



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

IDONEA COMUNICACION DE RESULTADOS

CARACTERIZACION DE LA
PRODUCCION DE
GLUCOAMILASA EN DOS
MUTANTES DE
Aspergillus niger EN
CULTIVO SUMERGIDO

En México, D.F. se presentaron a las 17:00 horas del día 19 del mes de **NOVIEMBRE** del año 2001 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DRA. MA. ELENA ACUÑA ARGÜELLES;
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL;
DRA. CONCEPCION KEIKO SHIRAI MATSUMOTO Y
DR. ERNESTO FAVELA TORRES

bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último se reunieron a la presentación de la Idónea Comunicación de Resultados para la obtención del Grado de

Maestro en: **BIOTECNOLOGIA**



de: **AUGUSTO CESAR GONZALEZ GUTIERREZ**

presentó una comunicacion de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

Aprobarlo

Acto continuo, la Presidenta del Jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISOR

[Signature]
LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT
DIRECCIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

VISTO BUENO

[Signature]
DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
DIRECTOR DE DIVISION

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. MA. ELENA ACUÑA ARGÜELLES

VOCAL

[Signature]
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL

[Signature]
**DRA. CONCEPCION KEIKO SHIRAI
MATSUMOTO**

SECRETARIO

[Signature]
DR. ERNESTO FAVELA TORRES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Tesis

Caracterización de la producción de glucoamilasa en dos mutantes de *Aspergillus niger* en cultivo sumergido.

**Que para obtener el grado de maestría en
biotecnología presenta**

**Augusto César González Gutiérrez
Ingeniero bioquímico industrial**

Asesores de la maestría

**Dr. Gustavo Viniegra González,
Dr. Octavio Loera Corral
y
Dr. Ernesto Favela Torres**

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Izapalapa aprobó la
comunicación de resultados que presentó:

I.B.I. Augusto César González Gutiérrez

El 19 de noviembre de 2001

Comité Tutorial:

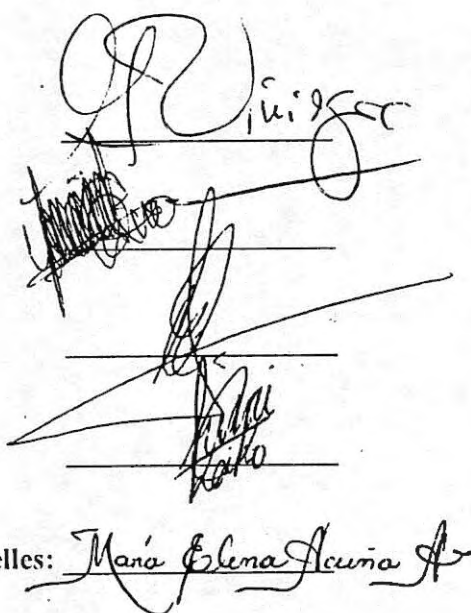
Tutor: Gustavo Viniegra González

Asesor: Octavio Loera Corral

Asesor: Ernesto Favela Torres

Sinodal: Keiko Shirai Matsumoto:

Sinodal: María Elena Acuña Argüelles:



The block contains five handwritten signatures, each written over a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to: Gustavo Viniegra González, Octavio Loera Corral, Ernesto Favela Torres, Keiko Shirai Matsumoto, and María Elena Acuña Argüelles. The signatures are in black ink and vary in style, with some being more cursive and others more blocky.

Nota:

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el padrón de posgrados de excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo con el convenio 471/0-Maestría en Biotecnología.

*Dios mi padre y de Nuestro Señor Jesucristo:
Gracias por todas las bendiciones que me has
dado y en especial durante el tiempo que
dedique a este trabajo.*

Madre:

*Te dedico esta tesis por el amor incondicional
que me has dado durante toda la vida.*

Padre:

*Te agradezco el ejemplo de tesón y lucha que
inspiró mi corazón en los momentos difíciles y
que alejó de mi mente la idea de abandonar
ésta empresa.*

Polo:

*Gracias hermano por el soporte moral que
siempre fue concreto y real durante toda esta
etapa de mi vida.*

Hij@:

Te agradezco que estés llegando en este tiempo por que me impulsas a dar un esfuerzo más digno.

Haydee mi cielo:

En ti encuentro la recompensa de todas mis batallas, gracias por tu apoyo incondicional. Te dedico a ti ésta meta cumplida.

Amigos Félix y Sergio:

*Agradezco su camaradería y honesta amistad;
la cual hizo de la estancia en el laboratorio
algo digno de recordarse.*

*Un especial agradecimiento a mis tutores por
su dedicación a la enseñanza y la formación de
todos sus alumnos entre los cuales tengo el
honor de contarme, sus enseñanzas y visión me
hicieron mejor persona.*

Índice general

	Página
<u>Resumen</u>	5
<u>Introducción</u>	6
<u>Importancia de la producción de las enzimas de origen fúngico en la industria</u>	
<u>Programas de mejoramiento genético de cepas industriales</u>	7
<u>Enzimas hidrolíticas de la familia de la glucoamilasa (GA)</u>	9
<u>Producción de la GA</u>	14
<u>Inducción y represión de enzimas en <i>Aspergillus</i></u>	
<u>Inducción y represión de las GA's y de otras amilasas</u>	17
<u>Las mutantes resistentes a la desoxiglucosa (dgr)</u>	18
<u>Antecedentes directos</u>	22
<u>Hipótesis</u>	
<u>Objetivos</u>	24
Objetivo general	
Objetivos particulares	
<u>Materiales y métodos</u>	
Microorganismos	
Medios de cultivo	
Condiciones de cultivo	
Métodos analíticos	26
Modelamiento matemático	
<u>Resultados y discusiones</u>	29
Caracterización preliminar de las cepas	
<u>Elección de fuente de nitrógeno</u>	30
<u>Caracterización cinética de las cepas mutantes y la cepa progenitora</u>	32
Crecimiento de las cepas 99-iii, 96-3 y C28B25	
Ajuste logístico para el crecimiento	33
Parámetros X_m y μ	
Consumo de sustrato	
Cinética de pH	38
Producción de actividad volumétrica	
El cociente $ p/q $	41

<u>Elección de tiempo del cultivo para la comparación de represión catabólica entre las distintas cepas</u>	42
<u>Efecto de la adición de glucosa inicial sobre los cultivos</u>	
<u>Efecto de la glucosa inicial sobre la producción de actividad volumétrica de GA</u>	43
<u>Conclusiones</u>	47
<u>Perspectivas</u>	48
<u>Bibliografía</u>	50

Índice de figuras

	Página
Figura 1 Estructura de la glucoamilasa	12
Figura 2. Cinética de producción para las cepas examinadas	33
Figura 3.1 Curvas de consumo de sustrato para las cepas examinadas	34
Figura 3.2 Cinética de producción de glucosa durante el cultivo de la cepa 99- iii de <i>Aspergillus niger</i> en el medio Czapek- maltosa.	35
Figura 3.3 Cinética de producción de glucosa durante el cultivo de la cepa C28B25 de <i>Aspergillus niger</i> en el medio Czapek- maltosa.	36
Figura 3.4 Cinética de producción de glucosa durante el cultivo de la cepa 96- 3 de <i>Aspergillus niger</i> en el medio Czapek- maltosa.	
Figura 4. Cinética de pH de las cepas examinadas	38
Figura 5. Cinética de actividad de glucoamilasa en las cepas examinadas	39
Figura 6. Valores de la actividad volumétrica de la glucoamilasa con respecto a la biomasa	40
Figura 7. Producción de biomasa a 48h de CSm de la cepa <i>Aspergillus niger</i> en medio Czapek- maltosa con glucosa y/o maltosa como fuente de carbono	43
Figura 8. Actividad volumétrica de <i>Aspergillus niger</i> a 48h de CSm en medio Czapek con glucosa y/o maltosa como fuente de carbono para tres diferentes cepas	44
Figura 9. Cociente de producción α' de tres cepas de <i>Aspergillus niger</i> en medio Czapek con distintas combinaciones de glucosa y maltosa como fuente de carbono	45

Índice de tablas

	Página
Tabla I. Parámetros cinéticos de una glucoamilasa y una α -glucosidasa y la glucoamilasa (Chiba, 1997).	13
Tabla II Modelos matemáticos	28
Tabla III. Índices de esporulación de las cepas en medio DEX y DDG a las 48h de cultivo en cajas petri.	29
Tabla IV. Valores de algunos parámetros de cultivo de <i>A. niger</i> para la producción de GA con distintas fuentes de nitrógeno cultivadas en medio Czapek- maltosa a 30°C durante 72h.	31
Tabla V. Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas crecidas en medio Czapek-Maltosa	33
Tabla VI. Parámetro cinéticos de consumo de sustrato para las cepas estudiadas.	34
Tabla VII. Parámetros cinéticos para la producción de GA para las cepas estudiadas.	41
Tabla VIII. Comparación de los parámetros alfa calculados por dos métodos distintos.	
Tabla IX Comparación de parámetros cinéticos de las cepas estudiadas.	
Tabla X. Diseño de experimento para verificar el efecto de la glucosa inicial sobre la producción de GA.	42
Tabla XI. Proporción de cambio en la producción de GA para tres cepas de <i>Aspergillus niger</i> en un medio con diferentes proporciones de glucosa al inicio	45
Tabla XII Actividad relativa respecto al experimento testigo (30 g/L de G)	47

Resumen

En el presente trabajo se pretende averiguar si las mutaciones de *Aspergillus niger* que le confieren resistencia a la 2-desoxi-D-glucosa (cepas dgr) y tienen un fenotipo de sobre producción de enzimas pectinasas y resistencia parcial a la inhibición de la síntesis de esas enzimas por la adición de glucosa. Son, a su vez, mutantes pleiotrópicos con un fenotipo de sobre producción de glucoamilasa (GA) y de resistencia a su represión catabólica por glucosa.

El interés de este problema se asocia a la posibilidad de que las mutantes antes mencionadas, llamadas 99-iii y 96-3 por Antier et al. (1993) tengan mutados genes regulatorios que controlen la síntesis de gran variedad de enzimas hidrolíticas y se apoya en los hallazgos de Allen y col (1989) quienes aislaron mutantes pleiotrópicos dgr de *Neurospora crassa*, que tenían afectados los procesos de control del transporte de azúcares, la síntesis de amilasa e invertasa y sus modificaciones post-traduccionales. Las mencionadas cepas de *A. niger* fueron obtenidas a partir de una cepa silvestre con características sobresalientes de producción de pectinasas y sujetas a mutaciones UV y a una criba selectiva con desoxiglucosa (Antier et al., 1993)

Las cepas estudiadas conservaron su fenotipo, dgr en medio con glucosa, indicando la estabilidad de esas mutaciones. Su crecimiento en 30 gL⁻¹ de maltosa fue muy similar, puesto que sus tasas específicas de crecimiento fueron muy similares entre sí ($\mu \approx 0.11 \text{ h}^{-1}$). Pero no fue el mismo caso con los parámetros estimados para la producción de actividad volumétrica y la actividad por unidad de biomasa, donde la cepa 99-iii mostró un valor de alfa 149% superior a la cepa progenitora y 160% con respecto de la cepa 96-3, mostrando que la primera era una cepa sobreproductora de GA. Al hacer crecer las mismas cepas en distintas condiciones de represión por glucosa se observó a las 48h del cultivo que las cepas 99-iii y la cepa progenitora se reprimieron bajando su actividad de GA 44 y 26 % respectivamente al crecer con 10 g/L de glucosa, mientras que con 30 g/L de glucosa redujeron 87 y 96 % sus actividades volumétricas, demostrando así su sensibilidad a la represión por carbono. Por lo contrario la cepa 96-3 retuvo su producción de GA en un 90 % en la condición mas reprimida e incluso tuvo una sobreproducción del 82% al crecer con 10g/L de glucosa (Todas las comparaciones son hechas con respecto a la condición de referencia: 30g/L de maltosa).

Los resultados de este trabajo nos hacen concluir que no todas las mutantes dgr poseen las características de sobre- producción y resistencia arriba mencionadas para más de un sistema enzimático (pectinasas y glucoamilasa), tal es el caso de la cepa 99-iii que resultó sobre- productora de GA pero sensible a la represión por carbono (glucosa), mientras que la cepa 96-3 mostró resistencia a la represión por carbono pero no fue sobre- productora de GA en medio líquido.

Por otro lado se demostró que las características de sobreproducción y resistencia mencionadas no se encuentran ligadas a un mismo genotipo dado que las mutantes analizadas no presentan los dos fenotipos conjuntos, por lo cual concluimos que cada una de ellos pertenecen a un distinto tipo de mutantes.

Dado que las cepas mutantes estudiadas en este trabajo fueron reportadas anteriormente como sobreproductoras de pectinasas y resistentes a represión por carbono, y analizando su comportamiento en el sistema de producción de GA; pensamos que el pleiotropismo de estas cepas, posiblemente esté asociado a distintos genotipos y por ello puede expresarse de manera muy distinta cuando se ensaya con distintos sistemas enzimáticos. Estas observaciones sugieren que *A. niger* quizás tiene, como *N. crassa*, una gran variedad de genes regulatorios que modulan su respuesta adaptativa a medios con diferentes sustratos (almidón o pectinas). Será de mucho interés investigar el origen genético de estas mutaciones para diseñar programas dirigidos a generar mutantes sobreproductoras de enzimas inducibles.

Introducción

Importancia de la producción de las enzimas de origen fúngico en la industria

Las enzimas son los catalizadores de naturaleza proteica que llevan a cabo una gran parte de las reacciones necesarias para la vida, ellas son las que realizan los procesos catabólicos y de síntesis en todos los seres vivos. El aprovechamiento de estos biocatalizadores debido a su especificidad y eficiencia en variados ámbitos de la industria es un hecho cotidiano. El uso de las enzimas está presente en ámbitos que van desde la industria alimentaria hasta el campo de la investigación en forma de reactivos analíticos de gran sensibilidad, las perspectivas de su uso son visionarias, y abarcan ramas de la actividad humana tan diversa como la industria extractiva hasta los usos médicos de vanguardia como la aplicación nanotecnológica de dichas moléculas para la cura y tratamiento de diversas enfermedades. (Davis, 1997; Hisaeda y Koso, 2000).

Las enzimas se producen actualmente en diversos grados de pureza para un igualmente variado campo de actividades, se producen en grandes cantidades con baja pureza para usos biotecnológicos diversos como en los procesos alimentarios y bioremediación, pero también en cantidades pequeñas con alta pureza para usos diagnósticos y de investigación; por supuesto la relación con su precio es proporcional a la dificultad de su obtención y el grado de pureza requerida.

Históricamente la fuente de obtención de las enzimas ha sido el reino vegetal y animal de donde se han extraído mediante procesos mecánicos y extracción de solventes, a excepción de los usos del koji, tofú y tempé de origen oriental en los cuales las enzimas utilizadas son de origen fúngico.

A partir del desarrollo de la tecnología del cultivo sumergido (CSm) y las técnicas de manipulación de microorganismos para la producción de las enzimas, estos últimos han desplazado las fuentes vegetales y animales de una gran cantidad de enzimas, el cultivo microbiano es el proceso más importante actualmente para la manufactura de estos biocatalizadores. Entre los microorganismos ocupados para estos procesos se encuentran, las bacterias, las algas y los hongos filamentosos, en algunos procesos se prefiere por diversas razones un tipo específico de microorganismo, así por ejemplo, actualmente la producción de proteasas (una familia muy importante de enzimas) se lleva a cabo utilizando principalmente una especie de bacteria, *Bacillus subtilis*, en tanto que la producción de la glucoamilasa (la enzima hidrolítica que nos ocupa) es producida casi en su totalidad en la industria por *Aspergillus niger*, un hongo filamentoso (Lowe, 1992).

La proporción de enzimas que se obtienen de las distintas fuentes disponibles en la industria ha sido estimada, aunque los datos de todos y cada uno de los procesos disponibles son difíciles de obtener debido a la competencia existente en el medio comercial, pero de acuerdo con esta estimación para 1992 el 25% de las enzimas se producen usando hongos filamentosos, contra un 40% producidos por bacterias, 25% por plantas y 10% son de origen animal (Lowe, 1992).

Los procesos que se usan para la producción de enzimas con hongos filamentosos han sido revisados por los gobiernos de los principales países productores con la finalidad de

asegurar que sean seguros para el consumo humano, clasificándolos como procesos "Generalmente Considerados Como Seguros" o por sus siglas en inglés (GRAS), ejemplos de hongos usados para la producción de enzimas en procesos GRAS son los de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, así como *Trichoderma* por citar los géneros más importantes (Lowe, 1992).

El medio de cultivo para la producción a gran escala de las enzimas normalmente consiste de sustratos poco refinados como fécula de maíz; por ejemplo; en la producción de la glucoamilasa es el sustrato industrial de mejores rendimientos. El régimen de cultivo usado para el cultivo de los hongos filamentosos es el cultivo en lote o lote alimentado, los procesos de cultivo continuo no se realizan industrialmente debido a dos razones principalmente: la primera es que los procesos de extracción son normalmente laboriosos y requieren un tratamiento en lote, y la segunda razón es la posibilidad de la reversión de las mutantes que son usadas en estos procesos, esto debido a que pierden rápidamente su capacidad de producción (Lowe, 1992).

En el caso de la glucoamilasa que es un enzima que hidroliza el almidón en sus monómeros es producida mediante el uso de los hongos como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. phoenicis* y *Rhizopus delemar*, aunque como se mencionó anteriormente la mayoría de los procesos son llevados a cabo con *Aspergillus niger* (Pedersen, y col., 2000). Los métodos de producción industrial para enzimas extracelulares como la glucoamilasa están basadas en el cultivo sumergido diseñado inicialmente para la producción de penicilina, este régimen de cultivo a escala industrial se lleva a cabo en grandes tanques de hasta 50,000 L de capacidad, los cuales son agitados por turbinas tipo Rushton y aireados mediante aspersores desde el fondo del tanque. Para mantener la temperatura adecuada son usadas chaquetas externas al tanque por medio de las cuales es bombeada agua a una temperatura más elevada para alcanzar las condiciones deseadas.

La producción de glucoamilasa ocupa un papel relevante en la industria de las fermentaciones, es ampliamente usada en la industria alimentaria para la producción de azúcar y jarabes fructosados a partir de harinas, por esta causa es de gran interés encontrar cepas mutantes sobre- productoras, entre ellas las resistentes a la desoxiglucosa que sean insensibles a la represión por carbono y si además son capaces de sobreproducir diversos tipos de enzimas el interés es doble. Con el fin de entender la importancia y función de la GA explicaremos más adelante algunos de sus sustratos y función catalítica.

Programas de mejoramiento genético de cepas industriales

El mejoramiento de las capacidades de un microorganismo para producir una enzima de interés es la parte esencial de los programas de desarrollo en la industria de las enzimas, dado que el mejoramiento de la productividad ó de alguna otra característica del producto se ve reflejado directamente en los costos de producción y/o en su valor agregado. Actualmente la tarea de mejoramiento de cepas industriales se han agrupado en una disciplina que se ha dado por llamar "Ingeniería metabólica" cuyas tareas principales consisten en:

1. -Mejorar procesos existentes o generar otros nuevos.

2. -Insertar nuevas rutas metabólicas en un microorganismo para la generación de metabolitos distintos a los impuestos evolutivamente.
3. -La producción heteróloga de distintos péptidos.

Para cumplir algunos de estos objetivos la ingeniería metabólica emplea técnicas clásicas de mejoramiento genético como la mutagénesis aleatoria seguido de selección racional o aleatoria; pero para los demás objetivos planteados es necesario la aplicación de técnicas de la biología molecular para modificar las características las capacidades genéticas de origen. Este proceso de mutación dirigida requiere de un análisis sofisticado para identificar el tipo y lugar de la mutación adecuada, análisis tales como:

1. Estudios fisiológicos detallados.
2. Análisis de flujo metabólico
3. Análisis de control metabólico,
4. Análisis termodinámico de las rutas metabólicas.
5. Modelamiento cinético (Nielsen, 1998).

Estos programas de mejoramiento son áreas de aplicación multidisciplinaria donde convergen distintas disciplinas por ejemplo, la estadística, la biología molecular, la genética, la microbiología y la ingeniería de las fermentaciones.

