se realizaron los cálculos para obtener las unidades formadoras de colonias (UFC), ver figura 3.

#### **6.4.2 Mutación y selección de las mutantes hiperproductoras**

Basándonos en los datos obtenidos en el apartado anterior, se realizó la mutagénesis de la cepa parental.

El resultado de este procedimiento se sembró sobre cajas de Petri con medio ML1 y papel celofán dulce 400 en su superficie, incubándose a 30°C durante 48 horas. Las colonias crecidas en este medio se pasaron a tubos inclinados con medio ML1, y sobre las cajas se llevó a cabo el revelado de actividad mananasa por el método de rojo congo (sección 6.5). Se tomaron las cepas cuyo halo de hidrólisis fue mayor (primera selección). Con estas cepas se llevó a cabo una fermentación sólida sobre pasta de copra y se cuantificó la actividad mananasa en los extractos crudos enzimáticos. Para ello, se colocaron 13  $\mu$ L del extracto enzimático correspondiente en círculos de papel filtro Whatman No. 41 de 6 mm de diámetro y se incubaron durante 30 minutos a 50°C. Se revelaron por el método del rojo Congo y se determinó qué cepas produjeron el mayor halo de hidrólisis. A estas cepas se les denominó mutantes hiperproductoras (segunda selección) (ver Figura 3).



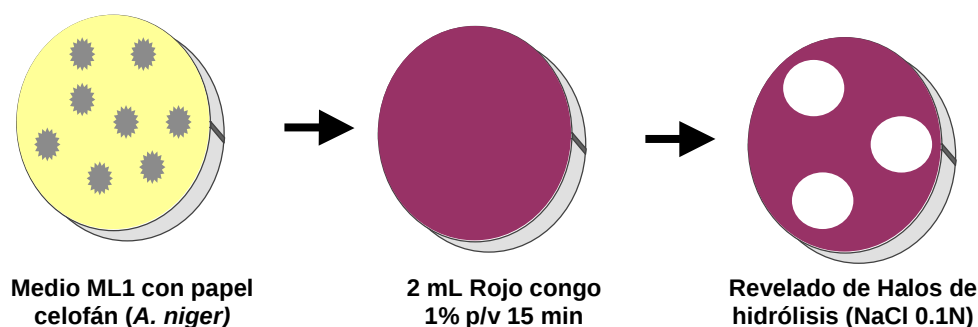
**Figura 3. Diagrama de mutagénesis y selección de cepas hiperproductoras**

### 6.5 Determinación de actividad mananasa

Para llevar a cabo la determinación de actividad mananasa se utilizó el método de Downie *et al.* (1994) con rojo Congo. Se realizó una modificación del método para obtener una mejor definición de los halos de actividad, ya que el micelio presente interfiere con la definición de los mismos. Por ello se colocó sobre el medio ML1 un círculo de papel celofán dulce 400, cubriendo completamente la caja de Petri, y sobre éste se colocó el inóculo. El tiempo y temperatura de incubación empleados fueron de 48 horas y 30°C, respectivamente. Un esquema de este método se ilustra en la Figura 4.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se midieron las colonias, se retiró el papel celofán y se adicionaron 3 mL de rojo Congo, agitándose las cajas ligeramente en periodos de 30 seg durante 15 min. Posteriormente se decantó el colorante y se lavaron las cajas con NaCl 0.1N. Se escurrió el exceso de líquidos y

se determinó el diámetro de los halos de hidrólisis, seleccionándose las cepas cuyos halos de hidrólisis fueron mayores para posteriores estudios.



**Figura 4. Determinación de actividad mananasa por el método de Downie et al. (1994)**

## 6.6 Cuantificación de la actividad enzimática

Se colocaron 25  $\mu$ L de sustrato más 25  $\mu$ L de extracto enzimático y se incubaron a 50°C durante 10 minutos. Posteriormente se enfrió la mezcla de reacción en hielo para a continuación determinar azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi (1944, 1952) empleando manosa como estándar.

### 6.6.1 Método de Nelson-Somogyi

El método de Nelson-Somogyi (1944, 1952) se realizó utilizando el siguiente procedimiento:

- Preparación de los reactivos

Reactivo de Nelson provisto por SIGMA

Reactivo de Somogyi:

A) sulfato de cobre pentahidratado 10% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.5N

B) Solución de fosfato tartrato

- Fosfato de sodio dibásico anhidro: 28g (ó  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 70.59 g), disuelto en 700 mL de  $\text{H}_2\text{O}$

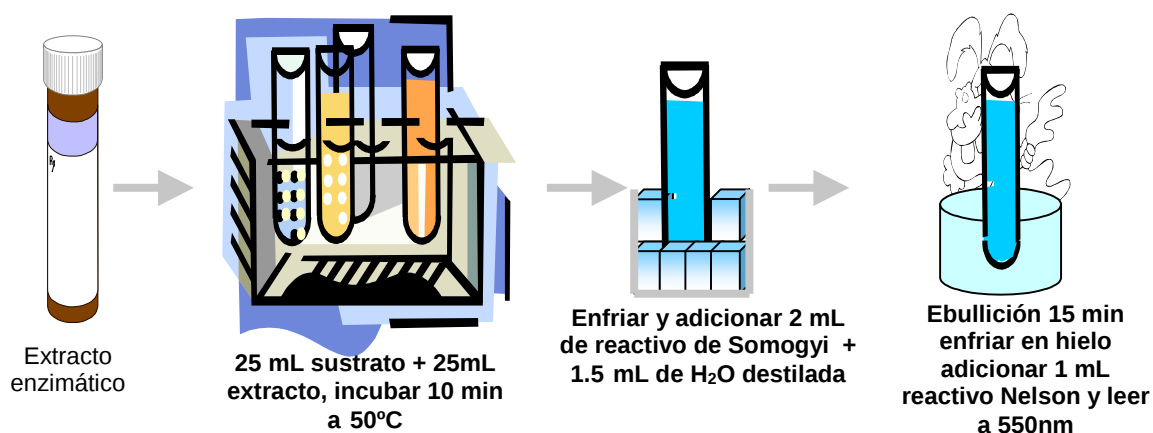
- Tartrato de sodio y potasio: 40 g disuelto en 100 mL de NaOH 1N

- Sulfato de sodio anhidro: 120 g, disueltos en la mezcla de tartrato, completándose al volumen hasta 900 mL

Reposar 48h a 30°C, filtrar y guardar a temperatura ambiente.

Mezclar 9 volúmenes de B + 1 volumen de A.

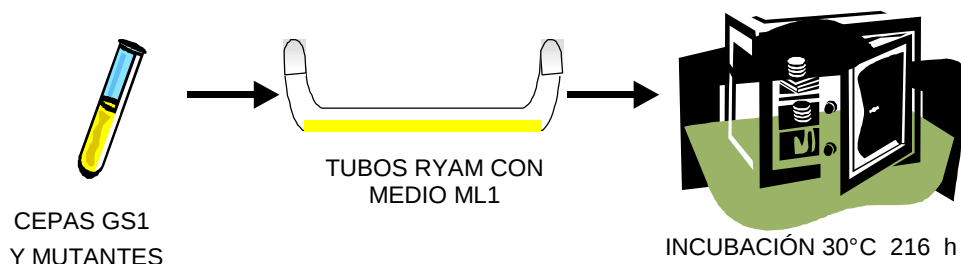
- La metodología fue la siguiente: después de la reacción enzimática se adicionaron 2 mL del reactivo de Somogyi más 1.5 mL de agua y la mezcla se colocó en un baño a ebullición durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo la mezcla se enfrió en baño de hielo y se adicionó 1 mL de reactivo de Nelson, agitándose y midiéndose la absorbancia a 550 nm (Figura 5).



**Figura 5. Método de Nelson-Somogyi para la cuantificación de actividad enzimática. Los sustratos empleados fueron carboximetil celulosa, goma de algarrobo y xilano.**

### 6.7 Velocidad de crecimiento radial

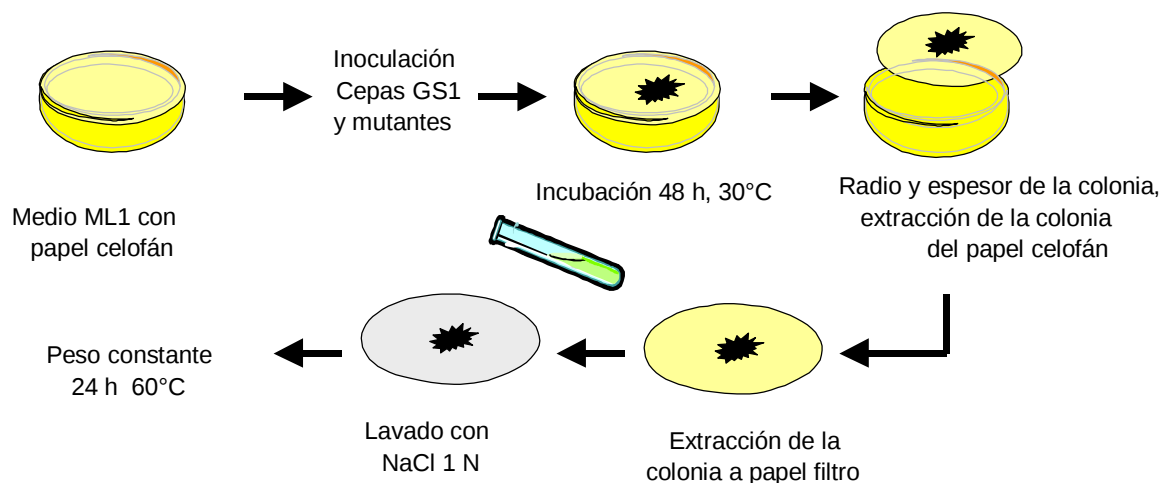
Se prepararon tubos de RYAM con 20 mL de medio ML1 y se inocularon por picadura en un extremo del tubo de RYAM, como se indica en la figura 6. Los tubos se incubaron durante 7 días a 30°C, determinándose el crecimiento radial como el incremento en la longitud de la colonia cada 24 h.



