

CBS



Casa abierta al tiempo

“EVALUACION DE LA RECOMBINACION PARASEXUAL EN
CEPAS DE *Aspergillus niger* PARA MEJORAR LA PRODUCCION
DE ENZIMAS EN CULTIVO EN ESTADO SOLIDO”

COMUNICACION IDONEA DE RESULTADOS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A :
I.B. ALBA MONICA MONTIEL GONZALEZ


TUTOR: DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESORES: DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ
DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO





NOVIEMBRE 2000

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE HONGOS FILAMENTOSOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, PERTENECIENTE A LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.

.. A. M. IZTAPALAPA

La Maestría en Biotecnología, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, se encuentra dentro del Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Este trabajo fue financiado por el CONACyT a través de la beca de Maestría No. 127832.

DEDICATORIA

**A CARLOS MONTIEL GARCÍA
Y LIDIA GONZÁLEZ LEYVA**

Por su apoyo incondicional para el logro de mis metas, por que me han enseñado lo importante del trabajo y la perseverancia para alcanzar todo lo que me proponga, por sus sabios consejos y por el gran amor y paciencia con que han tomado todas mis decisiones y especialmente por creer en mí.

A mi familia

Mis hermanos, **Zeuz, Luis Daniel, Halué y Carlos**, a mi prima **Alicia** y a mis sobrinas consentidas, **Yranny y Carla**, por hacer que los largos días de trabajo y las presiones, sean más soportables cuando me contagian su buen humor y su compañía. A mis abuelas **Manuelita y Claudia** y **Yola**, por que son las raíces de nuestra existencia.

Muy especialmente a Guillermo Sánchez R.

Por que sin importar los sacrificios, se que cuento siempre con su apoyo y con su amor y agradezco profundamente el interés que muestra ante las cosas que para mi son importantes en la vida.

**A mis compañeros de la maestría y mis amigos.
En especial a Jaime, Sonia, Minerva, Rocío y
Cristina.**

Que han estado conmigo en todo momento, han tenido confianza en mi , me han regalado su amistad y mucho de su tiempo y hemos compartido muy buenos momentos .

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los doctores **Octavio Loera Corral, Gustavo Viniegra González y Francisco José Fernández Perrino**, por la acertada asesoría que me brindaron a lo largo de esta Tesis, por compartir conmigo sus conocimientos y su experiencia y ayudar a mi formación como investigador.

Al **Dr. Armando Mejía**, por su interés en este proyecto, por su orientación y participación en la realización de esta Tesis.

A los miembros externos del Jurado: **Dra. María Elena Flores y Dra. Sara Elena Solís Pereira**, por sus invaluable aportaciones realizadas en la revisión del trabajo.

Al Enólogo **Alberto Reyes Dorantes** y a la Ingeniero **Frida Malpica Sánchez**, por su apoyo, sus consejos, su tolerancia y la amistad que me han brindado durante esta etapa.

Al CONACyT, por el apoyo financiero brindado.

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.- JUSTIFICACIÓN.....	11
2.- ANTECEDENTES	
2.1.- ANTECEDENTES.....	13
2.2.- HIPÓTESIS.....	17
2.3.- OBJETIVOS	
2.3.1.- General	17
2.3.2.- Específicos.....	17
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1.- MICROORGANISMOS.....	18
3.2.- AISLAMIENTO DE CEPAS AUXÓTROFAS	
3.2.1.- Curva de Supervivencia.....	20
3.2.2.- Mutagénesis.....	20
3.2.3.- Proceso de Enriquecimiento.....	21
3.3.- AISLAMIENTO DE CEPAS DIPLOIDES	
3.3.1.- Cruza Parasexual	23
3.3.2.- Prueba de Diploidía.....	25
3.4.- PRUEBA DE SENSIBILIDAD A 2-Desoxi-Glucosa (2DG).....	26
3.5.- CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO	
3.5.1.- Elaboración de medio de cultivo.....	28
3.5.2.- Acondicionamiento de Unidades Experimentales.....	29
3.5.3.- Cultivo en Estado Sólido.....	30
3.5.4.- Determinaciones analíticas	
3.5.4.1.- Biomasa.....	30
3.5.4.2.- pH.....	30
3.5.4.3.- Actividad Enzimática (invertasa).....	31
3.5.4.4.- Proteína.....	31
3.5.4.5.- Consumo de Sustrato.....	32
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1.- CURVAS DE SOBREVIVENCIA.....	33
4.2.- OBTENCIÓN DE CEPAS AUXÓTROFAS.....	34
4.3.- OBTENCIÓN DE CEPAS DIPLOIDES.....	36
4.4.- PRUEBA DE DIPLOIDÍA.....	37

4.5.- PRUEBA DE SENSIBILIDAD A 2DG.....	38
4.6.- CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO EN SISTEMAS CON AW DE 0.99 Y 0.96 DE LAS CEPAS HAPLOIDES ORIGINALES.	
4.6.1.- Cinéticas de Biomasa.....	44
4.6.2.- Cinéticas de pH.....	45
4.6.3.- Cinéticas de Actividad Enzimática (Invertasa).....	47
4.6.3.1.- Cinéticas de Actividad Volumétrica.....	47
4.6.3.2.- Cinéticas de Actividad Específica.....	48
4.6.3.3.- Rendimiento	49
4.6.4.- Cinéticas de Consumo de Sustrato.....	50
4.7.- CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO EN SISTEMAS CON AW DE 0.99 Y 0.96 DE LAS CEPAS DIPLOIDES	
4.7.1.- Cinéticas de Biomasa.....	52
4.7.2.- Cinéticas de pH.....	53
4.7.3.- Cinéticas de Actividad Enzimática (Invertasa).....	54
4.7.3.1.- Cinéticas de Actividad Volumétrica.....	54
4.7.3.2.- Cinéticas de Actividad Específica.....	55
4.7.3.3.- Rendimiento.....	57
4.7.4.- Cinéticas de Consumo de Sustrato.....	58
4.8.- COMPARACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS ENTRE CEPAS DIPLOIDES Y SUS CEPAS PROGENITORAS.....	61
4.9.- DISTRIBUCION DE LAS CEPAS DE <i>A. niger</i> SOBRE UN PLANO FORMADO POR LOS VALORES DE VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD.....	65
5.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1.- Conclusiones.....	68
5.2.- Recomendaciones.....	69
6.- ANEXOS.....	70
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	76

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

TABLAS	PÁGINA
TABLA 1.- Lista de cepas haploides originales y autores que las aislaron.....	18
TABLA 2.- Medio de cultivo propuesto por Antier y col., 1993.....	21
TABLA 3.- Diseño experimental.....	27
TABLA 4.- Medio de cultivo propuesto por Díaz-Godínez.,1997.....	28
TABLA 5.- Porcentaje de etilenglicol adicionado al medio de cultivo.....	29
TABLA 6.- Cuadro comparativo del efecto de 2DG sobre el crecimiento de las cepas de <i>A. niger</i> con distintas fuentes de carbono.....	42
TABLA 7.- Rendimiento Y P/X de las cepas haploides en los 2 sistemas probados.....	50
TABLA 8.- Rendimiento Y P/X de las cepas diploides en los 2 sistemas probados.....	57
TABLA 9.- Cuadro comparativo de los parámetros cinéticos entre las cepas haploides y diploides en un sistema con actividad de agua de 0.99.....	61
TABLA 10.-Cuadro comparativo de los parámetros cinéticos entre las cepas haploides y diploides en un sistema con actividad de agua de 0.96.....	62
GRÁFICOS	
GRÁFICO 1.-Curva de sobrevivencia para las cepas mutantes Aw96-3 y Aw96-4.....	33
GRÁFICO 2.-Prueba de sensibilidad a la luz UV de las cepas mutantes.....	34
GRÁFICO 3.-Prueba de sensibilidad a 2DG de las cepas Aw96-3 auxótrofas a alanina en presencia de glucosa como fuente de carbono.....	38
GRÁFICO 4.-Prueba de sensibilidad a 2DG de las cepas Aw96-3 auxótrofas a alanina en presencia de fructosa como fuente de carbono.....	38
GRÁFICO 5.-Prueba de sensibilidad a 2DG de la cepa Aw96-4 auxótrofa a fenilalanina en presencia de glucosa como fuente de carbono.....	39
GRÁFICO 6.-Prueba de sensibilidad a 2DG de la cepa Aw96-4 auxótrofa a fenilalanina en presencia de fructosa como fuente de carbono.....	39
GRÁFICO 7.-Prueba de sensibilidad a 2DG del diploide DAR1 y del autodiploide AD96-3 en presencia de glucosa como fuente de carbono.....	40
GRÁFICO 8.-Prueba de sensibilidad a 2DG del diploide DAR1 y del autodiploide AD96-3 en presencia de fructosa como fuente de carbono.....	40
GRÁFICO 9.-Prueba de sensibilidad a 2DG del diploide DAR2 y del autodiploide AD96-4 en presencia de glucosa como fuente de carbono.....	41
GRÁFICO 10.-Prueba de sensibilidad a 2DG del diploide DAR2 y del autodiploide AD96-4 en presencia de fructosa como fuente de carbono.....	41

GRÁFICO 11.-Cinética de crecimiento de cepas progenitoras con actividad de agua de 0.99.....	44
GRÁFICO 12.-Cinética de crecimiento de cepas progenitoras con actividad de agua de 0.96.....	45
GRÁFICO 13.-Cambio de pH con cepas haploides en un sistema con actividad de agua de 0.99...	46
GRÁFICO 14.-Cambio de pH con cepas haploides en un sistema con actividad de agua de 0.96	46
GRÁFICO 15.-Cinética de actividad volumétrica en cepas parentales con actividad de agua de 0.99.....	47
GRÁFICO 16.- Cinética de actividad volumétrica en cepas parentales con actividad de agua de 0.96.....	48
GRÁFICO 17.-Perfil de actividad específica en las cepas haploides con actividad de agua de 0.99.	48
GRÁFICO 18.-Perfil de actividad específica en las cepas haploides con actividad de agua de 0.99.	49
GRÁFICO 19.-Cinética de consumo de sustrato de las cepas haploides con actividad de agua de 0.99.....	50
GRÁFICO 20.-Cinética de consumo de sustrato de las cepas haploides con actividad de agua de 0.96.....	51
GRÁFICO 21.-Cinética de crecimiento de biomasa de cepas diploides con actividad de agua de 0.99.....	52
GRÁFICO 22.-Cinética de crecimiento de biomasa de cepas diploides con actividad de agua de 0.96.....	52
GRÁFICO 23.-Cambio de pH con cepas diploides en un sistema con actividad de agua de 0.99....	53
GRÁFICO 24.-Cambio de pH con cepas diploides en un sistema con actividad de agua de 0.96....	54
GRÁFICO 25.-Cinética de actividad volumétrica en cepas diploides en un sistema con actividad de agua de 0.99.....	54
GRÁFICO 26.-Cinética de actividad volumétrica en cepas diploides en un sistema con actividad de agua de 0.96.....	55
GRÁFICO 27.-Perfil de actividad específica en las cepas diploides con actividad de agua de 0.99.	56
GRÁFICO 28.-Perfil de actividad específica en las cepas diploides con actividad de agua de 0.96.	56
GRÁFICO 29.-Cinética de consumo de sustrato de las cepas diploides con actividad de agua de 0.99.....	58
GRÁFICO 30.- Cinética de consumo de sustrato de las cepas diploides con actividad de agua de 0.96.....	59
GRÁFICO 31.-Distribución de cepas haploides y diploides en un sistema con actividad de agua de 0.99.....	65
GRÁFICO 32.-Distribución de cepas haploides y diploides en un sistema con actividad de agua de 0.96.....	65

INDICE DE DIAGRAMAS Y FIGURAS

DIAGRAMAS	PÁGINA
DIAGRAMA 1.-Metodología general.....	19
DIAGRAMA 2.-Proceso de enriquecimiento para el aislamiento de auxótrofas.....	23
DIAGRAMA 3.-Esquema de emparejamiento de cepas auxótrofas para la cruce parasexual.....	24
DIAGRAMA 4.-Proceso de aislamiento de cepas diploides.....	25
FIGURAS	
FIGURA 1.- Hidrólisis de la sacarosa.....	9
FIGURA 2.- Pasos del proceso de enriquecimiento para el aislamiento de auxótrofas.	
FIGURA 2(a).- Detección de posibles cepas auxótrofas.....	34
FIGURA 2(b).- Prueba de auxotrofia de las cepas candidatas.....	34
FIGURA 2(c).- Purificación de auxótrofas.....	34
FIGURA 3.- Pasos del proceso para el aislamiento de diploides	
FIGURA 3(a).- Condiciones e inicio de las cruces parasexuales.....	36
FIGURA 3(b).- Inoculación de micelio germinado en placa.....	36
FIGURA 3(c).- Propagación del heterocarión.....	36
FIGURA 3(d).- Cultivo sumergido de esporas de heterocarión y aislamiento de diploides....	36
FIGURA 4.- Prueba de diploidía (haploidización y recuperación de auxótrofas).	
FIGURA 4(a).- Colonias con diferencias morfológicas de DAR2.....	37
FIGURA 4(b).- Colonias con diferencias morfológicas de DAR1.....	37
FIGURA 4(c).- Colonias con diferencias morfológicas de AD96-4.....	37
FIGURA 4(d).- Colonias con diferencias morfológicas de AD96-3.....	37
FIGURA 4(e).- Recuperación de cepas auxótrofas.....	37

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Antecedentes de la producción de enzimas por Fermentación en Estado Sólido

Es indiscutible, la creciente necesidad de utilizar, en forma cada vez más completa, los recursos renovables, verbi gratia: los grandes volúmenes de residuos orgánicos generados por las principales agroindustrias del país, esta idea debe impulsar a buscar nuevas alternativas biotecnológicas para transformar dichos residuos en nuevos productos de alto valor agregado. Así, se podrían transformar residuos tales como: la pulpa de café, la flor de Cempasúchil, que actualmente contaminan el suelo y el agua o simplemente se descomponen sin que se obtenga un beneficio económico de los mismos (Fisher y col., 1993; Hrubant y col., 1985).

Los grandes avances de la tecnología en general y de la biotecnología en particular aunado a un poco de trabajo, pueden lograr que esos excedentes que hoy se desperdician, sean aprovechables mediante la realización de procesos económicamente rentables. Algunos de ellos son un excelente sustrato, para el cultivo en medio sólido de determinados microorganismos (sobre todo hongos filamentosos), debido a que algunos de los componentes de dichos materiales inducen la aparición de compuestos de interés en el microorganismo (p.ej. ácido cítrico) y de actividades enzimáticas que permiten metabolizar dichos sustratos (glucoamilasas, pectinasas, proteasas, invertasa, etc.) (Monroy y Viniegra-González, 1981; Ilczuk y col., 1985), que pueden ser producidos por fermentación sumergida o por fermentación sólida (FES).

Los cultivos en estado sólido han sido definidos como el tipo de cultivo donde los sustratos no se encuentran disueltos, es decir, los componentes nutritivos necesarios para el desarrollo de los microorganismos son parte estructural de los materiales sólidos, que constituyen la fuente de carbono, energía, nitrógeno y otros nutrientes (Demain y Solorno, 1986). Pero, sería más general y a la vez más específico, definirlos por cultivos de microorganismos sobre materiales sólidos (biodegradables o no), que están humedecidos pero, en los cuales, el agua no se encuentra obstruyendo la transferencia de gases con la capa de microorganismos, sino que está formando una delgada película de agua libre adsorbida sobre el

material sólido y los nutrientes, se pueden disolver en esa delgada capa de agua para permitir el metabolismo de los microorganismos.

Este tipo de cultivo ofrece las ventajas de requerir menos agua de proceso y, en consecuencia, generar mucho menos agua residual. Pueden llevarse a cabo en recipientes de tipo rústico, como: zanjas, cuartos de malteo, charolas, tambores rotatorios, etc. Y tienen la notable propiedad de no presentar el fenómeno de represión catabólica, lo que facilita el uso de mezclas de inductores y azúcares para mejorar los rendimientos de las enzimas (Solís-Pereira et al., 1993). Además, pueden utilizar altas concentraciones de sustratos sólidos con bajas actividades de agua (A_w) [Paredes López y Alpuche-Solís, 1992]. No requieren medios asépticos, debido a que difícilmente se contaminan, porque el microorganismo usado compete eficientemente con las cepas silvestres de bacterias y levaduras (Moo-Yong y col., 1981). Por todas estas razones, este tipo de fermentación, es un método atractivo para el tratamiento biológico de materiales lignocelulósicos, con el fin de mejorar su digestibilidad o para facilitar su hidrólisis enzimática (Ward 1989).

Para justificar la importancia de la FES, bastará mencionar las siguientes características generales:

- ❖ En las fermentaciones tradicionales en estado sólido, pueden involucrarse mezclas de cultivos de flora microbiana propia del sustrato y mezclas de microorganismos iniciadores de la fermentación que provienen de cepas puras.
- ❖ Los sustratos sólidos, proveen un ambiente selectivo para algunas bacterias y un gran número de hongos filamentosos, tales como actinomicetos, que crecen en forma micelial.
- ❖ Los sustratos sólidos, por su naturaleza, proveen mezclas de fuentes de carbono, energéticas y de nitrógeno, además de diversas y complejas fuentes de micronutrientes (que pueden o no ser completos con respecto a los requerimientos nutricionales del microorganismo cultivado).

- ❖ Los sustratos tradicionales, contienen pequeñas moléculas de carbono, sin embargo, las paredes celulares de este sustrato son biopolímeros de alto peso molecular, como celulosa, hemicelulosa, pectina, proteína y lípidos, que requieren de hidrólisis enzimática para ser aprovechadas en el metabolismo como productos primarios asociados al crecimiento.
- ❖ Las enzimas hidrolíticas necesarias para la asimilación de los compuestos de alto peso molecular para los microorganismos generalmente empleados en fermentación sólida, son extracelulares y pueden localizarse en la superficie de los sólidos o en forma libre.
- ❖ La mezcla de compuestos de carbono de alto y bajo peso molecular induce a un complejo patrón de inducción, represión e inhibición en la regulación del metabolismo microbiano.
- ❖ El crecimiento microbiano ocurre en o cerca de la superficie del sólido, en una lámina líquida delgada, misma que es interfase de la fase sólida y el gas del ambiente externo.
- ❖ La transferencia de masa (nutrientes para organismos) se lleva a cabo en la interfase sólido-líquido y en la interfase líquido-gas y en estas interfases también se lleva a cabo la transferencia de calor.

Por tanto, la FES tiene las siguientes ventajas sobre la FML

- ❖ Los sustratos sólidos pueden requerir solamente la adición de agua y pequeñas cantidades de otros nutrientes (carbohidratos, vitaminas, etc.).
- ❖ Los volúmenes de agua residual se reducen considerablemente en la FES, con respecto a la FML.
- ❖ La baja cantidad de agua libre, reduce los riesgos de contaminación porque la A_w es mucho menor que en la FML y esto favorece el crecimiento de cultivos de los hongos que tienen una gruesa pared celular y resisten mejor el “estrés” osmótico que las bacterias.
- ❖ Proporciona condiciones similares al ambiente natural de los hongos saprofitos para su crecimiento.
- ❖ El producto obtenido puede ser incorporado directamente en dietas para animales, sin tener que separarlo del sustrato sólido.
- ❖ Es un método eficiente para la conservación de diversos residuos agroindustriales, porque el pH del material fermentado disminuye, inhibiendo el desarrollo de microorganismos indeseables.

- ❖ A diferencia de la fermentación líquida, la FES proporciona mayor rendimiento, debido a que el producto se encuentra concentrado gracias a la baja cantidad de agua.
- ❖ Incrementa la digestibilidad de polímeros complejos de carbohidratos por acción de enzimas celulolíticas, hemicelulósicas y ligninasas.
- ❖ Incrementa el valor nutricional de los subproductos utilizados.

A pesar de la bondades que ofrece este sistema, también podemos encontrar las siguientes desventajas:

- ❖ Los sustratos agrícolas, pueden requerir de algún pretratamiento (molido, abrasión, ajuste de pH, adición de enzimas, etc.)
- ❖ El calor metabólico generado por los microorganismos, constituye uno de los problemas por resolver en fermentaciones a gran escala.
- ❖ A falta del desarrollo específico de la tecnología, en este campo, es posible perder el control de los procesos industriales. (Demain y col.,1986).
- ❖ El manejo industrial de los materiales sólidos es más difícil y costoso que el de los líquidos, incluyendo operaciones unitarias como: mezclado, transporte y separación.