El programa de mejoramiento de la producción de la penicilina durante los años treinta a cincuenta es un ejemplo de sus alcances y consecuencias, entre las técnicas empleadas se encuentran la mutagénesis aleatoria y la selección, con la cual se consiguió no solo mejorar notablemente la producción del metabolito secundario, sino también aportar grandes conocimientos a la bioquímica de la síntesis de antibiótico, así como a la genética molecular de la reparación del DNA entre otros campos.

Mediante el conocimiento de los mecanismos de expresión de la información genética así como el conocimiento de la regulación de las enzimas de interés es posible diseñar métodos automatizados de mutagénesis y también métodos de selección racional para elegir las cepas mutantes, permitiendo la selección de las clonas más convenientes para los procesos industriales. Cada ronda de esta técnica tradicional contribuye al mejoramiento no solo de la productividad sino contribuye con las evidencias para poder entender los mecanismos envueltos para producir más y/o mejores enzimas y generar los estudios fisiológicos detallados que pueden ser aplicados racionalmente para obtener resultados dirigidos.

Como se mencionó anteriormente los programas de mejoramiento de las cepas industriales pueden enfocarse en una de dos tareas, producir más o mejores enzimas ó modificar genéticamente al microorganismo para que produzca más o distintos productos. En el último rubro incluye también la búsqueda de enzimas con un perfil adecuado para una aplicación en particular, en este proceso se han aplicado los conocimientos de la evolución molecular dirigida para diseñar enzimas mediante el cambio racional de aminoácidos para conferirles características sobresalientes, como K_m , V_{max} , y *termo- tolerancia* pero aun incluye el diseño de nuevas funciones catalíticas o la hibridación de funciones entre dos enzimas (Fang, y col., 1998; Shibuya, y col., 1992).

El otro enfoque de los programas de mejoramiento tiene que ver con producir mayor cantidad de una enzima, en este rubro se buscan mutantes con altas capacidades secretoras, existen diferentes niveles en los cuales pueden incidir estos programas, se pueden buscar que posean cartuchos de expresión con promotores fuertes como el de la glucoamilasa (*glaA*), estabilizadores del mensaje (mRNA) (Whiters, 1998), mejoramiento del péptido señal que ingresa la proteína sintetizada a la ruta secretora, ó la modificación del ambiente interno del retículo endoplásmico (RE) que incrementa la cantidad y calidad de la secreción de la enzimas (Mackenzie, y col., 1993; Verdoes, y col., 1993).

Un importante apartado en el mejoramiento de la producción de las cepas industriales es el referente a su insensibilidad a la represión por carbono (incluido en la sección de "análisis fisiológico" y "análisis del control metabólico" mencionados anteriormente) la cual es conocida en las bacterias como represión catabólica, este fenómeno natural consiste en la supresión de la síntesis de enzimas que degradan sustratos complejos en presencia de sustratos más fáciles de metabolizar, este mecanismo permite a la célula reservar sus recursos a las tareas más importantes en una condición ambiental dada. Por ejemplo, si se encuentra en un medio con distintas fuentes de carbono comenzará por consumir los sustratos más simples como la glucosa, fructosa u otras hexosas, para luego de ser consumidas seguir con los polímeros complejos como el almidón, la celulosa y las pectinas solo por mencionar algunos. Este mecanismo natural funciona en detrimento de los propósitos industriales ya que en dichos procesos se requieren cepas que a pesar de encontrarse en medios con glucosa sigan secretando las enzimas que degradan los sustratos complejos en presencia del inductor apropiado, ya que poseen un mayor valor agregado.

En el presente trabajo trataremos con un tipo de mutantes que poseen diferentes grados de insensibilidad a la represión por carbono, las que son resistentes a la desoxiglucosa, un análogo a la glucosa (2-DG), este análogo resulta ser tóxico a la célula, dado que un derivado metabólico de este, la 6-P-DG no puede ser metabolizado y agota sus reservas de ATP, entre otros efectos, provocándole la muerte. Algunas que son resistentes a este análogo se han encontrado resistentes a la represión por carbono, y sobre-productoras de enzimas hidrolíticas como las pectinasas (Minjares, y col., 1997)

Enzimas hidrolíticas de la familia de la glucoamilasa (GA)

El almidón es el sustrato más importante de la GA, este consiste en una mezcla de polímeros de glucopiranosos unidos predominantemente por enlaces α -1,4-glucosídicos. Entre ellos está la amilosa que es una molécula lineal de más de 1,000 unidades con algunas ramificaciones unidas por enlaces α -1,6, otro polímero es la amilopectina que tiene una estructura altamente ramificada de cadenas cortas con 20 o más unidades, las cuales están unidas por enlaces α -1,6, dichas moléculas forman hélices ahuecadas que pueden enredarse unas a las otras para formar estructuras compactas, la amilosa y la amilopectina se agrupan para formar gránulos que son verdaderos depósitos de almacenamiento que dejan pocos extremos no reductores al alcance del ataque enzimático de la GA. Otra configuración del almidón es posible cuando las ramificaciones están unidas por enlaces α -1,3 llamadas laminarias (Warren, 1996).

En 1835 Payen y Persoz aislaron del extracto de malta una sustancia que tenía la propiedad de hidrolizar el almidón en glucosa y la llamaron diastasa, este suceso fue histórico dado que fue el primer catalizador orgánico en ser aislado de un sistema vivo y que retenía su actividad en un filtrado libre de células (Asimov, 1994), posteriormente, con los avances técnicos para la separación de proteínas se encontró que un grupo de distintas enzimas llamadas en su conjunto "amilasas" eran las responsables de dicho proceso. El conjunto de enzimas que colaboran en la degradación de un polisacárido se conoce como un sistema de hidrólisis, así las amilasas son distintas enzimas pertenecientes al sistema de hidrólisis del almidón, cada una posee diferentes mecanismos de acción, aunque son inducidas por un mismo sustrato (Warreng, 1996; Kanemori, y col., 1993).

Dilucidar las enzimas de un sistema de hidrólisis es complejo ya que no es posible estudiarlas individualmente en el contexto homólogo por la obvia interferencia de las otras enzimas de dicho sistema. Actualmente con las técnicas de la biología molecular se han podido analizar por separado cada una de estas enzimas. Cuando se clonan cada una de las proteínas en un organismo que no posee amilasas se pueden analizar sin interferencias de otras amilasas, con esta técnica se han descubierto sus patrones de inducción, se han caracterizado sus propiedades cinéticas, sus mecanismos de acción, sus secuencias de aminoácidos y sus estructuras tridimensionales, con estos criterios se han clasificado y agrupado en varias familias de hidrolasas como las amilasas (Warreng, 1996).

El primer orden de clasificación es el referente a su función, en este sentido las amilasas pertenecen a un grupo más amplio de enzimas conocidas como glucohidrolasas debido a su capacidad de hidrolizar polímeros de la glucosa u otros azúcares, al mismo grupo de enzimas pertenecen las celulasas, xilanasas, mananasas, y quitinasas por mencionar las más importantes. El sistema enzimático de las amilasas lo integran diversas enzimas tales como las glucoamilasas (EC 3.2.1.3) las taka-amilasas (EC 3.2.1.1), las α -glucosidasas (EC 3.2.1.20), las pululanastas (EC 3.2.1.41), las β -amilasas y las isoamilasas (EC 3.2.1.68), dichas enzimas se encuentran distribuidas en la naturaleza en forma abundante en semillas, plantas, bacterias, hongos y algunos animales (Bowells, 1996). Para la mayoría de los organismos con capacidad amilolítica no les ha sido necesario poseer todas y cada una de las enzimas integrantes del sistema de hidrólisis del almidón, con la presencia de dos o tres de algunas de ellas son suficiente para degradar el polímero hasta glucosa, lo cual habla de la eficiencia de las enzimas y de la redundancia de sus funciones en el sistema referido (Warreng, 1996).

El segundo orden de clasificación puede ser explicado con referencia a la hidrólisis del almidón hasta glucosa que se lleva a cabo con la intervención de distintas enzimas, las cuales intervienen coordinadamente en las distintas etapas que pueden ser ejemplificadas con el proceso industrial de producción de jarabes fructosados, en dicho proceso se busca transformar una alta suspensión de solutos no disueltos de almidón granular a una solución homogénea de maltodextrinas de peso molecular bajo, dicho objetivo no se aleja de lo que la mayoría de los microorganismos hacen y sirven para ejemplificar las funciones de la familia de enzimas referida.

Para obtener jarabes fructosados a partir de almidón se usan enzimas del tipo malto-endo-glucohidrolasas como la α -amilasa que rompen en fragmentos de tamaño variable a las largas cadenas del almidón con una consecuente disminución de la viscosidad del medio, dicho proceso se conoce en inglés como "melting". El siguiente paso del proceso conocido como "sacarificación" busca reducir el tamaño de las maltodextrinas hasta convertirlas en su mayoría a glucosa, este paso lo puede realizar distintas enzimas como las α -glucosidasas ó las glucoamilasas (Crabb y Mitchinson, 1997).

Las glucoamilasas y α -glucosidasas pertenecen a otro gran grupo de glucohidrolasas, las malto-exo-glucohidrolasas, estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos de los extremos no reductores liberando glucosa o maltosa. Con el proceso de "melting" la procesividad y eficiencia de las enzimas exo-glucohidrolasas aumenta considerablemente pero al final la velocidad de hidrólisis se ve limitada por la acumulación de monómeros con enlaces ramificantes (α -1,6) que son más difíciles de hidrolizar para las enzimas anteriormente mencionadas, es cuando son usadas enzimas como las pululanases y las isomaltosas que rompen con mayor eficiencia dichos enlaces, estas enzimas pertenecen al mismo grupo de las exo-enzimas. La glucosa liberada de un cultivo de microorganismos ordinario es consumida rápidamente aunque en el proceso de producción de jarabes una última enzima, la invertasa que no pertenece al sistema de hidrólisis del almidón transforma hasta el equilibrio una solución de glucosa a una mezcla de glucosa y fructuosa (Crabb y Mitchinson, 1997).

Otro criterio de clasificación de las enzimas de este sistema de hidrólisis tiene origen en la naturaleza anomérica de sus productos, sobre la base de este criterio las enzimas se dividen en invertidoras ó conservadoras. El carbono uno del residuo glucosídico que posee quiralidad y forma parte del enlace hemiacetal al hidrolizarse puede generar dos productos anoméricos, uno es aquel en el que se invierte la configuración y otro es aquel en el que esta se conserva, así por ejemplo, la glucoamilasa invierte el enlace de un residuo α -glucosídico a un producto con una conformación beta, la β -glucosa, mientras que la α -glucosidasa que es una enzima conservadora produce α -glucosa (Chiba, 1997).

No menos importante es el conocimiento que la biología molecular y la cristalografía aportan a los criterios de clasificación en lo referente a la secuencia de aminoácidos y de las estructuras tridimensionales de las enzimas. En hongos filamentosos por ejemplo, las glucoamilasas han sido ampliamente estudiadas y se ha descrito la estructura y función de su sitio catalítico el cual posee tres residuos ácidos de gran importancia (Sierks, y col., 1990).

Las secuencias de los residuos aminoácidos en la región conservada han resultado ser un criterio adecuado para su clasificación. La comparación de las secuencias han mostrando que de entre más de 50 glucoamilasas registradas no existen diferencias suficientes para dividir las en más de una familia, lo que hace concluir a los investigadores que poseen un origen común (Chiba, 1997; Henrissat, y col., 1991), no es el mismo caso de las α -glucosidasas cuyas secuencias conservadas así como sus estructuras tridimensionales hacen distinción a por lo me tres distintas familias (Chiba, 1997).

Dicho lo cual podemos dar una definición funcional de la enzima como sigue: La glucoamilasa ó amiloglucosidasa es una exo-glucohidrolasa invertidora que cataliza la hidrólisis de los residuos 1,4- α -D-glucosa de los extremos no reductores del almidón y de otros oligo y polisacáridos con la consecuente liberación de β -D- glucosa, a diferencia de la α -glucosidasa que libera α -D- glucosa (Chiba, 1997). Las distintas formas de esta enzima pueden hidrolizar con moderada rapidez las uniones 1,6- α -D-glucosídicas que son las responsables de las ramificaciones de la amilopectina, siempre y cuando la unión anterior en la secuencia sea α -1,4; incluso algunas preparaciones de esta enzima hidroliza las uniones 1,3-alfa-D-glucosídicas de otros polisacáridos como el glucógeno.

En cuanto a su estructura la GA posee tres dominios: El dominio catalítico que degrada los oligosacáridos de los extremos no reductores liberando glucosa. El dominio de unión al almidón que como su nombre lo indica es el sitio por medio del cual se une al almidón o a la pared celular del hongo y el dominio de ligamento que se extiende como un bastón para conectar los otros dos dominios (Figura 1, Coutinho, 1997) Otras amilasas han mostrado tener estructuras similares, tales como la β -amilasas, las α -amilasas, las cuales poseen dominios de unión al sustrato independientes al sitio catalítico y han mostrado homologías de hasta 150 residuos, se encontraron por ejemplo, distintos triptofanos conservados en esta región que están involucrados en la unión al almidón, se cree que el sitio de unión al sustrato posee funciones menos pasivas que simplemente unirse al almidón como es el incremento de la procesividad de la enzima. En cuanto al dominio de ligamiento se ha encontrado la presencia de una zona rica de treoninas y serinas, la mayoría de ellas glucosiladas, esta glicosilación no muestra influencia en la actividad del sitio catalítico, toda vez que sus especies desglicosiladas retienen íntegramente su actividad enzimática, pero se cree que dicho dominio poseen funciones de protección contra la proteólisis (Warren, 1996).

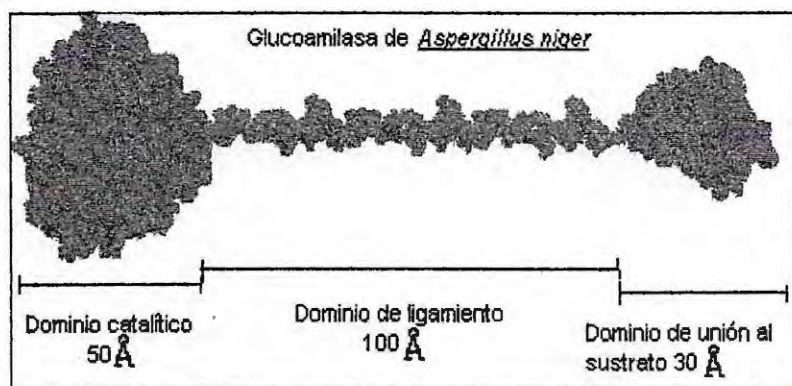


Figura 1: La estructura molecular de la glucoamilasa, tomada de la página de internet de Coutinho y col. (citada arriba)

Existen distintos tipos de GA's del género *Aspergillus* producidas en cultivo sumergido. Las distintas isoenzimas poseen un peso molecular de entre 20,000 a 100,000 daltones, dos de sus formas (G1 y G2) son derivadas a partir del mismo gene a través de splicing alternativo, entre estas dos proteínas existe una estrecha relación enzimática e inmunológica y poseen secuencias Amino-terminales idénticas, pero difieren en sus regiones Carboxilo-terminal. Un intrón (intrón E) es editado a partir de un extenso RNAm para generar una GA

de menor tamaño que dará lugar a la especie G2 de la isoenzima. Nunberg (1984) determinó la identidad de la proteína G2 mediante secuenciación y la comparó con la secuencia de la especie G1 de *Aspergillus niger*, lo que observó fue que el RNAm de G2 no posee una secuencia de 169 bp de la isoenzima G1 (véase también: Hata, y col., 1991).

Se ha encontrado alternamente que en cultivo sobre soporte sólido se genera un tercer tipo de GA la cual carece del dominio de unión al sustrato y que es codificado por el gen *glaA* encontrado en *Aspergillus oryzae* (Hata, y col., 1998; Ramadas, y col., 1996; Selvakumar, y col., 1996).

Las glucoamilasas poseen un pH óptimo de actividad entre 4.5 a 5.0 y son menos termoestables que las α -amilasas, su desnaturalización ocurre a 70°C, aunque a 60°C son perfectamente estables, a esta temperatura se opera industrialmente en la etapa de sacarificación (Goto, y col., 1998).

En cuanto a la afinidad de las GA's por sus sustratos varía mucho dependiendo el tamaño de la cadena del malto- oligosacárido, esto se ve reflejado en la afinidad molecular (K_o), como se puede ver en la tabla I, mientras que para la α -glucosidasa de *A. niger* K_o no varía mucho en un amplio rango de la serie el caso de la glucoamilasa de *Paecilomyces varioti* es diferente, K_o aumenta considerablemente con cada residuo, este fenómeno se observa de manera invertida con los valores de la eficiencia catalítica (K_o/K_m), para el caso de la glucoamilasa conforme aumenta el número de residuos de la serie aumenta considerablemente el valor del parámetro, hasta la abrumadora diferencia al tratarse del almidón soluble. La α -glucosidasa es incapaz de atacar el almidón glomerular, esto indica que mientras la primera es una enzima especializada en monómeros la glucoamilasa es principalmente una enzima para polímeros de alto peso molecular. Por otro lado esto explica por qué la maltosa es lentamente hidrolizada por la glucoamilasa.

Substrato	α -glucosidasa de <i>A. niger</i>			Glucoamilasa de <i>P. varioti</i>		
	K_m (mM)	K_o (s ⁻¹)	K_o/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (mM)	K_o (s ⁻¹)	K_o/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Maltosa	0.75	144	192	1.2	7.2	6
Maltotriosa	0.69	181	262	0.26	27.2	105
Maltotetrosa	1.1	193	175	0.14	43.4	310
Maltopentosa	1.9	147	77.4	0.13	41.1	316
Maltohexosa	3.2	170	53.1	0.12	41.6	347
Maltoheptosa	4.9	146	29.8	0.11	46.6	424
Maltodextrina	11.0	127	11.5	0.03	36.5	1,220
Isomaltosa	8.0	50.5	6.31	59	0.5	0.01
Almidón soluble	4.3	163	37.9	1.1x10 ⁻³	49.1	44,600

Tabla I. Parámetros cinéticos de una glucoamilasa y una α -glucosidasa (Chiba, 1997).

Producción de la GA

Las opciones comerciales para obtener la glucoamilasa están inclinadas a las fuentes de origen fúngico, ya sea de levaduras o de hongos filamentosos, por un lado se considera a *Saccharomyces cerevisiae* o a una levadura relacionada, *Saccharomyces diastaticus* como las que centran el mayor interés de investigadores e industriales, y por el otro lado está *Aspergillus niger* un hongo filamentoso que es conocido por su alta capacidad de secretar enzimas al medio de cultivo, *Aspergillus niger* es de hecho el microorganismo más utilizado industrialmente para la producción de glucoamilasa y la glucoamilasa a su vez es el segundo producto enzimático más producido globalmente solo detrás de las proteasas de la bacterias del género *Bacillus* (Metwally, 1998).

La producción de la GA está asociada a la tasa de crecimiento específico en la fase de crecimiento exponencial (Metwally, 1998), aunque los niveles más altos se alcanzan al entrar y durante la fase estacionaria. Se ha demostrado un aumento de producción en condiciones limitantes de oxígeno (Aunstrup, 1977), aunque estas condiciones no son recomendables en la fase de crecimiento exponencial, si la producción es alta como es el caso de las cepas industriales, los rendimientos alcanzan del 10 al 15 g/L de biomasa y 5 a 10 g/L de glucoamilasas (Aunstrup, 1977).

La habilidad de la GA de *Aspergillus niger* para catalizar la hidrólisis de los enlaces 1,4- α -D-glucosídicos es usada satisfactoriamente en el proceso industrial para producir glucosa a partir del almidón, así como la producción de productos intermediarios como los jarabes fructosados (hícs). Más de la mitad de las golosinas de importación de EU y virtualmente la mayoría de las bebidas edulcoradas de aquel país son hechas con jarabes fructosados en lugar de glucosa, dado que los jarabes fructosados son más dulces y más baratos. La glucoamilasa es usada también como reactivo en determinaciones de almidón total en productos alimenticios, para este uso es requerido que sea purificada mediante electroforesis y estabilizada en glicerol al 50%, su actividad es ajustada usando p-nitrofenil B-maltosido. Para fines analíticos es necesario que la GA no este contaminada con α -amilasas (<0.0001%) y celulasas (< 0.005%) que interfieren la medición del almidón ya que generan glucosa no derivada del almidón, su precio estimado por unidad de actividad es de 2¢ US en forma de liofilizado (Datos del proveedor: Novo-Nordisk, 1997).