**Figura 6. Crecimiento radial**

### 6.8 Densidad de la colonia

Se prepararon cajas de Petri con medio ML1, colocándose sobre el medio un papel celofán e inoculándose sobre éste el microorganismo por picadura. Las cajas se incubaron a 30°C durante 4 días. Posteriormente, se retiró el papel celofán del medio de cultivo y la biomasa obtenida se lavó con una solución de NaCl al 10% p/v, colocándola en un papel filtro de peso conocido. La biomasa colectada en el papel filtro se lavó 2 veces con agua destilada y se llevó a peso constante durante 24 h a 60°C (Figura 7).



**Figura 7. Diagrama para la determinación del crecimiento de la colonia**

### 6.9 Nivel de esporulación

Se prepararon matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio ML1. Y se inocularon con las cepas de *Aspergillus niger* GS1, GS1-S059, y GS1-0S67, usándose una concentración de inóculo de  $1 \times 10^6$  esporas/mL e incubándose durante 4 días a 30°C. Posteriormente, se cosecharon las esporas con 50 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.2% y se realizó el conteo de esporas en una cámara de Neubauer.

Cálculo:

$$(\text{Esporas/mL}) = 25 \times X \times 10^4 \times 10$$

donde:

25 es el número de cuadros totales de la cámara de Neubauer

X= media aritmética del número de esporas

$10^4$  = Factor de volumen de la cámara de Neubauer

10= dilución de la muestra

### 6.10 Fermentación sólida

Para llevar a cabo la fermentación sólida se empleó pasta de copra, la cual se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 15 libras/pulgada<sup>2</sup> durante 15 minutos. La pasta se inoculó con la cepa correspondiente en condiciones estériles y los experimentos se realizaron por triplicado, con una concentración de esporas de  $2 \times 10^7$  esporas/g de materia seca. La pasta de copra inoculada se empacó en columnas de vidrio de 2 cm de radio por 20 cm de largo (Figura 8) las cuales se colocaron en un sistema de fermentación (Raimbault y Alazard, 1980) (Figura 9), a 30°C durante 48 horas.

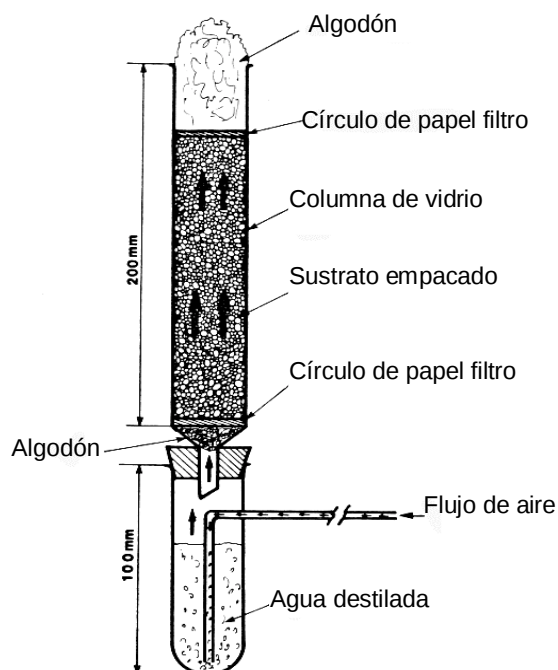
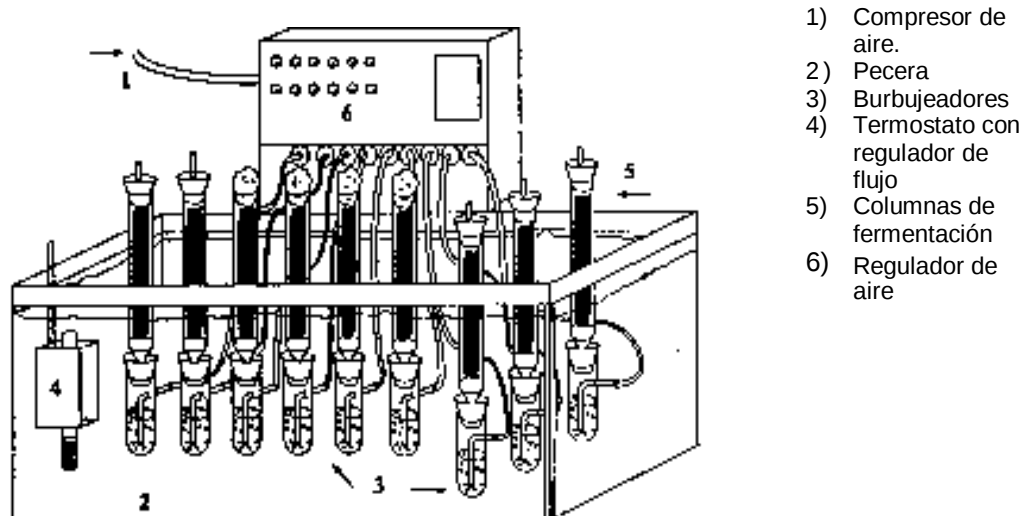


Figura 8. Columna de fermentación (Tomado de Raimbault y Alazard, 1980)



**Figura 9. Sistema de fermentación sólida en columna  
 (Raimbault y Alazard, 1980)**

#### **6.10.1 Obtención del extracto enzimático**

Terminada la fermentación, el material empacado fermentado se sometió a una extracción para obtener un extracto crudo enzimático. Con estos extractos se llevó a cabo la cuantificación de las actividades mananasa, xilanasa y carboximetil celulasa.

Para la extracción se pesó el contenido de una columna de fermentación, y se le adicionó buffer de acetatos 50mM pH 5 en relación 1:1, homogenizándose con una espátula. La extracción se realizó mediante una prensa hidráulica (ERKCO modelo PH-51T) a una presión de 2,000 psi. Posteriormente, el extracto se filtró al vacío usando papel Whatman® 41. Al filtrado obtenido lo referimos en lo sucesivo como extracto crudo enzimático.

#### **6.11 Fermentación sumergida**

Preparación del sustrato: Se colocaron 20 g de pasta de copra en un litro de agua destilada caliente (entre 85-90°C) con agitación, durante 10 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar y se filtró. Se colocaron 50 mL de este extracto en

matraces bafleados de 250 mL y se esterilizó a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos. Los matraces se inocularon con la cepa correspondiente en condiciones estériles, realizándose los experimentos por triplicado con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas por mililitro de medio de cultivo. Finalmente, se incubaron a 30°C durante 120 horas, con agitación en un agitador orbital rotatorio a 200 rpm.

#### **6.11.1 Obtención del extracto enzimático**

El micelio incubado se filtró sobre papel Watman No.41 colectándose los distintos filtrados en frascos debidamente etiquetados: a este filtrado se le denominó extracto crudo enzimático. Con estos extractos se llevó a cabo la cuantificación de las actividades mananasa, xilanasa y carboximetil celulasa.

#### **6.12 Fermentación sobre espuma de poliuretano (PUF)**

Preparación del Sustrato: Se colocaron 20 g de pasta de copra en un litro de agua destilada caliente (entre 85-90°C) con agitación, durante 10 minutos y se dejó enfriar. Posteriormente, se filtró el medio y se colocaron 50 mL en matraces de 125 mL con 5 g de poliuretano (a peso constante). Estos matraces se inocularon con una suspensión de esporas que permitiera tener una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas/g de PUF y se colocaron en un agitador orbital rotatorio a 200 rpm durante 120 horas, a 30°C.

#### **6.12.1 Obtención del extracto enzimático**

Tras la fermentación se pesó el poliuretano, adicionándose buffer de acetatos 50 mM pH 5 en relación 1:1, más 10 mL de exceso. Se agitó la mezcla durante 10 min y posteriormente se filtró sobre papel filtro Whatman No. 41. Los filtrados se colectaron en frascos debidamente etiquetados: a este filtrado se le denominó extracto crudo enzimático. Con estos extractos se determinaron las actividades mananasa, xilanasa y carboximetil celulasa.

## **6.13 Estudios morfológicos**

### **6.13.1 Preparación de las muestras para microscopía electrónica de barrido**

Se inocularon las cepas GS1, GS1-S059 y GS1-S067 en cajas de Petri con medio ML1 a 30°C durante 48 horas. Se cortaron trozos de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> y se colocaron en viales de 5 mL. Se adicionó glutaraldehído al 5% preparado con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.3, para realizar un fijado primario de las células. Posteriormente, se lavaron las preparaciones con buffer hasta la eliminación total del olor a glutaraldehído. Se adicionó tetraóxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.3 y se dejó actuar durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el tetraóxido de osmio de las preparaciones y se lavaron las preparaciones con buffer de fosfatos (Figura 10)

### **6.13.2 Deshidratado**

Se deshidrataron las preparaciones por etapas, con la adición de acetona a diferentes concentraciones (30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100%), lavándose las preparaciones dos veces a intervalos de 30 minutos con las diferentes soluciones de acetona (Figura 10)