Para poder observar en una fermentación la inducción y producción de una enzima, por la técnica de FES, es conveniente echar mano de un sistema modelo usando un soporte no biodegradable, en el que se sugiere la utilización de un soporte sintético. Entre este tipo de soportes se ha visto que la espuma de poliuretano es una buena opción para estos experimentos (Díaz-Godínez, 1997).

Este soporte esta hecho de un material inerte, es decir, los compuestos que lo forman no interactúan con los componentes del medio de cultivo. Esto permite obtener resultados con mayor precisión en los balances de materia, tanto del sustrato como de la biomasa y los productos. De esa forma, se obtienen datos confiables acerca de la eficiencia y los perfiles cinéticos en la fermentación. El soporte, además debe ser un material poroso que permita la absorción del medio de cultivo y, por ende, facilite el crecimiento invasivo del hongo, en una mayor superficie debido a la disponibilidad de medio de cultivo para nutrirse y también a la

disponibilidad de una gran área expuesta a la interfase entre el medio de cultivo y el aire. Finalmente cabe mencionar que su fácil manejo ha permitido obtener sistemas más homogéneos en cuanto al tamaño de partícula del soporte (Díaz-Godínez, 1997).

Por ejemplo: la espuma de poliuretano de baja densidad (17 g/L) tiene travéculas cilíndricas de diámetro cercano a 0.2 mm, las cuales pueden absorber cerca de 20 veces su peso seco por agua absorbida por capilaridad sobre dichas travéculas. Así, se puede dispersar el medio líquido en una lámina muy delgada, con un espesor menor a 0.1 mm, del cual puede nutrirse un cultivo de mohos, si este medio está provisto de los nutrientes necesarios. Además, esa lámina de agua tiene una elevada relación entre el área y el volumen ($> 100 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$), la cual, favorece el intercambio de gases entre el medio líquido y la fase aérea circundante. Finalmente, el poliuretano no permite la invasión de los micelios a su interior, pues forma estructuras compactas. Esto garantiza que todo el cultivo de mohos crecidos sobre este material sea un cultivo de superficie o de micelios aéreos expuestos al aire pero arraigados a la lámina del nutriente líquido.

Al final de la fermentación, la biomasa puede estimarse directamente por medio de la medición de las diferencias de la masa seca acumulada y los productos (las enzimas excretadas al medio) y los substratos, se pueden medir directamente mediante la extracción cuantitativa del caldo de cultivo utilizado.

Antecedentes microbiológicos y genéticos

Los hongos filamentosos, utilizados con frecuencia como inóculo en estos procesos, se caracterizan por ser microorganismos eucarióticos heterótrofos, que poseen paredes celulares rígidas, están ampliamente distribuidos en la naturaleza y crecen en forma de micelio formado por hifas. No se ha encontrado reproducción sexual en los mohos de interés industrial, por lo que se consideran deuteromicetos, se reproducen en forma asexual por medio de conidiosporas y tienen un ciclo parasexual mediante el cual se recombinan genéticamente (Smith y col., 1975). Determinadas especies, como *Aspergillus niger* (probablemente el más común de los deuteromicetos), producen enzimas extracelulares muy utilizadas en la industria,

por ejemplo: las amilasas y las proteasas para la digestión enzimática del arroz y de la soya, en la industria alimentaria oriental, las invertasas, en confitería, las amilasas, en la producción de jarabes fructosados; la glucosa oxidasa, en medicina, para medir la glucosa con fines diagnósticos y, las celulasas, proteasas, fitasas y xilanasas, para el mejoramiento de piensos y forrajes. En Asia, el método tradicional para producir estas enzimas es la Fermentación en Estado Sólido (FES), llamada koji en Japón, pero en Occidente, el método preferido es la llamada Fermentación en Medio Líquido (FML), también llamada Fermentación Sumergida (FSM), para distinguirla de la Fermentación de Superficie que se empleó a principios del siglo XX en recipientes someros con una capa flotante de mohos. Pero para todos estos tipos de procesos industriales, los mohos han resultado magníficos candidatos como productores de enzimas porque producen y excretan muchas enzimas con facilidad, crecen con rapidez, toleran altas concentraciones de nutrientes, pueden glucosilar las proteínas excretadas y su biomasa puede separarse con facilidad de los caldos de cultivo (Viniestra-González, 1998). Además, como su hábitat natural es la materia orgánica en descomposición, suelen ser magníficos candidatos para los procesos de FES.

Con el fin de usar estas propiedades de los mohos, se han realizado estudios que permiten modificar su metabolismo, para hacer que sobreproduzcan enzimas, tanto en fermentaciones en Cultivo Sumergido (CS), como en Fermentación en Estado Sólido (FES). Por ejemplo: algunas cepas de *Aspergillus niger*, mutadas por exposición a luz UV, que resultan resistentes a un análogo de la glucosa, la 2-desoxi-D-glucosa (2DG) que es tóxico (El-Ghaouth y col., 1997). También resultan ser cepas sobre productoras de diversas enzimas excretadas al medio (Antier et al, 1993). En estudios llevados a cabo con *Saccharomyces cerevisiae*, se ha visto que este tipo de mutaciones están asociadas a un gen que codifica para la producción de la hexoquinasas (HXK2) y que por alguna razón no bien entendida aún, disminuye el nivel de represión catabólica de la síntesis de muchas enzimas. Allen et al. (1989), demostraron que las mutantes de *Neurospora crassa*, resistentes a 2DG, son multialélicas (se encuentran en distintos cromosomas) y además tienen efecto pleiotrópico, es decir, afectan simultáneamente la velocidad de transporte de glucosa, aumentan la síntesis de diversas enzimas (invertasa y amilasa) y cambian la edición postranscripcional de las mismas. Por otra parte, se ha demostrado que la mutación que confiere la resistencia a 2DG parece estar asociada con un

cierto grado de desrepresión catabólica de varios complejos enzimáticos (Meng-Chen y col., 1995). tales como las pectinasas, amilasas, invertasa, xilanasas, etc. y de algunos ácidos orgánicos (específicamente ácido cítrico) y por lo tanto con la sobreproducción de estos (Antier y col., 1993; Minjares-Carranco y col., 1997; Aranda-Tamaura y Loera., 1999; Parvez y col., 1998 y Susuki y col. 1996). Lo mismo se ha observado para la producción de algunos metabolitos secundarios como la penicilina (Barredo y col., 1988). Finalmente, Kimura et al. (1988a), han utilizado este tipo de mutantes de *A. niger* para aumentar la producción de ácido cítrico.

Los trabajos de Antier et al. (1993), se orientaron al aislamiento de mutantes de *A. niger* que, siendo resistentes a la 2DG, además pudiesen crecer y esporular con rapidez en medios con distinto nivel de actividad de agua. A estas mutantes se les denominó dgr AW96 y dgr AW99. De esa manera, se encontró que las mutantes con el fenotipo AW96 producían mayores niveles de pectinasas que las mutantes AW99, cuando eran crecidas en un medio con $A_w = 0.96$ como la pulpa de café y, en forma inversa, las mutantes AW99 producían mayores niveles de pectinasas que las AW96, si el medio tenía $A_w = 0.99$, como un medio líquido convencional. Minjares et al. (1997), demostraron que las mutantes AW99 crecían y esporulaban mucho más rápido que las mutantes AW96 y que la cepa protótrofa, llamada C28B25, cuando eran crecidas en un medio de 1% de glucosa, suplementada con 0.1% de 2DG.

I

Loera-Corral y Viniegra-González (1999) demostraron que la cepa diploide, obtenida por la cruce de una mutante auxótrofa de arginina de tipo AW96 con otra, auxótrofa heteroalélica de arginina y de tipo AW99, llamada D4, produjo mayor cantidad de pectinasas que las cepas mutantes haploides, aunque se había revertido el fenotipo de resistencia a la 2DG. Esto indicó que, si bien, las mutaciones heteroalélicas de resistencia a la 2DG pueden complementarse, las mutaciones regulatorias de tipo AW99, parecían tener un fenotipo dominante sobre el fenotipo AW96.

No se ha entendido la causa por la cual las mutantes dgr, frecuentemente resultan mutantes desreprimidas. Es decir, que tienen menor grado de inhibición de la síntesis de enzimas cuando se les añade un exceso de glucosa al medio, en presencia de un inductor

específico para la síntesis de una enzima. Pero está claro que no hay una relación entre causa y efecto, porque los fenotipos que dejan de ser dgr pueden seguir siendo desreprimidos. Esto se ha observado en las revertantes espontáneas (Antier et al, 1993) y en las cepas diploides complementarias antes descritas (Loera-Corral , 1999). Y tampoco se conoce la causa por la cual una cepa diploide refuerza el fenotipo AW99 cuando se cruza con una cepa AW96. Sin embargo, estas observaciones indican que existen fenómenos de complementación genética que pueden ser favorables para aumentar la producción de las enzimas mediante el cruzamiento parasexual. Y esta parece ser la justificación por la que diversos autores han utilizado esta técnica para el mejoramiento de cepas de *A. niger* productoras de ácido cítrico (Kirimura y col., 1988 a y b y Sarangbin y col., 1994) y para mejorar la producción de pectinasas, mediante la fusión de protoplastos entre cepas de distintas especies de *Aspergillus* (Solís et al., 1996)

Para lograr la obtención de cepas diploides, se ha recurrido a la fusión de protoplastos y a la aplicación del ciclo parasexual, característica que poseen este tipo de microorganismos, descubierto por primera vez por Pontecorvo y col., 1953, el cual consiste en la siguiente secuencia de eventos:

- 1.- Anastomosis hifal de homocariones de diferentes genotipos con la formación de un micelio heterocarión.
- 2.- Fusión de dos núcleos haploide.
- 3.- División mitótica durante la multiplicación del núcleo diploide, generándose recombinantes homocigotas por cada cromosoma.
- 4.- Producción de haploides con un juego sencillo de cromosomas o de diploides recombinantes homocigotos para uno o más cromosomas completos.

A diferencia de la recombinación meiótica, no hay coordinación precisa entre fusión nuclear, recombinación y reducción del número de cromosomas. Evidencias de este tipo de recombinación han sido encontradas en miembros de todas las clases de hongos: Ascomicetos, Ficomicetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos. La recombinación parasexual puede ser usada eficientemente en análisis genético de hongos por asignación de marcas a un grupo y mapeo de cromosomas (Debets, 1990).

Antecedentes sobre la regulación de la síntesis de enzimas por *Aspergillii*

En muchos casos es conveniente utilizar un modelo enzimático inicial fácil de medir, para evitar problemas técnicos al determinar las variables de respuesta. Un buen modelo inicial sería la invertasa que no es una enzima perteneciente a una familia enzimática, sino que es codificada por sólo dos genes, *suc1* y *suc2* en *Aspergillus niger* (Berges y col., 1993; Zimmerman y Schel, 1977), además de que se sabe que este hongo la produce en su metabolismo natural (Bennet y col., 1998) y por lo tanto, no serían tan complicados los análisis para su determinación (Boddy y col., 1993).

La invertasa, es una enzima producida por plantas y microorganismos y se usa como modelo para el estudio de enzimas glucosiladas, secretadas por levaduras y hongos filamentosos. Es una enzima inducible en *Aspergillus niger* y sus principales sustratos inductores son la sacarosa y rafinosa.

Interviene en la reacción de hidrólisis de la sacarosa a D-glucosa y D-fructosa en la que ocurre un cambio en la rotación óptica de dextro a levógiro. razón por que la sacarosa hidrolizada es llamada azúcar invertida. La invertasa también es conocida como sacarasa, β -fructofuranosidasa, β -fructofuranósido fructohidrolasa, (E.C. 3.2.1.26) y es específica para romper la unión de tipo β -D-fructofuranósido. (Voet y Voet, 1995).

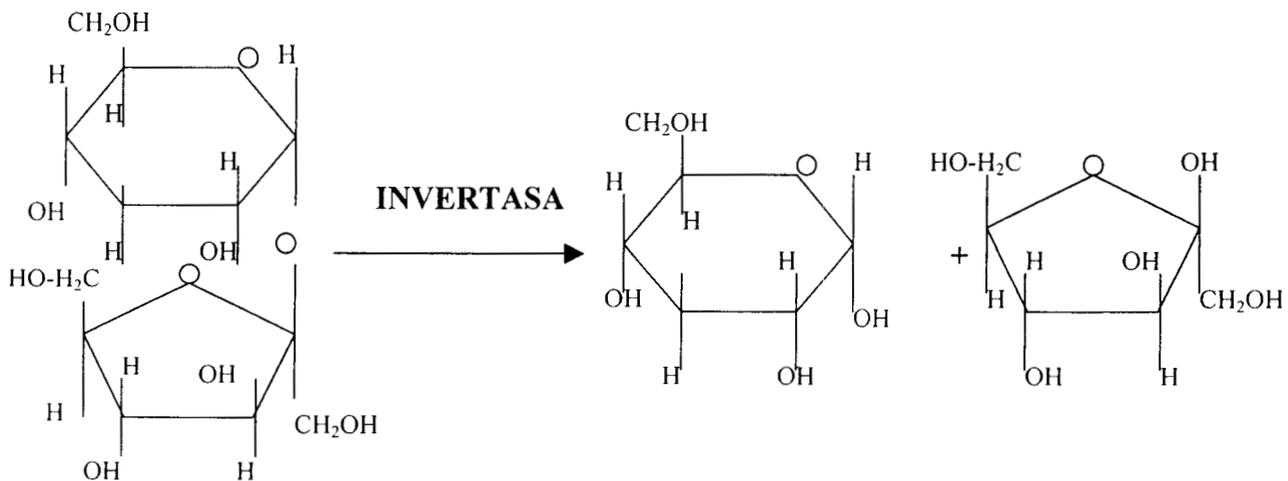


Fig. 1. Hidrólisis de sacarosa (Ruiz y col., 1999)

Esta enzima es utilizada en la industria dulcera y de confitería como:

-Beachwood Ingredient Services 23219 Greenlaun Ave.

Beachwood, OH 44122-1421, USA.

Tel. +1-216-291-3229, Fax. +1-216-765-0446.

-Burke Candy & Ingredient Inc. 3840 N. Fratney St.

Milwaukee, WI, USA.

Tel. +1-888-287-5350, Fax. +1-414-964-7644.

-Oringer Co. 10 Minuteman Way, Brockton, MA 02401 USA

Tel. +1-508-580-1700, Fax. +1-508-584-9425.

-UOP 8Food Antioxidants Dep.) 25 East Algonquin Rd.

Des Plaines, IL 60017-5017, USA.

Tel. +1-847-391-2440, Fax. +1-847-391-3804.

Las empresas que proporcionan la mayor cantidad de invertasa en la actualidad son :
Novo Nordisk y Genencore en el campo de alimentos. También es usada por empresas como
VNIIPV que la ofrece, por licencia de “Know -how” y documentación técnica, para la
manufactura de : Fibras-biocatálisis (enzimas inmovilizadas: beta-galactosidasa e invertasa).

JUSTIFICACIÓN POTENCIAL DE APLICACIÓN DEL ESTUDIO

En México, existen industrias que se dedican a la extracción de ciertos productos a partir de materiales de origen vegetal (café, caña, coco y copra). De esta forma se producen una gran cantidad de subproductos, sin interés económico y que para la empresa no son más que residuos. Este es el caso, por ejemplo, de los pigmentos vegetales que se extraen de flores o de chiles secos (PIGVEG de México, S.A. de C.V.) o la producción de café, en que solo se utiliza la semilla y se desecha la pulpa. Los subproductos anteriormente mencionados generalmente causan problemas de contaminación, por la gran cantidad que se produce y por el abandono en que se mantienen; Muchos de ellos no pueden ser utilizados directamente en la alimentación animal porque contienen compuestos tóxicos (antinutricionales) o no cubren las exigencias mínimas de calidad nutricional, requeridas para este fin, tal es el caso de la pulpa de café (que contiene cafeína y taninos que son tóxicos para los animales), o el residuo de flor de cempasúchil, (que no cubre, por sí sola, los requerimientos nutricionales del ganado).

Por tales razones, se considera que una de las alternativas para utilizar los subproductos mencionados, sería su aprovechamiento como sustratos en procesos FES, orientados a la producción de compuestos de interés comercial, tales como las enzimas. Sin embargo, para producir estas enzimas, se requiere del uso de microorganismos como *Aspergillus niger*, que posean una gran versatilidad metabólica, con posibilidad de mejorarse, para obtener mejores rendimientos. De forma paralela deben hacerse los estudios de ingeniería y optimización de medios de cultivo, con el fin de lograr un desarrollo integral de estos procesos.

Con el propósito de optimizar estos procesos, se han realizado varios estudios para mejorar cepas que incrementen la producción de enzimas. Y entre las técnicas ya conocidas para ese fin, se encuentra el uso de cruces de cepas, por medio del ciclo parasexual. Este ciclo reproductivo proporciona cepas diploides se caracterizan por sobreproducir, algunas veces, enzimas, tales como pectinasas y xilanasas.

La hipótesis que justifica el uso de esta técnica genética esta fundamentada en la posibilidad de lograr mejoras a cepas con mutaciones hetero alélicas, que sean complementarias entre sí. Y de esa forma, se puedan obtener refuerzos en mutaciones que no sería posible combinar por técnica convencionales de recombinación genética intra cromosomal.

Cabe mencionar que el interés de probar cepas diploides y autodiploides, es debido a que como se menciona en los antecedentes, se tienen reportes de diferencias en la producción de ácido cítrico de acuerdo al tipo de cepas que se trate (diploide o autodiploide).

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.- ANTECEDENTES

2.1. ANTECEDENTES DIRECTOS A ESTE TRABAJO

Actualmente, en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa existe un grupo de investigación que se dedica a los procesos de fermentación de residuos sólidos. Uno de los mayores intereses de este grupo es encontrar las mejores condiciones con las que se pueda dar el mejor uso a los desechos o subproductos agrícolas (pulpa de café, el bagazo de caña, la copra, entre otros), con la ayuda de algunos microorganismos y especialmente de hongos de la especie *Aspergillus niger*.

Para asegurar que estos microorganismos aprovechen los residuos usándolos como soporte y sustrato en fermentaciones sólidas para la producción de enzimas como pectinasas, tanasas, xilanasas, etc., autores como Aquíhuatl y col. en 1987 aislaron cepas de *A. niger* a partir de pulpa de café, (lo que asegura que los microorganismos aislados poseen la maquinaria metabólica adecuada para utilizar el subproducto como sustrato). De este trabajo se aisló la cepa de *Aspergillus niger* C28B25 haciendo un análisis de cepas silvestres nativas de plantas de café o de suelo de plantaciones de café. La cepa C28B25 fue probada en fermentación sólida usando pulpa de café y fue la mejor productora de pectinasa, razón por la que ha sido elegida para este estudio. Esta cepa pertenece a la colección fúngica del IRD-UAM.

Sin embargo, existió la inquietud de aislar cepas modificadas genéticamente, para aprovechar mejor el proceso de fermentación en estas condiciones. Con esta perspectiva, en 1993, Antier y col. lograron aislar a partir de la cepa de *Aspergillus niger* C28B25, 2 series de mutantes, seleccionadas bajo los criterios de resistencia a un análogo tóxico de la glucosa (2DG) y sobreproducción de pectinasas, como se ha mencionado anteriormente.

Las cepas mutantes dgrAw99 mostraron tener sobreproducción de pectinasas en medio líquido mientras que las mutantes de dgrAW96 fueron sobreproductoras de pectinasas en pulpa de café por fermentación sólida. Las mutantes Aw96, se seleccionaron, como ya se mencionó, como resistentes a 2DG, sin embargo una de ellas, (cepa Aw96-3) revirtió posteriormente a su fenotipo silvestre de sensibilidad a 2DG, aunque no perdió la característica de sobreproducción.

Otro mecanismo para la modificación de las cepas ha sido la obtención de cepas diploides a partir, ya sea de la fusión de protoplastos de dos especies o la cruce parasexual.

La obtención de cepas diploides utilizando la fusión de protoplastos, se ha aplicado en investigaciones para la producción de β -glucosidasa por cepas de *Aspergillus niger*. En esta investigación se indujo la fusión de protoplastos entre 2 cepas auxótrofas de *A. niger* con polietilenglicol y Ca^{2+} . Induciéndose a continuación su haploidización. Se aislaron los diploides y los haploides segregados y estos exhibieron grandes variaciones en su morfología y en su actividad β -glucosidasa. Una de estas cepas mostró tener un incremento de más de 2.5 en actividad en comparación con las cepas parentales (Hoh y col., 1992).