Inducción y represión de enzimas en *Aspergillus*

Muchos microorganismos al igual que los del género *Aspergillus* ajustan su metabolismo del carbono a las condiciones en que se encuentran, bajo este principio en presencia de una mezcla de fuentes de carbono los microorganismos asimilan preferentemente aquellos substratos fácilmente metabolizables sobre aquellas fuentes más complejas. Uno de los mecanismos utilizados para este fin es la represión de la síntesis de enzimas relacionadas con el metabolismo de substratos que requieren mayor energía para ser consumidos, este fenómeno es conocido como represión por carbono, en otros organismos este proceso se conoce como represión catabólica pero como en *Aspergillus* no existen evidencias contundentes que un catabolito actúe directamente sobre algún represor o algún promotor se ha convenido utilizar el termino de represión por carbono.

Los beneficios del sistema de represión son en primer lugar el ahorro energético al utilizar el sustrato que requiere menos energía en metabolizarse, y en segundo lugar el ahorro que supone no sintetizar enzimas para consumir otro sustrato.

Existe una variedad de sustratos que pueden causar represión por carbono sin embargo, la glucosa es la que resulta ser más represiva es por eso que inicialmente este fenómeno se conocía como efecto glucosa, pero la represión por glucosa es un ejemplo específico de un fenómeno más general, la represión por carbono.

En *Aspergillus niger* y *Aspergillus nidulans* se conoce desde hace tiempo que un represor con carácter general que no solo actúa controlando la represión por carbono sino otros fenómenos de carácter general, el represor CREA. (Scazzocchio, y col., 1995; Ruijter y Visser, 1997)

La primera evidencia que existe para identificar el fenómeno de represión por carbono es la observación de que una enzima baja su actividad al añadir un segundo sustrato al medio, pero existen pocos ejemplos en los cuales se halla demostrado la represión directa sobre el promotor de un gen relevante como son los sistemas enzimáticos para el metabolismo del alcohol y la prolina. La mayoría de las veces solamente se han establecido evidencias indirectas como es la falta de formación del inductor.

Existen tres tipos de genes sobre los cuales el represor CREA actúa, el primero de ellos son los genes que codifican para las enzimas de metabolismo concomitante, como lo son todas las glucohidrolasas, las cuales son reprimidas por glucosa, otro tipo de genes son los del sistema enzimático de la ruta del glioxilato y la ruta gluconeogénica aunque no han sido estudiadas profundamente en *Aspergillus*, y por último, los genes de las rutas enzimáticas del metabolismo secundario, como es el caso de la producción de penicilina de *Aspergillus nidulans* a pH ácido, en esta condición la producción está reprimida por sacarosa ó glucosa.

El sistema de represión por CREA fue descubierto mientras se buscaba mutaciones supresoras a las mutaciones *areA* nulas en los sistemas del consumo de la prolina y la acetamida. La proteína AREA es un activador que regula el metabolismo del nitrógeno, su función es identificar el nivel de amonio o glutamina en la célula y activar el consumo de fuentes alternas de nitrógeno en ausencia de amonio. El consumo de la prolina y la acetamida no solo está sujeto al control de AREA, sino también de CREA así que es fácil descubrir por qué es que en mutantes nulas de AREA de estos dos sistemas se descubrió el represor CREA, ya que la prolina y la acetamida son consumidas solo si no existen condiciones de represión de carbono o nitrógeno.

Otro método de aislamiento de mutantes *creA* fue descubierto utilizando una mutante *pdhA*, la cual no posee una piruvato deshidrogenasa funcional, dicha mutante es incapaz de transformar el piruvato a acetil-CoA, estas cepas no pueden ser alimentadas por metabolitos del TCA (ciclo de los ácidos tricarboxílicos), pero son capaces de crecer en alcohol etílico ó acetato pero no en presencia de glucosa, ciertas pseudo- revertantes pueden crecer en estos sustratos aun en concentraciones altas de glucosa, estas son del tipo *creA* parcialmente abolidas. Estos dos tipos (*areA* y *gdhA*) han servido para clasificar las

distintas fuentes de carbono por su grado de represión, mediante una sencilla prueba que consiste en hacerlas crecer con el sustrato a clasificar y alcohol en el sistema de hidrólisis *gdhA*; o de otro modo, en prolina ó acetato en el sistema de regulación *areA*. La clasificación de las distintas fuentes de carbono se divide en tres: el grupo de sustratos fuertemente represores como la glucosa, la xilosa, la sacarosa y el acetato; el segundo grupo con represión intermedia con sustratos como la maltosa, la manosa, el manitol y la galactosa, y por último, las fuentes débilmente represoras ó no represoras como la fructuosa, la melobiosa, la lactosa, la arabinosa o el etanol. (Ruijter y Visser, 1997)

Otro factor importante en la represión por carbono es el de la concentración del represor, con el mismo método de clasificación se pudo observar que la glucosa a niveles menores o iguales a 0.5 g/L ya no produce efectos inhibitorios.

Una característica derivada de las cepas mutantes *creA* es su sensibilidad a alcohol alílico en presencia de concentraciones represoras de glucosa, las cepas silvestres no transforman el alcohol alílico en acroleína un poderoso tóxico para célula ya que la alcohol deshidrogenasa responsable de la reacción es reprimida por la glucosa, mientras que las primeras cepas al estar parcialmente desreprimidas si hacen la conversión tóxica ocasionando su inhibición, de esta manera se puede distinguir si una mutación responsable de desrepresión está localizada en el gen *creA*. (Scazzocchio, y col., 1995; Ruijter y Visser, 1997)

Aunque los transportadores de maltosa en *Aspergillus* han permanecidos poco estudiados, en las levaduras existe un estudio importante que apuntan a tener una participación importante en la inducción de las amilasas (Medintz y col., 1996).

El paso de la maltosa al interior de la célula es el primero de una serie de eventos que desencadenan la inducción de las amilasas que luego se encargarán de degradar el sustrato de alto peso molecular encontrado en el medio, entender el mecanismo de transporte de la maltosa a través de la membrana es un paso importante en el entendimiento de su papel en los fenómenos de inducción y represión de las enzimas del sistema de hidrólisis del almidón, así lo indican los estudios actualmente realizados en levaduras, microorganismos relacionados con el género *Aspergillus* (Harma y col., 1998).

Cierto que la regulación por carbono entre las levaduras y los hongos tienen importantes diferencias que deben ser consideradas, quizá la más importante de estas sea la referente al papel de la hexoquinasa II la cual juega un papel decisivo en las levaduras para desencadenar el proceso de represión por carbono, dicha función no parece intervenir en el género *Aspergillus* (Scazzocchio, y col., 1995; Ruijter y Visser, 1997).

En las levaduras se ha encontrado que el paso de la maltosa al interior de la célula, su transformación a glucosa, y el paso de esta última a la vía de la glucólisis no está regulada solamente por la abundancia de las enzimas involucradas sino por un control más sutil en el que está involucrado una hexoquinasa. Este supuesto control regula el flujo y consumo de la maltosa, lo anterior está soportado en la evidencia mostrada por la mutante Hex2 de *S. cerevisiae*. La mutante Hex2 es intolerante a la maltosa, lo que significa que es incapaz de crecer con el disacárido como única fuente de carbono, se ha observado que esta mutante

acumula grandes cantidades de glucosa en el interior al grado de excretarla. En una cepa silvestre esta intoxicación no podría suceder dado que en presencia de glucosa o de desoxiglucosa rápidamente se degrada el transportador de maltosa, además de que el fenómeno de represión desencadenaría la represión de las enzimas encargadas de su hidrólisis (Etian y Loureiro-Dias, 1990). En *Aspergillus* un proceso similar podría llevarse a cabo, en donde la presencia de determinados niveles de glucosa podrían ser capaces de reprimir en primera instancia el transporte de la maltosa, cerrando el paso a la inducción de las amilasas.

La necesidad de mejorar la producción de las enzimas inducibles principalmente en el ramo industrial ha dirigido una gran cantidad de recursos de investigación al mejoramiento de cepas para la producción a escala de enzimas con aplicaciones comerciales, entre ellas están las glucohidrolasas.

El principal candado en la producción de hidrolasas es el de la represión por carbono, dicho mecanismo limita los niveles de producción de las enzimas especialmente en los que el producto de la acción de dichas enzimas es un azúcar represor como la glucosa, en tal caso la producción de dicha enzima está limitada por la abundancia parcial de glucosa en el medio. Dado que por razones de economía de recursos los microorganismos "preferirán" consumir la glucosa antes que los substratos más complejos. Este mecanismo natural que los microorganismos poseen ha sido modificado en la mayoría de las cepas industriales, las mutantes resistentes a la represión por carbono producen niveles más altos de enzimas que sus cepas progenitoras ya que no son inhibidas por el producto de la acción de las enzimas producidas.

Las clases de mutantes resistentes a la represión por carbono están divididas principalmente en dos grupos, aquellas que tienen algún tipo de mutación en el gen *creA* y aquellas que son independientes de este mecanismo general de represión. En cuanto al efecto de las mutaciones en la represión por carbono también se pueden dividir en dos grupos: el de las mutantes generales y las particulares, las primeras tienen sus mecanismos de represión afectados para un grupo muy amplio de enzimas inducibles, y las particulares solo poseen un sistema enzimático desreprimido (Ruijter y Visser, 1997).

Otra característica de las cepas mutantes tipo *creA* es que poseen afectaciones pleiotrópicas, tales como exiguo crecimiento colonial, esporulación reducida, y bajo rendimiento celular en cultivo sumergido, estas propiedades reflejan la variedad de procesos que están a cargo del represor CREA, a tal punto que no es posible aislar una mutante nula de este sistema, así las mutantes *creA*, son el tipo más importante de mutantes generales. (Ruijter y Visser, 1997).

Inducción y represión de las GA's y de otras amilasas

La expresión de las amilasas está regulada principalmente por inducción y represión. La inducción de estas enzimas no puede ser debida directamente al almidón dado que su enorme tamaño le impide el acceso al interior de la célula, ahora se sabe que enzimas producidas constitutivamente generan del almidón pequeños monómeros de bajo peso molecular que desencadenan el proceso de inducción tales como oligo- maltodextrinas ó la maltosa, excepto la glucosa.

Los genes y promotores de tres amilasas: la glucoamilasa (*glaA*), la taka-amilasa (*amyB*) y la α -glucosidasa (*agdA*) han sido clonados y estudiados en *Aspergillus oryzae* con el fin de conocer las regiones responsables de su inducción. Los hallazgos encontrados indican que existen tres regiones conservadas que son responsables de la inducción por la maltosa (Kanemori, y col., 1999; Minetoki, y col., 1995).

Como mencionamos arriba en condiciones normales el almidón es parcialmente degradado por pequeñas cantidades de enzima que se producen de manera constitutiva, la maltosa o malto-oligosacáridos producidos siendo de bajo peso molecular entran a la célula presumiblemente mediante un transportador específico y mediante un mecanismo de transducción aun no dilucidado (tal vez a través de la unión directa del azúcar con el DNA), se desencadena el proceso de inducción. El proceso de transformación del almidón a glucosa en si es rápido, el paso limitante del proceso es la disolución del almidón granular y el número de extremos no reductores libres en el polímero, una vez disueltos los gránulos la procesividad de las enzimas y su eficiencia catalítica hacen posibles altos niveles de glucosa parcial tanto en el interior de la célula como en su exterior. Los niveles de glucosa parciales es quizá el obstáculo más importante para la producción a escala de la GA, así como las demás amilasas, ya que reprimen rápidamente la inducción de la enzima (Goto, y col., 1998).

La represión de estas enzimas inducibles está controlada mediante represión por carbono y principalmente por un tipo perteneciente a ésta, la represión por glucosa, se ha probado que concentraciones del 5.0 g/L de glucosa son suficientes para reprimir la producción de las amilasas en cepas silvestres (Ruijter y Visser, 1997). Industrialmente se ha buscado trabajar con cepas menos sensibles a la represión catabólica, lo que da importancia a este trabajo como se discute más adelante

La inducción de algunas de estas enzimas como la glucoamilasa y la taka-amilasa se ha logrado exitosamente con análogos de la maltosa como el p-nitrofenil-B-maltosido, pero quizá el más importante de ellos sea α -metil-D-glicosido ya que es el único análogo de la maltosa que ha sido usado con éxito como única fuente de carbono en *Aspergillus fumigatus*, el análogo tiene la ventaja sobre el inductor natural en que no genera acumulación temporal de glucosa lo cual reduce el nivel de represión de la enzima (Goto, y col., 1998).

Las mutantes resistentes a la desoxiglucosa (*dgr*)

En los hongos tal como en la levadura uno de los controles más importantes a nivel genético para la expresión de genes envueltos con la degradación de carbohidratos es la regulación por glucosa, este mecanismo de control incluye no solo la regulación de la transcripción sino también la regulación pos-transcripcional. (Han y col. 1995) a dicho mecanismo se le conoce de manera particular como represión por glucosa y de manera general como represión por carbono, tal fenómeno controla el uso adecuado de los recursos de la célula, evitando la síntesis de enzimas para el consumo de sustratos complejos cuando se encuentran sustratos fáciles de consumir mediante las enzimas que se producen de manera constitutiva.

Este mecanismo de seguridad presente en todos los hongos es una desventaja desde el punto de vista industrial, dado que limita la producción de una gran cantidad de enzimas glucohidrolíticas debido primeramente a que el resultado de la hidrólisis de los carbohidratos es la glucosa, esta glucosa rápidamente reprime la síntesis de dichas enzimas, pero también debido a que la glucosa es usada generalmente para la producción inicial de microorganismos en la primer etapa de la producción de las enzimas.

Una solución a este problema es la obtención de cepas resistentes a un análogo de la glucosa (la desoxiglucosa) que tienen características de valor industrial como una alta capacidad de sobre- producir enzimas glucohidrolíticas.

La 2-desoxiglucosa es un análogo a la glucosa que al ser fosforilado en el interior de la célula se convierte a la 6-fosfo-2-desoxiglucosa la cual no puede ser metabolizada acumulándose en el interior de la célula. Esta acumulación desencadena un agotamiento del ATP intracelular, y por consiguiente un agotamiento energético que produce a la postre la muerte celular (Moore 1981).

La 2-DG es transportado al interior de la célula por los mismos transportadores que usa la glucosa, y junto con otros compuestos la 2-DG conforma un grupo muy importante de análogos con diversos efectos a la célula. Otros análogos de importancia son la fructosa y la sorbosa (Moore 1981).

Por otro lado la 2-DG ha sido estudiada también por su capacidad de modular la actividad del sistema de reparación del DNA en levaduras. Bala y colaboradores (1997) encontraron que la 2- DG reduce la velocidad del sistema de reparación del DNA "libre de errores", sistema característico de la regulación del ciclo celular. Esto se demostró cuando con una energía ionizante dada de UV el porcentaje de mutantes aumentaba al añadir al medio concentraciones sub- letales de 2- DG. El sistema de reparación de lesiones letales y sub- letales producidas en cultivos de *Saccharomyces cereviceae* con UV son eliminadas ya sea mediante el sistema de reparación "libre de errores" o se arreglaban mediante un segundo sistema que utiliza la recombinogénesis, dicho sistema de reparación es denominado sistema de reparación "propenso a cometer errores", último sistema que fue también inhibido en su totalidad con la adición de la 2- DG (Bala y col. 1997).

En los años 80' ya los investigadores conocían la utilidad de la 2- DG para generar mutantes con características de interés industrial, esto debido que algunas resistentes a la 2-DG lo eran también para la represión por carbono, lo cual significa un aumento en la productividad de la producción de enzimas inducibles y metabolitos primarios en condiciones restrictivas para cepas sensibles tales como la adición a la glucosa (Kirimura y col., 1992).

Al estudiar las múltiples cepas mutantes de hongos dgr (desoxiglucosa resistentes) se llegó rápidamente a la conclusión de que no todas eran iguales aunque existían características comunes. Estos llevó a concluir que los mecanismos para la resistencia al análogo tóxico son diversos, y por lo tanto la posición de las mutaciones son también varios.

Los mecanismos que una cepa mutante utiliza para resistir los efectos perjudiciales del al 2-DG son variados y son una fuente de investigación continua en el campo de la inducción y represión, actualmente muy activa.

Entre los mecanismos de resistencia estudiados están los siguientes:

- Una de las explicaciones posibles de la alta capacidad de acumular metabolitos primarios, así como las notables capacidades secretoras que poseen las cepas dgr es que sus sistemas de transporte de glucosa estén de alguna manera afectados, esto junto con altas capacidades catabólicas para utilizar la glucosa explicarían la insensibilidad a los efectos tóxicos de la 2-DG. Esto fue evidenciado mediante el análisis de los sistemas de transporte de la glucosa en *Aspergillus niger*, Torres y col. (1996) Demostraron que existen al menos dos sistemas diferentes para dicho transporte, uno de alta afinidad activado a concentraciones de 1% p/v y otro de baja afinidad activado a concentraciones de 15% p/v, ambos sistemas resultaron ser muy sensibles a un rango de pII bajo, condiciones que se presentan en la acumulación de ácido cítrico, sin embargo, se demostró que mutantes dgr poseen una insensibilidad al pII para el sistema de transporte de baja afinidad permitiendo acumulaciones muy altas del ácido orgánico, los autores piensan que esta afectación en tales cepas juega un papel importante en la capacidad de las mutantes dgr para responder a nivel altos de glucosa extra celular.
- Otro rasgo muy común en las cepas dgr es su disminuida capacidad para crecer en glucosa y/o fructuosa, esta característica es debida a que poseen un transporte deficiente de glucosa, tales evidencias han sido probadas en *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cereviceae* y *Schizosaccharomyces pombe*. En tales mutantes no se encontraron diferencias entre las actividades de sus hexoquinasas. (Milbradt y col. 1994)
- Otro tipo de cepas fue descrito por Bailey y col. (1984), las cuales poseen mutaciones pleiotrópicas, des- reprimiendo una serie de enzimas citoplasmática, como la maltasa, la invertasa, y la galactosidasa, en este tipo de mutantes se encontró que los niveles de la hexoquinasa son muy elevados con respecto a la cepa progenitora. Este tipo de mutaciones permite a la célula compensar el arribo de la 2-DG mediante una incrementada capacidad para fosforilar la glucosa en competencia con el análogo (ver también Novak y col., 1990)
- Otro tipo de mutantes fue reportado por Fiedurek y col. (1987) que describió cepas dgr de *Aspergillus niger* que presentan una alta actividad en una fosfatasa la cual se encontró que está involucrada en el fenómeno de la resistencia. En levaduras ya se ha aislado, analizado sus parámetros cinéticos y clonado dicha fosfatasa que actúa de manera directa sobre el compuesto 6- fosfo- 2- desoxiglucosa que se genera de la fosforilación de la 2-DG.
- Un asunto aun pendiente es la importancia que tiene o carece el AMP cíclico el cuál posee un destacado papel en la represión catabólica en bacterias, en cuanto a la producción de glucoamilasa se han hecho experimentos en los cuales su adición a

cultivos en condiciones de represión catabólica libera en cierto grado la producción de esta enzima a niveles similares que en condiciones no represivas. (Ivanova y col., 1983)

Ya hemos mencionado algunas características generales asociadas a las cepas dgr, sin embargo, conviene mencionar que existen otras propiedades de dichas cepas que están directamente relacionadas a la sobreproducción de enzimas y a la resistencia a la represión por carbono, tales características no se encuentran presentes en todas las cepas dgr e incluso se ha demostrado que no están directamente a los Loci de las mutaciones que confiere resistencia a la 2-DG. A continuación listamos algunas de ellas:

- Por ejemplo, Aon y col. (1997) mostraron en levaduras que la 2-DG disminuye el porcentaje de esporulación, pasando de 50% a 2% asci por célula cuando la concentración del análogo pasa de 0.03 a 0.3 g/L de 2-DG, bajo las mismas condiciones la tasa de consumo de acetato cuando se encuentra en el medio disminuye hasta en un 60% así como también disminuye la velocidad de la ruta del glioxalato y la gluconeogénesis de 0.7 y 0.3 mmol/g ms (materia seca) a valores despreciables respectivamente. Esto puede significar que uno de los efectos negativos de la 2-DG es la de afectar la tasa metabólica.
- Parvez y col. (1998) Experimentaron con mutantes 2-DG resistentes creciendo con altas concentraciones de melasas y encontraron que estas poseen Q_s y q_s aumentados con respecto de la cepa progenitora, también encontraron que aumentaba la producción de ácido cítrico de 80 a 120 g/L, de tal forma que los valores Q_s y q_s son significativamente mayores mostrando que los niveles de represión catabólica estaban disminuidos.
- Entre otras cepas de la misma categoría (Suzuki y col. 1996) presentan incrementos de hasta 150% en sus niveles de producción con respecto a las cepas progenitoras, estas cepas presentan además una capacidad aumentada para la sobreproducción en medio sólido con respecto a la producción que desarrollan en cultivo sumergido tanto para la producción de ácido cítrico como para la glucoamilasa.