### **6.13.3 Montaje de las muestras**

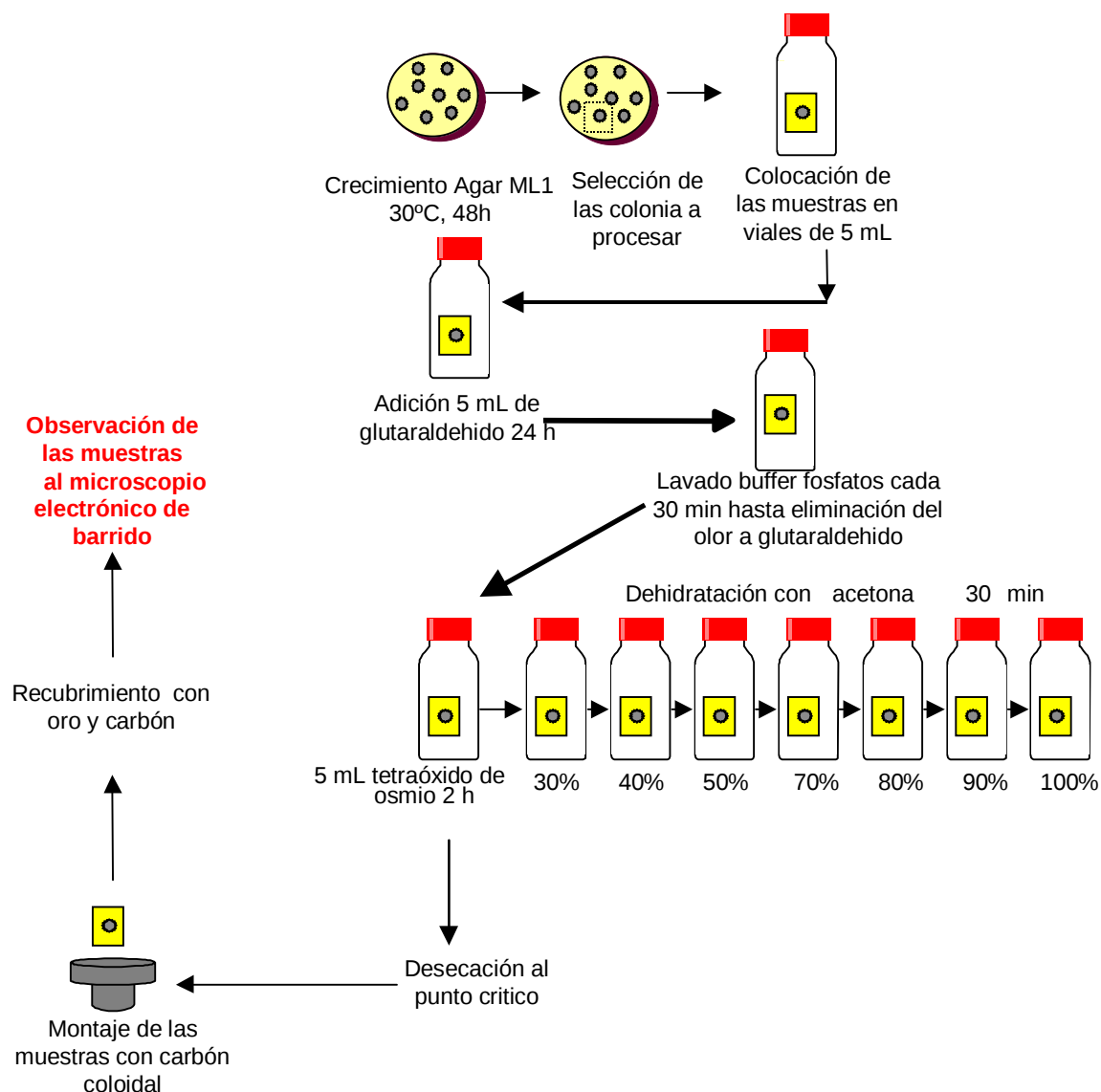
Las muestras se colocaron en portamuestras de aluminio, fijándolas con carbón coloidal.

### **6.13.4 Secado al punto crítico**

El secado al punto crítico se realizó en un equipo Samdri-780B

### **6.13.5 Cobertura con carbón y oro**

La cobertura con carbón evaporado al vacío se realizó con un equipo Baltec SCD050. Posteriormente, las muestras se recubrieron con iones de oro, llevándose a cabo la observación de las preparaciones en un microscopio electrónico de barrido Zellss DSM 940 A.



**Fig 10. Diagrama para la preparación de muestras y observación al microscopio electrónico de barrido**

## 6.14 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron usando el paquete estadístico SPSS 9.0

### 6.14.1 Prueba de intervalos múltiples (Duncan)

Este procedimiento compara todas las parejas de medias. Dicha prueba determina el error estándar de cada promedio, a continuación, se prueban las diferencias observadas, entre las medias, comenzando por el valor más alto contra el más pequeño, comparando esta diferencia con el intervalo mínimo significativo. Después se calcula la diferencia entre el valor más alto y el segundo más pequeño

y se compara con el intervalo significativo mínimo. Este procedimiento continua hasta que todas las medias han sido comparadas con la media más grande. A continuación, la diferencia entre la segunda media más grande y la más pequeña se calcula y compara contra el intervalo mínimo significativo. Este proceso continua hasta que ha sido consideradas las diferencias entre todos los posibles pares. Si una diferencia observada es mayor que el intervalo mínimo significativo correspondiente, se concluye que la pareja de medias en cuestión es significativamente diferente. Para evitar contradicciones, ninguna diferencia entre una pareja de medias se considera significativa si las dos medias se encuentran entre otras dos que no difieran significativamente

#### **6.14.2 Correlación simple (Pearson)**

En el modelo clásico de regresión, sólo Y, a la que se le ha llamado la variable dependiente, es aleatoria. La variable X se define como una variable fija (no aleatoria o matemática) y recibe el nombre de variable independiente. Cuando tanto Y como X son variables aleatorias, se tiene lo que se conoce como el modelo de correlación. Típicamente, bajo el modelo de correlación, se obtienen observaciones de la muestra seleccionando una muestra al azar de las unidades de asociación y tomando una medida de X y una medida de Y sobre cada una. La correlación, que comprende dos variables, implica una correlación entre las variables ambas sobre un mismo terreno y no las distingue, refiriéndose a una como la variable dependiente y a la otra como la variable independiente.

## 7 Resultados y discusión

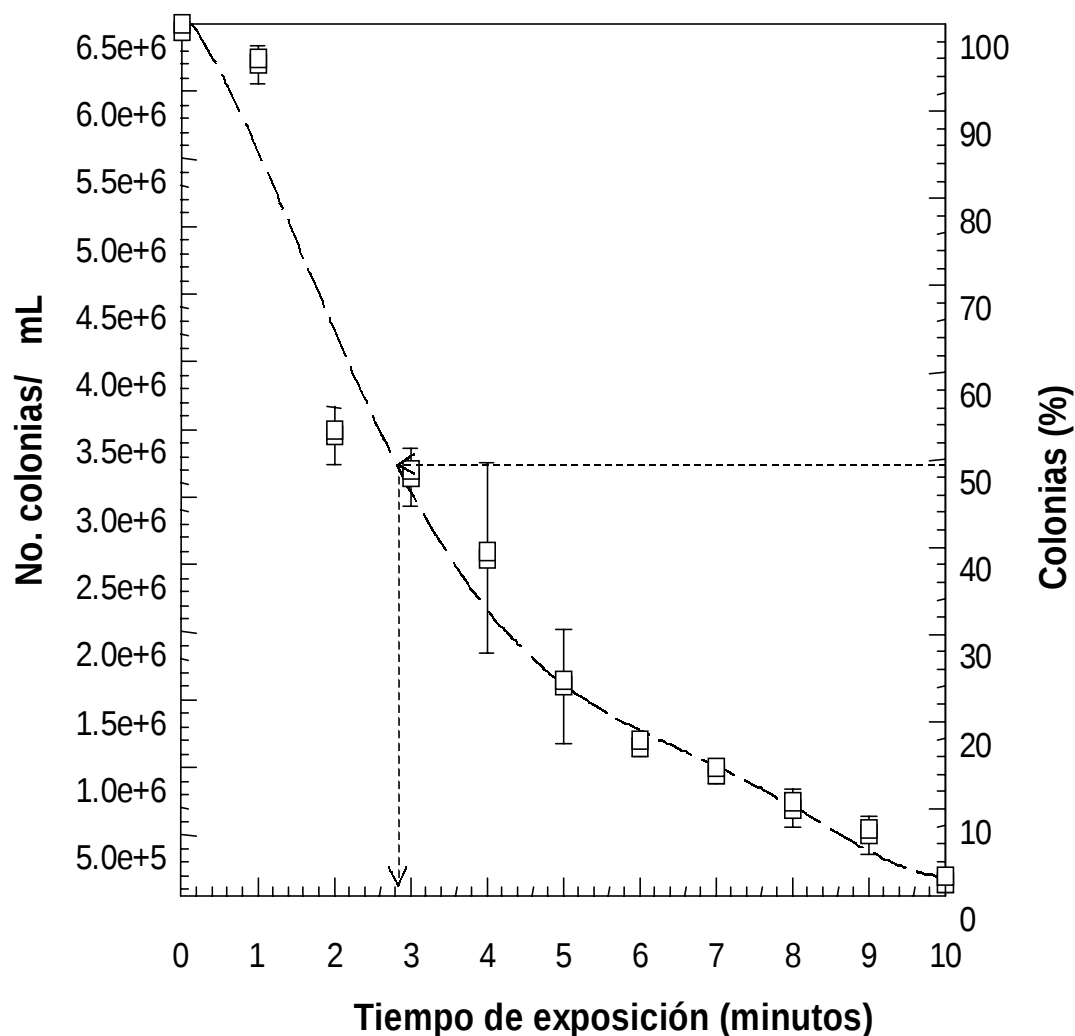
### 7.1 Dosis letal 50

Los rayos UV son importantes inductores de la aparición de mutaciones. Debido a sus altas frecuencias, los rayos UV son absorbidos con facilidad por algunos compuestos, sobre todos los que contienen purinas y pirimidinas.

Las pirimidinas (timina y citosina) son especialmente sensibles y se modifican por la absorción de rayos UV. Los cambios efectuados en las bases pueden provocar el principal efecto mutagénico de los rayos UV, no por alterar el ADN propiamente dicho, sino por formar dímeros de timina que distorsionan la hélice de ADN y bloquean futuras replicaciones. Por lo general, la relación que existe entre la dosis de rayos UV incidente y la tasa de mutación producida no es lineal.

Datos provenientes de muchos estudios realizados con diversos materiales indican que el efecto mutagénico de los rayos UV es indirecto y que implica a precursores y enzimas productoras de ADN y no al ADN propiamente dicho. La irradiación con UV puede tener consecuencias letales para la cepa por lo que se determinó como óptimo para nuestro estudio un tiempo de exposición a la luz UV en el cual se obtiene un 50% de sobrevivencia. Si partimos de una suspensión inicial de  $1 \times 10^7$  esporas/mL, contaríamos aún con un buen número de sobrevivientes entre las que se podría seleccionar aquellas con mayor capacidad de degradación de la goma de algarrobo como fuente de carbono (indicativo de la actividad hidrolítica incrementada de las mananasa).

En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos en la curva de determinación de la dosis letal 50, donde se determinó que el tiempo en el cual se tiene un 50% de mortandad después de la mutagenización es de 3 minutos para *Aspergillus niger* GS1



**Figura 11. Curva de dosis letal 50 para *Aspergillus niger* GS1, con exposición a la luz UV a una longitud de onda 254 nm**

Los resultados obtenidos, en cuanto a la dosis letal para *Aspergillus niger*, se encuentran dentro del rango reportado con anterioridad (Loera, 1994; Herrera, 2002).