La fusión de protoplastos también ha sido utilizada para obtener cepas diploides de *A. niger*, con el objetivo de incrementar la producción de ácido cítrico en medio líquido (Kirimura y col., 1988 a y b). Los autores fusionaron los protoplastos de dos cepas productoras de ácido cítrico en diferentes sistemas, una era productora en cultivo sólido y la otra en cultivo sumergido. Todas las cepas diploides mostraron menor productividad que la cepa parental cuando se probaron en medio líquido. Sin embargo en cultivo sólido, algunas diploides mostraron más altas productividades que la cepa parental. Las mejores cepas diploides produjeron 120% más ácido cítrico que las cepas parentales en medio sólido.

En el caso de la cruce parasexual, se sabe que este ciclo es un mecanismo de recombinación genética. En éste, la fusión de dos hifas de cepas compatibles resulta en la aparición de un micelio con núcleos de ambas cepas parentales. Este heterocarionte es normalmente estable, con los núcleos parentales mezclados pero sin interacción y con la capacidad de expresar todos sus genes de manera independiente. En algunos casos se produce la fusión nuclear y se forma un núcleo diploide, originándose la recombinación genética mediante entrecruzamiento mitótico (Crueger y Cruger, 1989; Debets, 1990).

Este tipo de mecanismo ha sido empleado en hongos industriales como *Aspergillus niger*, para mejorar la producción de metabolitos como enzimas y ácido cítrico (Kirimura y col., 1998 a y b, Loera y col., 1999).

Algunos trabajos previos, como el realizado por el grupo de investigación de Loera y col. (1999) en esta universidad, reportan haber obtenido un diploide (D4) a partir de la cruce parasexual de auxótrofos de arginina de 2 cepas sobreproductoras de pectinasas. Estas cepas parentales se han caracterizado por una mayor producción de pectinasas en Cultivo Sumergido (Cepa Aw99-iii2) y en Cultivo en Estado Sólido (Cepa Aw96-4), esta última cepa tuvo también un incremento en su producción enzimática de pectinasas en Cultivo Sumergido, en comparación con la cepa silvestre C28B25. El diploide resultante conservó las características de sobreproducción en Cultivo Sumergido, obteniéndose, a las mismas condiciones, un incremento del 122% con respecto a la cepa silvestre *A. niger* C28B25 (Antier y col, 1993; Loera y Viniegra-González, 1998).

También se ha utilizado este ciclo para obtener cepas diploides productoras de quimosina. Las cepas fueron aisladas por Bodie y col, en 1994 y son diploides de la especie *Aspergillus niger* variedad *awamori*. En este trabajo, la cruce parasexual fue usada para obtener cepas sobreproductoras de quimosina y para analizar el comportamiento genético de las cepas. Se utilizó una cepa ya mejorada por técnicas clásicas de mutación y selección en presencia de 2DG. La existencia de diversas mutaciones en las vías de asimilación espontánea del nitrato, en estas cepas mejoradas, permitió la utilización de clorato como agente de selección de las cepas diploides generadas. Así, sólo aquellas diploides en las que las mutaciones se complementaron, fueron capaces de crecer en dicho medio selectivo.

Un análisis genético preliminar del diploide y de los haploides segregados indicó que la resistencia a 2DG, que daba lugar a la sobreexpresión de la quimosina, fue recesiva. Las mutaciones en dos diferentes genes que confieren resistencia a 2DG, se tradujeron, así mismo, en un incremento del nivel de producción de quimosina. Cuando algunas de estas cepas fueron combinadas vía recombinación parasexual, las haploides resultantes produjeron alrededor del 15% más de quimosina que cada una de las cepas parentales.

En otros estudios se ha usado también la recombinación parasexual para mejorar la producción de enzimas y de otros metabolitos de interés, como los reportados por Sarangbin y col. (1994). En ellos inducen la formación de una cepa autodiploide en *A. niger* con un tratamiento con colchicina, para mejorar la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido. Se pudo apreciar que la actividad enzimática de exoenzimas es más alta, en el autodiploide, que en la cepa parental, por lo que produce 1.4 veces más ácido cítrico que la cepa parental. Por los resultados obtenidos, se determinó que el incremento en la producción de ácido cítrico por las cepas autodiploides fue debido a la formación de autodiploides y no a una posible mutación del gen causada por el tratamiento con colchicina.

En el presente trabajo se desea evaluar la cruce parasexual usándola como herramienta de recombinación genética para mejorar la producción de enzimas por *Aspergillus niger* en cultivo sólido, empleando para ello espuma de poliuretano (PUF) como soporte sintético.

2.2. HIPÓTESIS

La hipótesis planteada en esta tesis sostiene que

La utilización del ciclo parasexual como mecanismo de recombinación genética entre auxótrofos de las cepas de *Aspergillus niger* Aw96-3 y Aw96-4, proporcionará diploides con características de sobreproducción de invertasa, en Cultivo en Estado Sólido.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. OBJETIVO GENERAL

- ❖ **Evaluar la recombinación parasexual en cepas de *Aspergillus niger*, para obtener nuevas cepas con incrementos en la producción de enzimas en Cultivo en Estado Sólido.**

2.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ **Crear y aislar cepas auxótrofas, a partir de 2 cepas seleccionadas, usando bajas dosis de mutágeno con un proceso posterior de enriquecimiento.**
- ❖ **Aislar cepas diploides estables de ambas cepas y conservarlas a largo plazo.**
- ❖ **Evaluar la producción de invertasa, en primera instancia, como modelo enzimático en Cultivo en Estado Sólido.**

CAPÍTULO III

**MATERIALES
Y
MÉTODOS**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se listan los materiales y se describen los métodos utilizados para cada tipo de experimento realizado.

3.1 MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron hongos filamentosos de la especie *Aspergillus niger*. La cepa de *Aspergillus niger* C28B25 fue aislada de un desecho agroindustrial, pulpa de café (Aquiáhuatl y col., 1988); a partir de esta cepa se aislaron las cepas mutantes Aw96-3 y Aw96-4, que se seleccionaron bajo el criterio de resistencia al azúcar análogo de la glucosa, 2 desoxi-D-glucosa (2DG). Además, estas cepas mutantes son sobreproductoras de pectinasas en sistemas con $A_w = 0.96$, que es un valor normalmente hallado en FES.

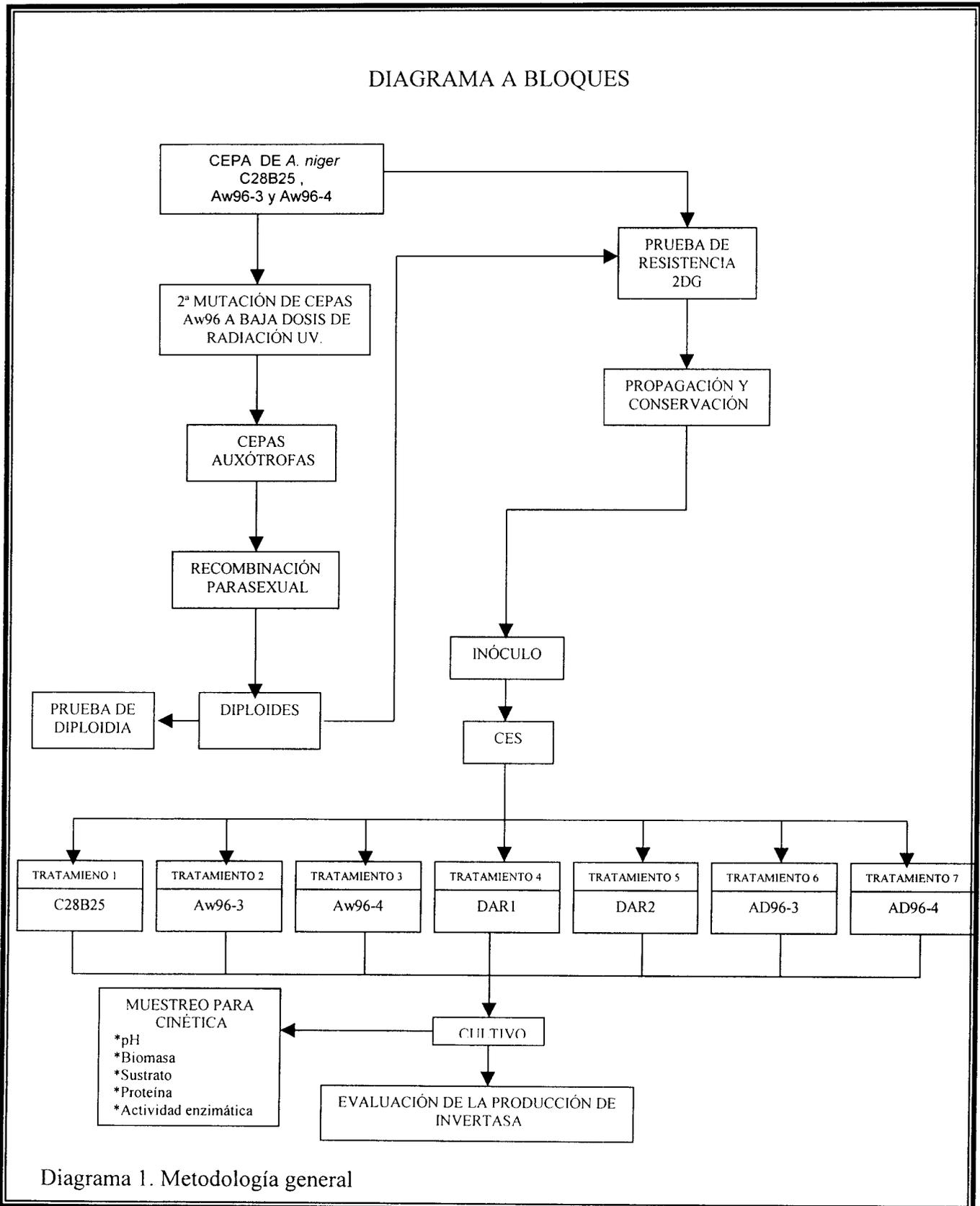
En el momento de comenzar nuestro estudio la cepa Aw96-4 permaneció con características de resistencia a 2DG, mientras que la cepa Aw96-3 revirtió esta resistencia, conservando, sin embargo, la característica de sobreproducción de pectinasa (Antier y col., 1993). La selección bajo este criterio permite obtener cepas desreprimidas catabólicamente para varias enzimas y por tal razón, se utilizaron estas cepas para producir invertasa, además de que es sabido que *Aspergillus niger*, es productor de invertasa en su metabolismo natural.

De la cepa Aw96-4 se había aislado previamente sólo una cepa auxótrofa a arginina. Sin embargo para los fines que aquí se persiguen se requieren 4 cepas auxótrofas, dos de cada cepa mutante, y se obtuvieron entonces las 3 cepas auxótrofas restantes.

CEPA	AISLADA POR
C28B25	Aquiáhuatl y col., (1987)
Aw96-3	Antier y col., (1993)
Aw96-4	Antier y col., (1993)
Aw96-4 arg ⁻	Loera y col., (1999)

Tabla 1. Lista de cepas haploides originales y autores que las aislaron.

El diagrama general de la metodología a realizar en este trabajo es el siguiente:



3.2 AISLAMIENTO DE CEPAS AUXÓTROFAS

Lo primero que se hizo para realizar el aislamiento de la cepas auxótrofas necesarias, fue construir una curva de sobrevivencia para poder determinar el tiempo de exposición de las esporas a la luz UV, (con el fin de tener aproximadamente un 60% de sobrevivencia).

3.2.1 Curva de sobrevivencia

Las cepas mutantes Aw96-3 y Aw96-4 fueron propagadas, por picadura, en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 70 ml de PDA (Agar Papa dextrosa) esterilizado en autoclave a 121°C y 15 psi de presión (La esterilización de todos los medios de este trabajo se realizó de la misma manera). Cuando la superficie del matraz estuvo completamente esporulada, se le adicionaron aproximadamente 20 ml de una solución de Tween 80 al 0.02% (v/v), para obtener una suspensión de esporas. Las esporas se despegaron del agar agitando con una barra magnética estéril, y la suspensión obtenida se mantuvo en hielo. Posteriormente se realizó una cuenta de esporas, con el fin de ajustar el volumen (por dilución con Tween 80) a 27 ml de suspensión con una concentración de 8×10^6 esporas/ml (Loera, 1994).

La suspensión, contenida en una caja de Petri estéril, se colocó sobre una parrilla con agitación magnética, durante todo el experimento, usando una barra magnética pequeña, estéril dentro de la caja a irradiar durante todo el experimento. La parrilla estuvo situada debajo de una lámpara de luz UV a una distancia de 15 cm y a una longitud de onda de 254 nm, lo que nos proporciona una intensidad de radiación de $310 \mu\text{w}/\text{cm}^2$ y la suspensión fue irradiada en condiciones estériles. Se fueron tomando muestras de 0.5 ml cada 0.5 min. durante los primeros 2.5 min y cada 2.5 min durante los otros 17.5 min restantes. Cada muestra fue conservada en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, en hielo y en la obscuridad durante aproximadamente 30 min. (con el fin de reducir los casos de reversión por reparación de los daños causados por la irradiación).

Pasado este tiempo, se hicieron diluciones de cada tubo muestreado (1:2000) para ajustar el número de esporas a 400 esporas/100 μL (que es la cantidad experimental a la cual se distinguen perfectamente las colonias crecidas sobre las placas), y se inocularon 100 μL de cada dilución sobre una caja de Petri con PDA, desoxicolato de sodio al 0.1% y extracto de levadura al 0.2% (por triplicado). Se incubaron las cajas a 30°C durante 48 h y se contaron las colonias originadas. Con esto se pudo realizar una gráfica de % de sobrevivencia vs tiempo con el fin de encontrar el tiempo adecuado de irradiación de la suspensión de esporas para tener un 60 % de sobrevivencia y realizar el procedimiento de aislamiento de auxótrofas

3.2.2. Mutagénesis

Una vez determinado el tiempo de irradiación, con las condiciones ya mencionadas, se realiza nuevamente el proceso de mutagénesis. Para ello fue necesario lo siguiente:

Medios de Cultivo

-Medio mínimo con glucosa al 1% (MMG) con la siguiente composición:

Compuesto	Cantidad en g/L
KH_2PO_4	1.3
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.13
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.75
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3
Urea	0.25
CaCl_2	0.3
Glucosa	10
pH	5.5

Tabla 2. Medio propuesto por Antier y col., 1993.

- Medio mínimo MM, con la composición anterior pero sin fuente de carbono.
- Medio mínimo con fructosa al 1% (MMF)
- Medio mínimo con fructosa 1% y alanina 2 mM (MMF/ala)
- Medio mínimo con fructosa 1% y fenilalanina 2 mM (MMF/fen)
- Medio mínimo con glucosa 1% y alanina 2 mM (MMG/ala)
- Medio mínimo con glucosa 1% y fenilalanina 2 mM (MMG/fen)

Después de propagadas las cepas mutantes, se formó una suspensión de esporas por el procedimiento en el apartado 3.2.1. Se irradiaron las esporas en las mismas condiciones en las que se construyó la curva, utilizando tiempos de exposición de 1 minuto para Aw96-4 y 1.5 minutos para Aw96-3 (la diferencia en el tiempo de irradiación aplicado fue determinada en el experimento anterior y probablemente se deba a una diferencia en la sensibilidad a la luz UV de las distintas cepas mutantes), posteriormente se mantienen en hielo y en la obscuridad por 30 minutos. Pasado este tiempo se inocularon 100 μl de la suspensión irradiada sin diluir, en cajas de Petri con MMG más el aminoácido del cual se buscan auxótrofas que en este caso fueron alanina (MMG/ala) para Aw96-3 y fenilalanina (MMG/fen), para Aw96-4. Se incubaron a 30°C durante 72 h y se conservaron a 4°C.

3.2.3 Proceso de enriquecimiento

Este proceso facilita el aislamiento de las esporas auxótrofas presentes en las cajas conservadas tras la mutagénesis. El fin que se persigue es eliminar las esporas que no son auxótrofas haciendo que germinen en un MMG líquido, para luego filtrarlas: en el medio líquido quedarían las esporas que no han germinado y que es más probable que sean las auxótrofas que se buscan.

El proceso se inició realizando una suspensión de esporas de las cajas conservadas, en la forma descrita anteriormente, para cada una de las cepas por separado. Se contaron las esporas y se pusieron 2.5×10^5 esporas/ml, en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 60 ml de MMG líquido, (manteniéndose las condiciones de esterilidad). Los matraces se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm y 30°C durante 14 h.

Pasado este tiempo, se sacaron los matraces y se filtraron uno a uno a través de una tela "magitel" que fue previamente tratada (se lava perfectamente con agua destilada para eliminar los detergentes que contiene) y el filtrado se recuperó en tubos para centrifuga estériles de 50 ml. Se centrifugó durante 15 min a 6000 rpm. Para separar el micelio de las esporas sin germinar, se decantaron los tubos y el sedimento se resuspendió con la solución de tween 80 al 0.02% (v/v), inoculándose en matraces con MMG líquido nuevo.

Se volvió a incubar en las mismas condiciones, se repitió el proceso de filtrado dos veces más y finalmente se resuspendió el último sedimento de los tubos con la solución de Tween 80, inoculándose 100 µl de la suspensión en cajas con MMG más el aminoácido correspondiente y desoxicolato de sodio al 0.1 %. Las cajas se incubaron durante 48 horas aproximadamente y las colonias formadas y esporuladas se replicaron sobre cajas con MMG, incubándose nuevamente. Las colonias que no logran crecer en este medio de cultivo se consideraron candidatas a la auxotrofia buscada y se purificaron (cuidando de conservar una disposición exacta de cada caja replicada para facilitar la identificación de las colonias candidatas a ser auxótrofas).

La purificación consistió en la siembra de esporas de las colonias candidatas, por estría, sobre cajas con MMG y el aminoácido correspondiente y su posterior incubación. La purificación se realiza con el fin de recuperar colonias que provengan de una sola spora. Una vez crecidas, se identificaron las colonias y se inocularon por picadura sobre cajas que contenían MMG y MMG con aminoácido para corroborar la auxotrofia. Se utilizó la cepa mutante original como control positivo (Aw96-3 en el caso de auxótrofas a alanina y Aw96-4 para auxótrofas a fenilalanina).

De este proceso se obtuvieron 2 cepas auxótrofas a alanina a partir de la cepa Aw96-3, que mostraron ser distintas en sus perfiles de crecimiento y resistencia a 2DG y una auxótrofa a fenilalanina a partir de la cepa Aw96-4. Estas cepas auxótrofas se crioconservaron a -70 °C.

El proceso se describe en el diagrama 2.

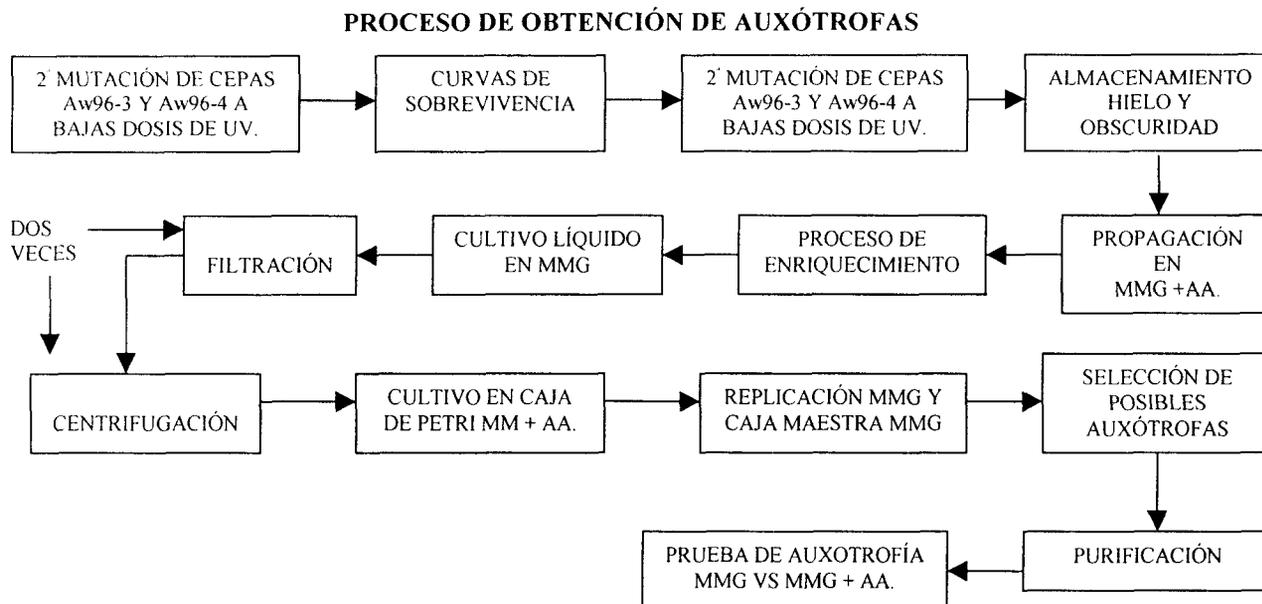


Diagrama 2. Proceso de aislamiento de Auxótrofas.