Los experimentos de Antier y col (1993) para la obtención de las cepas de este estudio consistieron en inducir mutaciones sobre esporas de la cepa C28B25 por medio de rayos UV en una razón de supervivencia del 10 % y hacer crecer 1.15×10^7 esporas en cajas de petri con un medio adicionado con 10 mg/L de 2-DG y 15 g/L de etilenglicol (EG), la actividad de agua (Aw) fue de 0.954, obteniendo en promedio una colonia por caja, por otro lado en otro experimento se seleccionaron mutantes con el mismo medio pero con una actividad de agua de 0.99 las cuales se denominaron Aw99 y se utilizó la décima parte del análogo tóxico.

En los distintos reportes se han encontrado que distintas mutantes resistentes a la 2-DG poseen también resistencia a la represión por carbono. De los estudios hechos en algunas de ellas, se han podido dividir como generalistas o especialistas, las primeras poseen mutaciones que confieren resistencia a la represión en la producción de un grupo

importante de sistemas hidrolíticos, en tanto que las particulares solo les confiere resistencia en la producción de algunas pocas enzimas.

Un ejemplo de cepas generalistas se encontraron en levaduras, las cuales son resistentes a la represión por glucosa (Bailey y col. 1984), las cuales poseen mutaciones pleiotrópicas, desreprimiendo una serie de enzimas citoplasmática, como la maltasa, la invertasa, y la galactosidasa, en este tipo de mutantes se encontró que los niveles de la hexoquinasa son muy elevados con respecto a la cepa progenitora.

Antecedentes directos

En 1993 Antier y col. a partir de una cepa silvestre aislada de la zona cafetalera de Veracruz obtuvieron cepas mutantes especializadas en la producción de pectinasas en cultivo sumergido ó cultivo sobre soporte sólido, dichas cepas fueron seleccionadas mediante el fenotipo de resistencia a la 2-DG, Esta selección comparte características con otras cepas dgr, como sobreproducción de enzimas inducibles, producción constitutiva de glucoamilasa e invertasa y resistencia a la represión por carbono para varios sistemas las cuales indican mutaciones pleiotrópicas.

La cepa progenitora C28B25 de las cuales se obtuvieron las mutantes para este estudio fue elegida de entre 248 cepas obtenidas de un muestreo en diversas zonas cafetaleras del estado de Veracruz, dichas cepas fueron comparadas por su actividad pectinolítica con una cepa de referencia, la cepa CH4 que fue reportada por Acuña y col. en 1993. La comparación se hizo midiendo el halo de hidrólisis de las colonias crecidas en agar con pectina, y comparándolas con el halo de hidrólisis de la cepa CH4, de este análisis se eligieron 22 cepas las cuales fueron evaluadas por su producción en cultivo sobre soporte sólido (CSS), en este caso la CSS se realizó sobre pulpa de café. La cepa más productora en ese ensayo fue la cepa C28B25 con 135 UP_{asa}/g PS (Unidades de pectinasa por gramo de pulpa seca).

Las características de la C28B25 son el crecimiento rápido y abundante en pulpa de café con un máximo de actividad pectinolítica a las 72h que muestra sensibilidad a represión catabólica cuando se la hace crecer en cultivo sumergido (CSm) con 5 y 10 g de sacarosa.

La técnica de selección utilizada para obtener dichas mutantes se basó en la resistencia a la 2- desoxiglucosa (2-DG) en actividades de agua de 0.99 y 0.954, las cuales fueron claves para la obtención de dos series distinguibles por su nivel de producción en los sistemas de referencia líquido y sólido, las cepas seleccionadas en actividades de agua de 0.99 clasificadas como la serie Aw99 resultaron ser las de mayor producción de pectinasas en CSm, mientras que las seleccionadas en actividad de agua de 0.954 denominadas la serie Aw96 tuvieron una mayor producción en cultivo sobre soporte sólido (CSS), dichas series poseen la característica de comportarse de manera opuesta una de la otra, es decir las cepas de la serie Aw96 resultaron excelentes productoras en CSS pero no mostraron una buena producción en CSm al contrario de las cepas de la serie Aw99 que son sobre- productoras de pectinasa en CSm pero su producción es pobre en CSS. Las serie Aw99 la componen las cepas Aw99-a, b, c, i, ii y iii, mientras que las cepas Aw96-1, 2, 3, y 4 componen la serie Aw96, la cepa de la serie Aw99 con mayor actividad en CSm es la cepa Aw99-iii con más

de 140 UP_{asa}/g PS (pulpa seca), y menos de 50 UP_{asa}/g DP (Dry Pulp) en CSS, en tanto que de la serie Aw96 la cepa Aw96-3 fue una de las más productoras en CSS con 227 UP_{asa}/g DP y 50 UP_{asa}/g PS en CSm, posteriormente, se observó que la cepa 96-3 reversionó su fenotipo dgr al sensible a la 2-DG, pero sin perder sus otras características, como por ejemplo, la sobreproducción de pectinasas.

Otra de las características importantes que algunas cepas resistentes a la 2-DG poseen es que tienen un nivel de represión catabólica menor en CSm y producen mayor cantidad de pectinasa en CSS y CSm. En una gráfica de actividades en CSS *Vs* CSm se observa que todas las mutantes caen en uno de dos dominios, las cepas de la serie Aw99 tienen un mejor desempeño en CSm que en CSS, en tanto que las cepas Aw96 el caso es opuesto, por otro lado se observa en las cepas Aw99 con mayor capacidad en CSS la obtienen en decremento a su capacidad en CSm con una correlación de 0.78 y $\alpha=0.005$, el dominio de las cepas Aw96 no se observa esta correlación con la misma claridad, dado que aumentan sus capacidades de secreción tanto en CSS como en CSm. (Antier y col., 1993).

Una cepa que se sale de los patrones generales observados en el estudio realizado por Antier y col. es la cepa Aw96-4 la cual es buena productora en CSS pero también en CSm con cerca de 200 U/g DP en CSS y 75 U/g DW en CSm, esta cepa y la cepa Aw99-iii (140 UP_{asa}/g PS, y 26 UP_{asa}/g DP) fueron utilizados para experimentos posteriores realizados por Loera y col. (1999) quien consiguió mutantes auxótrofos de arginina de ambas cepas para obtener un dicarionte mediante cruce parasexual, el dicarionte D4. El dicarionte D4 posee características muy interesantes, primero: es sensible a la 2-DG como la cepa progenitora y por otro lado, mantiene una alta capacidad de producción de pectinasas más de 120 U/g PS en CSm y menos de 40U/gDP en CSS, Lo anterior muestra concluyentemente que las mutaciones que les confieren la resistencia a la 2-DG a la cepas 99-iii está en diferentes loci, ya que complementaron para dar un fenotipo sensible, en tanto que según su producción de enzima predominó el fenotipo de la cepa 99-iii lo cual indica que la sobreproducción de enzimas no está directamente relacionada con la resistencia a la 2-DG.

En cuanto al conocimiento que se tiene de la mutación dgr Randez- Gil y col. (1995) han reportado la existencia de por lo menos dos genes responsables de la resistencia a la 2-DG en levaduras, los genes DOGR1 y DOGR2, estos genes poseen generan proteínas con 92% de identidad en su secuencia de aminoácidos las cuales posee la función de fosfatasas del 2-desoxiglucosa- 6- fosfato el cual es el derivado fosfatado de la 2- DG, y es la especie acumulada en el proceso tóxico de la célula, dichas enzimas poseen requerimiento de $MgCl_2$ y son inhibidas por fósforo inorgánico.

Por otro lado se ha visto que la maltosa (el cual es un sustrato ampliamente utilizado para la síntesis de glucoamilasa y que es un producto común en la degradación enzimática del almidón) a una concentración de 5 g/l. induce la producción de distintas enzimas del sistema de las glucohidrolasas aunque se ha visto que puede inhibir por producto la síntesis de dichas enzimas e incluso el crecimiento del hongo a niveles de 40 g/L. En algunas mutantes esta inhibición por producto parece estar abolida permitiendo que el hongo produzca la enzima a concentraciones de maltosa de hasta 60 g/L (Ivanova y col. 1983).

Hipótesis

- Las cepas 99-iii y 96-3 que en trabajos anteriores se confirmó que poseen resistencias a la represión por carbono en la sobre producción de pectinasas e invertasa poseen también la misma resistencia en la producción de glucoamilasa.
- Las cepas 99-iii y la cepa 96-3 poseen de acuerdo al método de selección previa (trabajos anteriores) mutaciones distintas y por lo tanto tendrán diferentes respuestas en la producción de glucoamilasa y diferentes grados de represión por glucosa.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar el patrón de inducción y represión de la glucoamilasa para las cepas 99-iii y 96-3 de *Aspergillus niger*, las cuales son mutantes, la primera, resistente a la desoxiglucosa, y la segunda, revertante sensible para el mismo compuesto.

Objetivos particulares

- Corroborar la estabilidad de las cepas mutantes.
- Establecer la fuente de nitrógeno para los cultivos sumergidos.
- Evaluar las cinéticas de producción de glucoamilasa en medios con maltosa.
- Caracterizar los efectos de la glucosa a la producción de glucoamilasa sobre cada una de las cepas elegidas

Materiales y métodos

Microorganismos

Las cepas de *Aspergillus niger* resistentes a la 2- Desoxi- D- Glucosa (dgr): 96-3 y 99-iii pertenecen al cepario de la UAM- ORSTOM y fueron reportadas por Antier y col. en 1993, la cepa progenitora C28B25 pertenece al mismo cepario y fue reportada por Aquiauathl y col. 1982.

Medios de cultivo

Agar papa dextrosa: Todos los microorganismos fueron mantenidos en este medio (PDA de Sigma- Aldrich) a 4°C.

Medio Czapek: Usado como medio base, contiene en gramos por litro (g/L): Glucosa, 30; NaNO₃, 3; K₂HPO₄, 1; MgSO₄, 0.5; KCl, 0.5.0.

Medio Czapek- Maltosa:

Este es el medio usado para la producción de la glucoamilasa en matraces Erlenmeyer, contiene 30 gL⁻¹ de maltosa sustituyendo la glucosa del medio Czapek original pero conservando las demás sales.

Medios para condicionar la represión por carbono:

Con el fin de sujetar a las cepas a diferentes condiciones de represión por glucosa se usaron tres medios de cultivos: Czapek, Czapek- Maltosa- Glucosa (medio Czapek con 10 g/L de glucosa y 20 g/L de maltosa como fuente de carbono), y Czapek- Maltosa.

Medios de identificación:

Con el propósito de confirmar la resistencia a la desoxiglucosa de las cepas mutantes se utilizó los siguientes medios:

Medio BBM: El medio BBM contiene en gramos por litro (g/L): KH_2PO_4 , 1.3; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0.75; MgSO_4 , 0.75; NaHPO_4 , 0.60; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.30; CaCl_2 , 0.25; Urea, 0.25; Agar, 10.

Medio DEX: Medio BBM con 10g/L de dextrosa

Medio DDG: Medio DEX con 0.5g/L de 2- Desoxi- D- Glucosa. (2DG)

En todos los casos la glucosa fue esterilizada por filtración así como la 2DG

Condiciones de cultivo

Conservación de cepas

Las cepas fueron conservadas en viales de vidrio con 5mL de medio PDA inclinado e inoculadas por asada con esporas. Los viales fueron cultivados a 28°C por 72 h, tiempo al cual la superficie del vial se ha cubierto completamente de esporas. Los viales esporulados fueron sellados con parafilm y conservados a 4°C.

Identificación de cepas

Para confirmar la identidad tanto de las cepas mutantes (99-iii y 96-3) como la cepa progenitora (C28B25) se procedió a realizar cultivos monoesporicos en medio DDG que contiene desoxiglucosa en niveles tóxicos (Minjares- Carranco y col. 1997). En el medio DDG la cepa progenitora crece menos en comparación con las cepas mutantes lo que caracteriza a estas familias de mutantes. Las cepas de la familia Aw99 tienen (de acuerdo a su clasificación previa) un índice de esporulación diferente al de la familia Aw96. El índice de esporulación se define como el cociente de los diámetros de esporulación entre el diámetro de colonia a cierto tiempo.

Producción de esporas

La producción de esporas se consiguió mediante resiembras sucesivas en medio PDA de los cultivos de reserva. La primera resiembra se inició con la siembra de tubos inclinados por asada a 28°C, 72 h después se cosecharon con 15 mL de tween 80 (0.05%) estéril. La segunda resiembra se hizo con 0.3 mL de la suspensión obtenida del tubo inclinado, resembrado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio PDA, todos incubados a 28 °C, por último, se obtuvo de los matraces una suspensión con la que se inocularon los medios de producción.

CSm en matraz Erlenmeyer

En los diferentes experimentos con cultivos sumergidos para la producción de glucoamilasa se usaron distintos medios de cultivo. Las condiciones estándar de cultivo fueron la inoculación de 60 mL de medio inoculados con $6.25 \cdot 10^5$ esporas por mililitro (e/mL) en matraces Erlenmeyer

de 250 ml. de capacidad. Los matraces fueron agitados a una velocidad de 250 r.p.m. y una temperatura de 30°C por 48 h o 72 h según el experimento. Los muestreos para medir las variables cinéticas se realizaron cada 12h a menos que se indique lo contrario.

Obtención del extracto enzimático

El cultivo fue filtrado al alto vacío a través de papel Watman número 1 que permite un filtrado rápido y un extracto cristalino. El extracto fue colectado para ensayos enzimáticos y otras determinaciones.

Índice de esporulación

Para distinguir la variedad de mutantes obtenidas en el grupo se utilizó un parámetro conocido como índice de esporulación, el cual se define como el cociente de los diámetros del área esporulada de la colonia entre el diámetro total de la misma, dicha colonia debe ser originada por una sola espora y crecida en un medio de cultivo de referencia. (Minjares, y col., 1997).

Métodos analíticos

Cuantificación de la biomasa

El crecimiento en la CSM fue determinado por peso seco (PS) mediante la retención del micelio a través de un filtro de papel Watman tal como se explico anteriormente, después de lavar el micelio con agua destilada se seco en un horno a 80 °C por 24 h.

Cuantificación de la glucosa

La glucosa del medio fue medida con un estuche de "Cuantificación de glucosa de Spinreact[™]" basado en la actividad de la glucosa oxidasa deshidrogenasa o método Trinder (1969)

Cuantificación de la actividad de la glucoamilasa

El filtrado libre de células obtenido fue usado para ensayos enzimáticos. La actividad de glucoamilasa (realizada por la Glucoamilasa E.C.3.2.1.3; Innis. y col. 1985) fue ensayada a través de la medición de la glucosa liberada a partir de maltosa, según lo reporta Schrickx y col. (1993 y 1995). Las unidades volumétricas fueron reportadas como UI/L donde una unidad internacional de (UI) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de producto por minuto ($\mu\text{mol P/min}$).

Mezcla de reacción

La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 1 mL con 0.2 mL de una solución con 10 g/L de maltosa, 0.5 mL de un amortiguador 1M de acetatos a un pH de 5.3 y 0.3 mL del extracto enzimático.

Condiciones de la reacción

La temperatura fue 55°C y el tiempo de reacción fue de 30min. La reacción fue detenida por con una solución Tris*Cl 5M pH 7.5; y leída contra un blanco de reacción.

Blanco de reacción

El blanco de reacción fue considerado como la mezcla previa de la solución Tris*Cl 5M pH 7.5 con el extracto enzimático, con este procedimiento se garantizó que el avance de la reacción de hidrólisis una vez añadido el sustrato fuera cero.

Unidades de actividad.

La actividad se reportó en micromoles de glucosa por litro liberados por minuto de reacción.

Cuantificación del sustrato

El sustrato se midió mediante una técnica modificada del reactivo de Miller (DNS- Fenol- NaOH) para la determinación de azúcares reductores, reportada por el autor en 1958, con la salvedad del estabilizador (Sales de Rochel) de color sugerida por el autor, del cual prescindimos en las determinaciones.

Las muestras fueron tratadas previamente mediante una hidrólisis ácida con HCl a temperatura de ebullición, con el fin de hidrolizar la maltosa residual.

Modelamiento matemático

Los datos experimentales de las cinéticas de biomasa, actividad y consumo de sustrato fueron ajustados de acuerdo a los modelos matemático descritos por Pirt (1975) y ajustados mediante una rutina matemática de MicroSoft™ Excel® 97 llamado Solver® de acuerdo con las siguientes ecuaciones integradas (Ver cuadro I).

$$1.- \quad \frac{dx}{dt} = \mu \left[1 - \frac{x}{x_m} \right] x.$$

$$\text{Integrando: } x = \left[\frac{x_m}{1 + \left(\frac{x_m - x_0}{x_0} \right) e^{(-\mu t)}} \right]$$

Donde $x = x_0$ cuando $t = t_0$

$x \rightarrow x_m$ cuando $t \rightarrow \infty$.

$$2.- \quad -\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} + mx.$$

$$\text{Integrando: } s = s_0 + \frac{x_0 - x}{Y_{x/s}} - \frac{mx_m}{\mu} \ln \left[\frac{x_m - x_0}{x_m - x} \right] \quad \text{Donde } S = S_0 \text{ cuando } t = 0.$$

$$3.- \quad \frac{dE}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x$$

$$\text{Integrando: } E = E_0 + \alpha(x - x_0) + \frac{\beta x_m}{\mu} \ln \left[\frac{x_m - x_0}{x_m - x} \right] \quad \text{Donde } E = E_0 \text{ cuando } t = 0$$

$Y_{x/s}$ = Rendimiento de la biomasa (g x/g s).

m = Coeficiente de mantenimiento (g s/gx h).

μ = Tasa específica máxima de crecimiento (1/h).

x_m = Nivel máxima de la biomasa (g).

α = Rendimiento de biomasa asociada al crecimiento (UE/g x).

β = Tasa de producción o destrucción de la enzima asociada a la biomasa (UE/gx h)

E = Concentración de enzima producida.

x = Concentración de biomasa en el medio.

S_0 = Concentración de sustrato inicial.

S = Concentración de sustrato al tiempo t .

t = Tiempo.

Tabla II. Modelos matemáticos utilizados para ajustar las curvas cinéticas.

Resultados y discusiones

Caracterización preliminar de las cepas

De acuerdo a lo reportado las mutantes 99-iii y 96-3 crecidas agar con una concentraciones de 1 g/L (2-DG) poseen un índice de esporulación característico, el cual es mucho mayor que la cepa silvestre C28B25 (Minjares, y col., 1997).

Con el fin de verificar esta características de dichas mutantes, se hicieron crecer en placas de agar con medio DEX (que contiene glucosa) y medio DDG (con glucosa y 0.5g/L de 2-DG) las placas fueron inoculadas por picadura utilizando un palillo de dientes estéril e inoculando esporas de cada una de las mutantes y de la cepa progenitora.

A las 48h de inoculación se midieron los diámetros de la colonia y los diámetros de la zona esporulada y se calculó la relación de área esporulada. Los datos aparecen en la Tabla III.

La relación de esporulación de la cepa progenitora disminuyó al crecer en medio adicionado con 2- DG, mientras que para las cepas mutantes resistentes, pareció no afectar a este índice. En contraste la cepa 99-iii pareció aumentarse ligeramente la relación de la zona esporulada.

Por otro lado la cepa C28B25 (crecida en medio adicionado con glucosa sin 2- DG) desarrolló un valor de 20 a 26% más alto en el índice de esporulación que las cepas mutantes. Mientras que, en medio con el análogo tóxico fue la que obtuvo de 60 a 76% menor índice de esporulación. Lo contrario sucedió con la cepa 99-iii que fue la cepa con menor índice en medio DEX (26.6% menos que la cepa progenitora) pero obtuvo el máximo valor en medio DDG (10% más que la otra mutante y 76.7% que la cepa progenitora).