## 7.2 Elección del papel celofán

De acuerdo con la bibliografía el papel celofán se puede usar sobre las placas de agar para permitir un crecimiento homogéneo de las colonias (Trinci, 1973).

El papel celofán usado para la determinación de halos de actividad enzimática por el método del rojo Congo se eligió de acuerdo a las características del crecimiento

y tamaño de las colonias que crecían sobre el, además de la resistencia del papel celofán a la rotura al ser retirado del agar (Tabla 3).

**Tabla 3. Elección del papel celofán usado en la determinación de halos de actividad mananasa**

| Tipo de celofán | Crecimiento | Tamaño de la colonia | Resistencia del papel celofán |
|-----------------|-------------|----------------------|-------------------------------|
| Papelería       | X           |                      |                               |
| BIORAD          | √           | ++                   | +                             |
| Dulce 300       | √           | +++                  | +                             |
| Dulce 400       | √           | +++                  | +++                           |
| Dulce 500       | √           | ++                   | +++                           |

Donde X = sin crecimiento, √ = crecimiento, + = Nivel de resistencia y tamaño de la colonia.  
(mayor número de símbolos implican mayor resistencia y tamaño de las colonias).

De acuerdo con la Tabla 3, el papel celofán adquirido en la papelería no permite el crecimiento de *Aspergillus niger* GS1. Los tipos restantes si permitieron el crecimiento del microorganismo. En cuanto al tamaño de la colonia, los papeles denominados como dulce 300 y 400 mostraron un mejor desarrollo de *Aspergillus* (cuantificado como incremento en el diámetro de la colonia) después de 48 h de incubación a 30°C. En cuanto a la resistencia del papel celofán, los denominados como dulce 400 y 500 tienen la mejor resistencia al ser retirados de la caja de Petri. De acuerdo con el análisis anterior, el papel celofán que permite un mejor crecimiento y presenta mayor resistencia es el papel celofán dulce 400.

### 7.3 Primera selección: Determinación de halos de actividad enzimática y crecimiento de las colonias

La selección de mutantes hiperproductoras de mananasas se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 6.4.2 utilizando un tiempo de mutagénesis de 3 minutos y se llevó a cabo en cuatro ocasiones. Se obtuvieron 84 en total, determinándose el diámetro de halo de hidrólisis para cada una de ellas, por

triplicado (indicativo de la actividad mananasa de cada cepa). Una vez determinado este dato, se tomaron sólo las cepas cuyos halos de hidrólisis fueron mayores al de la cepa parental.

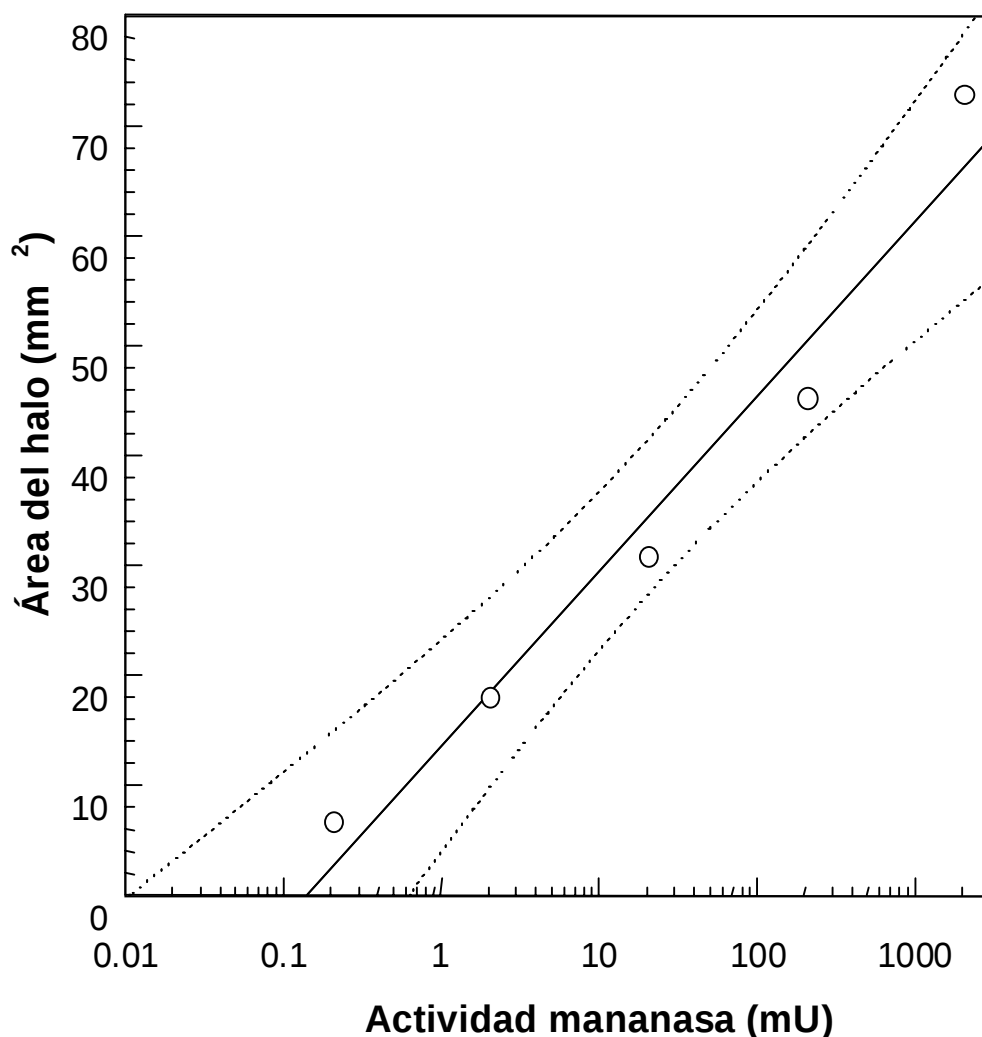
**Tabla 4. Halos de actividad mananasa y crecimiento de colonias  
(primera selección)**

| <b>Cepas<br/><i>A. niger</i></b> | <b>Diámetro de la colonia<br/>(cm)</b> | <b>Diámetro del halo<br/>(cm)</b> | <b>Relación<br/>Halo:Colonia</b> |
|----------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| <b>GS1</b>                       | <b>1</b>                               | <b>1.3</b>                        | <b>1.30</b>                      |
| <b>GS1-S047</b>                  | <b>0.9</b>                             | <b>1.4</b>                        | <b>1.56</b>                      |
| <b>GS1-S048</b>                  | <b>0.6</b>                             | <b>1</b>                          | <b>1.67</b>                      |
| <b>GS1-S059</b>                  | <b>1</b>                               | <b>1.8</b>                        | <b>1.8</b>                       |
| <b>GS1-S064</b>                  | <b>1</b>                               | <b>1.4</b>                        | <b>1.4</b>                       |
| <b>GS1-S067</b>                  | <b>1</b>                               | <b>1.7</b>                        | <b>1.7</b>                       |

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos en la primera selección de mutantes con el método del rojo Congo. Como resultado de la primera selección se obtuvieron cinco cepas hiperproductoras, con las cuales se llevó a cabo una fermentación en medio sólido con pasta de copra. En esta misma tabla se puede observar que las cepas mutantes GS1-S059 y GS1-S067 tienen la mayor relación diámetro halo de hidrólisis con respecto a la cepa parental.

#### **7.4 Recta patrón de actividad mananasa**

Para llevar a cabo esta determinación se utilizó un extracto enzimático comercial denominado como DP497 (ver Tabla 1), al cual se le determinó una actividad mananasa de 1,614.30 U/g (Figura 12).



**Figura 12. Recta patrón de actividad mananasa (50°C, 30 min)**

Las distintas concentraciones utilizadas nos permiten confirmar la linealidad de la relación entre actividad enzimática y área del halo. Con esta recta se realizó la segunda selección pudiendo convertir los diámetros del halo de hidrólisis en los extractos enzimáticos obtenidos por fermentación en medio sólido sobre pasta de copra (sección 6.4.2) en actividad enzimática

### 7.5 Segunda selección: determinación de actividad mananasa

Las mutantes obtenidas en la primera selección fueron sometidas a fermentación en medio sólido, obteniéndose extractos crudos enzimáticos y determinándose la actividad enzimática de acuerdo con la metodología descrita en la sección 6.6 y 6.6.1. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Determinación de actividad enzimática  
(segunda selección)**

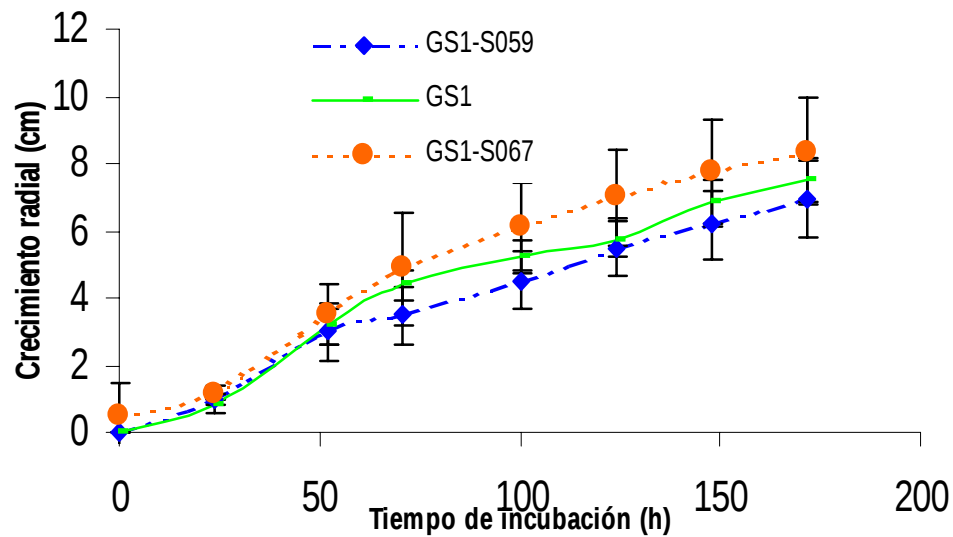
| <b>Cepas<br/><i>A. niger</i></b> | <b>Actividad mananasa<br/>(U/mL)</b> |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| <b>GS1</b>                       | <b>0.153</b>                         |
| <b>GS1-S047</b>                  | <b>0.114</b>                         |
| <b>GS1-S048</b>                  | <b>0.170</b>                         |
| <b>GS1-S059</b>                  | <b>0.501</b>                         |
| <b>GS1-S064</b>                  | <b>0.256</b>                         |
| <b>GS1-S067</b>                  | <b>0.438</b>                         |

De acuerdo con los resultados obtenidos las cepas mutantes con mayor actividad enzimática son las denominadas como GS1-S059 y GS1-S067, las mismas que presentaron una relación diámetro halo de hidrólisis:diámetro colonia mayor. Estas cepas se tomaron para realizar los estudios fisiológicos y morfológicos posteriores.