3.3 AISLAMIENTO DE CEPAS DIPLOIDES

En el proceso anterior se aislaron 3 cepas auxótrofas faltantes para el proceso de obtención de diploides: dos cepas Aw96-3 auxótrofas a alanina, y la cepa Aw96-4 auxótrofa a fenilalanina. Con estas, y la auxótrofa a arginina de la cepa Aw96-4 que ya se tenía (Loera y col.,1999), se inició la cruce parasexual para permitir el aislamiento de cepas diploides y autodiploides.

3.3.1. Cruza parasexual

Se inició este apartado con la propagación de las cepas auxótrofas en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 40 ml de MMG/ala y MMG/fen según la cepa (cuando esporuló completamente la superficie del agar), se indujo la cruce, bajo el siguiente esquema y mediante el procedimiento que se describirá a continuación.

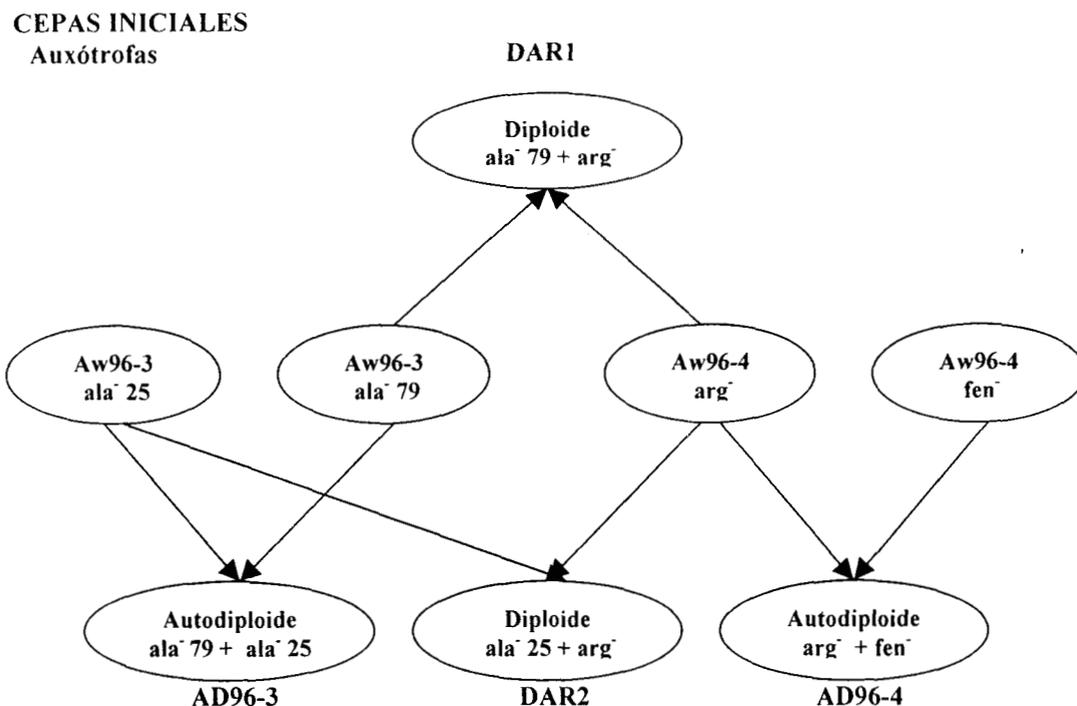


Diagrama 3. Esquema de emparejamiento de las cepas auxótrofas, para la cruce parasexual.

Para las cruces parasexuales se dispusieron las auxótrofas de dos en dos para obtener dos autodiploides (AD96-3 Y AD96-4), de la cruce entre las cepas auxótrofas de las mutantes originales Aw96-3 y Aw9-4 respectivamente y dos diploides (DAR1 Y DAR2), de la cruce de cada una de las cepas auxótrofas a alanina de Aw96-3 con la cepa auxótrofa a fenilalanina de Aw96-4.

Después de la propagación de las cepas auxótrofas, se prepararon 6 tubos de ensayo de 20 ml, con 10 ml de MMG líquido con los aminoácidos correspondientes, se taparon con tapones de plástico y se esterilizaron (se prepararon 6 tubos para cada una de las cuatro cruces descritas).

A cada tubo se le inoculó una asada de cada uno de los pares de las cepas auxótrofas elegidas para la cruce, por ejemplo, en el caso del autodiploide AD96-4, se inoculó una asada de la cepa Aw96-4 fen⁻ y una de la cepa Aw96-4 arg⁻ en MMG líquido y en el caso del autodiploide AD96-3, se inoculó una asada de cada auxótrofa a alanina. Los tubos inoculados se incubaron a 30° C durante 48 h, con el fin de que las esporas de las dos auxótrofas germinaran y el micelio de ambas se recombinara. Cuando el crecimiento del micelio formó una película en la superficie de los tubos, éstas se filtraron a través de tela "magitel" tratada previamente como ya se mencionó, sobre esta tela se recuperaron las películas formadas de micelio, se lavaron con suero fisiológico estéril (solución de cloruro de sodio al 1% (p/v)), y con unas pinzas estériles se transfirieron a cajas de Petri con MMG y se incubaron a 30° C durante 72 h. Durante este tiempo un sector del micelio inoculado en cada caja inició su crecimiento, lo que indica la formación del heterocarión.

A continuación, se cortaron pequeños cuadros del heterocarión formado en las cajas, junto con el agar y se inocularon nuevamente en cajas de Petri con MMG, incubándose a las mismas condiciones hasta que se tuvo crecimiento sobre toda la superficie de la caja. Posteriormente se hizo una suspensión de estas esporas para inocular nuevas cajas con pequeñas gotas (sobre las cuales se adicionó el MMG para cubrirlas y llenar las cajas). Se incubaron y las colonias que logran crecer en estas cajas fueron las cepas diploides de la cruz correspondiente.

Estas colonias se purificaron sembrándolas por estría sobre cajas con MMG, obteniéndose colonias aisladas provenientes de una sola espora y finalmente se crioconservaron a -70°C .

El diagrama de obtención de diploides es el siguiente.

PROCESO DE OBTENCIÓN DE DIPLOIDES

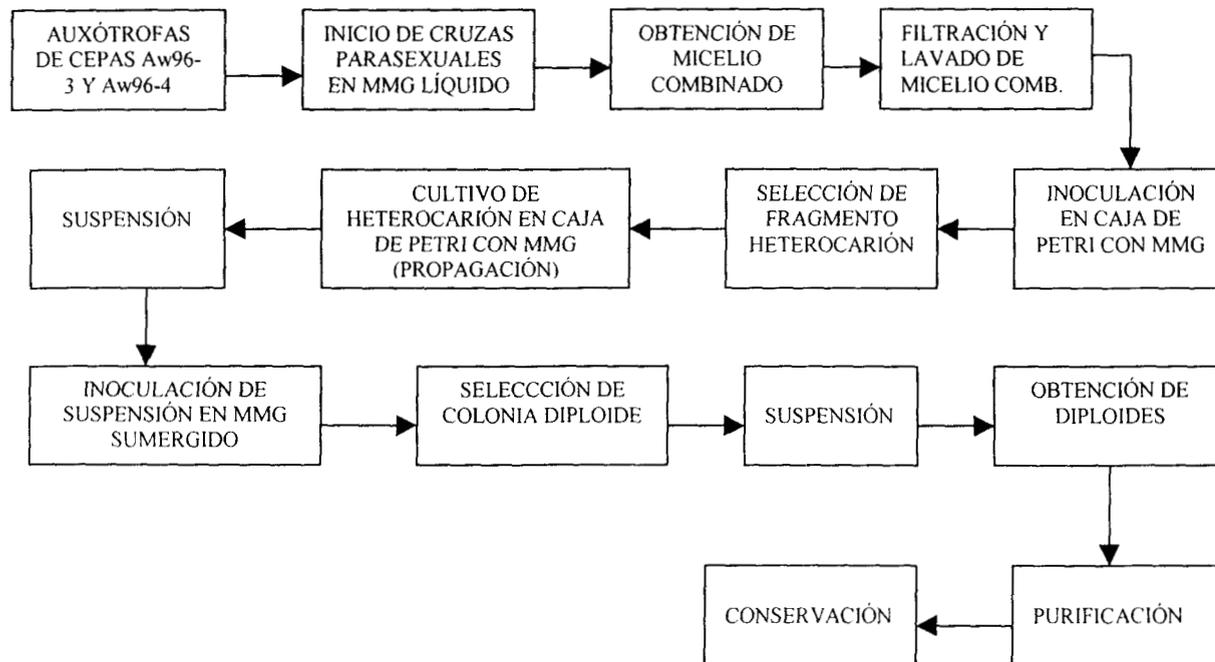


Diagrama 4. Proceso de aislamiento de diploides.

3.3.2. Prueba de diploidía

Con el fin de verificar que las dos cepas diploides (DAR1 y DAR2) y las dos cepas autodiploides (AD96-3 y AD96-4) realmente lo son, se evaluaron 2 criterios:

- 1.- Tamaño de espora
- 2.- Capacidad de haploidización

Para observar el tamaño de las esporas, se hicieron diluciones (1:100), para las soluciones de esporas de cada cepa diploide y para las tres cepas haploides, utilizando Tween 80 al 0.02% (v/v). Se observó una gota de cada suspensión al microscopio óptico a 100x. Posteriormente se mezcló una gota de la suspensión correspondiente a cada cepa diploide con una gota de la suspensión de esporas de una cepa haploide y se volvió a observar al microscopio, (esta mezcla se realizó para cada cepa diploide con cada cepa haploide a la vez, con el objeto de ver diferencias sustanciales en los respectivos tamaños de espora).

El tamaño de espora no es, sin embargo, un criterio por sí mismo válido o definitivo para confirmar que una cepa es diploide. Por ello se indujo la haploidización de cada una de las cepas diploides, utilizando como control negativo las cepas Aw96-3 y Aw96-4. El agente haploidizante fue la p-fluorofenilalanina, utilizándose dos concentraciones distintas: 90 y 60 mg/L. Se prepararon cajas de Petri con MMG/ala/arg, MMG/fen/arg y MMG/ala, para inocularlas con la cepa diploide correspondiente. Luego de esterilizar los medios se dejaron enfriar hasta los 45°C aproximadamente y se les adicionó el agente haploidizante, esterilizado por filtración (pasados a través de filtros de 0.22 μ m), a la concentración especificada. Se llenaron las cajas, se dejaron solidificar y después se inocularon 10 cajas con tres piquetes de la cepa designada. Se realizó el mismo procedimiento con 10 cajas para cada una de las diploides y todas ellas se incubaron a 30°C durante aproximadamente 6 días. Pasado este tiempo se observó la morfología de crecimiento de la colonias.

3.4 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A 2DG

Como se mencionó en el punto 3.2.3, las cepas auxótrofas de Aw96-3 y de Aw96-4, así como las diploides y autodiploides obtenidas, provienen de 2 cepas mutantes que se aislaron bajo el criterio de resistencia a 2DG. La cepa Aw96-4 conservó esta resistencia, mientras que la cepa Aw96-3 revirtió al fenotipo silvestre de sensibilidad al tóxico. Es de nuestro interés confirmar si la segunda mutación con luz UV (que se hace con el fin de obtener auxótrofas), altera o no estos patrones de sensibilidad tanto en las auxótrofas como en las cepas diploides y autodiploides.

Para estos experimentos se utilizaron dos fuentes de carbono (glucosa y fructosa al 1%, debido a que se ha visto efecto de las permeasas para estos dos compuestos en el ingreso de la fuente de carbono y el tóxico), adicionadas a un MM con el aminoácido correspondiente cuando se usaron las cepas auxótrofas, también se añadieron 5 concentraciones de 2DG, 0, 0.15, 0.3, 0.4 y 0.5 g/L al MM. Se esterilizaron los medios con las diferentes concentraciones de 2 DG y se llenaron 18 cajas de Petri estériles, con 20 ml de MMG, otras con MMG/ala, y otras con MMG/fen, con 20 ml de MMF, con MMF/ala y con MMF/fen, todas con una concentración de 2DG de 0 g/L. La misma cantidad de ellas se llenaron con los mismos más una concentración de 0.15 g/L de 2DG. De la misma manera se hizo hasta tener cajas para todas las concentraciones.

Esta prueba se hizo por triplicado para cada cepa y se usó la cepa C28B25, siempre como control.

3.5 CULTIVO EN ESTADO SOLIDO

La última prueba que se realizó con las cepas, tanto haploides como diploides, fue usarlas como inóculo en cultivos en estado sólido. Este experimento se realizó siguiendo el diseño que se muestra a continuación.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo se realizó bajo un diseño factorial 7×2 , con tratamientos distribuidos completamente al azar y con dos repeticiones cada uno. Los tratamientos se basaron en el tipo de inóculo, evaluados a valores de Aw de 0.99 y de 0.96: el tratamiento (1) se hizo con la cepa parental de *Aspergillus niger* C28B25 (como tratamiento testigo o de comparación), el tratamiento (2) con el inóculo de la cepa mutante haploide Aw96-3, el tratamiento (3) con el inóculo de la cepa mutante haploide Aw96-4, el (4) y el (5) con inóculos de las cepas diploides (resultantes de la cruce de las mutantes Aw96-3 y Aw96-4), DAR1 y DAR2 y finalmente los tratamientos (6) y (7) se realizaron con inóculos de las cepas autodiploides AD96-3 Y AD96-4, (formadas por la cruce de las cepas Aw96-3 y Aw96-4 consigo mismas, respectivamente). La siguiente tabla muestra la distribución del diseño experimental.

ACTIVIDAD DE AGUA	TRATAMIENTO						
	1	2	3	4	5	6	7
Aw 0.99	C28B25	Aw96-3	Aw96-4	DAR1	DAR2	AD96-3	AD96-4
Aw 0.96	C28B25	Aw96-3	Aw96-4	DAR1	DAR2	AD96-3	AD96-4

Tabla 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El modelo que describe las variables de respuesta es:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

μ = Efecto medio general

τ_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor renglón (tratamiento)

β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor columna (Aw)

$(\tau\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción τ_i y β_j

ε_{ijk} = Componente del error aleatorio

i = número de tratamientos

j = número de niveles

k = número de repeticiones.

HIPÓTESIS

Hipótesis nulas

Ho =No existe diferencia entre tratamientos

Ho =No existe diferencia entre niveles

Ho =No existe diferencia entre la interacción tratamiento-nivel

Hipótesis alternativas

Ha =Existe al menos un tratamiento diferente

Ha =Existe diferencia entre niveles.

Ha =Al menos una interacción tratamiento-nivel es diferente. (Mongomery, 1991)

Las variables de respuesta fueron:

-Biomasa

-pH

-Actividad enzimática (invertasa)

-Proteína

-Consumo de sustrato

3.5.1 Elaboración del medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado en la fermentación fue reportado por Díaz-Godínez (1997), con la única modificación de la incorporación de sacarosa al 10% (p/v), como fuente de carbono. La composición del medio es la siguiente:

COMPUESTO	CONCENTRACION (g/l)
Sacarosa	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	12.6
K ₂ HPO ₄	11.8
Urea	3.0
MgSO ₄	0.2
FeSO ₄	0.29
Oligoelementos:	
MnSO ₄	1x10 ⁻³
CuSO ₄	1x10 ⁻³
ZnCl ₂	1x10 ⁻³

Tabla 4. Medio para cultivo sólido, basado en el propuesto por Díaz-Godínez., 1997.

Este medio conserva una relación C/N = 10 y una relación C/P = 20 y fue ajustado a un valor de pH = 5.0.

Con el fin de evaluar la producción de invertasa en dos sistemas con diferentes valores de $A_w = 0.99$ y 0.96 , fue necesario utilizar un compuesto capaz de abatir la A_w , en nuestro caso etilenglicol, que nos permitiera modificar este parámetro a nuestra conveniencia, para tener este último valor, sin afectar al crecimiento, ya que no es tóxico y tampoco inhibe la expresión de la enzima (Loera y col., 1998).

Para encontrar el porcentaje correcto del reductor de A_w a añadir al medio para tener un valor de 0.96 , se realizó una gráfica variando la cantidad de Etilenglicol. Los valores empleados se muestran en la tabla 5.

Medio de Cultivo (ml)	Etilenglicol (ml)	% Etilenglicol
46.5	3.5	7
46	4	8
45.5	4.5	9
45	5	10
42.5	7.5	15
40	10	20

Tabla 5. Porcentaje de etilenglicol adicionado en un volumen de 50 ml de medio por duplicado.

Después de preparar el medio con las distintas proporciones de etilenglicol, en un matraz Erlenmeyer de 125 ml se embebieron cubos de PUF de 0.125 cm^3 y se homogeneizó. A continuación se colocó una muestra de los cubos con medio sobre una charola del equipo Acualat para medir el valor de A_w , que tiene como definición la presión de vapor de agua/ la presión de vapor de agua en la mezcla. La actividad de agua se describe por la ecuación:

$$A_w = P_{\text{(agua en la mezcla)}} / P_{\text{(agua)}}$$

Con los resultados obtenidos se estimó que el porcentaje de etilenglicol adecuado para conseguir un valor de A_w de 0.96 es de 8% (ver anexo 1), esta es la cantidad a añadir, en estos casos, al medio descrito en la tabla 3.

3.5.2.- Tratamiento del soporte y formación de unidades experimentales

El soporte a utilizar es la espuma de poliuretano (PUF), debe estar preferentemente limpia y homogénea, por lo que se le dió un tratamiento inicial. Este tratamiento consistió en cortar la PUF en cubos de aproximadamente 0.125 cm^3 , lavarlos con agua destilada caliente, (dos veces seguidas dejándolos en un recipiente por 1 h) y finalmente con agua destilada fría, con esto nos aseguramos de que no tiene impurezas. Posteriormente se exprimieron y se dejaron secar en un horno a 60°C durante 24 h.

Las unidades experimentales consistieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 1 g de cubos de PUF limpios, estériles y embebidos con el medio de cultivo descrito anteriormente, (estéril a su vez).

3.5.3.- Cultivo en estado sólido

Se realizaron dos tipos de cultivos, uno con A_w de 0.99 y otro con A_w de 0.96. En ambos casos se utilizaron 18 matraces para el cultivo de cada una de las cepas probadas y para cada valor de A_w . Se dejó la fermentación durante 48 h en todos los casos y se tomaron muestras cada 6 h.

Primeramente se tuvieron preparadas y estériles las unidades experimentales, sin el medio de cultivo. Aparte el medio de cultivo estéril, con el pH ajustado previamente a 5.5 y frío fue inoculado con 1×10^8 esporas (de cada cepa propagada previamente en matraces Erlenmeyer de 500 ml con MM y sacarosa conservadas a 4°C)/g de fuente de carbono. De este medio inoculado se agregaron 25 ml a cada matraz, y se incubaron a 30°C durante 48 h, con movimientos periódicos para evitar que el medio, por gravedad, escurriera al fondo de los matraces.

Se tomaron muestras de las fermentaciones cada 6 h, por duplicado y a cada matraz muestreado se le separó el soporte del extracto exprimiéndolo con la ayuda de una jeringa de 50 ml. El extracto se filtró a través de una membrana de disco de 0.45 μm de diámetro de poro y se almacenó en tubos de plástico a 4°C. La PUF se lavó perfectamente con agua destilada y se colocó en charolas de aluminio.