Cepa	n=	Índice de esporulación (I _s) en DEX	Desv. Estándar	n=	Índice de esporulación (I _s) en DDG	Desv. Estándar
C28B25	2	0.81	0.01	3	0.43	0.03
99-iii	3	0.64	0.01	3	0.76	0.10
96-3	3	0.67	0.02	3	0.69	0.15

Tabla III. Índices de esporulación de las cepas en medio DEX y DDG a las 48h de cultivo en cajas petri

Las cepas pertenecientes a la colección de la UAM- ORSTOM que usadas en el presente trabajo fueron seleccionadas mediante su resistencia a la desoxiglucosa, y mediante esta resistencia se re- identificaron. En los experimentos realizados por Minjares y col. (1997) se encontró que las cepas Aw99-iii y la cepa Aw96-3 poseían características distintivas cuando eran crecidas en medios de cultivo que contenían concentraciones sub- letales de 2-DG. Dichas características consistieron principalmente en la velocidad de crecimiento radial de la colonia con respecto a las cepas que crecieron en un medio sin desoxiglucosa y la relación de área esporulada en la misma colonia. Estos índices proporcionaron relaciones típicas de acuerdo al grupo de mutantes a las que pertenecen, así por ejemplo, las cepas de la familia Aw99-iii registraron índices de esporulación más altos que las cepas de la familia Aw96-3 cuando fueron crecidas en 2-DG.

La medición que usamos para re- clasificar a las cepas utilizadas fue el índice de esporulación. En nuestras observaciones obtuvimos índices de esporulación más altos para todas las cepas analizadas que las obtenidas antes por nuestro grupo (Minjares y col. 1997). Mientras que inicialmente se encontraron índices de esporulación promedio para las cepas de la familia Aw99 de 0.42 ± 0.06 y para las cepas de la familia Aw96 el promedio obtenido por los autores mencionados fue de 0.24 ± 0.04 . En nuestro caso las cepas analizadas Aw99-iii y Aw96-3 tuvieron valores de 0.6914 y de 0.6545 respectivamente, las cuales resultaron similares a las obtenidas en glucosa. De acuerdo a estos resultados la tendencia jerárquica es la misma solo que los valores reportados en este trabajo resultaron más altos.

Elección de fuente de nitrógeno

Una vez seleccionada la maltosa como inductor y fuente de carbono mediante el análisis bibliográfico (Goto y col.,1998) como se discute en el capítulo de materiales y métodos la siguiente elección en orden de importancia para la formulación del cultivo fue la de la fuente de nitrógeno. Esta elección se tomó probando distintas sales de nitrógeno en función de los siguientes criterios:

1. pH
2. Tipo de crecimiento producido
3. Nivel del consumo de azúcar
4. Nivel de actividad de GA.

En cuanto al pH debería permanecer por arriba de 4 y lo más cercano a 4.5 dado que el pH óptimo de secreción y estabilidad de la GA se encuentra en este rango, tal como lo indica Schrickx (1993).

El crecimiento por otro lado debería ser abundante y de tipo micelial, con este fin debería seleccionarse una fuente de nitrógeno que reuniese las condiciones donde la secreción no estuviese impedida por la formación de pellets (Wösten y col., 1991) y así, garantizase que el hongo no estuviese limitado por la accesibilidad del tipo de sal de nitrógeno en el medio.

El consumo de azúcares debería ser alto (cerca del 100%), dado que ésta característica garantizaría que la cepa no tuviese problemas para consumir la maltosa en las condiciones de cultivo y que el estuviera exclusivamente limitado por carbono.

El título final de la actividad "E" (UI / L) debería ser importante. Este quizá es el parámetro más importante para la elección de la sal de nitrógeno idónea, ya que de nada serviría que cumpliese con los requisitos anteriores si los niveles de actividad no fuesen buenos.

Para la elección de la sal adecuada se utilizó la cepa Aw96-3. Los cultivos se llevaron a cabo por 72h a 30°C a 250 r.p.m. de agitación en medio Czapek- maltosa variando la fuente de nitrógeno, para ver más detalles remítase al capítulo de materiales y métodos.

Las fuentes de nitrógeno utilizadas para la selección fueron las siguientes:

- a Nitrato de sodio.
- b Nitrato de amonio.
- c Urea.
- d Una combinación de nitrato de amonio y urea.

El nitrato de sodio es considerado como una fuente de nitrógeno que produce bajos rendimientos para enzimas secretables pero su metabolismo no modifica de manera importante el pH del medio. Al contrario, el nitrato de amonio es una excelente fuente de nitrógeno para la producción de enzimas secretables, pero su metabolismo acidifica el medio (Nielsen, 2000). La urea como fuente de nitrógeno al metabolizarse alcaliniza el medio. Considerando las características de las fuentes de nitrógeno, se pusieron a prueba dichas fuentes por separado, y una combinación de nitrato de amonio y urea para compensar sus efectos sobre el pH. Los resultados se muestran en la tabla IV

Fuente de nitrógeno (Equivalentes a 3g de Nitrato de sodio)	Actividad		Actividad por		Consumo	Tipo de
	pH	Biomasa (g/L)	Enzimática (UI/L)	Unidad de biomasa (UI/g)	Azuc. (%)	Crecimiento
Urea	4,21	5,87	60	10.2	47	*****
Sulfato de amonio	1,70	5,99	0	-	64	*****+
Urea-sulfato de amonio (75-25)%	2,00	7,72	300	38.9	74	*+++++
Urea-sulfato de amonio (50-50)%	2,63	9,43	350	37.1	78	***++
Urea-sulfato de amonio (25-75)%	4,79	10,48	370	35.3	81	**+++
Nitrato de sodio	4,29	11,31	340	30.1	100	*+++++
+ = crecimiento micelial * = crecimiento en pellets						

Tabla IV. Valores de algunos parámetros de cultivo de *A. niger* *dgrAw96-3* para la producción de GA con distintas fuentes de nitrógeno cultivadas en medio Czapek- maltosa a 30°C durante 72h.

La tabla IV muestra los resultados de las fermentaciones realizadas y la sal de nitrógeno que acumuló más características convenientes (mostradas en negrillas) fue el nitrato de sodio. Esta fuente de nitrógeno es la misma que se ocupa en el medio de cultivo Czapek.

En todos los experimentos para seleccionar la fuente de nitrógeno se utilizó la concentración de sales especificada en el medio comercial de Czapek. La formula final del medio se describe en el capítulo de materiales y métodos.

Se puede observar en dicha tabla los efectos de las distintas sales que contienen nitrógeno y que fueron probadas para elegir una de ellas para los experimentos, de dichos resultados podemos decir que al menos en el sistema de cultivo en lote para la producción de glucoamilasa por nuestras cepas de hongos, el nitrato de sodio resulta tener un efecto más favorable que el sulfato de amonio o la urea como fuentes de nitrógeno exclusivas.

Por otro lado los tipos de crecimiento observados en las distintas condiciones muestran una mayor producción de pellets con urea y sulfato de amonio. Mientras que con nitrato de sodio el crecimiento es principalmente de tipo micelial. La formación de pellets es considerada como el resultado de condiciones adversas de crecimiento y genera la disminución de área de secreción debido a que son las puntas de las hifas por donde las enzimas son secretadas, de esta manera la formación de pellets puede ser relacionada inversamente con la cantidad de enzima secretada (Wösten y col. 1991).

En cuanto al pH del cultivo como se había previsto el sulfato de amonio acidificó el medio de manera considerable, mientras que la urea y el nitrato de sodio quedaron en un intervalo cercano al óptimo de secreción y actividad de la enzima. En cuanto al consumo de azúcares, los cultivos crecidos en urea y el amonio condujeron a un consumo de sustrato menor con respecto a los cultivos crecidos en nitrato de sodio en el cual el consumo fue del 100%.

En cuanto a los experimentos realizados con una mezcla en diferentes proporciones de sulfato de amonio y urea tanto el tipo de crecimiento como en la actividad de la glucoamilasa la principal mejora fue el caso del tratamiento con 75% de urea y 25% sulfato de amonio. Dicha combinación presentó un pH muy ácido (2.0), producción de biomasa baja (46% menos que para nitrato de sodio), pero la actividad por unidad de biomasa 29% más alta que el cultivo con nitrato, y un consumo de solo el 74% contra el 100% de consumo con respecto a la sal de nitrato. Se eligió el nitrato de sodio como fuente de nitrógeno para debido que la acidez del medio y el bajo rendimiento de biomasa podría introducir variables no deseables en este estudio, y debido a que nitrato de sodio acumuló más características adecuadas (negritillas en la tabla 4).

Caracterización cinética de las cepas mutantes y la cepa progenitora

Con el motivo de caracterizar preliminarmente las cepas mutantes 96-3 y 99-iii y compararlas con la cepa progenitora C28B25 se realizaron cultivos en un medio Czapek sustituyendo la glucosa por maltosa como fuente de carbono. De los resultados obtenidos se escogieron las condiciones para evaluar el efecto de la glucosa sobre la inducción de la glucoamilasa.

Crecimiento de las cepas 99-iii, 96-3 y C28B25

Las tres cepas tuvieron un buen crecimiento en un medio con maltosa como única fuente de carbono (ver Fig. 2) indicando de esta manera su capacidad de inducir las enzimas necesarias para desdoblar el disacárido. A las 18h para todos los casos el cultivo desarrolló pellets característicos, pero a partir de las 36h el crecimiento se volvió mayormente de tipo micelial. En cuanto a su manejo para obtener un filtrado libre de células, los cultivos al tercer día presentaron una consistencia viscosa y difícil de filtrar.

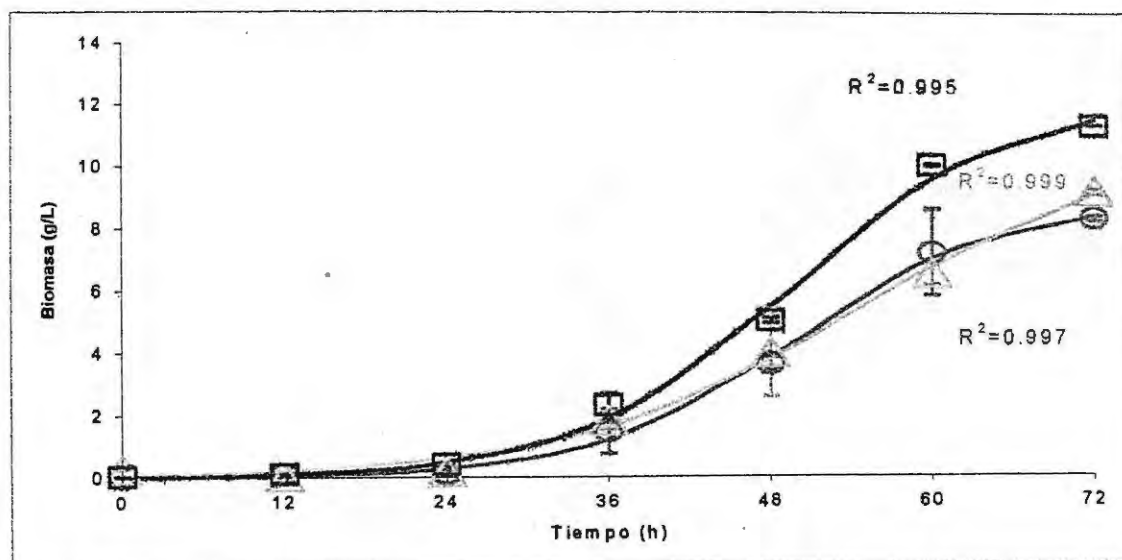


Figura 2. Cinética de crecimiento para las cepas examinadas: C28B25 (Δ), 99-iii(o) y 96-3 ($\square$) El cultivo se realizó en Czapek- maltosa durante 72h, las líneas continuas representan el ajuste matemático de los valores experimentales los cuales se muestran mediante los símbolos vacíos.

Ajuste logístico para el crecimiento

Los datos obtenidos de la determinación de la biomasa por peso seco se ven graficados en la figura 2 y además se trataron matemáticamente para ajustarlos a un modelo logístico propuesto por Pirt (1975), Este modelo sirvió para calcular los principales parámetros cinéticos (ver Materiales y métodos) los cuales están mostrados en la Tabla V.

Parámetros	Cepas			Promedio	Desv. Est.
	C28B25(Δ)	99-iii(o)	96-3($\square$)		
X_0 (g/L)	0,07	0,01	0,03	0.036	0.03
X_m (g/L)	11,00	9,00	12,25	10.75	1.70
μ (1/h)	0,09	0,13	0,12	0.11	0.02

Tabla V Parámetros cinéticos de crecimiento calculados para las cepas analizadas. Las cepas crecieron en medio Czapek con maltosa como única fuente de carbono en un cultivo de 72h, el modelo fue ajustado mediante la rutina Solver de Microsoft®.

Parámetros X_m y μ

Las cepas analizadas presentaron valores similares en sus parámetros cinéticos. Para X_m se calculó un valor promedio de 10.75 g/L con algunas variaciones poco significativas para cada una de las cepas (Desv.Est. de 0.03), donde la X_m más alta fue la cepa 96-3 (12.25 g/L), la cual es una cepa mutante especialista en CSS. En el caso del parámetro μ el valor promedio fue de 0.11 h^{-1} (Ver tabla V).

Dado que las cepas de este trabajo son principalmente producto de un método de mutación aleatoria era necesario primeramente averiguar si eran capaces de crecer en maltosa, y comparar sus comportamientos cinéticos con los descritos por la cepa progenitora ya que podrían presentar alguna mutación que les impidiera crecer sobre este substrato. Anteriormente se habían caracterizado algunas mutantes junto con la cepa C28B25 sobre

almidón. Dichos experimentos indicaban una baja actividad amilolítica pero era necesario verificar con más detalle cada una de las cepas analizadas en las condiciones elegidas (Romero- Gómez y col., 1993)

Las dos cepas mutantes y la cepa progenitora crecieron bien sobre maltosa, aunque su viscosidad después de las 60h presentaría dificultades para posteriores análisis (ver sección 4.1).

Consumo de sustrato

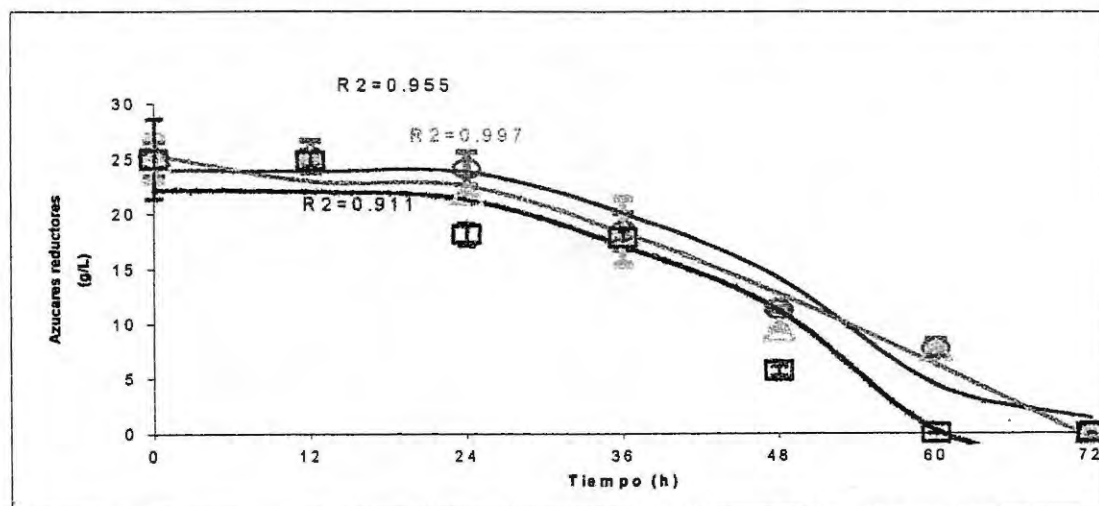


Figura 3.1 Curvas de consumo de sustrato para las cepas examinadas: C28B25 (Δ), 99-iii(o) y 96-3 ($\square$). El sustrato inicialmente es exclusivamente maltosa y fue cuantificada mediante la cuantificación de azúcares reductores.

En la Figura 3.1 se muestran las curvas de consumo de sustrato que fueron muy similares entre sí. Los datos obtenidos de la determinación del consumo del sustrato se ajustaron mediante el modelo matemático antes señalado para calcular los principales parámetros cinéticos (Tabla VI).

Parámetros	Cepas		
	C28B25 (Δ)	99-iii (o)	96-3 ($\square$)
S_0 (g/L)	22,84	24,13	22,19
$Y_{X/S}$ (gx/gs)	0,39	0,36	0,46
q_s (gS/gx h)	0.23	0.36	0.26

Tabla VI. Parámetros cinéticos de consumo de sustrato calculados para las cepas analizadas. (ver condiciones en el pie de la tabla V)

Los resultados mostrados indican que las tres cepas analizadas poseen la capacidad de consumir la maltosa y convertirla en biomasa de forma que entre 60 a 72 h pudieron consumir la totalidad del sustrato añadido.

La producción de la glucosa en los tiempos intermedios del cultivo

Durante las fermentaciones realizadas con *Aspergillus niger* en medios con maltosa se realizaron mediciones de la glucosa que se liberaba a partir de la maltosa en el medio de cultivo por medio de un método enzimático (ver Materiales y métodos), los datos obtenidos para cada cepa se muestran en las figuras 3.2, 3.3 y 3.4 junto con las curvas de biomasa y consumo de azúcares reductores antes analizados para cada cepa.

Lo que se puede observar de las figuras mencionadas es que la hexosa durante el curso del cultivo oscila incrementándose al inicio de la fase exponencial y hasta el final de la misma, dicho patrón parece ser constante para todas las cepas y refleja el hecho de que concentraciones importantes de glucosa (hasta 4 g/L) se acumulan en el caldo durante el cultivo, además de esto, otra característica en común es que al inicio la glucosa inicial es baja (menor a 2.0 g/L), al menos para las primera 12h.

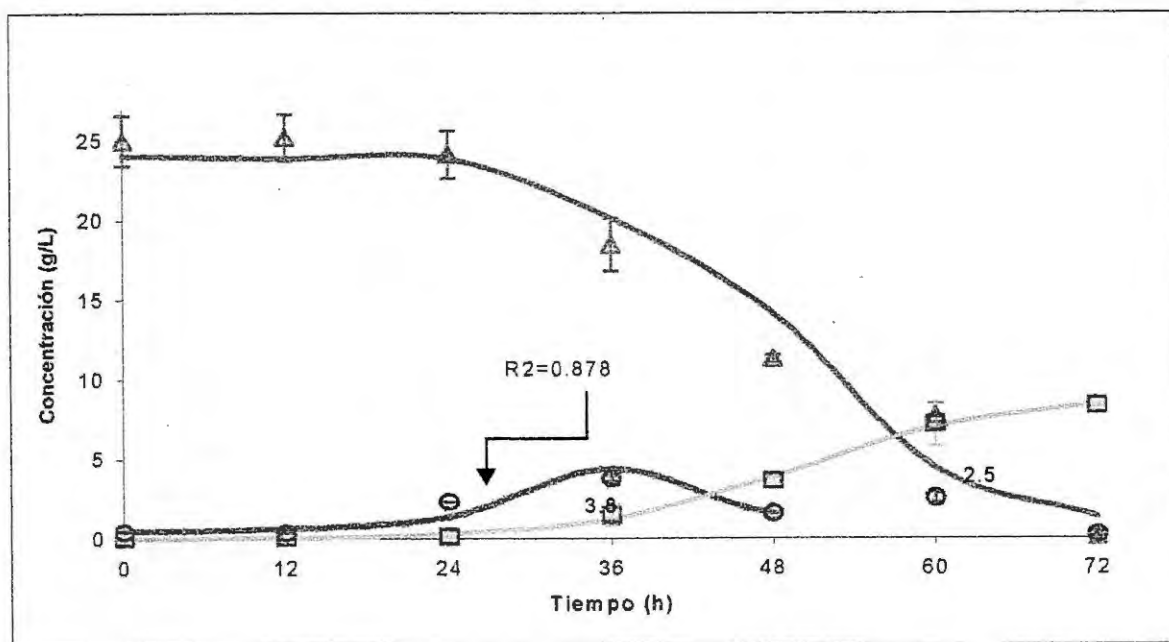


Figura 3.2 Cinética de producción de glucosa ($\circ$) durante el cultivo de la cepa 99-iii de *Aspergillus niger* en el medio Czapek- maltosa, junto con las curvas de consumo de azúcares reductores totales (Δ) y biomasa ($\square$). Las curvas de biomasa y consumo de azúcares reductores son las mismas que aparecen en las figuras 2 y 3.1 respectivamente. El modelo de producción y consumo de glucosa fue adaptado a partir de la ecuación 3 del cuadro I de materiales y métodos.