## **7.6 Estudios fisiológicos**

### **7.6.1 Velocidad de crecimiento radial (o apical)**

La velocidad de crecimiento apical es indicativa de la velocidad de crecimiento del microorganismo y de su capacidad invasiva. Con este experimento, así como con los correspondientes a la segunda y tercera etapa de la estrategia experimental, se pretende comparar y determinar posibles diferencias a nivel fisiológico y morfológico relacionables con el aumento en la capacidad de producción de mananasas en las cepas hiperproductoras. (Siempre en comparación con la cepa parental). En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos para el crecimiento radial o apical.



**Figura 13. Gráfica de crecimiento radial contra tiempo**

Debido a que no se puede apreciar claramente una diferencia entre las cepas, se determinó la velocidad de crecimiento radial mediante una regresión lineal de los datos y un análisis de varianza de las velocidades obtenidas por el método de Duncan con una  $\alpha$  de 0.05 (Tabla 6). La cepa GS1 no muestra diferencia significativa con la cepa GS1-S059 pero sí con la cepa GS1-S067.

**Tabla 6 Crecimiento de la colonia**

| Cepas<br><i>A. niger</i> | Kr (cm/h)  | Crecimiento<br>(g biomasa/cm <sup>2</sup> *h) |
|--------------------------|------------|-----------------------------------------------|
| GS1                      | 0.0439 (a) | 3.541x10 <sup>5</sup>                         |
| GS1-S059                 | 0.0402 (a) | 3.404x10 <sup>5</sup>                         |
| GS1-S067                 | 0.0516 (b) | 4.117x10 <sup>5</sup>                         |

**Método de Duncan  $\alpha=0.05$**

La velocidad de crecimiento ( $K_r$ ) para la cepa GS1-S067 es 1.17 veces mayor que la constante obtenida para la cepa GS1. En cuanto al crecimiento dado en g de biomasa/cm<sup>2</sup>xh, la cepa GS1-S067 incrementó su biomasa 1.16 veces más rápido que la cepa GS1. El crecimiento radial y la  $K_r$  se relacionan con la capacidad invasiva del microorganismo sobre el sustrato, resultando prometedor en este aspecto el mutante GS1-S067 desde el punto de vista de su utilización en fermentación sólida. En este tipo de fermentación se requiere que el microorganismo empleado tenga una alta capacidad invasiva, para evitar contaminaciones (Viniegra-González, 1997).

### 7.6.2 Nivel de esporulación

El nivel de esporulación obtenido para las tres cepas se muestra en la Tabla 7. En ella se puede observar que existen diferencias en el nivel de esporulación entre las cepas probadas. La cepa GS1-S059 es la que presenta el mayor nivel de esporulación.

**Tabla 7. Nivel de esporulación de las cepas y viabilidad de las esporas**

| <b>Cepa</b>     | <b>Tiempo de incubación (h)</b> | <b>Esporas/mL</b>                                      | <b>% de viabilidad de las esporas</b> |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>GS1</b>      | <b>96</b>                       | <b><math>2.45 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7</math></b> | <b>43</b>                             |
| <b>GS1-S059</b> | <b>96</b>                       | <b><math>3.61 \times 10^8 \pm 2 \times 10^7</math></b> | <b>41</b>                             |
| <b>GS1-S067</b> | <b>144</b>                      | <b><math>1.42 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7</math></b> | <b>36</b>                             |

Otra diferencia notoria entre las cepas, es el tiempo de esporulación, mayor para la cepa GS1-S067 (aunque su nivel de esporulación sea 1.67 veces menor que para la cepa GS1). Un retardo en el tiempo de esporulación podría resultar benéfico, ya que se podría incrementar el tiempo de fermentación sin llegar a tener un exceso de esporas en el extracto enzimático.

El 43% de las esporas que se inocularon, para la cepa GS1 resultaron viables. Para las cepas GS1-S059 y GS1-S067 la viabilidad de las esporas disminuye 1.01 y 1.2 veces, respectivamente, con relación a la cepa silvestre. Este fenómeno

podría ser efecto de la mutación o del rosa de Bengala agregado al medio de cultivo para retardar el crecimiento y poder contar las colonias.

### 7.6.3 Nivel de actividad mananasa

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos, encontrándose un nivel de actividad mananasa en medio sólido incrementado en 3.26 veces, para la cepa GS1-S059, y en 2.85 para la cepa GS1-S067. No se detectó actividad mananasa con la metodología utilizada empleando fermentación en medio líquido o espuma de poliuretano (PUF) como soporte sólido.

No se pudo determinar la biomasa en la fermentación en medio sólido. Para la fermentación en medio líquido, la biomasa obtenida en la cepa GS1 fue 2.38 veces mayor que la de las cepas mutantes, mientras que para la fermentación sobre PUF la biomasa correspondiente a la cepa GS1 fue 1.24 veces mayor que en las mutantes, no pudiéndose determinar este parámetro en la cepa GS1-S067.

**Tabla 8. Nivel de actividad y crecimiento de las cepas seleccionadas**

| Cepas           | Cultivo         |            |                |              |                |              |
|-----------------|-----------------|------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
|                 | Sólido          |            | Líquido        |              | PUF            |              |
|                 | Actividad U/ mL | Biomasa mg | Actividad U/mL | Biomasa mg   | Actividad U/mL | Biomasa mg   |
| <b>GS1</b>      | <b>0.153</b>    | <b>ND</b>  | <b>-</b>       | <b>165.8</b> | <b>-</b>       | <b>39.48</b> |
| <b>GS1-S059</b> | <b>0.501</b>    | <b>ND</b>  | <b>-</b>       | <b>71.56</b> | <b>-</b>       | <b>31.7</b>  |
| <b>GS1-S067</b> | <b>0.438</b>    | <b>ND</b>  | <b>-</b>       | <b>70.29</b> | <b>-</b>       | <b>-</b>     |

**1U = micromoles de manosa liberados por minuto**

Comparando con los datos reportados en la bibliografía, se encontró que la actividad enzimática producida por *Bacillus subtilis* (Mendoza *et al.*, 1994) fue de 0.8 U/mL a las 24 h, con condiciones de reacción de 37°C, pH 5.5 y 10 min (Torrier *et al.*, 1990) reportaron 0.2 IU/mL para *Trichoderma harzianum* E58 en un cultivo de 48 horas, definiendo las unidades en función de las condiciones de reacción (50°C, 30 min y pH 4.8). Tanto estos autores como los anteriores usaron

goma de algarrobo como inductor de la actividad mananasa (Talbot y Sygusch, 1990).

En nuestro caso el uso de la mutación con luz UV incrementó el nivel de producción de enzima 3.6 y 2.6 veces, respectivamente, con lo cual se cumple uno de los objetivos del presente trabajo. Mejoras similares en la producción, aunque en este caso de ácido cítrico en *A. niger*, se han descrito también mediante la utilización de mutagénesis con luz UV (Ikram-ul-Haq, 2001).

#### 7.6.4 Perfil Enzimático

Los resultados del perfil enzimático (Tabla 9) muestran que el nivel de producción de celulasa se incrementó 3.70 veces para la cepa GS1-S059 respecto de la cepa GS1, y 2.65 veces en la mutante GS1-S067. Para la actividad xilanasa, el incremento fue 6.19 veces en la cepa GS1-S059 y de 4.82 veces para la cepa GS1-S067.

**Tabla 9. Perfil enzimático de las cepas seleccionadas**

| Cepas           | Actividad enzimática (U/mL) |               |               | $\mu\text{CO}_2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ |
|-----------------|-----------------------------|---------------|---------------|------------------------------------------|
|                 | Mananasa**                  | Celulasa **   | Xilanasa**    |                                          |
| <b>GS1</b>      | <b>0.1538</b>               | <b>0.098</b>  | <b>0.065</b>  | <b>0.14</b>                              |
| <b>GS1-S059</b> | <b>0.5014</b>               | <b>0.363</b>  | <b>0.4025</b> | <b>0.15</b>                              |
| <b>GS1-S067</b> | <b>0.4384</b>               | <b>0.2604</b> | <b>0.3136</b> | <b>0.15</b>                              |

\*\* Indican correlación entre ellas (Análisis estadístico de Pearson)

Las cepas mutantes GS1-S059 y GS1-S067 incrementaron su nivel de producción de xilanasas y celulasas, mejorando así sus posibilidades de aplicación en la industria, ya que estas enzimas intervienen en los procesos de biopulpeo (Ratto y Poutanen, 1988; Buchert *et al.*, 1992) y en la elaboración de piensos (Wong y Saddler, 1993). De acuerdo con los resultados obtenidos para el perfil enzimático podemos suponer que el regulon específico para mananasas es el mismo para xilanasas y celulasas ya que al incrementar una las otras también incrementan. El análisis estadístico de Pearson realizado para el perfil enzimático indica que las

actividades enzimáticas son dependientes entre si, es decir si la actividad mananasa se incrementa también se incrementarían los niveles de actividad enzimática para celulasa y xilanasas lo cual confirma nuestra suposición de una regulación conjunta entre las tres enzimas.

## 7.7 Estudios morfológicos

Los estudios morfológicos se realizaron comparando la cepa parental con las cepas mutantes. Estos estudios se realizaron por microscopía electrónica de barrido, con la finalidad de caracterizar las cepas.

### 7.7.1 Diámetro de los esporangios

Los esporangios o cabezas de conidios son característicos para diferenciar los diferentes grupos de *Aspergillus*. Estas cabezas están formadas por un conidióforo, vesícula, una serie de esterigmas primarios, seguida de una segunda serie de esterigmas secundarios de los cuales brotan las conidias o esporas. En la Figura 14 se muestran estas estructuras para la cepa parental.