3.5.4.- Determinaciones analíticas

Las determinaciones realizadas tanto al extracto como al soporte se hicieron, inmediatamente después de obtenerlo, como la medición del pH y la determinación del peso seco y otras se realizaron al término de la fermentación como la determinación de actividad enzimática, de proteína y de consumo de sustrato.

3.5.4.1.- Biomasa

Para la cuantificación de la biomasa, después de la extracción del líquido, el soporte se lavó perfectamente con agua destilada, se exprimió lo más posible y se colocó en cajas de aluminio, pesadas previamente, secándose en un horno a 65°C durante 24 h. Pasado este tiempo se pusieron en un desecador 15 min y posteriormente se pesaron, obteniéndose el peso seco de la biomasa por diferencia de peso.

3.5.4.2.- pH

Una vez obtenido el extracto de cada matraz, se filtró y se le midió el pH con un potenciómetro marca Orión.

3.5.4.3.- Actividad Enzimática (invertasa)

Para medir la actividad enzimática se usó el método de determinación de azúcares reductores DNS (Miller, 1959) y la glucosa como referencia. Una unidad de actividad invertasa (UI) se definió como la cantidad de enzima que liberó un μmol de azúcares reductores (glucosa y fructosa) por minuto bajo las condiciones utilizadas.

En este método se necesitó un buffer de acetatos 0.1M con un pH de 5.0, una solución de sacarosa 0.1M como sustrato, el reactivo de DNS y los extractos de las muestras.

Para valorar las concentraciones de azúcares reductores en las muestras se realizó una curva estándar con glucosa al 0.1%. (ver anexo 2), curva que se realizó al mismo tiempo que los ensayos de las muestras y sus blancos.

Los blancos de cada muestra se prepararon agregando 200 μl de buffer de acetatos, 250 μl de sustrato de sacarosa, 1 ml de DNS y 50 o 20 μl de extracto, (según la cantidad de enzima contenida en la muestra, determinada por repeticiones previas).

Las muestras se prepararon poniendo 200 μl de buffer de acetatos y 250 μl de sustrato de sacarosa. Todos los tubos de la curva, de los blancos y de las muestras se colocaron en un baño con temperatura controlada a 30°C, que es la temperatura a la cual la invertasa tiene su mayor actividad (referencia). En este momento se les adicionaron 50 o 20 μl de extracto a los tubos de las muestras y se incubaron todos durante 30 min exactos, pasado este tiempo se detuvo la reacción adicionando 1 ml de DNS a cada uno de los tubos de las muestras.

Posteriormente los tubos se colocaron en agua en ebullición durante 3 min aproximadamente, se enfriaron en hielo y se leyeron en un espectrofotómetro a 575 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado

3.5.4.4.- Proteína

También se determinó la proteína extracelular de las muestras por el método de microensayo (colorante ligado a la proteína) de Bradford (1976).

Se utilizó una curva estándar en la que se usó una solución de seroalbúmina bovina de 100 $\mu\text{g/ml}$. (ver anexo 3)

Para la determinación de proteína en las muestras, se agregaron 800 μl del extracto de cada muestra en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad, por triplicado y se adicionaron a cada tubo 200 μl de reactivo de Bradford. Posteriormente se agitaron con un vórtex y después de 5 min se leyeron en un espectrofotómetro a 595 nm.

225555

3.5.4.5.- Consumo de Sustrato

El consumo de sustrato se midió de acuerdo con el método de determinación de azúcares reductores de Antrona.

Para esta determinación, y la de azúcares reductores, se usaron las muestras filtradas para evitar la cuantificación de azúcares hidrolizables del micelio que se liberaron en la extracción del líquido de las fermentaciones.

Se necesitó 1 ml de cada muestra diluida 1:1000 y el reactivo de Antrona. En tubos de ensayo y por triplicado se colocó 1 ml de la muestra diluida sobre una gradilla inmersa en hielo, se adicionaron 2 ml del reactivo de Antrona, se agitó con un vórtex y se puso a ebullición, en agua, durante 10 min. Después de este tiempo, los tubos se pusieron a enfriar sobre hielo y se leyeron en un espectrofotómetro a 625 nm.

Para conocer la concentración de azúcares totales contenidos en las muestras se construyó una curva estándar usando sacarosa como referencia (ver anexo 4).

CAPÍTULO IV

**RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN**

4. RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, la cepa de *Aspergillus niger* C28B25, es una cepa aislada a partir de pulpa de café y probada en fermentación sólida, con el mismo sustrato del que fue aislada, siendo la mejor productora de pectinasas. En este trabajo, es la cepa rogenitora de todas las demás cepas tanto haploides mutantes (Aw96-3 y Aw96-4), como diploides y autodiploides.

4.1.- CURVAS DE SOBREVIVENCIA

Para encontrar el tiempo de irradiación necesario para tener un 60% de sobrevivencia en las esporas de las cepas mutantes Aw96-3 y Aw96-4 de *Aspergillus niger* (para asegurar que se tiene una sobrevivencia mayor a la mitad y se pueda aislar, mediante el proceso adecuado, la cepas auxótrofa que se desee), se realizó una curva de sobrevivencia en la que se graficó el tiempo de exposición de las cepas mutantes a la luz UV contra el porcentaje de colonias sobrevivientes cuantificadas en placa. Los resultados se muestran en el gráfico 1.

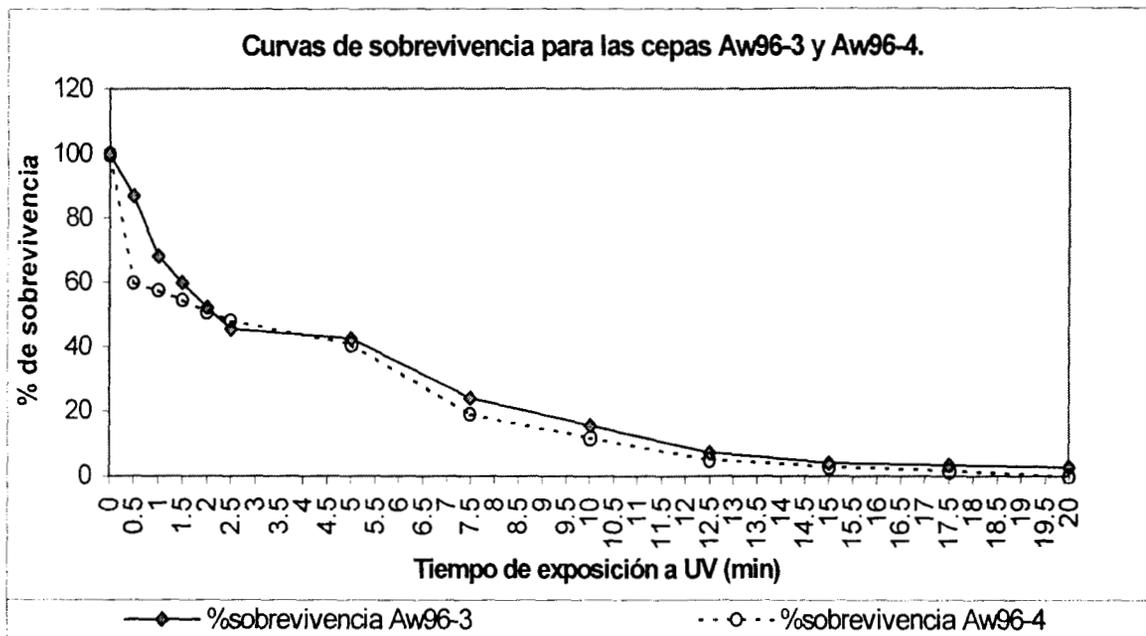


Gráfico 1. Curvas de sobrevivencia para las cepas mutantes Aw96-3 y Aw96-4.

Podemos observar que en ambos casos, el tiempo de irradiación necesario para recuperar un 60% de esporas viables es muy corto, 0.5 min para Aw96-4 y 1.5 min para Aw96-3, lo que nos habla de su alta sensibilidad a la luz UV. Sin embargo, a pesar de que las dos cepas provienen de una misma cepa silvestre, no poseen la misma sensibilidad. Esto podría ser explicado en función de la primera mutación a la que fueron sometidas: el hecho de que una de ellas sufriera reversión de su resistencia al compuesto tóxico 2DG y la otra no, nos permite conjeturar que las dos cepas obtenidas son distintas en cuanto a su constitución genética (la mutación). Para ver con mayor claridad esta diferencia en la sensibilidad de las cepas, se graficó el ln del % de sobrevivencia de las cepas contra el tiempo. Este gráfico se muestra a continuación:

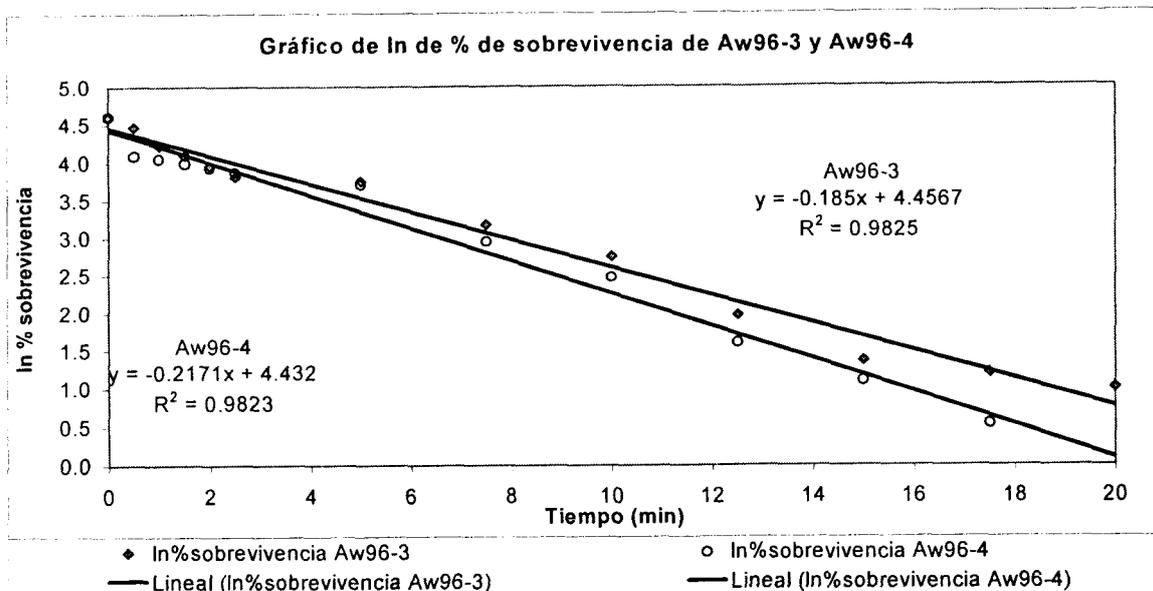


Gráfico 2. Prueba de sensibilidad de las cepas mutantes Aw96-3 y Aw96-4 de *A. niger* a la luz UV.

Podemos apreciar una clara diferencia entre las pendientes de sensibilidad a la luz UV de las dos cepas comparadas, lo cual refuerza la afirmación de que hay diferencias entre las cepas.

Más importante aún que esto, los tiempos que se obtuvieron en el gráfico 1 son necesarios para el siguiente experimento: realizar una segunda mutación a las cepas mutantes para obtener cepas auxótrofas a aminoácidos distintos y poderlas cruzar posteriormente.

4.2.- OBTENCIÓN DE CEPAS AUXÓTROFAS

Después de someter a las mutantes a una segunda mutación, se efectuó un proceso de enriquecimiento para aislar cepas auxótrofas de Aw96-3 y de Aw96-4. En el caso de la cepa Aw96-3 se lograron aislar dos cepas auxótrofas a alanina distintas entre sí, (con diferencias marcadas en cuanto a su resistencia a 2DG y a su perfil de crecimiento). Una de ellas se reconoció como Aw96-3 ala⁻ 25 y la otra como Aw96-4 ala⁻ 79. En este caso se puede pensar en la posibilidad de que estas cepas estén modificadas en el mismo sitio, lo que haría que no se lleve a cabo la obtención de un autodiploide aislable con el método propuesto (crecimiento en MM). En el caso de la cepa Aw96-4, sólo fue necesario obtener una auxótrofa a fenilalanina, ya que anteriormente a este trabajo se realizó el aislamiento de una auxótrofa a arginina de esta cepa.

Utilizando el proceso de enriquecimiento, descrito anteriormente, se analizaron aproximadamente 200 colonias de cada cepa y entre ellas se pudo recuperar la auxótrofa para fenilalanina y las dos auxótrofas para alanina. En la figura 2, se muestran fotografías de cada uno de los pasos del proceso de enriquecimiento para el aislamiento de cepas auxótrofas.

Proceso de enriquecimiento para aislamiento de auxótrofas



Figura 2 (a). Caja maestra que muestra la ausencia en el crecimiento de las posibles cepas auxótrofas.

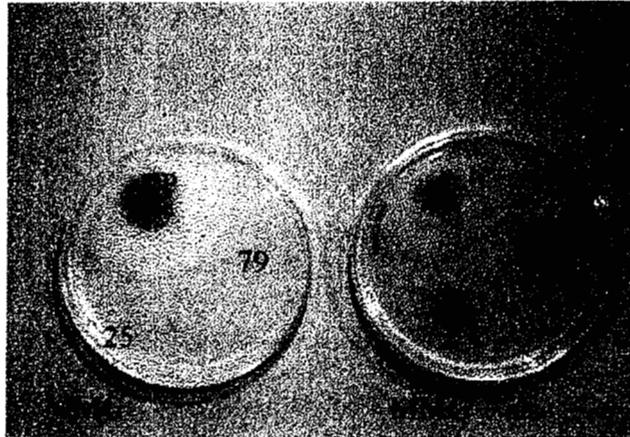


Figura 2 (b). Prueba de auxótrofia de las candidatas a auxótrofas.

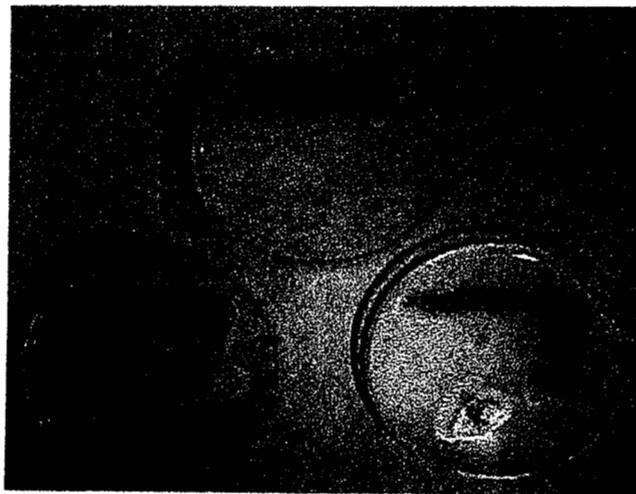


Figura 2 (c). Purificación de las cepas auxótrofas para obtener y conservar colonias provenientes de una sola espora.

4.3.- OBTENCIÓN DE CEPAS DIPLOIDES

Una vez obtenidas las tres diferentes cepas auxótrofas se indujo la cruce parasexual de los pares de cepas auxótrofas. Posteriormente se inició el proceso para el aislamiento de las cepas diploides, como se describe en la sección de Material y Métodos.

De este proceso se obtuvieron 2 cepas diploides (DAR1 y DAR2) formadas a partir de la cruce entre cada una de las cepas auxótrofas a alanina de Aw96-3 con la auxótrofa a arginina de Aw96-4 y 2 cepas autodiploides (AD96-3 y AD96-4) obtenidas de las cruces entre sí de las auxótrofas a alanina de Aw96-3 y la auxótrofa a fenilalanina con la auxótrofa a arginina de Aw96-4, respectivamente.

En la Figura 3, se muestran algunas fotografías de los pasos del proceso para el aislamiento de diploides.

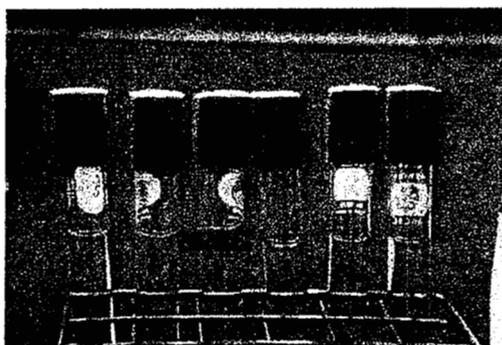


Figura 3 (a). Condiciones e inicio de las cruces parasexuales. Tubos con MMG/a. inoculados con el par de auxótrofas correspondientes.

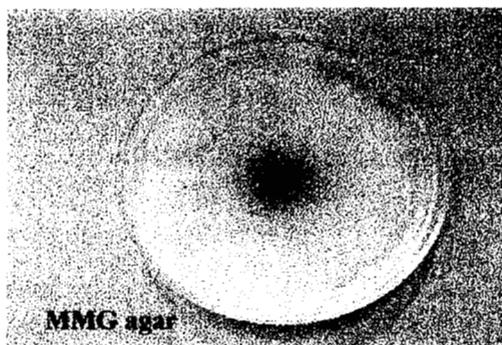


Figura 3 (b). Inoculación del micelio, germinado y libre de residuos de medio sobre MMG en placa para la formación del heterocarión.



Figura 3 (c). Propagación del heterocarión formado, que es candidato a ser diploide.

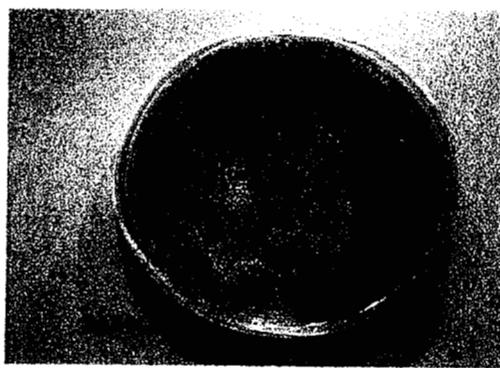


Figura 3 (d). Siembra sumergida de solución de esporas del heterocarión propagado y aislamiento de diploides.

4.- PRUEBA DE DIPLOIDÍA

Finalmente, a las cepas diploides y autodiploides obtenidas, se les sometió a dos pruebas de haploidía. Por un lado se indujo la haploidización usando cajas de Petri con MMG más los aminoácidos para los que fueron auxótroficas las cepas haploides cruzadas y p-fluorofenilalanina como agente haploidizante, observando experimentalmente con este método, un cambio evidente en la morfología de crecimiento de las colonias, así como la posible recuperación de cepas auxótroficas, inoculando algunas esporas de los sectores distintos, sobre cajas maestras con MMG y el aminoácido requerido y transfiriéndolas, después de su esporulación, a otra caja maestra con MMG solamente. Por otro lado se realizó una minuciosa observación microscópica, para evaluar el tamaño de las esporas diploides y su diferencia con respecto al tamaño de las esporas haploides. Tanto las cepas diploides como las autodiploides tienen un tamaño de espora mucho mayor, casi del doble del tamaño de espora de las cepas haploides (figura no mostrada). Con los resultados obtenidos podemos garantizar que las cepas aisladas son efectivamente diploides. En la figura 4, se muestran fotografías de la prueba de haploidización y recuperación de auxótroficas.



Figura 4 (a)

Figura 4 (b)

Figura 4 (c)



Figura 4 (d)



Figura 4 (e)

Las figuras a, b, c y d muestran colonias con claras diferencias morfológicas en el crecimiento para cada una de las cepas diploides y autodiploides, cada una en una concentración específica de p-fluorofenilalanina (agente haploidizante). La figura del inciso e muestra las cajas maestras mediante las cuales se lograron recuperar cepas auxótroficas. Estas auxótroficas, no tienen que ser las mismas con las que se inició la cruce, pueden ser auxótroficas para el mismo aminoácido pero con diferentes perfiles metabólicos. Al comprobar que las 4 cepas son diploides, podemos asegurar que la mutación que provocó la auxotrofia para alanina en las dos cepas de Aw96-3, se encuentran en genes diferentes, de lo contrario, no se hubiera podido identificar la cruce, debido a que si se trataba del mismo gen, no podría crecer en medio mínimo.