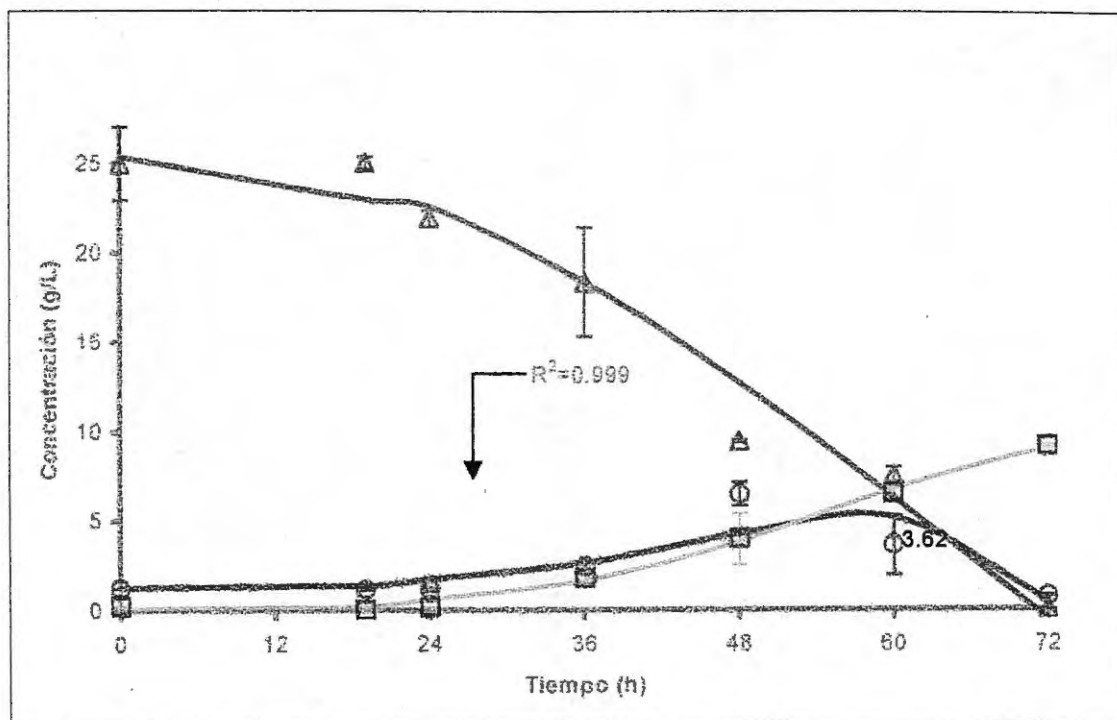


Figura 3.3 Cinética de producción de glucosa (o) durante el cultivo de la cepa C28B25 de *Aspergillus niger* en el medio Czapek- maltosa, junto con las curvas de consumo azúcares reductores totales (Δ) y biomasa (□). Las curvas de biomasa y consumo de azúcares reductores son las mismas que aparecen en las figuras 2 y 3.1 respectivamente.

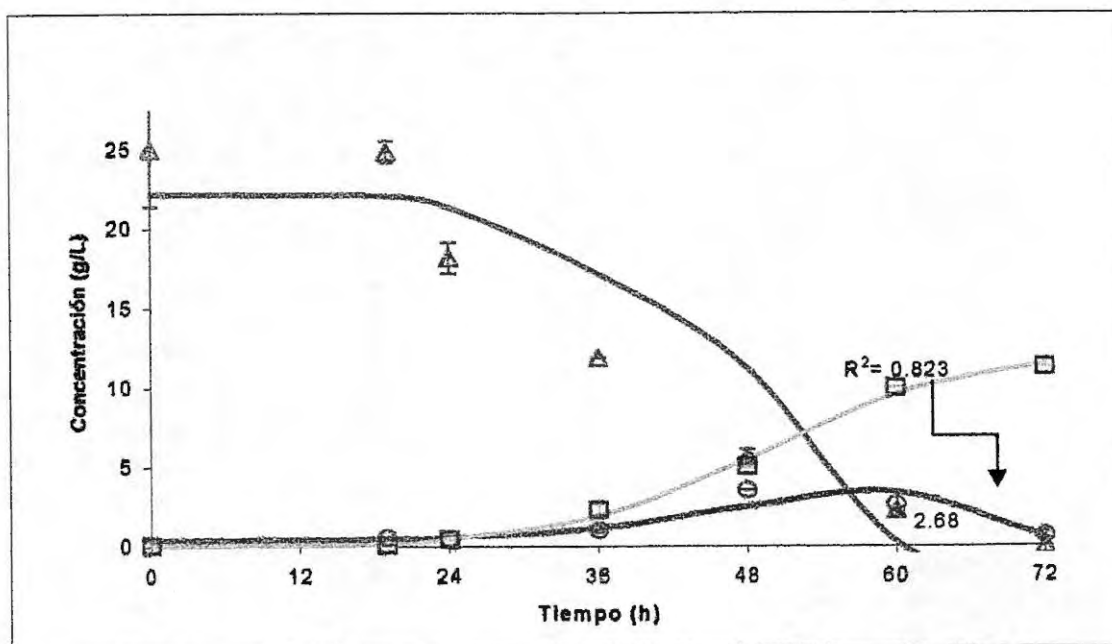


Figura 3.4 Cinética de producción de glucosa (o) durante el cultivo de la cepa 96-3 de *Aspergillus niger* en el medio Czapek- maltosa, junto con las curvas de consumo de azúcares reductores totales (Δ) y biomasa (□). Las curvas de biomasa y consumo de azúcares reductores son las mismas que aparecen en las figuras 2 y 3.1 respectivamente. El modelo de producción y consumo de glucosa fue adaptado a partir de la ecuación 3 del cuadro I de materiales y métodos.

Como se mencionó en la introducción uno de los factores que limitan la producción de GA y otras enzimas es la presencia de glucosa en el medio ya que esta ejerce un efecto represor sobre la síntesis de la misma, En la mayoría de los sistemas de producción de GA se utiliza fécula de maíz que se compone principalmente de almidón, pero la principal desventaja de estos sistemas es la acumulación de glucosa en los tiempos intermedios del cultivo que terminan por reprimir en diferentes grados la producción de la GA.

En los experimentos mostrados se observa el mismo fenómeno de acumulación de glucosa en tiempos intermedios del cultivo (así se puede constatar en las figuras 3.2, 3.3 y 3.4), dicha acumulación de entre las 32 a 40h es similar para todas las cepas en este estudio y puede ser explicada por esquema de reacción exógena del tipo:



La cual es llevada a cabo por la GA excretada. Esta acumulación va seguida de su consumo por la biomasa. Por otro lado los niveles alcanzados de glucosa acumulada siempre fueron menores a los 10 g/L los cuales están reportados como niveles represivos para la cepa (ver Antier y col. 1993, Aguilar y Huitrón 1986), sin embargo, los niveles de glucosa intermedia deben ser tomados en cuenta para los experimentos en los que se usa glucosa inicial en el medio de cultivo.

Cuando se agrega la glucosa al medio de cultivo (tal como sería el caso en los experimentos de la sección 6, ver también tabla X) la glucosa disponible para el microorganismo tendrá dos fuentes obvias, la que se desprende de la hidrólisis de la maltosa y la añadida en el medio.

Como se puede observar en las figuras antes mencionadas, la glucosa comienza a acumularse a partir de la 12 h que es la mitad de la fase de adaptación, es en estas 12 horas previas a la presencia de glucosa donde la adición de glucosa tendrá un mayor efecto sobre la inducción de GA ya que es en este tiempo que ocurre el cambio del modo de producción de GA, pasando del modo de producción constitutiva al modo de producción inducida.

Otra observación de las últimas figuras presentadas es que la cepa con mayor acumulación de glucosa intermedia fue la cepa 99-iii, dicha cepa presenta dos máximos locales de acumulación de glucosa claramente distinguibles, el más grande a las 36h (3.8 g/L) y el otro a las 60h (2.5 g/L). La cepa 96-3 por su parte fue la cepa que acumuló la menor cantidad de glucosa. De la comparación de las dos cepas anteriores podríamos inferir que la primera cepa es la que mayor actividad enzimática poseería, ya que acumula mayor cantidad de glucosa, en tanto que la última liberaría menos glucosa o la consumiría más rápido dado que la acumula en menor grado.

Como se verá más adelante los resultados acerca de la capacidad de producción de glucosa intermedia debida a su capacidad exógena de hidrólisis está relacionada con capacidad de secretar la GA (α).

Cinética de pH

El progreso del pH durante el cultivo está presentado en la Figura 4. Al inicio del mismo, una importante diferencia fue observada en el pH de la cepa 99-iii que disminuyó su pH de manera considerable con respecto a las otras dos cepas. Sin embargo, cerca de las 48 h se puede observar una convergencia del potencial de hidrógeno de las tres cepas al valor de 4.5 que es el pH óptimo de actividad de la enzima y además el pH al que la secreción de la enzima es mayor.

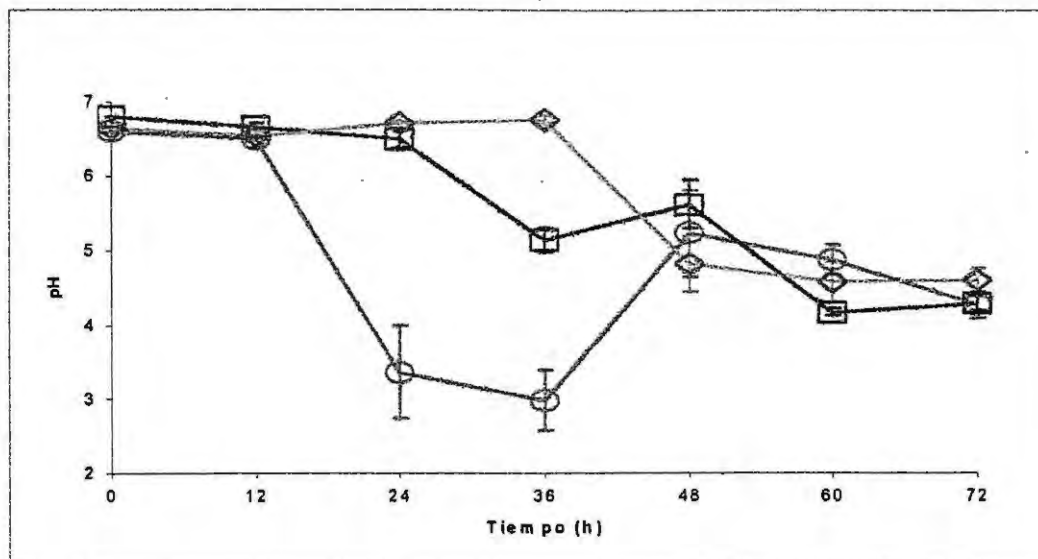


Figura 4. Cinética de pH de las cepas examinadas: C28B25 (Δ), 99-iii(○) y 96-3 (□), En medio Czapek con maltosa como única fuente de carbono.

A partir de la 48 h el pH en las tres cepas disminuye lenta y de manera homogénea hasta un pH de aproximadamente 4.5, y es precisamente en este periodo donde las diferencias de producción de actividad enzimática son más importantes.

El hecho de que en esta etapa se observen las diferencias más importantes entre las cepas es muy significativa debido a que no pueden ser imputadas a diferencias de pH, y también al hecho de que a este pH las condiciones son idóneas para la secreción de la GA lo cual no puede ser atribuido de un fenómeno de limitación de la secreción por este parámetro.

En la literatura se marca que el pH óptimo de secreción de GA en cultivos de *Aspergillus niger* así como el pH de actividad de la enzima son cercanos a 4.5 (Fang y col. 1998) lo cual coincide con las condiciones imperantes en la final del crecimiento exponencial y el inicio de la fase estacionaria de producción de la enzima en las condiciones de nuestro cultivo.

Producción de actividad volumétrica

La producción de glucoamilasa, E, medida en (UI/L) presentó un patrón similar en las tres cepas crecidas con maltosa. Las tres curvas mostradas en la figura 5 tuvieron máximos bien definidos alrededor de las 60h. Estas curvas se pudieron ajustar razonablemente bien ($r > 0.8$) mediante el modelo de Luedeking y Piret.

Desde el punto de vista cuantitativo las cinéticas de actividad volumétrica mostradas en la Figura 5 revelan la diferencia más importante entre las cepas analizadas, la cual se observa entre la cepa 99-iii y las otras dos cepas, la diferencia estriba en el nivel máximo de producción. La cepa 99-iii produce casi dos veces la actividad de las otras dos cepas estudiadas.

En cuanto a los valores de la tasa de producción de la fase no asociada al crecimiento (β) se puede observar que en todos los casos es de un valor pequeño y de signo negativo (Tabla VII). Esto indica que la enzima en la fase no asociada al crecimiento está siendo destruida o está siendo sensible a la inactivación pero a una velocidad muy baja (β menor a -11.1 UI/gh). En cuanto a la naturaleza de esta inactivación puede ser debida a la actividad de proteasas. (Dosoretz y col., 1990). Por otro lado el valor de α resultó ser muy similar entre las cepas C28B25 y 96-3 (125 y 120 UI/g respectivamente), pero marcadamente superior para la cepa 99-iii ($\alpha = 312$ UI/gh).

Con el fin de utilizar un medio alternativo para calcular α además del método logístico, también se calculó por un ajuste lineal, considerando cierto el supuesto que la producción de la enzima, E , es proporcional a la biomasa ($\Delta E \cong \alpha \cdot \Delta x$). Estas relaciones se muestran en la figura 6. En esta figura se puede ver la misma tendencia jerárquica observada en los valores de α para el conjunto de las tres cepas, donde la cepa 99-iii muestra un valor superior por casi el doble que la cepa 96-iii (ver tabla VIII, Figura 6.).

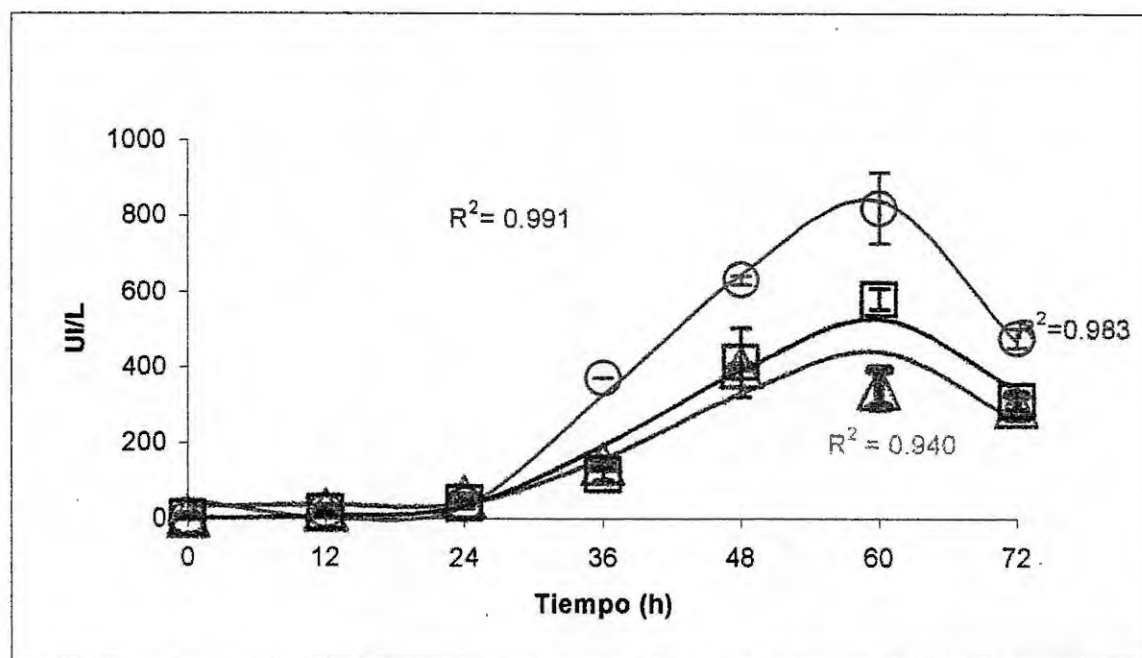


Figura 5. Cinética de actividad de glucoamilasa en las cepas examinadas: C28B25 (Δ), 99-iii($\circ$) y 96-3 ($\square$). En medio Czapek con maltosa como única fuente de carbono.

Las diferencias entre los valores calculados logísticamente y los calculados linealmente se deben principalmente a la cantidad de datos que fueron utilizados para dichos cálculos, en el primer modelo fueron ocupados todos los datos experimentales, mientras que para el modelo lineal solo se ocuparon aquellos que conservaban una tendencia lineal entre biomasa y la actividad, lo que excluye al menos el último punto de cada serie.

Si se combinan las diferencias entre la velocidad de crecimiento μ (Tabla V) y el coeficiente de rendimiento α (Tabla VII) se obtiene el coeficiente de producción ($q_p = \mu\alpha$). En la tabla IX se observa que las diferencias en q_p se acentúan, teniendo la cepa 99-iii un $q_p = 40$ UI/gh y las otras cepas un $q_p \cong 12$ UI/gh en promedio.

Comparando los valores del parámetro q_p que indica la velocidad de producción de la GA con el parámetro $|\beta|$ de la cepa correspondiente se observa en todos los casos que la tasa de producción es hasta tres veces mayor que los valores del parámetro $|\beta|$. Esto indica que la destrucción de la enzima es pequeña al compararla con su capacidad de producción. Por otro lado para el primer parámetro la cepa 99-iii posee el valor más alto ($\alpha = 312$ UI/gX), esto significa que tiene su velocidad de producción de GA es 149% más alta que la cepa progenitora 160% más que la otra mutante (Tabla IX)

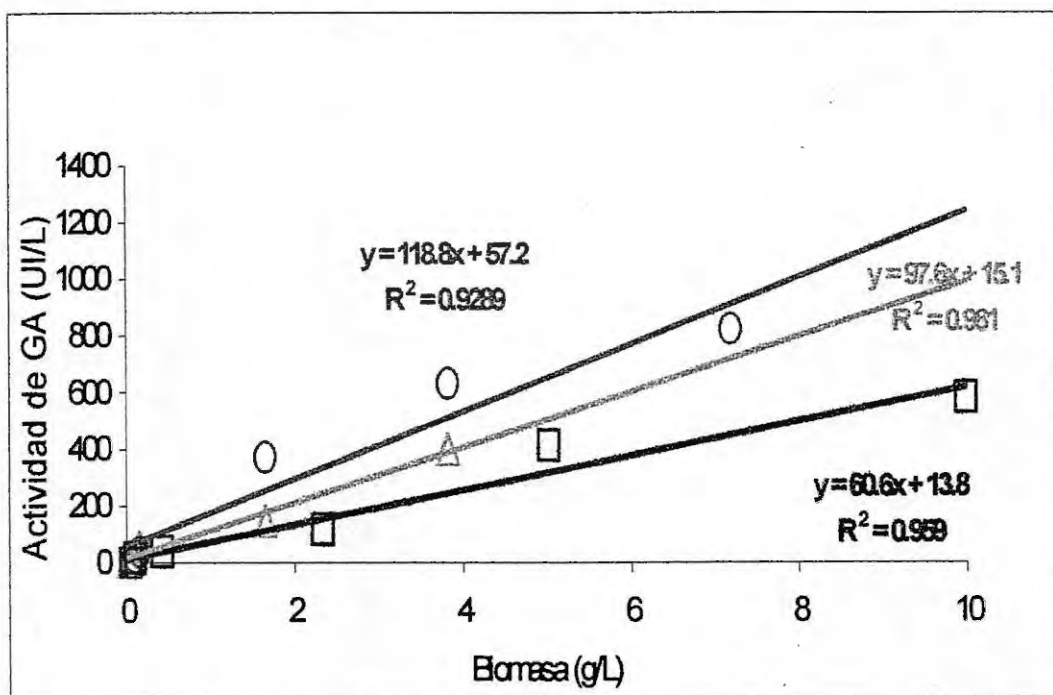


Fig. 6. La figura muestra los valores de la actividad volumétrica de la glucoamilasa con respecto a la biomasa encontrada en el cultivo, las pendientes de las rectas estimadas representan el parámetro α . C28B25 (Δ), 99-iii (o) y 96-3 ($\square$).