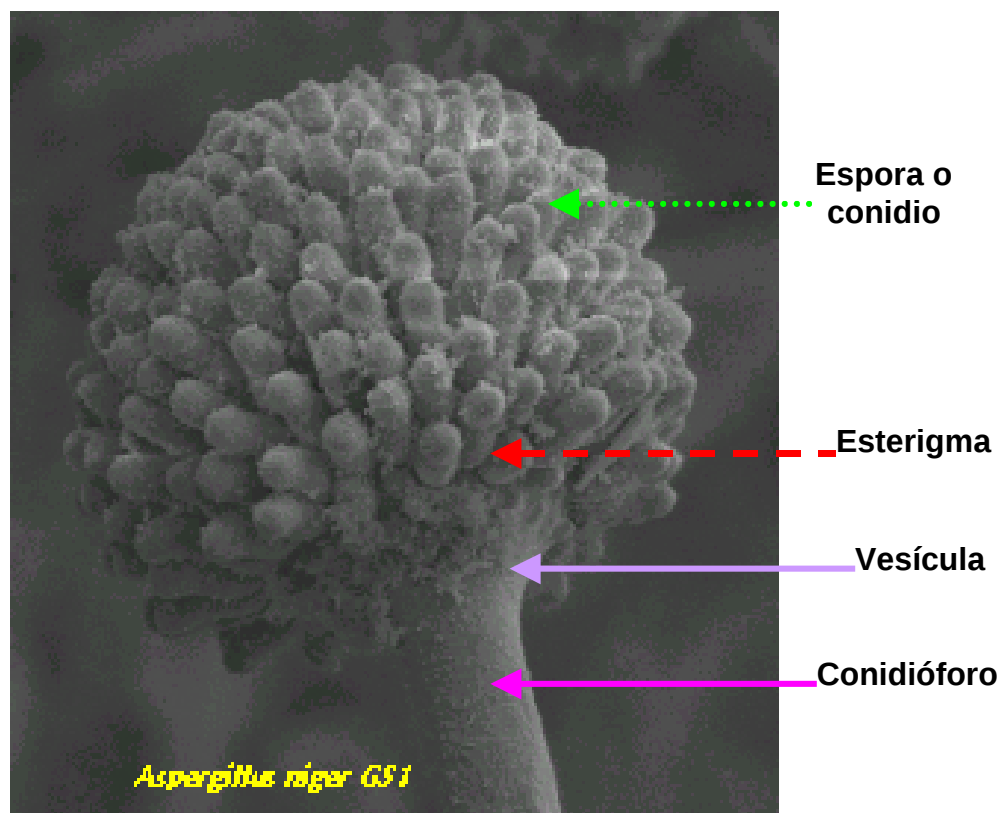


Figura 14. Esporangio de *Aspergillus niger* GS1. Distancia de trabajo 13 mm, voltaje 5kv, amplificación 2000 X, ancho de imagen 44.64  $\mu$ m

Se ha descrito la aparición de cambios morfológicos en bacterias y levaduras tras la aplicación de radiación UV (Takahito *et al.*, 1991). La cepa mutante GS1-S059 presenta las mismas estructuras, a nivel del esporangio que la cepa parental, como se puede apreciar en la Figura 15. Lo mismo ocurre con la cepa GS1-S067 Figura 16 en estas figuras se pueden distinguir los esterigmas primarios característicos de *Aspergillus niger*, además de todas las estructuras señaladas para la cepa parental.

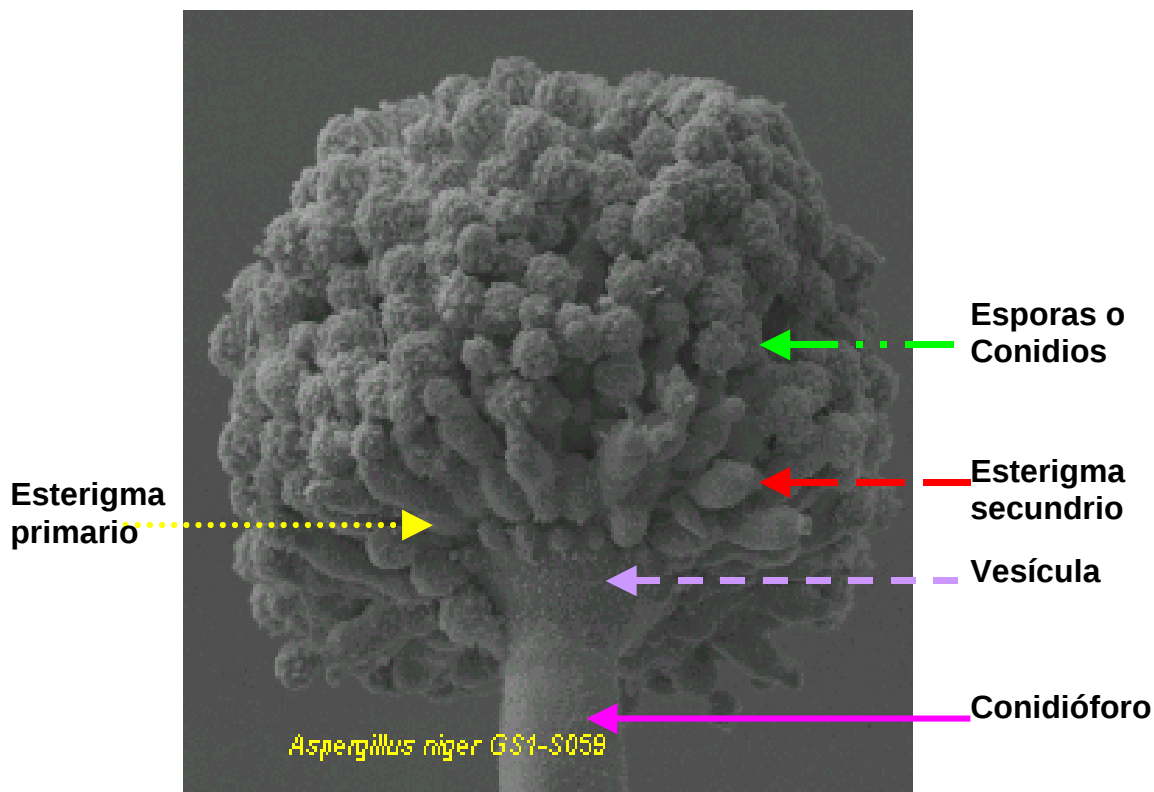
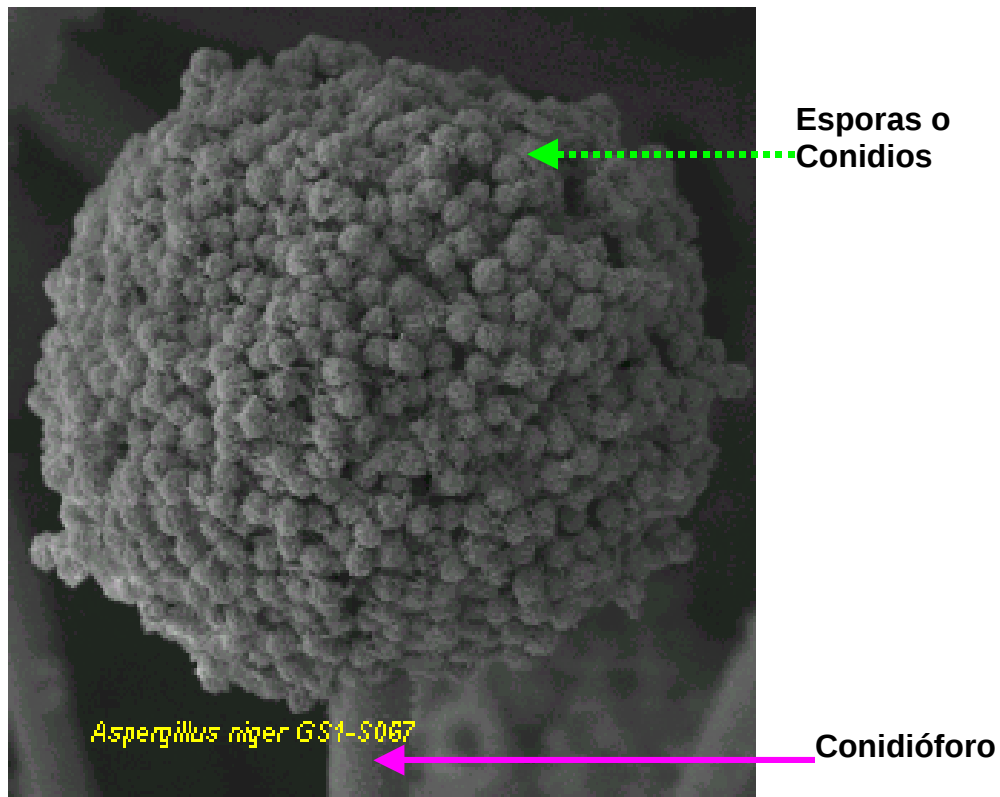


Figura 15. Esporangio de *Aspergillus niger* GS1-S059. Distancia de trabajo 6mm, voltaje 5 kv, ampliación 1900 X, ancho de imagen 47.3 $\mu$ m.



**Figura 16. Esporangio de *Aspergillus niger* GS1-S067. Distancia de trabajo 6mm, voltaje 5 kv, amplificación 1000 X, ancho de imagen 90  $\mu$ m**

Las cepas mutantes sí mostraron variaciones en el diámetro del esporangio con respecto a la cepa original (Tabla 10). Utilizando en la comparación la media de 20 mediciones efectuadas en diferentes campos.