4.5.- PRUEBA DE SENSIBILIDAD A 2DG

Un aspecto de gran interés dentro de este trabajo fue mostrar si la mutación a la que fueron sometidas las cepas Aw96-3 y Aw96-4 tenía algún efecto sobre los patrones de resistencia o sensibilidad a la 2DG, ya que como se mencionó antes, esta característica se asocia con cierto grado de desrepresión catabólica. Para tal fin, se realizaron experimentos utilizando dos fuentes de carbono: glucosa y fructosa con diferentes concentraciones de 2DG en MM. Los gráficos 3-10, muestran el comportamiento de las cepas haploides originales y de las cepas diploides en presencia de distintas concentraciones de 2DG, graficando éstas contra el diámetro de la colonia crecida en 64 h, usando la cepa silvestre C28B25 como control.

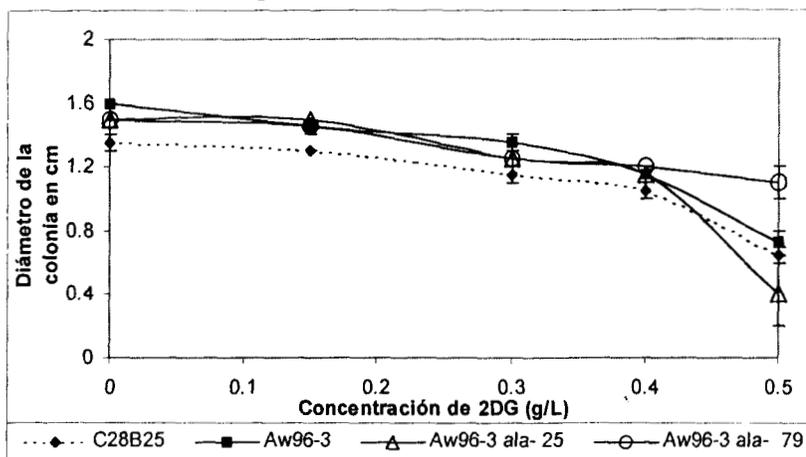


Gráfico3.- Prueba de sensibilidad a 2DG de las cepas originales y auxótroficas para alanina de Aw96-3 en presencia de glucosa como fuente de carbono.

En el gráfico 3, se muestra el crecimiento de las cepas auxótroficas de Aw96-3 sobre medio mínimo con glucosa y 2DG a diferentes concentraciones. Puede observarse que en todas las cepas hay un decremento en el diámetro de la colonia conforme aumenta la concentración del análogo tóxico, aunque se mantiene el crecimiento.

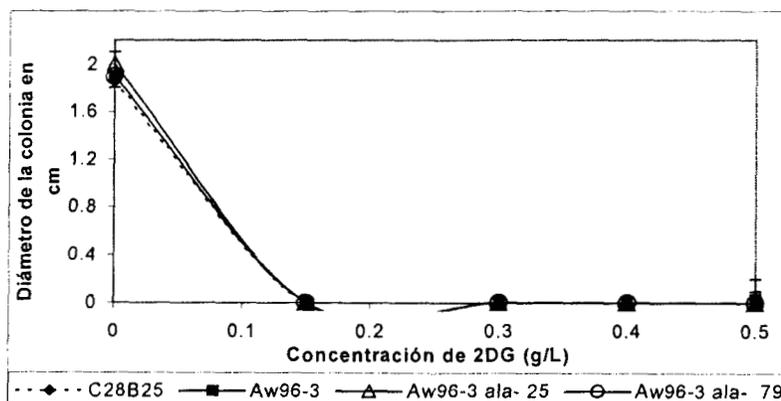


Gráfico 4.- Prueba de sensibilidad a 2 DG de las cepas originales y auxótroficas Aw96-3 ala-25 y ala-79, en presencia de fructosa como fuente de carbono.

En el gráfico 4 se muestra el crecimiento de las cepas auxótrofas para alanina, obtenidas de la cepa Aw96-3 sobre medio mínimo con fructosa y 2DG a diferentes concentraciones. Puede observarse que en todas las cepas cesa el crecimiento de la colonia desde la concentración más baja de 2DG.

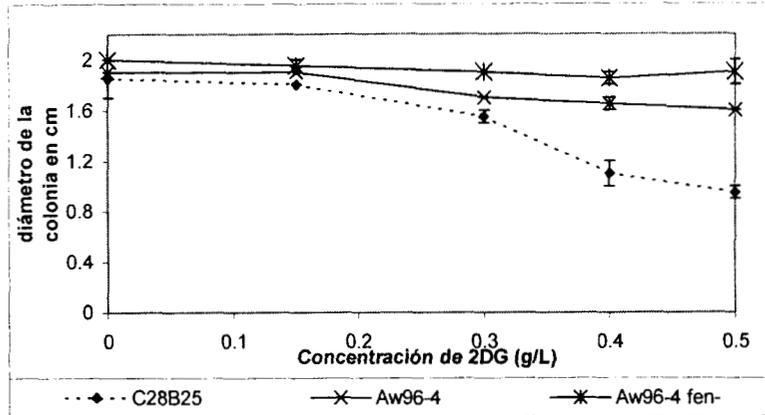


Gráfico 5.- Prueba de sensibilidad a 2DG de las cepas originales y auxótrofa para fenilalanina Aw96-4 fen⁻, en presencia de glucosa como fuente de carbono.

En el gráfico 5 se muestra el crecimiento de la cepa auxótrofa de Aw96-4 sobre medio mínimo con glucosa y 2DG a diferentes concentraciones. Puede observarse que en C28B25 hay un decremento en el diámetro de la colonia conforme aumenta la concentración del análogo tóxico, aunque se mantiene el crecimiento. En la cepa Aw96-4 y su auxótrofo, el crecimiento se mantiene constante e independiente de la concentración de 2DG, lo que indicaría que no existe pérdida de la resistencia a 2DG, en consecuencia, posiblemente a los mecanismos de reversión que pudieran presentarse por la segunda mutación.

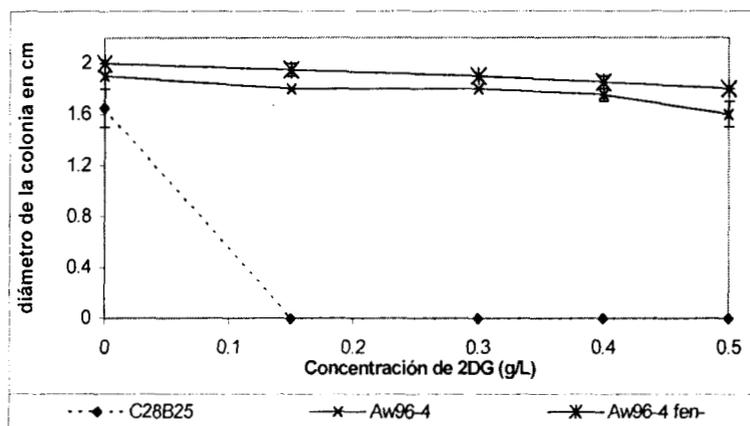


Gráfico 6.- Prueba de sensibilidad a 2 DG de las cepas originales y auxótrofa para fenilalanina Aw96-4 fen⁻, en presencia de fructosa como fuente de carbono.

El gráfico 6 muestra el crecimiento de la cepa auxótrofa Aw96-4 fen⁻, comparada con las cepas originales, sobre medio mínimo con fructosa y 2DG a diferentes concentraciones. Puede observarse que sólo la cepa C28B25 no crece desde la concentración más baja del tóxico, mientras que las cepas Aw96-4 y su auxótrofo para fenilalanina tiene un crecimiento casi constante de la colonia en todas las concentraciones del análogo tóxico.

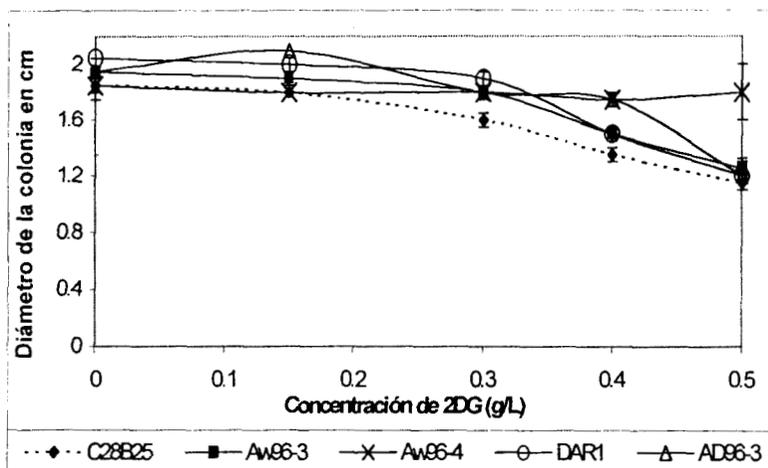


Gráfico 7.- Sensibilidad a 2 DG de las cepas originales y del diploide DAR1 y del autodiploide AD96-3 en presencia de glucosa como fuente de carbono.

En el gráfico 7 se observa el crecimiento de las cepas diploides DAR1 y AD96-3, comparándolas con las cepas parentales, sobre medio mínimo con glucosa y 2DG a diferentes concentraciones. Puede observarse que en todas las cepas hay un decremento en el diámetro de la colonia conforme aumenta la concentración del análogo tóxico, aunque se mantiene el crecimiento, a excepción de la cepa Aw96-4.

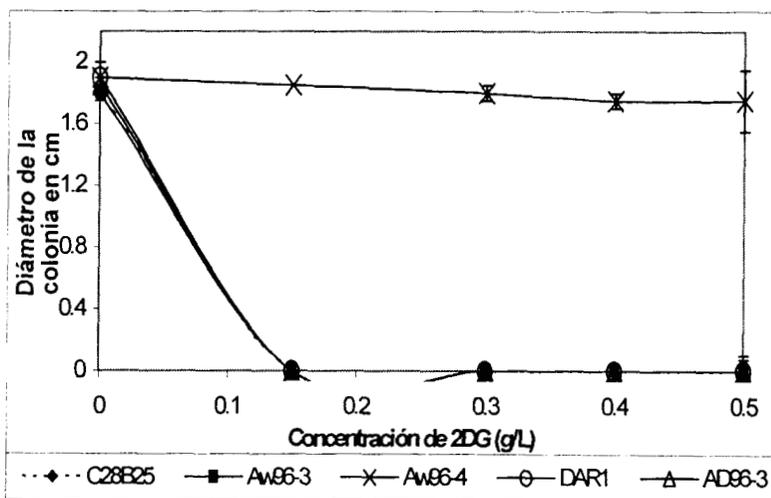


Gráfico 8.- Sensibilidad a 2DG del diploide DAR1 y del autodiploide AD96-3 en presencia de fructosa como fuente de carbono.

En el gráfico 8 se muestra el crecimiento de las cepas diploides DAR1 y AD96-3 sobre medio mínimo con fructosa y 2DG a diferentes concentraciones. Puede observarse que en todas las cepas (excepto Aw96-4), cesa el crecimiento de la colonia conforme aumenta la concentración del análogo tóxico, mientras que Aw96-4 mantiene un crecimiento constante.

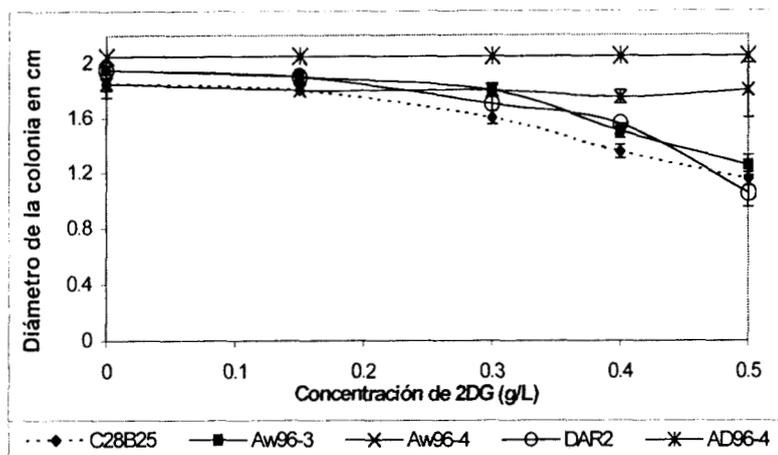


Gráfico 9.-Sensibilidad a 2DG de las cepas originales de *A. niger* y del diploide DAR2 y del autodiploide AD96-4 en presencia de glucosa como fuente de carbono.

El gráfico 9 muestra el crecimiento de las cepas diploides DAR2 y AD96-4 comparándolas con las cepas parentales Aw96-3, Aw96-4 y C28B25, sobre medio mínimo con glucosa y 2DG a diferentes concentraciones. Puede observarse que en todas las cepas, excepto Aw96-4 y AD96-4, hay un decremento en el diámetro de la colonia conforme aumenta la concentración del análogo tóxico, aunque se mantiene el crecimiento.

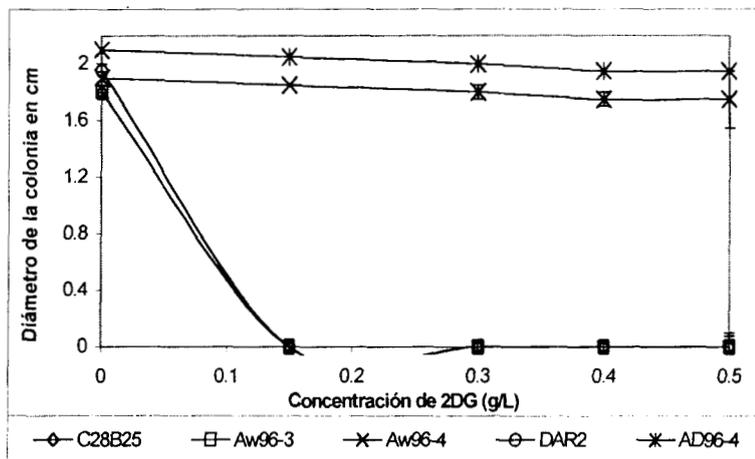


Gráfico 10.- Sensibilidad a 2 DG del diploide DAR2 y del autodiploide AD96-4 en presencia de fructosa como fuente de carbono.

Aquí se muestra el crecimiento de las cepas diploides DAR2 y AD96-4 comparadas con sus cepas parentales, sobre medio mínimo con fructosa y 2DG a diferentes concentraciones. Puede observarse que en todas las cepas, excepto AD96-4 y Aw96-4, no hay crecimiento desde la más baja concentración del tóxico, mientras que las otras dos cepas muestran un crecimiento constante independiente de la concentración de 2DG.

Con estos resultados podemos concluir que hay evidencia de que la segunda mutación, no tuvo ningún efecto sobre los fenotipos de las cepas que fueron probadas, esto es importante para caracterizar a las cepas que se cruzaran posteriormente. Los resultados obtenidos en estos gráficos se resumen en la siguiente tabla:

Cepa	Substrato	Resultado	Gráfico(s)
C28 B25	Glucosa	Resistente	3,5,7,9
AW96-3	Glucosa	Resistente	3,7,9
AW96-3 ala25	Glucosa	Resistente	3
AW96-3 ala79	Glucosa	Resistente	3
AW-96-4	Glucosa	Resistente	5,7,9
AW96-4 fen	Glucosa	Resistente	5
DAR1	Glucosa	Resistente	7
AD96-3	Glucosa	Resistente	7
DAR2	Glucosa	Resistente	9
AD96-4	Glucosa	Resistente	9
C28 B25	Fructosa	Sensible	4,6,8,10
AW96-3	Fructosa	Sensible	4,8,10
AW96-3 ala25	Fructosa	Sensible	4
AW96-3 ala79	Fructosa	Sensible	4
AW-96-4	Fructosa	Resistente	6,8,10
AW96-4 fen	Fructosa	Resistente	6
DAR1	Fructosa	Sensible	8
AD96-3	Fructosa	Sensible	8
DAR2	Fructosa	Sensible	10
AD96-4	Fructosa	Resistente	10

Tabla 6.-Cuadro comparativo del efecto de 2DG sobre el crecimiento de las cepas de *A. niger*, con distintas fuentes de carbono.

De estos datos podemos decir que en presencia de glucosa, ninguna de las cepas fue sensible, ya que lograron crecer, pero en presencia de fructosa, sólo las cepas derivadas de Aw96-4, fueron resistentes. Probablemente lo que esta sucediendo, tiene que ver con las permeasas para estas fuentes de carbono. Se sabe que las permeasas para la glucosa son constitutivas mientras que las permeasas para fructosa son inductivas, así que cuando tenemos glucosa y 2DG en el medio, las permeasas ingresan a ambos a la misma velocidad, ejerciendo entonces la glucosa, un efecto diluyente de la toxicidad de la 2DG, por esta razón, sólo con glucosa no puede determinarse la sensibilidad o resistencia de las cepas al tóxico. En cambio cuando la fuente de carbono que se usa es la fructosa, no sucede lo mismo. Antes de que la fructosa induzca la producción de las permeasas que permitirán su ingreso, la 2DG ya entró en la célula y modificó de alguna manera la vía de utilización de la fructosa, impidiendo a la célula tener una fuente de carbono disponible, que entre a la misma velocidad y que diluya, también el efecto tóxico de la 2DG.

En el caso de las cepas Aw96-4, que son resistentes con ambas fuentes de carbono, podemos pensar que lo que da toxicidad a la 2DG es algún producto que se derive de este compuesto por acción de una enzima, si la mutación causada en estas cepas modificó a esta enzima, será incapaz de producir el compuesto tóxico a partir de 2DG y esto provoca que la célula crezca independientemente de la fuente de carbono que se suministrara.

4.6.- CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO EN SISTEMAS CON A_w DE 0.99 Y 0.96 DE LAS CEPAS HAPLOIDES ORIGINALES.

Para evaluar el perfil metabólico de la fermentación se determinó la producción de biomasa, el pH, la actividad enzimática, la cantidad de proteínas totales y el consumo de sustrato en cada cultivo. En esta sección se presentan los resultados obtenidos de las cinéticas de fermentación en estado sólido usando como inóculo las cepas haploides originales, para posteriormente compararlas con las diploides y autodiploides obtenidas.

4.6.1.- Cinéticas de biomasa

En el gráfico 11, se muestra el perfil de crecimiento de las cepas haploides en un sistema con A_w de 0.99.

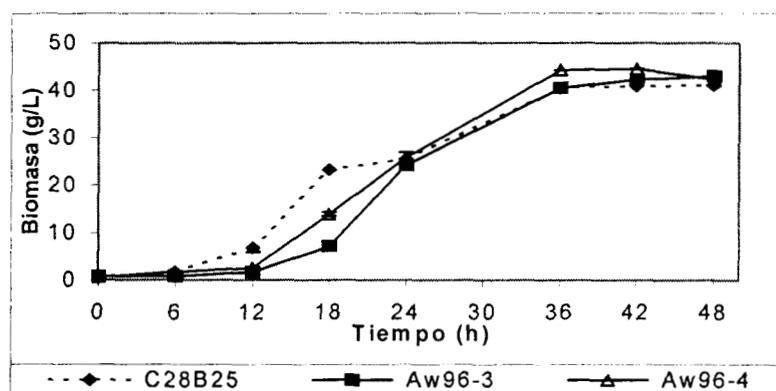


Gráfico 11. Cinética de crecimiento de cepas progenitoras de *A. niger* con A_w de 0.99.

En todos los casos el perfil de crecimiento fue similar, iniciando la fase exponencial a las 6 h en la cepa C28B25 y a las 12 h en las mutantes, la fase estacionaria se presentó aproximadamente a las 30 h en las 3 cepas y con un valor final de biomasa de entre 40 y 45 g/l. Las velocidades específicas de crecimiento (calculadas mediante las pendientes resultantes de graficar el ln de la biomasa producida en el tiempo de la fase exponencial, con el modelo logístico) para cada haploide en este sistema fueron: 0.18 h^{-1} para C28B25, 0.302 h^{-1} para Aw96-3 y 0.230 h^{-1} para Aw96-4, esto nos indica que las cepas mutantes crecen a mayor velocidad que su progenitora, probablemente por que este valor de A_w , favorece el metabolismo de las cepas.