	C28B25 (Δ)	99-iii (o)	96-3 ($\square$)
E inicial	28.4	11.2	0.0
α (UI/gX)	125.1	312.2	119.8
β (UI/gh)	-4.3	-11.1	-4.0

Tabla VII. Parámetros cinéticos en la producción de actividad de glucoamilasa de las cepas analizadas. (ver condiciones en el pie de la tabla V)

Cepa	α calculada por regresión	R^2	α calculado logísticamente	R^2
C28B25	97.6	0.98	125.1	0.94
96-3	60.6	0.96	119.8	0.98
99-iii	118.8	0.93	312.2	0.99

Tabla VIII. Comparación de los parámetros alfa calculados por dos métodos distintos.

El cociente $|\beta/q_p|$

Como se comentó anteriormente en los tres casos estudiados los valores de β fueron negativos, para comparar las cepas se usó el coeficiente $|\beta/q_p|$ parámetro que nos informa de la fracción de destrucción con respecto a la de síntesis. Los valores de dicho parámetro se muestran en la tabla IX. Los cuales estuvieron entre $0.25 < |\beta/q_p| < 0.4$. Esto indica que las tres cepas tuvieron una proporción similar entre la tasa de destrucción de la enzima ($|\beta|$) y la de síntesis (q_p) y se confirma por la similitud de los máximos de producción mostrados en figura 5.

	C28B25	Aw99-iii	Aw96-3
α (UI/g)	125.1	312.2	119.8
μ (1/h)	0,092	0,131	0,123
β (UI/gh)	-4.3	-11.1	-4.0
q_p (UI/gh)	11.3	40.6	14.4
$\alpha\mu/\alpha\mu_{99-iii}$ (S/U)	0.4	1.00	0.4
$ \beta/q_p $ (S/U)	0.38	0.27	0.28

Tabla IX Comparación de parámetros cinéticos de las cepas estudiadas.

Por otro lado comparando los valores de q_p de las cepas mutantes encontramos que la cepa 99-iii posee casi cuatro veces el valor de la cepa 96-3 y la cepa progenitora, lo cual confirma que la regulación de la síntesis de GA en la primera está asociada al crecimiento y menos reprimida que en las últimas dos, mostrando así su mayor productividad.

Elección del tiempo de cultivo para la comparación de represión catabólica entre las distintas cepas

De los experimentos anteriores podemos observar que:

- Las cepas mutantes 96-3 y 99-iii así como su cepa progenitora son capaces de utilizar la maltosa como única fuente de carbono.
- Las cepas presentaron actividad de glucoamilasa.
- Existen diferencias en actividad entre las distintas cepas suficientes para sospechar que poseen diferentes patrones de inducción y represión de la glucoamilasa.
- Se encontró que a las 48h existían suficientes diferencias en la actividad de la GA entre las distintas cepas y que el manejo del micelio para su filtración aún era permisible.
- El pH a las 48h era estable y cercano a 4.5 para todas las cepas.

En consecuencia se decidió realizar las comparaciones de los grados de represión catabólica de las distintas cepas a las 48h de cultivo en las condiciones así establecidas.

En cuanto al punto "d" no es de desestimarse el cambio de las propiedades del fluido debida al crecimiento de tipo micelial, esto es más notorio al filtrar mediante el sistema de alto vacío. Existe un cambio muy importante en el tiempo de filtrado para un cultivo de 48 a uno de 60 h el cual es de alrededor de tres veces más lento, esta característica hace muy difícil manejar diseños experimentales con más de 12 muestras debido al manejo de los tiempos estimados de filtrado a la hora de analizar las muestras.

Efecto de la adición de glucosa inicial sobre los cultivos

Una vez elegido el tiempo de cultivo más propicio para comparar el efecto de glucosa inicial sobre la producción de actividad (ver inciso F), se procedió a realizar cultivos con las mismas condiciones establecidas pero variando la composición de la fuente de carbono como se muestra en la tabla X

Composición de la fuente de carbono	Concentración de glucosa (g/L)	Concentración de maltosa (g/L)	Información que proporciona el experimento
Solo glucosa	30	0	Nivel de producción basal de GA
Glucosa y maltosa	10	10	Nivel de represión de la GA por glucosa de referencia *
Solo maltosa	0	30	Experimento testigo

*Ruijter y Visser. 1997

Tabla X. Diseño de experimento para verificar el efecto de la glucosa inicial sobre la producción de GA:

El efecto de la glucosa inicial sobre la producción de biomasa puede observarse en la figura 7, en esta figura se aprecia que efecto de la variación de la fuente de carbono sobre el crecimiento de las cepas es discreto, al menos para las cepas C28B25 y 99-iii, y lo que si se observa es un efecto asociado a las cepas. En este grupo de experimento se observa que a las 48h la cepa que más crece es la cepa C28B25 seguida de la cepa 96-3 y por último, la cepa 99-iii. Dicha tendencia no es la misma observada en la caracterización de las cepas al comparar este tiempo en el experimento testigo (0 g/L de glucosa y 30 g/L de maltosa)

aunque sería necesario estudiar más puntos de la cinética para encontrar la convergencia de ambos análisis.

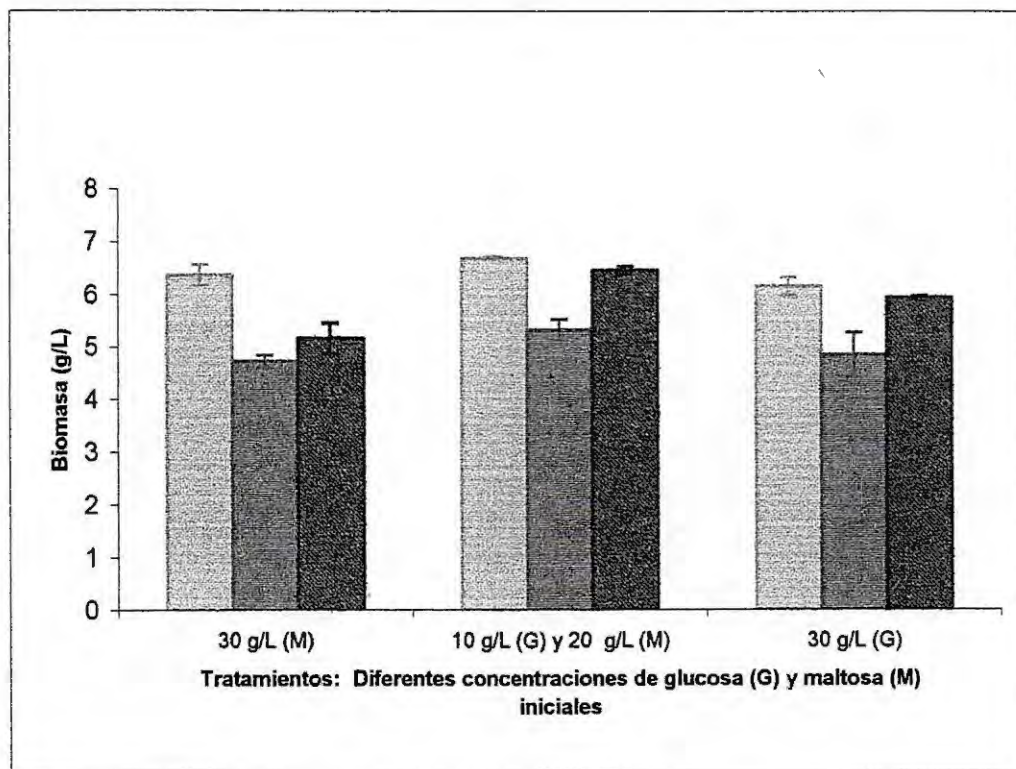


Fig. 7. Producción de biomasa a 48h de CSm de la cepa *Aspergillus niger* en medio Czapek- maltosa con glucosa y/o maltosa como fuente de carbono C28B25 (□), 99-iii(▤) y 96-3 (▥)

Es conocido desde hace tiempo que para incrementar la producción de una enzima inducible es conveniente agregar glucosa al inicio del cultivo con el fin de incrementar la cantidad de biomasa, dado que entre mayor sea la concentración de biomasa mayor será la cantidad de unidades secretoras de enzimas, esto es debido a que la glucosa es un sustrato que rinden mayores tasas de crecimiento del hongo, empero tiene la desventaja de reprimir la producción de la enzima de interés. De nuestros resultados observamos que las cepas producen el mismo nivel de biomasa sin que exista un efecto considerable con la adición de glucosa, sin embargo, como se verá adelante su efecto sobre la actividad es muy importante.

Efecto de la glucosa inicial sobre la producción de actividad volumétrica de GA

En la figura 8 se presenta el efecto de la glucosa inicial sobre los valores de la actividad de glucoamilasa, como se puede observar para las cepas C28B25 y la cepa 99-iii existe un marcado efecto de la glucosa inicial sobre el nivel de actividad alcanzada, disminuyendo de manera importante. No así para la cepa 96-3 cuya actividad fue la única en aumentar al agregar glucosa al medio, también se puede apreciar que su actividad en el medio con glucosa como única fuente de carbono produjo un nivel de actividad equiparable al conseguido con el testigo con solo maltosa. Este fenómeno está representado la tabla XI.

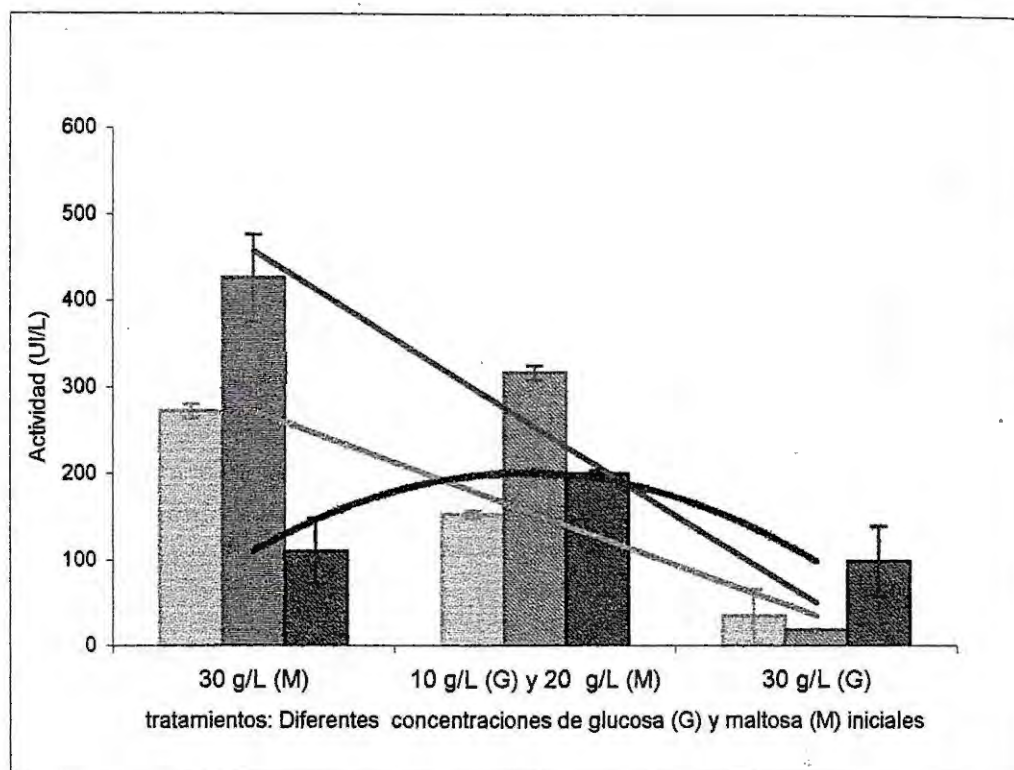


Figura 8. Actividad volumétrica de *Aspergillus niger* a 48h de CSm en medio Czapek con glucosa y/o maltosa como fuente de carbono para tres diferentes cepas. C28B25 (□), 99-iii(□) y 96-3 (□)

	0%G (F.C.) 30 g/L M (Referencia)	33%G (F.C.) 10 g/L G, 20 g/L M	100%G (F.C.) 30 g/L G.	Porcentaje de cambio con glucosa al 33% (F.C.)	Porcentaje de cambio con glucosa al 100% (F.C)
C28B25	100%	56%	13%	-44%	-87%
99-iii	100%	74%	4%	-26%	-96%
96-3	100%	182%	90%	+82%	-10%

Tabla XI. Proporción de cambio en la producción de GA para tres cepas de *Aspergillus niger* en un medio con diferentes proporciones de glucosa al inicio, los porcentajes de glucosa y maltosa son en relación p/v, y los porcentajes de cambio están referidos al obtenido en el medio sin glucosa inicial.

La cepa 99-iii (caracterizada como sobre productora de pectinasas en medio sumergido) es la cepa que mayor actividad de GA posee en un medio solo con maltosa, pero su actividad disminuye en un 26% al añadir 10 g/L de glucosa y un 96% al crecer en un 30 g/L del azúcar represor. El mismo efecto se puede observar para la cepa C28B25 que disminuye un 44% y 87% respectivamente al ir añadiendo glucosa al medio. Pero la cepa 96-3 tuvo una respuesta completamente distinta ya que al añadir el primer nivel de glucosa en lugar de disminuir la actividad aumento casi al doble (82%) y en el nivel más alto de glucosa (30 g/L) presentó solo una disminución de 10% de su actividad referida a la desarrollada por el testigo (30 g/L de maltosa).

Concluimos que la cepa 96-3 es una cepa que no disminuye su producción de GA en presencia de glucosa, o dicho de otra manera que la cepa 96-3 es insensible a la represión por glucosa, e incluso a un nivel de 10 g/L de glucosa junto con la maltosa presenta un incremento importante de actividad como un efecto de co-metabolismo.

Por otro lado dividiendo la producción de la actividad de glucoamilasa entre la producción de la biomasa se consigue expresar un cociente de rendimiento de actividad por gramo de biomasa (α'), lo cual expresa el grado de inducción de la GA en las diferentes condiciones de glucosa inicial, los valores de α' para los anteriores experimentos se muestran en la figura 9.

Lo primero que podemos observar de la figura 9 es que el experimento testigo (30 g/L de M) muestra un orden en los valores α' para cada una de las cepas que es el mismo que el observado para el parámetro α discutido al caracterizar las cinéticas de crecimiento y producción (ver Fig. 5 y tablas V y VI). Se puede observar el parámetro de inducción disminuye con la adición de glucosa para el caso de las cepas 99-iii y para la cepa C28B25, sin embargo, la cepa 96-3 incrementa su inducción con la adición de 10 g/L de glucosa y se mantiene en el mismo nivel de inducción tanto en presencia exclusiva de glucosa como en presencia exclusiva de maltosa que es caso del testigo.

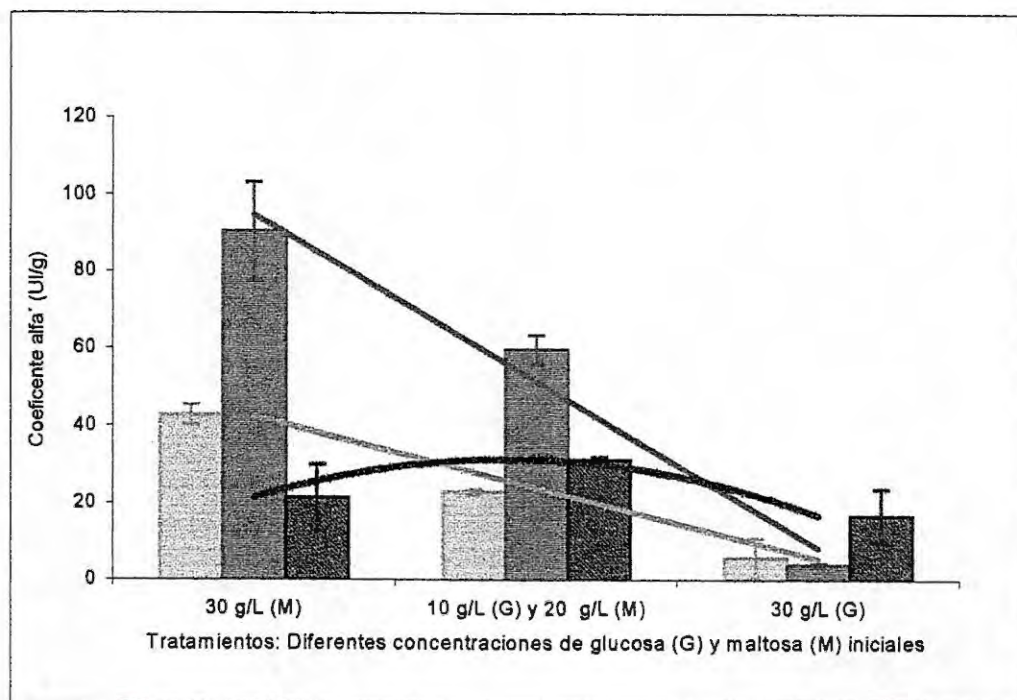


Figura 9. Cociente de producción α' de tres cepas de *Aspergillus niger* en medio Czapek con distintas combinaciones de glucosa y maltosa como fuente de carbono. C28B25 ($\square$), 99-iii($\square$) y 96-3 ($\square$)

Otra manera de observar el efecto de la glucosa sobre la inducción de la GA es estandarizar la producción de la actividad de GA con respecto a aquella producida en ausencia del inductor (producción constitutiva). La Tabla XII muestra los datos así Tratados, y muestran de una manera dramática el efecto de la concentración de la glucosa inicial sobre la actividad de la enzima. En el caso de la cepa 99-iii se puede observar la gran capacidad de producción de GA en maltosa con respecto a la producida con solo glucosa, esta diferencia de casi 25 veces mayor que la cepa progenitora, por otro lado también se observa la gran sensibilidad de la cepa 99-iii a la concentración de glucosa inicial, que en un menor grado se observa en la cepa C28B25, sin embargo, para la cepa 96-3 el efecto no tiene paralelo con las otras cepas mostrando un comportamiento completamente distinto. La cepa 96-3 incrementa su actividad discretamente al combinar glucosa y maltosa, pero de manera notable su actividad se mantiene en niveles equiparables en la presencia exclusiva del inductor o en la presencia exclusiva del represor, así lo demuestra el hecho de que no exista diferencias significativas entre la producción de GA en un medio con solo glucosa o un medio con solo maltosa.

Cepa	30 g/L de G	10 g/L de G, 20 g/L de M	30 g/L de M
99-iii	1,0	17,0	22,9
C28B25	1,0	4,4	7,8
96-3	1,0	2,0	1,1

Tabla XII Actividad relativa respecto al experimento testigo (30 g/L de G)

Los mismos datos pueden ser observados en la Tabla XII donde el valor de la primera columna expresa la producción de glucoamilasa en ausencia del inductor (Producción constitutiva), y en las dos columnas siguientes se pueden encontrar los factores en los cuales se multiplica la producción de glucoamilasa.

En cuanto al efecto de la glucosa sobre la producción de GA como se mencionó en los resultados las cepas C28B25 y 99-iii fueron reprimidas de manera muy importante en tanto que la cepa 96-3 no parece tener una respuesta negativa ante la presencia de glucosa (véase las figuras 8 y 9), su producción de GA con glucosa como única fuente de carbono no es significativamente diferente a la obtenida con maltosa como única fuente de carbono, sin embargo, produce cerca del 80% más en combinación de los dos substratos. Esta evidencia nos indica que la cepa 96-3 solo ocupa su capacidad constitutiva de producción de GA excepto en la combinación de substratos al inicio del cultivo, en dicho caso parece ocurrir el fenómeno de cometabolismo.

El termino de actividad constitutiva debe ser entendido como la cantidad de enzima producida en ausencia del inductor y en presencia del represor de dicha actividad y cometabolismo como el incremento de la actividad de forma sinérgica en presencia de dos substratos.