**Tabla10. Diámetro de los esporangios de la cepa silvestre y las mutantes**

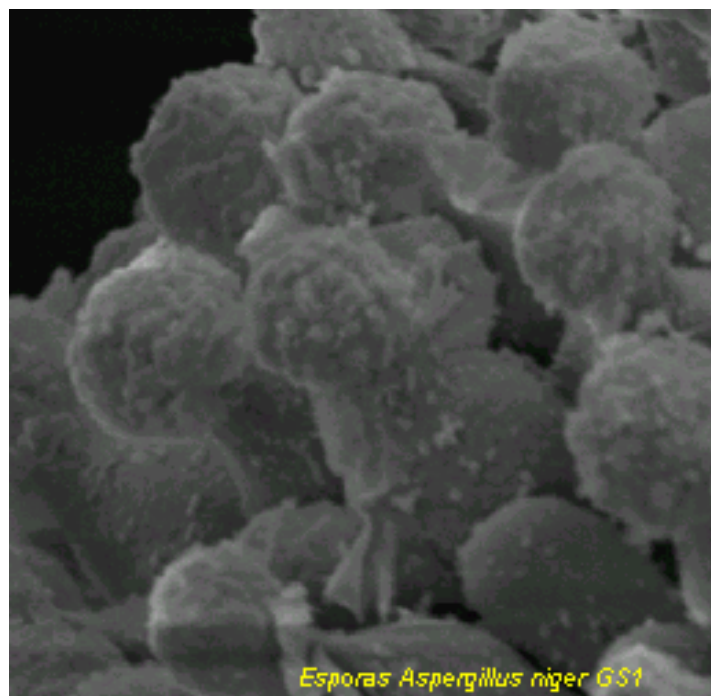
| <b>Cepas<br/><i>A. niger</i></b> | <b>Diámetro del esporangio<br/>mm</b> |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| <b>GS1</b>                       | <b>45.28 (a)</b>                      |
| <b>GS1-S059</b>                  | <b>54.25 (b)</b>                      |
| <b>GS1-S067</b>                  | <b>64.56 (c)</b>                      |

**Método de Duncan  $\alpha= 0.05$**

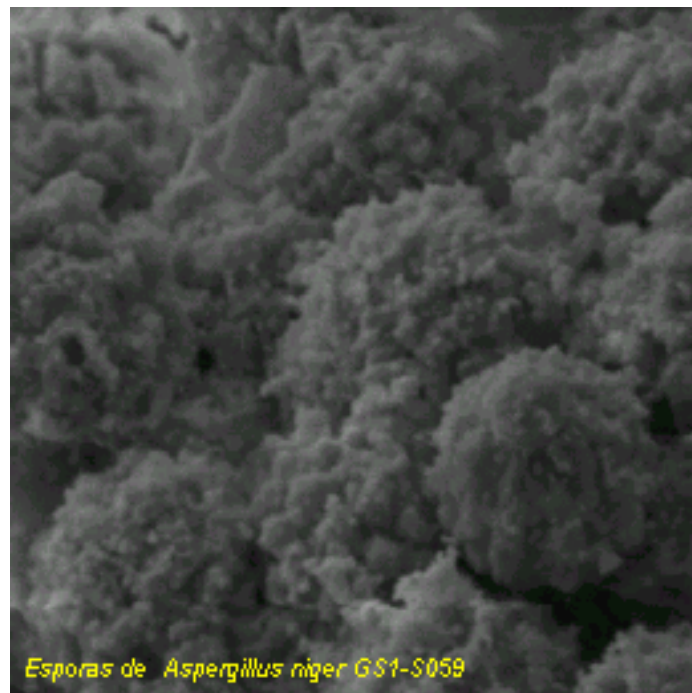
Después de un análisis de varianza por el método de Duncan se determinó que el diámetro del esporangio de las cepas mutantes se incrementó 1.2 veces en la cepa GS1-S059 y 1.42 en la cepa GS1-S067 con respecto a la cepa original. Se observan asimismo diferencias en la apariencia de los esporangios. Cabe señalar que las fotografías se tomaron en todos los casos a la misma amplificación y distancia de trabajo.

### 7.7.2 Diámetro de las esporas

Takahito *et al.* (1991) encontró en *C. tropicalis* que no sólo se modifica la morfología colonial en las cepas sometidas a mutación con luz UV, también existe un efecto en cuanto a la morfología celular. Con el fin de caracterizar aspectos individuales de nuestras cepas se procedió a estudiar la morfología de las especies de la cepa parental y mutantes, en primer lugar. El resultado se muestra en las figuras 17, 18 y 19.



**Figura 17. Esporas de *Aspergillus niger* GS1. Distancia de trabajo 6mm, voltaje 5 kv, amplificación 10000 X, ancho de imagen 9µm**



**Figura 18. Esporas de *Aspergillus niger* GS1-S059. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5 kv, amplificación 10000 X ancho de imagen 9  $\mu$ m**



**Figura 19. Esporas de *Aspergillus niger* GS1-S067. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5kv, amplificación 5000X, ancho de imagen 17.92  $\mu$ m**

Las esporas de las cepas mutantes presentan una mayor superficie con respecto a la cepa parental, siendo el incremento mayor para la cepa GS1-S067. (1.13 concretamente). Después de un análisis de varianza por el método de Duncan, se demostró que si existe diferencia significativa, ya que las mutantes presentan una mayor área con respecto a la cepa GS1. Figura 17.

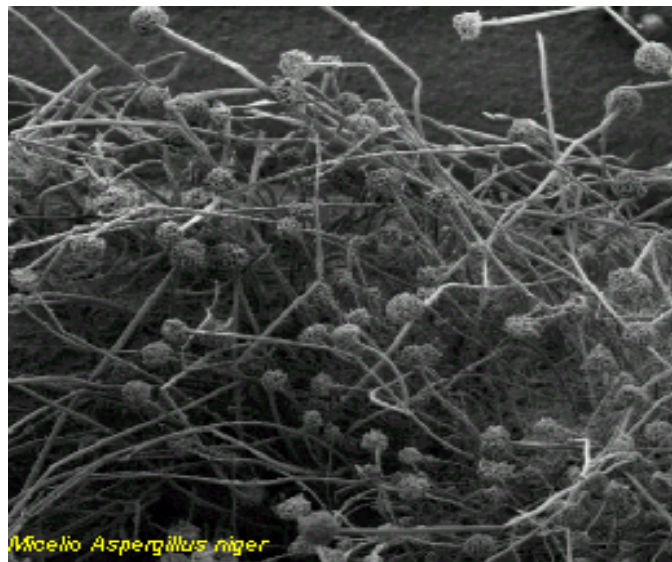
**Tabla 11. Diámetro de las esporas de cepa silvestre y mutantes**

| <b>Cepas<br/><i>A.niger</i></b> | <b>Diámetro de las esporas<br/>(mm)</b> |
|---------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>GS1</b>                      | <b>3.78 (a)</b>                         |
| <b>GS1-S059</b>                 | <b>3.88 (a)</b>                         |
| <b>GS1-S067</b>                 | <b>4.30 (b)</b>                         |

**Método de Duncan  $\alpha = 0.05$**

### 7.7.3 Longitud de las hifas

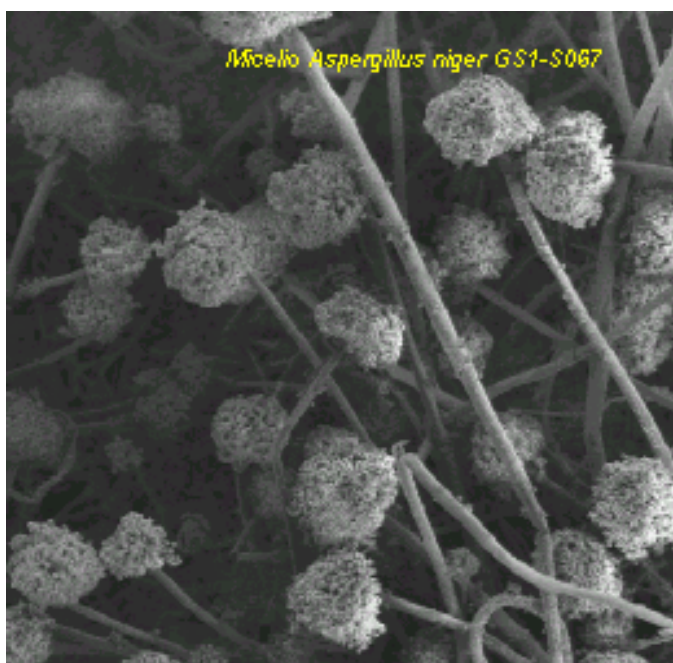
En los procesos de fermentación en medio sólido se usan comúnmente hongos filamentosos, los cuales tienen la capacidad de invadir los sustratos usados para llevar a cabo este tipo de fermentación. Se requiere por ello que los hongos tengan una alta capacidad invasiva para crecer en la superficie del sustrato. La posesión de hifas largas y ramificadas incrementa al número de sitios de interacción con el sustrato, siendo una característica interesante para una cepa de alta producción. En las figuras 20, 21 y 22 se observa la estructura del micelio de las tres cepas estudiadas. En ellas se puede observar las hifas y sus ramificaciones, así como los esporangios (analizados anteriormente).



**Figura 20. Micelio de *Aspergillus niger* GS1. Distancia de trabajo 7 mm, voltaje 5kv, amplificación 100 X, ancho de imagen 900  $\mu$ m**



**Figura 21. Micelio de *Aspergillus niger* GS1-S059. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5 kv, amplificación 80 X, ancho de imagen 1125  $\mu$ m**



**Figura 22. Micelio de *Aspergillus niger* GS1-S067. Distancia de trabajo 6 mm, voltaje 5 kv, amplificación 200 X, ancho de imagen 450  $\mu$ m**

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al diámetro, longitud y número de ramificaciones de las hifas, para la cepa parental y sus mutantes, estos resultados son las medias de 20 hifas independientes.

**Tabla 12. Longitud y diámetro de las hifas de la cepa silvestre y las mutantes**

| <b>Cepas<br/><i>A. niger</i></b> | <b>Longitud<br/>(mm)</b> | <b>Diámetro<br/>(mm)</b> | <b>No.<br/>ramificaciones</b> |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <b>GS1</b>                       | <b>404.6 (a)</b>         | <b>9.8 (a)</b>           | <b>3</b>                      |
| <b>GS1-S059</b>                  | <b>814.6 (b)</b>         | <b>12.16 (b)</b>         | <b>2</b>                      |
| <b>GS1-S067</b>                  | <b>492.6 (a)</b>         | <b>13.26 (b)</b>         | <b>-</b>                      |

**Método de Duncan  $\alpha = 0.05$**

La longitud de las hifas se incrementó dos veces para la cepa GS1-S059, con respecto a la cepa GS1, presentando diferencia significativa estadísticamente

(Método de Duncan con un  $\alpha = 0.05$ ). Como ya se mencionó anteriormente, el incremento en la longitud de las hifas representa un beneficio para la fermentación en medio sólido, y en particular cuando se usa pasta de copra como sustrato como fue nuestro caso. La pasta de copra es una harina de partículas muy pequeñas lo que hace que se incremente el área de contacto para que el microorganismo pueda crecer alrededor de cada partícula de harina. La cepa GS1-S059 mostró una mayor capacidad de invasión del sustrato, al observar las columnas de fermentación al microscopio, que las otras cepas (resultados no mostrados).