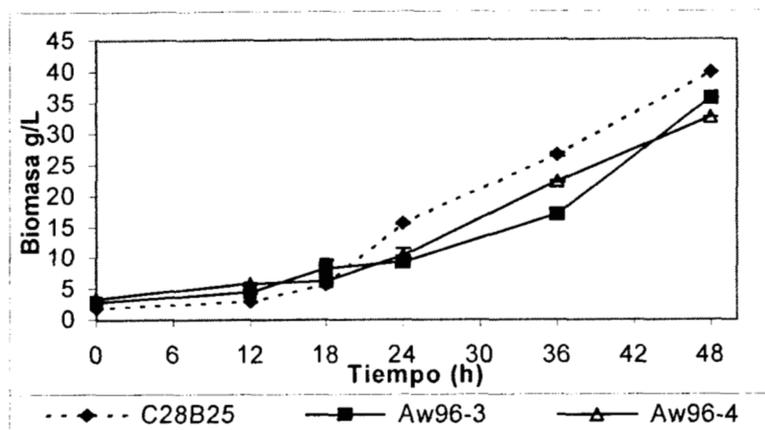


Gráfico 12.- Cinética de crecimiento de cepas progenitoras de *A. niger* con A_w de 0.96

El gráfico 12 muestra el perfil de crecimiento de las cepas progenitoras pero en un sistema con valor de A_w de 0.96. En este caso también se obtuvieron perfiles de crecimiento de biomasa similares para todas las cepas. Puede notarse que la fase lag es más prolongada en la cepa silvestre por 6 h mientras que en las cepas mutantes es igual y no se detecta la presencia de la fase estacionaria durante las 48 h que duró el cultivo. En este sistema la cantidad de biomasa al final de la fermentación está entre los 33 y 40 g/L. Los valores de velocidad específica de crecimiento fueron 0.114 h^{-1} para C28B25, 0.05 h^{-1} para Aw96-3 y 0.081 h^{-1} para Aw96-4, que son mucho menores a las obtenidas en el sistema con mayor valor de A_w .

4.6.2.- Cinéticas de pH

Los cambios de pH el medio se determinaron y se muestran los resultados obtenidos en los gráficos, tomando en cuenta que independientemente del tipo de inóculo utilizado, estos cambios (descensos), se deben a la acidificación del medio producto del consumo de los azúcares y al metabolismo básico primario.

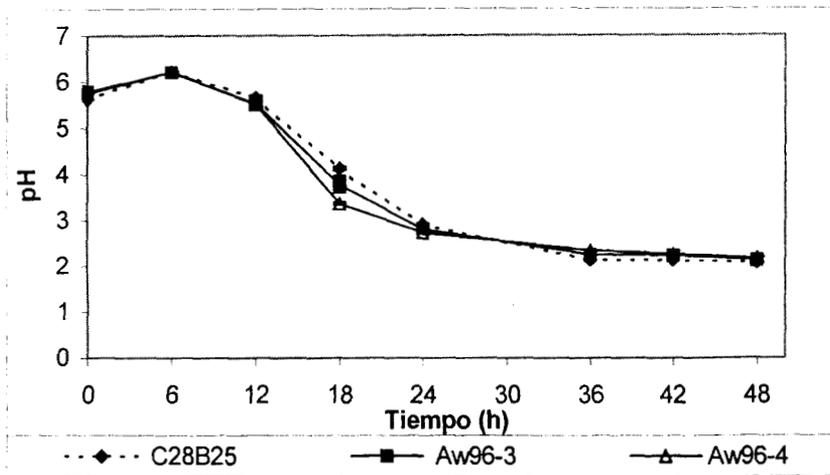


Gráfico 13.- Cambio de pH en el medio de cultivo en que se crecieron cepas haploides en un sistema con Aw de 0.99

El cambio en el valor de pH fue casi idéntico en las tres cepas haploides de *A. niger*, teniendo el descenso más importante a partir de las 12 h, posteriormente se estabilizó a las 30 h y llegó a un valor final de aproximadamente 2.5. Los tiempos en los que se dan los cambios de pH mayores corresponden con los tiempos de inicio de la fase exponencial del crecimiento.

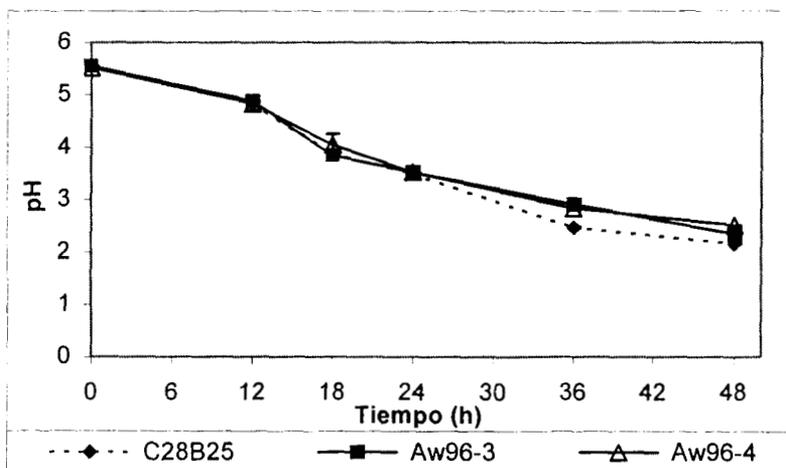


Gráfico 14.- Cambio de pH en el medio de cultivo en que se crecieron cepas haploides en un sistema con Aw de 0.96

En este caso también se obtienen perfiles muy similares en la variación del valor de pH en las tres cepas. Aunque no se observa un descenso tan pronunciado como en el caso del gráfico anterior. El descenso inicia desde las 6 h y no se estabiliza, alcanzando un valor final de 2.7.

4.6.3.- Cinéticas de actividad enzimática (Invertasa)

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la valoración de la actividad invertasa en las cepas progenitoras, en ambos sistemas (con Aw de 0.99 y Aw de 0.96).

4.6.3.1.- Cinéticas de actividad volumétrica

En el gráfico 15, se muestra el perfil de producción volumétrica de invertasa por las cepas progenitoras crecidas en MM con Aw de 0.99.

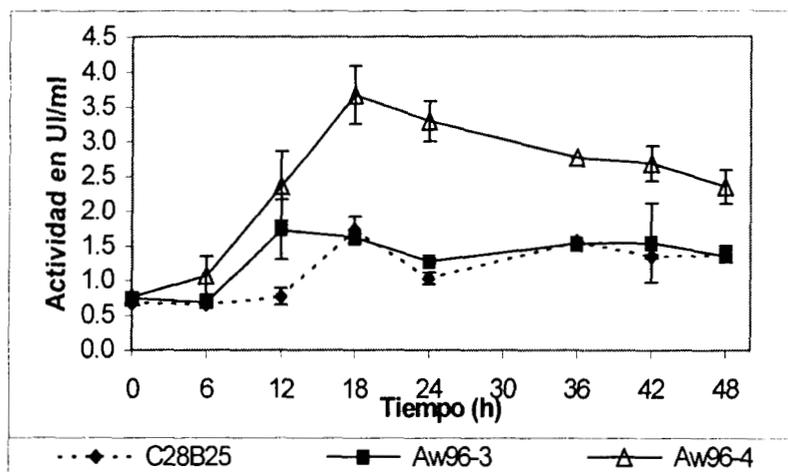


Gráfico 15.- Cinética de actividad volumétrica (invertasa) de las cepas parentales con Aw de 0.99.

En el gráfico 15 se muestra la producción volumétrica de invertasa de las cepas haploides en un sistema con Aw de 0.99. Se puede observar que la cepa Aw96-4 produjo más UI/ml de invertasa (3.66 UI/ml), seguida por la cepa Aw96-3 que produjo 1.73 UI/ml y por último por la C28B25 produciendo 1.73 UI/ml, (que aunque produce casi las mismas unidades, lo hace 6 h después que Aw96-3). Esto puede ser resultado de la selección de estas dos mutantes, que las caracteriza como sobreproductoras, a diferencia de la cepa silvestre.

En el gráfico 16, se presenta la cinética de actividad volumétrica de invertasa de las cepas parentales en un sistema con A_w de 0.96.

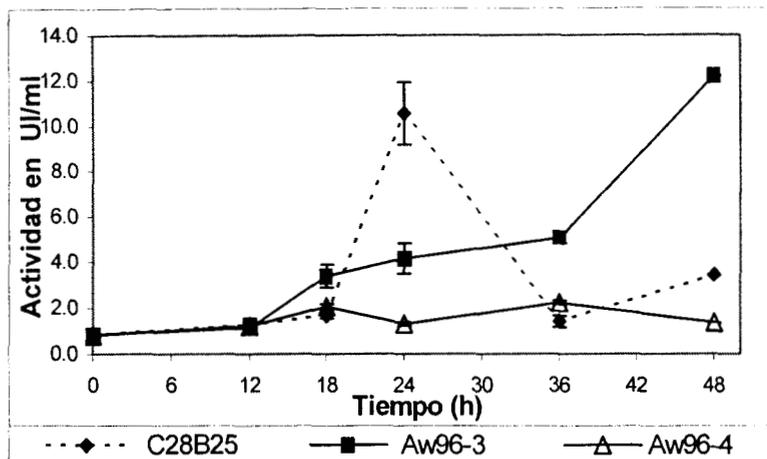


Gráfico16.- Cinética de actividad volumétrica (invertasa) de las cepas parentales con A_w de 0.96.

En este gráfico podemos observar la productividad volumétrica de invertasa de las cepas parentales, pero en sistema con A_w de 0.96. En este sistema la cepa que tiene mayor producción es Aw96-3 que produjo 12.2 UI/ml (aunque ésta no se consigue hasta las 48 h), seguida por la C28B25 produciendo un máximo de 10.57 UI/ml a las 24 h. Aw96-4 es la que menor producción tiene y fue de 2.21 UI/ml a las 36 h. Cabe mencionar que este es un medio que puede causar mayor estrés, debido a que tiene un valor de A_w menor (0.96).

4.6.3.2.- Cinéticas de actividad específica

Para conocer cual es la cantidad de proteína que tiene actividad catalítica invertasa se construyeron gráficos en los que se relacionó la actividad volumétrica con la cantidad de proteína (actividad específica) y ésta se expresó en función del tiempo. Los perfiles se muestran a continuación.

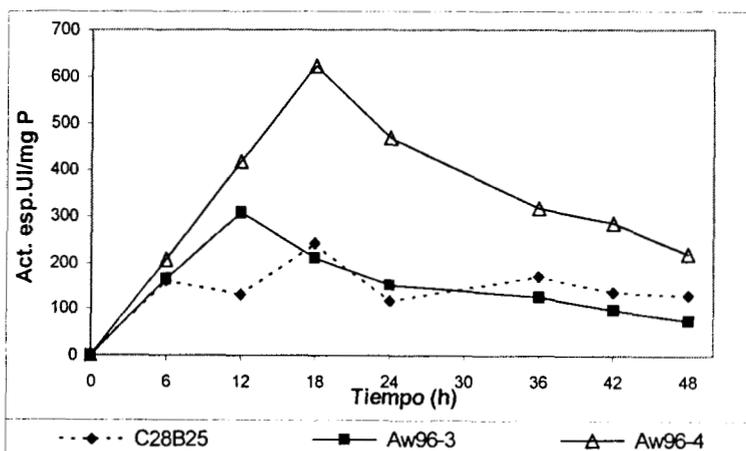


Gráfico17.- Perfil de actividad específica de las cepas haploides con A_w de 0.99

El gráfico 17 muestra la actividad específica de invertasa en las cepas haploides en un sistema con Aw de 0.99. Se observa que la cepa Aw96-4 produjo 623 UI/mg proteína de invertasa a las 18 h siendo la más productora, seguida por la cepa Aw96-3 con 308 UI/mg a las 12 h y por último por la C28B25 que produjo 242 UI/mg a las 18 h. Es notorio que la actividad de la enzima producida no es muy estable, efecto observado en las 3 cepas, debido a la caída tan pronunciada de los picos.

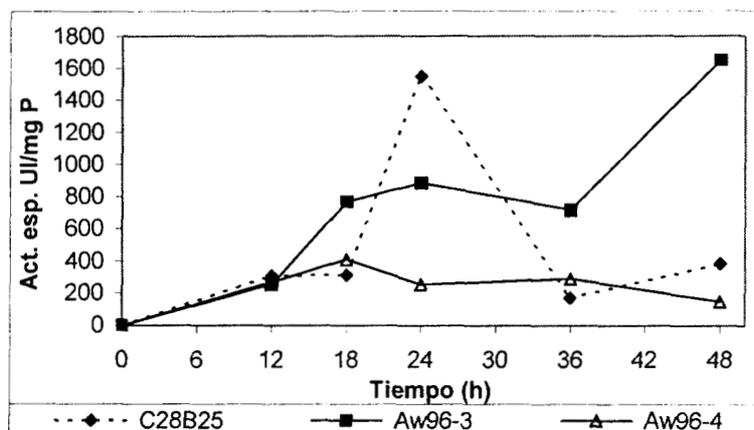


Gráfico 18.- Perfil de actividad específica de las cepas haploides con Aw de 0.96

En el gráfico 18, podemos observar la producción específica de invertasa por las cepas haploides pero en sistema con Aw de 0.96. En este sistema la cepa que tiene mayor producción es Aw96-3 y es de 1647 UI/mg de proteína (aunque ésta no se alcanza hasta las 48 h), seguida por la C28B25 que produjo 1549 UI/mg a las 24 h. La cepa Aw96-4 es la que menor producción tiene de 412 UI/mg alcanzada a las 18 h. También en este sistema los picos de producción obtenidos muestran inestabilidad en la actividad de la enzima. Se observa también que en el sistema con Aw de 0.99 las actividades específicas obtenidas son más bajas que las observadas en el sistema con Aw de 0.96 y de igual manera sucede con las actividades volumétricas, esto puede ser, debido a que las cepas fueron seleccionadas como sobreproductoras de pectinasas en medios con un valor de Aw de 0.96.

4.6.3.3.- Rendimiento

Se obtuvo el rendimiento $Y_{P/X}$ (cantidad de enzima en UI/gramo de biomasa) de cada cepa haploide en los dos sistemas, considerando el punto de la cinética en el cual la cantidad de actividad invertasa en UI dividida entre la cantidad de biomasa producida correspondiente al mismo punto es máxima. Los resultados se muestran en la tabla 7.

CEPA	Y _{P/X} (UI/g de X)	
	Aw 0.99	Aw 0.96
C28B25	368 (6h)	679 (24h)
Aw96-3	1046 (12h)	441 (24h)
Aw96-4	906 (12h)	324 (18h)

Tabla 7.- Rendimiento Y_{P/X} de las cepas haploides en los dos sistemas probados.

Se puede observar que los mayores rendimientos se encuentran en el sistema con Aw de 0.99 en las cepas mutantes y en el sistema con Aw de 0.96 en la cepa silvestre. Esto puede indicarnos que en Aw de 0.96, las cepas mutantes están produciendo más biomasa que enzima y en el sistema con Aw de 0.99, tienen una mayor producción de enzima, con respecto a la biomasa. En el caso de la cepa silvestre sucede lo contrario, cuando el medio es menos estresante, la producción de biomasa es mayor a la de enzima y cuando el medio con Aw de 0.96 causa estrés, la cepa produce más enzima que biomasa.

4.6.4.- Cinéticas de consumo de sustrato

En esta parte se presentan los resultados de las cinéticas de consumo de sustrato (sacarosa) de las cepas haploides originales en los dos sistemas de fermentación en estado sólido.

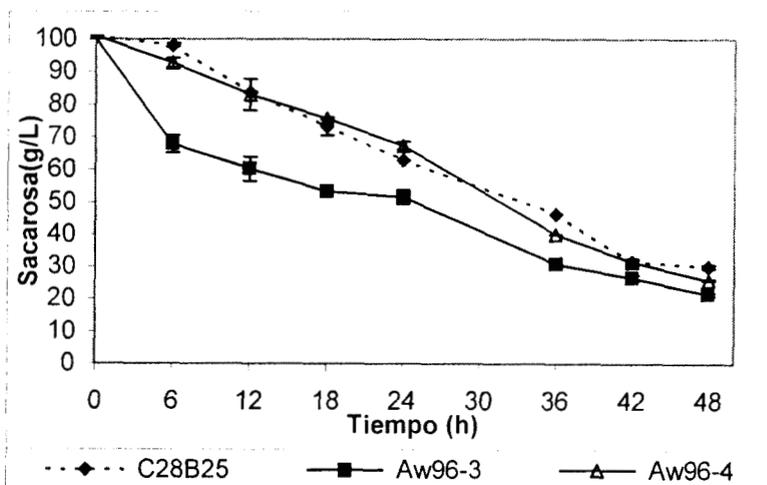


Gráfico 19.- Cinética de consumo de sustrato de las cepas haploides con Aw de 0.99.

Podemos notar que el consumo se realiza más rápidamente en Aw96-3, iniciándose durante las primeras 6 h. En Aw96-4 y C28B25 el consumo es casi igual e inicia después de las 6 h. Entre las 42 y 48 h el consumo empieza a estabilizarse proporcionando para todas las cepas una eficiencia de consumo de casi el 80 %.

En la cepa C28B25 la fase exponencial de crecimiento inicia a las 6 h y en este momento el consumo de sustrato se hace más notorio, lo mismo sucede con Aw96-4 que inicia su fase exponencial de crecimiento a las 12 h y su consumo a este tiempo en más pronunciado, pero no sucede lo mismo con Aw96-3, en esta cepa se inicia el consumo desde las primeras 6 h cuando su fase exponencial de crecimiento inicia hasta las 12 h, aunque el descenso en la cantidad de sustrato sigue siendo importante a partir de este tiempo.

En el gráfico 20 se muestran las cinéticas de desaparición de sustrato en las cepas haploides con Aw de 0.96.

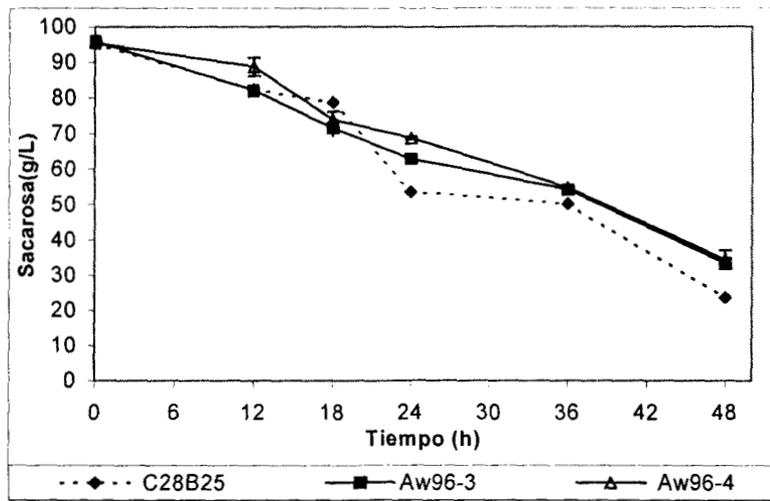


Gráfico 20.- Cinética de consumo de sustrato de las cepas haploides con Aw de 0.96

En este caso observamos que el consumo se realiza a la misma velocidad en las tres cepas. Se nota que en Aw96-4 el consumo importante se inicia después de las 6 h, mientras que en Aw96-3 y C28B25 se inició durante las primeras 6 h. No se presenta una estabilización en ninguno de los casos. A las 48 h la cepa C28B25 tuvo una eficiencia de consumo del 76 %, mientras que Aw96-3 y Aw96-4 presentan eficiencias de aproximadamente el 66%.

En este sistema todas las cepas inician su fase exponencial de crecimiento a las 12 h, sin embargo podemos ver que este tiempo no coincide con el inicio del consumo de sustrato en ninguna de las cepas, aunque a las 12 h aún hay consumo acelerado de sustrato.

Con este análisis podemos afirmar que en nuestras cepas no podríamos identificar de manera acertada la fase de crecimiento exponencial a través solo del gráfico de consumo de sustrato como podría suponerse.

4.7.- CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO EN SISTEMAS CON AW DE 0.99 Y 0.96 DE LAS CEPAS DIPLOIDES

Para evaluar el perfil metabólico de la fermentación en las cepas diploides y autodiploides obtenidas se determinó la producción de biomasa, el pH, la actividad enzimática, la concentración de proteínas totales extracelulares y el consumo de sustrato en cada cultivo. En esta sección se presentan los resultados obtenidos de las cinéticas de fermentación en estado sólido, usando como inóculo las cepas diploides y autodiploides.

4.7.1.- Cinéticas de biomasa

En el gráfico 21, se muestra el perfil de crecimiento de biomasa en las cepas diploides en el sistema con Aw de 0.99.