En cuanto a la cepa 99-iii que fue catalogada como sobre- productora de pectinasas en cultivo sumergido, se encontró que posee características de sobreproducción de GA en comparación con la cepa progenitora, aunque en cuanto a su regulación resultó ser la más

sensible de las cepas analizadas, cuando dicha cepa creció en glucosa su producción de GA fue de una quinta parte que la producida por la cepa 96-3. (figuras 8 y 9)

Para la cepa 96-3 se puede observar que existen diferencias concluyentes que nos indican que su producción constitutiva es diferente a la cepa silvestre de hecho su producción en el medio sin inductor fue de más del 200% que la cepa progenitora, aunque la producción de GA en presencia del inductor es mucho menor en comparación con la cepa silvestre (ver figura 8).

Como se mencionó en los resultados tratados y presentados en la Tabla XII se muestra de manera muy ilustrativa las diferencias entre las distintas cepas, en dicha Tabla se comparan las actividades constitutivas con las actividades inducidas, esta capacidad de inducción debida a la presencia del inductor, también puede verse como la sensibilidad a la represión por carbono en presencia de la glucosa. Así de esta manera se puede observar las profundas diferencias entre las cepas mutantes que fueron generadas a partir de la cepa C28B25.

Con los datos antes mostrados se puede decir que la cepa 96-3 es insensible a la represión por carbono, en tanto que la 99-iii y la cepa progenitora resultaron ser sensibles a la represión catabólica, aunque en diferentes grados.

Conclusiones

Una vez analizado y discutido los resultados llegamos a las siguientes conclusiones.

Se verifica que la mutante 99-iii tiene aumentada la producción de una hidrolasa

La cepa 99-iii resultó ser una cepa mutante dgr con capacidad aumentada de producción de glucoamilasa con respecto a la cepa progenitora y la otra mutante estudiada. Esta característica fue claramente distinguida con respecto los demás parámetros cinéticos medidos en este estudio, como μ , x_m , ó β , que resultaron ser similares para todas las cepas crecidas bajo las condiciones establecidas. Esto no sucedió con el parámetro q_p que expresa la tasa específica que producción enzimática, donde la cepa referida fue notablemente superior que las otras cepas estudiadas.

El aumento de la producción de la cepa progenitora a la cepa mutante 99-iii se debe a un incremento ligero en la tasa de crecimiento μ y aun aumento importante en el rendimiento α (UI/gx) de forma que el coeficiente q_p resultó notablemente superior en esta mutante.

Junto con otros trabajos de nuestro grupo se confirma la hipótesis de que las mutaciones obtenida para las cepas 99-iii y 96-3 son de tipo pleiotrópico

Con los resultados de este trabajo y otros realizados se muestran evidencias de que la cepa 99-iii posee fenotipos muy diversos como la sobreproducción y resistencia a la represión por carbono para la producción de pectinasas (5g/L de sacarosa), (Antier y col., 1993, Minjares y col., 1997) y además es sobreproductora de invertasa (Romero-Gómez y col., 2000) y la sobreproducción de la glucoamilasa (mostrada en esta tesis)

Por otro lado la cepa 96-3 además de ser sobreproductora de pectinasas en CSS y resistente a la represión por carbono en CSm (Antier y col. 1993), resultó ser insensible a la represión por carbono para la inducción de glucoamilasa, ya que la cepa generó niveles de actividad en la condición menos reprimida (30 g/L de maltosa. El inductor de GA) iguales a las obtenidas creciendo solo con glucosa (30g/L de glucosa. El represor más potente).

Lo anterior muestra que las mutaciones encontradas en las dos cepas modifican su metabolismo a niveles que afectan varios procesos cascada abajo como la sobreproducción y/o desrepresión catabólica para distintos sistemas enzimático.

Las diferencias notables entre la cepa 99-iii y 96-3 muestran la diversidad de fenotipos entre las mutantes dgr

Las cepas aquí analizadas fueron obtenidas en trabajos anteriores mediante diferentes presiones de selección y encontramos que las dos mutantes poseen fenotipos claramente distinguibles en cuanto a la producción de GA, la 99-iii resultó sobreproductora no así la cepa 96-3, mientras que ésta última resultó insensible a la represión por carbono para el sistema de producción de GA, mientras que la primera se reprimió su producción a un nivel de 10g/L de glucosa.

De lo anterior se concluye que las mutantes 99-iii y 96-3 poseen mutaciones distintas que afectan el metabolismo, por lo que el conocimiento de su localización y la naturaleza de dichas mutaciones es importante para el entendimiento de los mecanismos de sobreproducción y inducción- represión de los sistemas enzimáticos inducibles.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo plantean nuevas incógnitas que nos indican posibles proyecciones sobre este tema en particular, a continuación nos referimos a algunas:

¿Serán las mutantes resistentes a sorbosa?

Con el fin de identificar el tipo de mutantes a la cual pertenecen las cepas 96-3 y la cepa 99-iii sería importante conocer si estas cepas son capaces de crecer en algunos otros análogos como son la sorbosa y la fructosa que nos podrían dar más indicios de que mecanismo son los que utilizan cada cepa para presentar resistencia a la desoxiglucosa, y así puntualizar las diferencias entre las mutaciones que poseen ambas cepas, con este mismo fin también sería necesario cuantificar las tasas de ingreso de glucosa de los transportadores y de fosforilación del sistema de hexoquinasas,

¿Qué efectos tendría trabajar con un análogo a maltosa que no produzca glucosa intermedia?

Los datos arrojados durante este trabajo se remitieron en gran parte a la influencia de la glucosa inicial en la producción de glucoamilasa en un tiempo dado, como indicamos en las conclusiones, la contribución de la glucosa en estos experimentos proviene de dos fuentes,

la adición de glucosa inicial y la otra, la hidrólisis de la maltosa. Pero ¿qué tanto influye la una o la otra sobre la producción de la actividad a un tiempo dado?. Esa pregunta podría resolverse utilizando el D- maltoglucosido utilizado por Goto y col. (1998), el cual es un análogo a la maltosa que es completamente metabolizado y que puede ser utilizado como única fuente de carbono, utilizando este análogo que no produce glucosa al ser hidrolizado podemos distinguir los efectos de la glucosa inicial de manera independiente a la glucosa intermedia.

¿Serán las cepas mutantes reprimidas por la desoxiglucosa?

Como se mencionó en la introducción existen cepas mutantes resistentes a la desoxiglucosa que son insensibles a la represión por glucosa en la producción de enzimas inducibles pero son sensibles a la represión por la desoxiglucosa, o viceversa. Sería interesante saber si la cepa 99-iii que es sensible a la represión por glucosa lo es también para la desoxiglucosa, ó si la cepa 96-3 que es insensible a dicha represión no lo es también al análogo de la glucosa. De ser así podríamos saber más acerca del tipo de mutación que poseen, ya que como se sabe un tipo de mutantes *dgr* poseen fosfatasa específicas para la 6-fosfo-desoxiglucosa, lo cual podríamos identificar con este ensayo.

¿Cuánto se expresarían los cartuchos de DNA heterólogos con el promotor *glaA* en estas cepas?

Como es sabido el promotor de la glucoamilasa de algunos hongos del género *Aspergillus* son promotores muy fuertes y han sido utilizados en la expresión heteróloga de un gran número de proteínas, uno de los requisitos que debe reunir la cepa huésped es que sus promotores no compitan con el que se le insertará y que la cepa sea insensible a la represión por carbono. En el caso de la cepa 96-3 como vimos posee una baja actividad de glucoamilasa inducible (y una alta actividad constitutiva, a esto debemos añadir un insensibilidad a la represión por carbono, así que sería interesante probar un cartucho de expresión construido con el promotor de glucoamilasa y una proteína reportera; nosotros esperaríamos una alta expresión constitutiva así como una alta expresión inducida aun incluso en presencia de altas concentraciones de glucosa inicial, por lo cual consideramos a la cepa 96-3 una cepa útil para experimentos posteriores con finalidad de obtener proteínas heterólogas.

Es posible establecer un protocolo para generar mutantes *dgr* sobreproductoras de hidrolasas y/o insensibles a la represión por carbono que no tengan afectadas sus sistemas de transporte de glucosa

En el presente trabajo se estudiaron dos tipos de mutantes *dgr* una sobreproductora y otra insensible a la represión por carbono que no tuvieron problemas para crecer en maltosa o glucosa (sin defectos en sus sistemas de transportes de glucosa asociados a la membrana). Dado el método de selección con que fueron generadas (mutantes sin defectos en el gen *creA*) se puede predecir que es posible establecer un protocolo de mutación y selección racional para aislar mutantes con características similares. (Antier y col., 1993)

Bibliografía

Acuña Arguelles MA, Gutierrez Rojas M., Viniegra González G., Favela Torres E. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnol letters* Vol. 16 No. 1:23-28.(1994)

Aguilar G and Huitron C. Application of fed batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* s.p. *Enzyme Microb. Technol.* 1986,8:541-45.

Allen KE, McNally MT, Lowendorf HS, Slayman CW, and Free SJ. Deoxyglucose-Resistant Mutations of *Neurospora crassa*: Isolation, mapping, and biochemical characterization. *J.Bacteriol.* 1989, 171(1): 53-58.

Antier Ph, Minjares A, Roussos S, and Viniegra Gonzalez G. New approach for selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation. *Biochem.Adv.* 1993, 11:429-40.

Aon JC, Aon MA, Spencer JF, Cortassa S. Modulation of sporulation and metabolic fluxes in *Saccharomyces cerevisiae* by 2 deoxy glucose. *Anton. Van Leeuwen.* 1997, 72(4):283-90.

Aquíhuatl, MA, Raimbault M, Roussos S, and Trejo MR. In: "solid-state fermentation in bioconversion of agroindustrial raw materials", (Raimbault M ed.) Proceedings of the seminar ORSTOM monepllier, France, 1988, 13-26,

Asimov I, "Diastase". In: *Encarta Online Deluxe. Encyclopedia.* 1993-1999 Microsoft Corporation.

Aunstrup K., 1977, Production of industrial enzymes, In: "Biotechnology and fungal differentiation" (J. Meydath and J.D. Bu'Lock, eds), FEMS Symposium No.4 Academic press, New York, pp 157-171)

Bailey RB, and Woonword A. Isolation and characterization of pleiotropic glucose repression resistant mutants of *Scharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 1984, 193(3):507-512.

Bala M, Jain V. Indian J. 2-Deoxy-D-glucose induced modulation of DNA damage repair, survival, mutagenesis and recombination in 8-MOP+UVA treated yeast. *J. Biochem. Biophys.* 1997, 34(6): 483-93

Berka RM, Kodama KH, Rey MW, Wilson LJ, and Ward M. The development of *Aspergillus niger* var *awamori* as host for the expression and secretion of heterologous gene products. Food Biotechnol. 1991, 119.

Bowells LL. Amylolytic Enzymes. Food Sci. Technol. 1996, (75):105-129.

Cothino P, 1997, <http://www.public.iastate.edu/~pedro/glase/glase.Html>

Crabb WD and Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugar. TIB. 1997, 15(9):349-352.

Chiba S. Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997, 61(8):1233-9.

Davis SS. Biomedical applications of nanotechnology-implications for drug targeting and gene therapy. TIBTECH, 1997, (15):217-224.

Dosoretz CG, Chen HC, and Grethlein HE. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. App. Envir. Microbiol. 1990, (Febrero): 395-400.

Etian KD, and Louretro Dias M. Misregulation of maltose uptake in glucose repression defective mutant of *Saccharomyces cerevisiae* leads to glucose poisoning. J. Gen. Microbiol. 1990, 136: 855-860.

Fang TY, Ford C. Protein engineering of *Aspergillus awamori* glucoamylase to increase its pH optimum. Protein Eng. 1998, 11(5): 383-8.

Fiedurek J, Paszczynski A, Ginalska G, Ilczuk Z. Selection of amylolytically active *Aspergillus niger* mutants to 2-deoxy-D-glucose. Zentralbl Mikrobiol. 1987, 142(5):407-12

Goto CE, Barbosa EP, Kistner LCL, Moreira FG, Lenartovicz V, Peralta RM. Production of glucoamylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing a-methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose as substrate. FEMS Microbiol. Lett. 1998, (167): 139-143.

Han EK, Cotty F, Sottas C, Jiang H, and Michels CA. Characterization of AGT1 encoding a general a-glucosidase transporter from *Saccharomyces*. Mol. Microbiol. 1995, 17(6):1093-1107.

Harma T, Brondi JC, van den Rest ME, Pluim D, Vries Y, Stingl K, Poolman B, and Konings MN. Catabolic inactivation of wild-type and mutant maltode transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biological Chem. 1998, 273(25): 15352-57.

Hata V, Tsucchiya K, Kitamoto K, Gomi K, Kumagai C, Tamura G, and Hara S. Nucleotide sequence and expresion of the glucoamylase encoding gene *glaA* from *Aspergillus oryzae*. Gene 1991, 108: 145-150.

Hata Y, Ishida H, Ichikawa E, Akitsugu K, Sugunami K, Imayasu S. Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Gene 1998, 207: 127-134.

Henrissat B. A clasifcation of glycosil hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 1991, 280: 309-316.

Hisaeda Y. Artificial enzymes based on supramolecular chemistry. Tanpakushitsu Kakusan Koso 2000, 45(15): 2483-92.

Innis MA, Holland MJ, McCabe PC, Cole GE, Wittman VP, Tal R, Watt KWK, Gelfand DH, Holland JP, Meade JH, Expresion, Glycosilation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. Science 1985, Abril: 228.

Ivanova VV, Erokhina LT. Use of catabolic repression in the selection of the glucamylase- producer *Aspergillus niger*. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 1983, 19(6): 844-50.

Kanemori Y, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Chieko C, and Tamura G. Insetion analysis of putative fuctional elements in the promoter region of the *Aspergillus oryzae* taka-amylase A gene (*amyB*) using a heterologous *Aspergillus nidulans amdS::lacZ* fusion gene system. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1999, 63(1): 180-183.

Kirimura K, Sarangbin S, Rugsaseel S, and Shoji U. Citric acid production by 2-Deoxiglucose resistant mutants strain of *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992 (36): 573-77.

Loera O, Vinegra Gonzalez G, Aguirre J. Caracterización genetica preliminar de mutantes de *Aspergillus niger* resistentes a 2-Deoxiglucosa y sobre productoras de poligalacturonasas. En: Revista de la SMBB. " Biotecnologia V congreso nacional". 1993, 3(1 y 2): FB-9-12.

Loera O, Aguirre J, Vinegra Gonzalez G. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. *Enz. Microb. Technol.* 1999, 25: 103-108.

Lowe D.A. Fungal Enzymes. In: "Handbook of applied mycology", Vol. 4: Fungal biotechnology (Arora D.K., Elander R.P. And Mukerji K.G. eds.), Marcel- Dekker, Inc., New York, 1992: 681-706.

Mackenzie DA, Jeenes DJ, Belshaw NJ, and Archer DB, Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: Recent Developments and perspectives. *J. Gen. Microbiol.* 1993, (139): 2295-2307.

Medintz I, Jiang H, Han EK, Cui W, Michels CA. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1996, 178(8): 2245-54

Metwally M. Glucoamylase production in continuous culture emphasis on growth parameters. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 1998, (14): 113-118.

Milbradt B, Hofer M. Glucose-transport-deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*: phenotype, genetics and use for genetic complementation. *Microbiol.* 1994, 140 (Pt 10): 2617-23

Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 1958, 58(3)

Minetoki T, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Tamura G. Characteristic expression of three amylase-encoding genes, *agdA*, *amyB*, and *glaA* in *Aspergillus oryzae* transformants containing multiple copies of the *agdA* gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995, 59(12): 2251-4

Minjares Carranco A, Trejo Aguilar G, and Viniegra González G. Physiological comparison between pectinase -producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme Microbial. Technol.* 1997, 21: 25-31.

Moore B. Effects of hexose analogues on fungi: mechanisms of inhibition and of resistance. *New Phytol.* 1981(87): 487-515.

Nielsen J. Metabolic Engineering: Techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnol. Bioengineer.* 1998, 58(2-3).

Novak S, D'Amore T, and Stewart GG. 2-Deoxy-D-Glucose resistant yeast with altered sugar transport activity. FEBS Lett. 1990, 269(1): 202-204.

Nunberg, J.H., Meade J.H., Cole G., Lawyer F.C., Maccabe P., Scheickart V., Tal R., Wittman V.P., Flatgaard J.T., Innis M.A. Mol. Cel. Biol. 1984, 4: 2306-2315

Parvez, S; Rajoka, MI; Ahmed, MN; Latif, F; Shahid, R; Malik, KA Source Folia Microbiol. 1998, 43(1): 59-62.

Pedersen J. and Peberdy JF. Protein secretion in filamentous fungi trying to understand a highly productive black box. TIBS 1994, 12(2).

Pirt S.J. 1975, Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell scientific publications. New York, USA: 22-29.

Ramadas M, Holsts O, and Mattiason B. Productions of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under differets cultivation regiments. W. J. Microbiol. Biotechnol. 1996, (12):267-271.

Randez-Gil. J.A. Prieto. P. Sanz. The expression of a specific 2-Deoxy glucose-6-P phospatase prevents catabolite repression mediated by 2-Deoxyglucose in yeast. Curr. Genet. 1995, (28):101-107.

Romero-Gomez SJ, Acuña ME., Viniegra G. Caracterización genética preliminar de mutantes de *Aspergillus niger* resistentes a 2-Desoxiglucosa e hiperproductoras de pectinasas. En: Revista de la SMBB " Biotecnología V congreso nacional", 1993, 3(1-2): FS-65.

Romero-Gómez SJ, Augur C and Viniegra-González G. Invertase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Biotechnol.Lett. 2000, 22:1255-1258.

Ruijter GJG. y Visser J. Carbon repression in *Aspergilli*. FEMS Microbiol. Lett. 1997, (151): 103-114.

Scazzocchio, C., Gavrias, V., Cubero, B., Panozzo, C., Mathieu, M. y Felenbok, B. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: a review. Can. J. Bot. 1995, 73(Suppl. 1): S160-S166.

Schrickx JM, Krave AS, Verdoes JC, van den Hondel CAMJJ, Stouthamer AH, and van Verseveld HW. Growth and production formation in chemostat and recycling cultures by *Aspergillus niger* N402 and a glucoamylase overproducing transformants, provided with multicopies of the *glaA* gene. J. General. Microbiol. 1993, (139):2801-2810.

Schrickx JM, Stouthamer AH, and van Verseveld HW, Growth behaviour and glucoamylase production by *Aspergillus niger* N402 and glucoamylase overproduction transformant in recycling culture without a nitrogen source. App. Microbiol. Biotechnol. 1995(43): 109-116.

Selvakumar P, Ashakumary L, Helen A and Pandey A. Purification and characterization of glucoamylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Lett. App. Microbiol. 1996, (23): 403-406.

Shibuya I, Tamura G, Shima H, Ishikawa T, and Hara S. Construction of an α -Amylase/Glucoamylase fusion gene and its expression *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotech. Biochem. 1992, 56(6): 884-889.

Sierks M.R., Ford C., Reilly P.J., Svensson B. Protein Engineer. 1990, (3): 193-198.

Suzuki A, Sarangbin S, Kirimura K, Usami S. Direct production of citric acid from starch by a 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. J. Ferment. Bioengineer. 1996, 81(4): 320-323.

Torres NV, Riol-Cimas JM, Wolschek M, Kubicek CP. Glucose transport by *Aspergillus niger*: The low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. App. Microbiol. Biotechnol. 1996, 44(6): 790-794.

Trinder P. Ann. Clin. Biochem. 1969, 6(24):.

Verdoes JC, Punt PJ, Schrickx JM, van Verseld HW, Stouthamer AH, and van den Hondel CAMJJ. Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: molecular genetic analysis of the *glaA* gene. Transgenic Res. 1993, 2: 84-92.

Warren RAJ. Microbial hydrolysis of polycaccharides. Ann. Rev. Microbiol. 1994, 50:183-213.

Whiters. Optimization and stability of Glucoamylase production by recombinant. Strains of *Aspergillus niger* in chemostat culture. Biotechnol. Bioengineer. 1998, 59(4):.

Wösten HAB, Moukha SM, Sietsma JH and Wessels JGH.
Localization of grow and secretion in *Aspergillus niger*. J. Gen.
Microbiol. 1991, 137: 2017-2023.