Con respecto al diámetro de las hifas, se determinó que existe diferencia significativa de las cepas mutantes con respecto a la cepa GS1.

La cepa mutante GS1-S067, al ser observada en el microscopio electrónico, no muestra ramificaciones dentro del campo observado. Sin embargo no se descarta el hecho de que pueda presentarlas. Cabe mencionar que las muestras fueron tomadas directamente de una placa de agar, en la cual se cortaron trozos de las colonias para poder observarlas con el microscopio electrónico. Por ello resulta difícil tener una imagen de las zonas con mayor crecimiento, ya que las hifas forman redes muy compactas.

El análisis de correlación de Pearson indica que la longitud de las hifas, diámetro del esporangio, actividad celulasa, y xilanasa tienen una fuerte relación con respecto a la actividad mananasa (ver apéndice 10.1), es decir podríamos elegir el diámetro de la hifa y en base a este seleccionar una cepa hiperproductora de mananasas o bien de acuerdo con al diámetro del esporangio, o en base a el nivel de producción de mananasas podemos seleccionar una cepa hiperproductora de celulasa o bien xilanasa.

## 8 Conclusiones

Usando métodos clásicos de mejoramiento de cepas, como la radiación con luz UV, se obtuvieron dos mutantes GS1-S059 y GS1-S067 con mayor actividad mananasa, 3.26 y 2.85 veces respectivamente, que la cepa parental.

La mutación realizada con luz UV sobre la cepa GS1 provocó diferencias fisiológicas y morfológicas, incrementándose el nivel de producción de enzimas (mananasas, celulasas y xilanasas), la longitud de la hifa, el diámetro de las esporas, y el diámetro del esporangio.

La cepa GS1-S067 presenta una diferencia estadísticamente significativa, con respecto a la cepa parental, en su velocidad de crecimiento en medio ML1 ( $\alpha=0.05$ ).

Las mutantes obtenidas en el presente trabajo pueden ser empleadas para realizar mejoramiento genético adicional, dado que muestran una buena actividad enzimática para tres enzimas de gran importancia industrial como bioblanqueo, producción de piensos, procesos de gelificación etc.

## 9 Bibliografía

Araujo A. y Ward O. **1990**. Mannanase components from *Bacillus pumilus*., *Appl. Env. Microbiol.* 56:6, 1954-1956

Aspinall, G.O. **1959**. Structural chemistry of the hemicelluloses. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 14:429-468.

Aspinall, G.O. **1970**. *Polysaccharides*. Pergamon Press, Oxford

Buchert, J., Kantelinen, A., Ratto, M., Siika-aho, M., Ranua, M. Y Viikari, L. **1992**. Xilanases and manananases in the treatment of pulp. *5<sup>Th</sup> International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. Kyoto, Japan 139-144.

Christgau Stephan, Kauppinene Sakari, Vind Jesper, Kofod V. Lene, y Dalboge Henrik. **1994**. Expression cloning, purification and characterization of a  $\beta$ -1-4-Mannanase from *Apergillus aculeatus*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 33:917-925.

Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. 1975. *Carbohydr. Res.* 42:107-123

Downie Bruce, Henk W.M. Hilhorst y J. Derek Bewley. **1994**. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -mannanase activity using congo red dye. *Phytochemistry*. 36:829-835.

Ericksson, K.E., y Reedowski, W., **1969**. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose. *Acta Biochem. Biophys*, 124:683,688

Flores, Rafael E., Garcia, Burgos M.V. **1995**. Aislamiento de cepas de hongos filamentosos a partir de la copra. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Hassidd, W.Z. **1969**. Biosynthesis of oligosaccharides and polysaccharides in plants. *Science*, 165: 137-144.

Herrera García Octavio. **2002**. Obtención y selección de una cepa de *Aspergillus niger* sobreproductora de fitasa. Tesis de maestría UAM-Iztapalapa

Hollander y Claus. **1936**. Mecanismos de reparación por escisión en hongos. Genetica, Krieger Publishing Company, Huntington, New York

Ikram-ul-Haq-S. K. Sikander ali, Hamad Ashraf, M.A. Qadeer and M. Ibrahim Rajoka. **2001**. Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses. *World J. Microbial. Biotechnol.* 17:35-37

Kusakabe, I y Takahashi, R. **1988**.  $\beta$ -Mannanase of Streptomyces. En *Methods in Enzymology*, Vol 160, W.A. y Kellog, S.T., Ed Academic Press, London pp 611-615.

Loera O. **1994**. Caracterización de mutantes de *Aspergillus niger* sobreproductoras de pectinasas. Tesis Maestría UAM-Iztapalapa

Mendoza. N.S, Arai, M. Kawaguchi T. Yoshida T. Y Joson L.M. **1994**. Purification and properties of mannanase from *Bacillus subtilis* . *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:551-555.

Nelson, N. **1944**. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153:375-380

Puls, J., Schorn, B. Y Schuseil J. **1992**. Acetylmannanesterases: A new component in the arsenal of wood mannan degrading enzymes. *5<sup>th</sup> international Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. Kyoto. Japan. 357-363.

Raimbault, M. y Alazard. D. Culture method to study fungal growth in the fermentation, **1980**. *Eur. J. Appl. Microbiol*, 9:199-209.

Ratto, M. y Poutanen, K. **1988**. Production of mannan-degrading enzymes. *Biotechnology Letters* 10-9 661-664.

Regalado C.; Garcia-Almendárez B. E., Venegas-Barrera L.M., Téllez-Jurado A., Rodriguez-Serrano G., Huerta-Ochoa S., and Witaker J.R. **2000**. Production, partial purification and properties of  $\beta$ -mannanases obtained by solid substrate fermentation of spend soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *aspergillus niger*. *J. Sci Food Agric*. 80:1343-1350.

Sirvastava K.C. **1993**. Properties of thermostable hemicellulolytic enzymes from *Thermomonospora* strain 29 grown in solid state fermentation on coffee processing solid waste. *Biotech. Adv.* 11:441-465

Shcherbukhin, V.D. **1993**. Galactomannans of native flora. *Appl. Biochem. Microbiol.* 29:599-606.

Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23

Takahito S., Yuri M. y Ikuko I. **1991**. Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pk 233. *J. Gen. Microbiol.* 137:161-167

Talbot G., and Sygusch J. **1990**. Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *App. Env. Microbiol.* 56:3505-3510

Téllez J. A. **1998**. Purificación parcial y caracterización de mananasa producida mediante fermentación sólida por *Aspergillus* sp. Tesis de maestría UAM-Iztapalapa.

Timell, T.E. **1964**. *Adv. Carbohydr. Res.*, 11:293-301.

Timell, T.E. **1965**. Wood hemicelluloses. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 20:409-483.

Timell, T.E. **1967**. Wood hemicelluloses II, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 20:409-483.

Trinci A.P.J. **1973**. The hyphal Growth Unit of wild type and Spreading colonial Mutants of *Neurospora crassa*. *Arch. Mikrobiol* 91:127-136

Torrier, J.P. Senior, D.J. and Saddler, J.N. **1990**. Production of  $\beta$ -mannanases by *Trichoderma harzianum* E58. *Appl. Microbiol Biotechnol* 34:303-307

Venegas B. L.M. **1998** Producción, purificación de  $\beta$ -mananasas producidas por fermentación sólida del bagacillo de café con *Aspergillus oryzae*. Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, UAQ.

Viniegra-González G., **1997** Solid state Fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring. In Riussos, S; Losane, B.K; Raimbault, M.and Viniegra-González, G. *Advances in solid state fermentation*, Kluwer Acad. Publ; Dordrecht, pp 5-22.

Ward Owen P. *Biotecnología de la fermentación principios, procesos y productos*. **1989**. Ed. Acribia, S.A Capítulo 11.

Wong, K. K.Y. y Saddler J.N. **1993**. Application of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries. En *Hemicellulase and Hemicellulases*. Coughlan M.P., y Hazlewoo, G.P. Ed Portland Press, London, pp. 127-143.

## 10 Apéndice

### 10.1 Correlación de PEARSON

Correlations

|          |                     | CELULAS<br>A | XILANASA | MANANA<br>SA | ESPORA<br>NG | ESPORAS | LONHIFA |
|----------|---------------------|--------------|----------|--------------|--------------|---------|---------|
| CELULASA | Pearson Correlation | 1.000        | .977**   | .939**       | .428*        | -.037   | .748**  |
|          | Sig. (2-tailed)     | .            | .000     | .000         | .037         | .864    | .000    |
|          | N                   | 24           | 24       | 24           | 24           | 24      | 24      |
| XILANASA | Pearson Correlation | .977**       | 1.000    | .974**       | .493*        | -.030   | .733**  |
|          | Sig. (2-tailed)     | .000         | .        | .000         | .014         | .889    | .000    |
|          | N                   | 24           | 24       | 24           | 24           | 24      | 24      |
| MANANASA | Pearson Correlation | .939**       | .974**   | 1.000        | .519**       | -.061   | .702**  |
|          | Sig. (2-tailed)     | .000         | .000     | .            | .009         | .777    | .000    |
|          | N                   | 24           | 24       | 24           | 24           | 24      | 24      |
| ESPORANG | Pearson Correlation | .428*        | .493*    | .519**       | 1.000        | .121    | .211    |
|          | Sig. (2-tailed)     | .037         | .014     | .009         | .            | .573    | .323    |
|          | N                   | 24           | 24       | 24           | 24           | 24      | 24      |
| ESPORAS  | Pearson Correlation | -.037        | -.030    | -.061        | .121         | 1.000   | .073    |
|          | Sig. (2-tailed)     | .864         | .889     | .777         | .573         | .       | .733    |
|          | N                   | 24           | 24       | 24           | 24           | 24      | 24      |
| LONHIFA  | Pearson Correlation | .748**       | .733**   | .702**       | .211         | .073    | 1.000   |
|          | Sig. (2-tailed)     | .000         | .000     | .000         | .323         | .733    | .       |
|          | N                   | 24           | 24       | 24           | 24           | 24      | 24      |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).