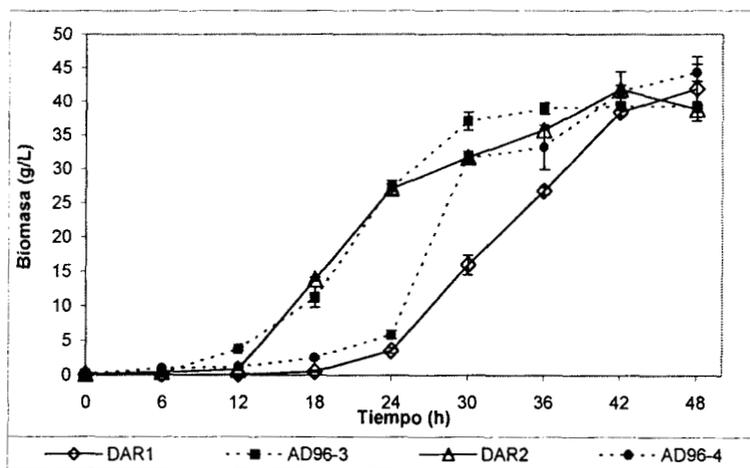


Gráfico 21. Cinética de crecimiento de biomasa de cepas diploides con Aw de 0.99.

En el gráfico 21 podemos apreciar que hay un incremento en el tiempo de la fase lag de las cepas diploides en comparación con las cepas parentales, especialmente en las cepas DAR1 y AD96-4 que no inician su crecimiento exponencial hasta las 18 h. Las cepas AD96-3 y DAR2 crecen más rápido que las cepas DAR1 y AD96-4 en este sistema con Aw de 0.99, llegando en los 4 casos a una cantidad de biomasa de aproximadamente 40 a 45 g/L. Las velocidades específicas de crecimiento para cada cepa en este sistema fueron: 0.22 h^{-1} para DAR1, 0.28 h^{-1} para AD96-3, 0.24 h^{-1} para DAR2 y 0.41 h^{-1} para AD96-4.

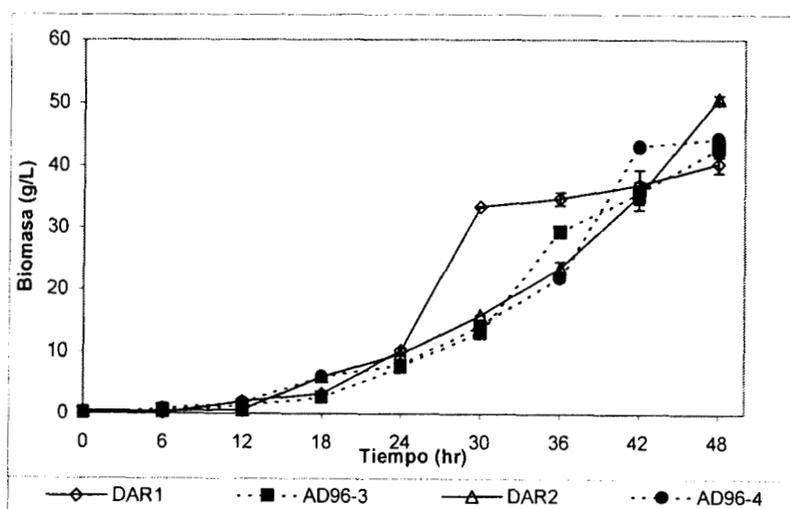


Gráfico 22.- Cinética de crecimiento de biomasa de cepas diploides con Aw de 0.96

El gráfico 22 muestra el perfil de crecimiento de las cepas diploides pero en un sistema con valor de A_w de 0.96. Podemos observar que el incremento en el tiempo de la fase lag es mayor para este sistema con A_w de 0.96 en general para todas las cepas. En este sistema la cepa DAR1 es la que presenta mayor velocidad de crecimiento en comparación con las cepas AD96-4, AD96-3 y DAR 2, obteniéndose una cantidad de biomasa de entre 40 y 50 g/L. Los valores de velocidad específica de crecimiento fueron: 0.45 h^{-1} , para DAR1, 0.18 h^{-1} para AD96-3, 0.1 h^{-1} para DAR2 y 0.15 h^{-1} para AD96-4, que también son mucho menores a las obtenidas en el sistema con mayor A_w (al igual que pasó con las cepas parentales).

4.7.2.- Cinéticas de pH

Los gráficos 23 y 24 muestran los cambios de pH del medio, obtenidos en los sistemas de cultivo con los dos diferentes valores de A_w para las cultivos de las cepas diploides.

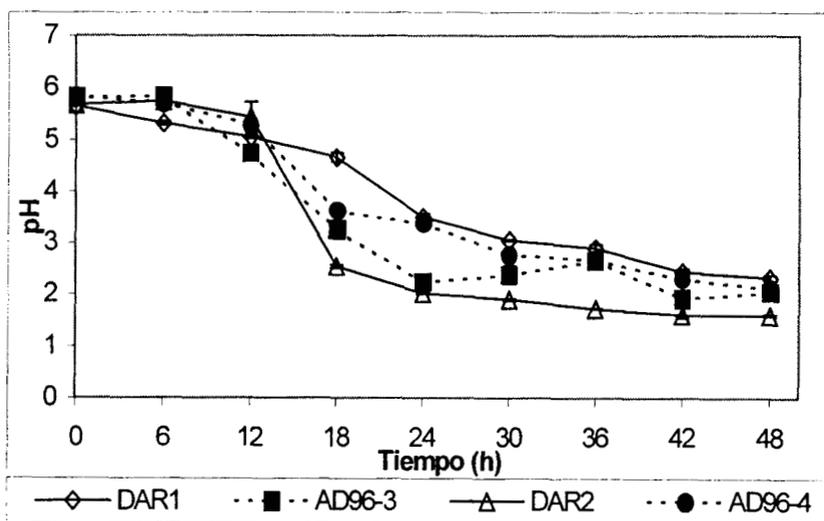


Gráfico 23.- Cambio de pH del medio en que se crecieron las cepas diploides en un sistema con A_w de 0.99.

Se puede observar que en este sistema la caída del valor de pH para las cepas AD96-3, AD96-4 y DAR2, es más pronunciada en comparación con la de la cepa DAR1. Esta caída de pH inicia entre las 6, las 12 y las 18 horas dependiendo de la cepa, en DAR2 se llega a un valor final de pH de aproximadamente 2 y en los otros 3 casos se llega a un valor aproximado de 2.5.

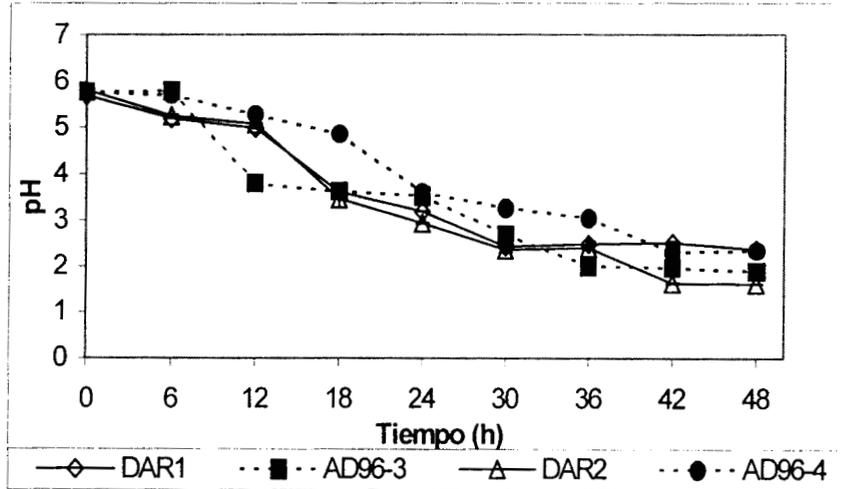


Gráfico 24.- Cambio de pH en cepas diploides en un sistema con Aw de 0.96

En Aw de 0.96, la caída del valor de pH es muy similar en las cuatro cepas, iniciando aproximadamente a las 6 horas (excepto en AD96-4 que inicia su descenso hacia las 12 h) y es menos marcada que para el sistema con Aw de 0.99. Los valores de pH obtenidos para las cuatro cepas, a las 48 horas, van de 1.69 a 2.5 (gráfico 24).

4.7.3.- Cinéticas de actividad enzimática (Invertasa)

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en cuanto a actividad enzimática (invertasa) en las cepas diploides y autodiploides, en sistemas con Aw de 0.99 y 0.96.

4.7.3.1.- Cinéticas de actividad volumétrica

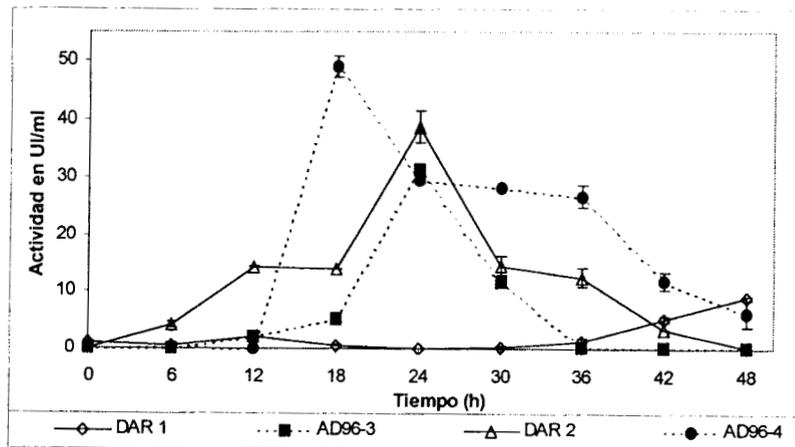


Gráfico 25.- Cinética de actividad volumétrica (invertasa) de las cepas diploides con Aw de 0.99.

En el gráfico 25, se muestra el perfil de producción volumétrica de invertasa por las cepas diploides con A_w de 0.99, donde se muestra la actividad volumétrica de invertasa en las cepas diploides en un sistema con A_w de 0.99. Se puede observar que la cepa AD96-4 produjo 49 UI/ml de invertasa a las 18 h y es la que más produce, seguida por la cepa DAR2 con 39 UI/ml producidas a las 24 h y por AD96-3 con una producción de 31 UI/ml a las 24 h. La cepa DAR1 inicia su producción mucho después, hacia las 48 h y es de 9 UI/ml. Es de destacar que la enzima producida por AD96-4 parece ser más estable que la producida por las otras 3 cepas, durante el tiempo en que duró la fermentación, ya que en el caso de DAR1 no se tiene información con respecto a la estabilidad de la actividad de la enzima que produce. Es evidente la superioridad en cuanto a producción de las cepas diploides en comparación con sus haploides originales, los incrementos en actividad son casi de 10 veces más.

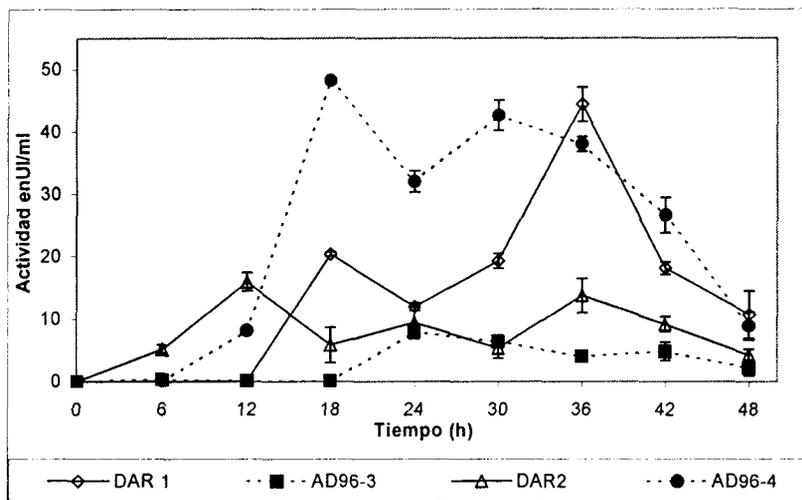


Gráfico 26.- Cinética de actividad volumétrica (invertasa) de las cepas diploides con A_w de 0.96.

En el gráfico 26 podemos observar la producción de invertasa por las cepas diploides en sistema con A_w de 0.96. En este sistema la cepa que tiene mayor producción es AD96-4 (48 UI/ ml a las 18 h), seguida por la cepa DAR1 que produjo 44 UI/ml en la hora 36 y finalmente por DAR2 y AD96-3 con una producción de 16 y 8 UI/ml a las 12 y 24 h respectivamente. AD96-3 es la que tiene la menor producción. También en este sistema los picos de producción obtenidos por AD96-4 muestran mayor estabilidad de la actividad de la enzima ya que las caídas en la producción son menos pronunciadas.

4.7.3.2.- Cinéticas de Actividad Específica

En este apartado se realizó el análisis para conocer la cantidad de proteína total que tiene actividad invertasa (actividad específica), construyendo los gráficos relacionando la actividad volumétrica con la cantidad de proteína.

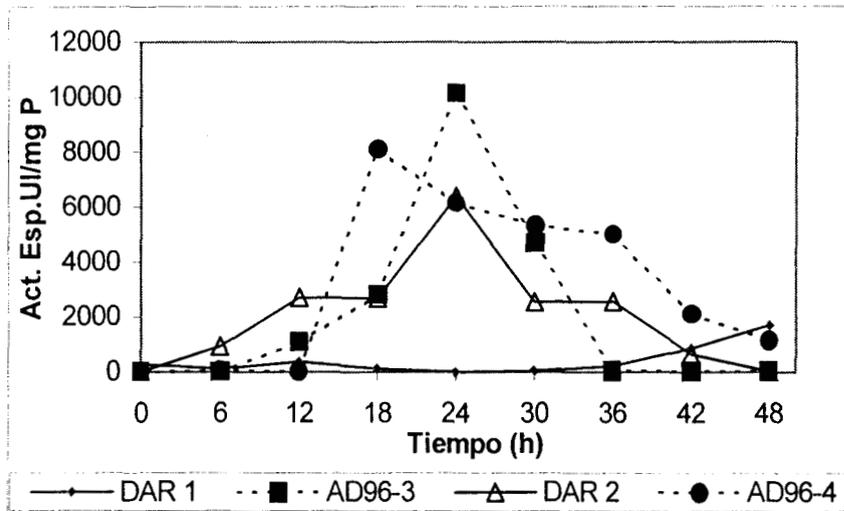


Gráfico 27.- Perfil de actividad específica de las cepas diploides con A_w de 0.99

Los perfiles de actividad específica para cada cepa diploide se muestran en el gráfico 27 y se observa que la producción específica de invertasa por las cepas diploides, en un sistema con A_w de 0.99. Se puede notar que la cepa con mayor actividad específica es AD96-3 con un valor de 10152 UI/mg de proteína a las 24 h, seguida por la cepa AD96-4 y por la cepa DAR2 produciendo 8098 y 6398 UI/mg a las 18 y 24 h respectivamente. La cepa DAR1 tiene menor producción y es de 1707 UI/mg, ésta inicia a partir de las 48 h. En el caso de AD96-4, por no tener una caída muy pronunciada del pico, se vuelve a ver un comportamiento más estable de la actividad de la enzima en comparación con la de las otras cepas.

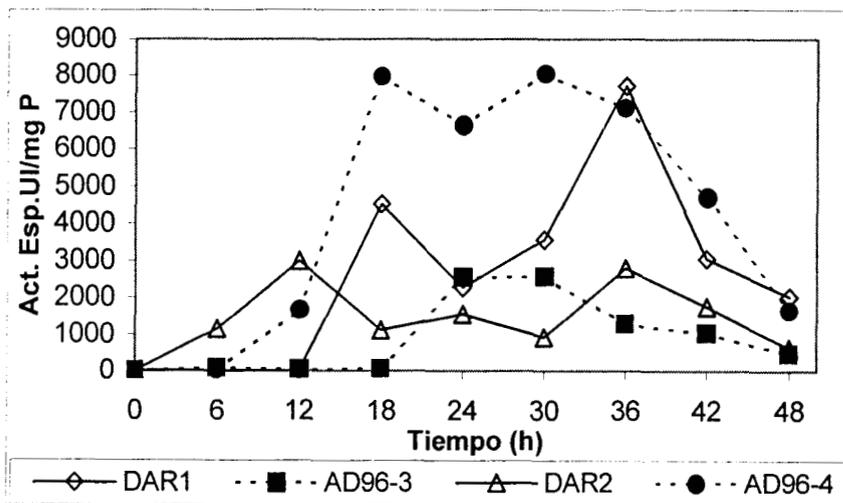


Gráfico 28.- Perfil de actividad específica en las cepas diploides con A_w de 0.96

En el gráfico 28, podemos ver la producción de invertasa por las cepas diploides, pero en sistemas con A_w de 0.96. En este sistema la cepa que tiene mayor producción es AD96-4 y es de 8036 UI/mg (a las 30 h), seguida por la DAR1 que produjo 7720 UI/mg a las 36 h y por DAR2 y AD96-3 que muestran picos similares en magnitud pero una diferencia de 18 h entre ellos (2999 y 2552 UI/mg a las 12 y 30 h respectivamente). También en este sistema los picos de producción obtenidos por AD96-4 muestran una mayor estabilidad de la actividad de la enzima.

4.7.3.3.- Rendimiento

Se obtuvo el rendimiento $Y_{P/X}$ (cantidad de enzima en UI/ gramo de biomasa) de cada cepa diploide en los dos sistemas, considerando el mismo criterio que se utilizó en el caso de las cepas haploides para elegir el punto de mayor rendimiento (sección 4.6.3.3). Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

CEPA	$Y_{P/X}$ (UI/g de X)	
	A_w 0.99	A_w 0.96
DAR1	14474 (12h)	6333 (18h)
DAR2	18163 (12h)	26225 (12h)
AD96-3	1156 (24h)	1033 (24h)
AD96-4	19364 (18h)	7967 (18h)

Tabla 8.- Rendimiento $Y_{P/X}$ de las cepas diploides en los dos sistemas probados.

Podemos observar que, efectivamente las cepas diploides, en ambos sistemas, tienen mejores rendimientos que los obtenidos en las cepas haploides, hasta de 2 ordenes de magnitud. En algunos casos el tiempo en que se consiguen estos rendimientos, es mayor en las cepas diploides que en las haploides. Sin embargo los rendimientos alcanzados por estas cepas, pueden compensar de manera adecuada el tiempo de más en la fermentación, que en algunos casos es hasta de 12 h.

4.7.4.- Cinéticas de Consumo de Sustrato

En esta sección se presentan los resultados de las cinéticas de consumo de sustrato (sacarosa) de las cepas diploides y autodiploides en los dos sistemas de fermentación en estado sólido.

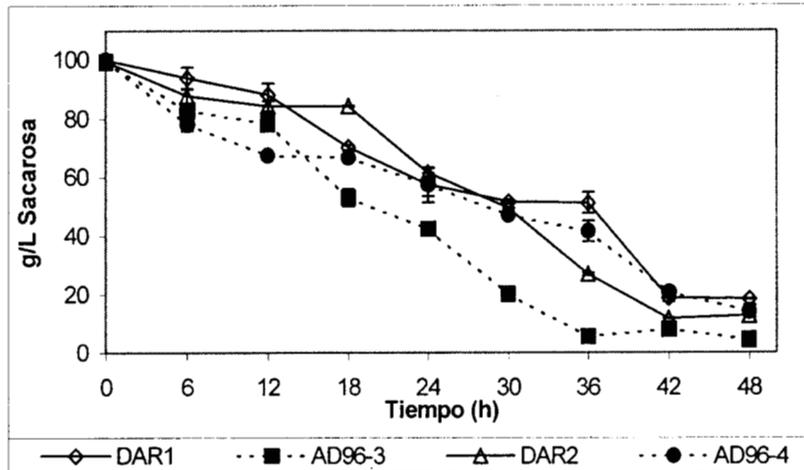


Gráfico 29.- Cinética de consumo de sustrato de las cepas diploides con A_w de 0.99.

Podemos notar que el consumo se realiza más rápidamente en AD96-3, iniciando durante las primeras 6 h. En AD96-4, DAR1 y DAR2 el consumo es casi igual e inicia también durante las primeras 6 h, aunque el descenso es menos marcado. La cepa AD96-3 se estabiliza a partir de las 36 h, con una eficiencia de consumo de casi el 95%. Entre las 42 y 48 h el consumo empieza a estabilizarse para las otras tres cepas, proporcionando una eficiencia de consumo de entre el 85 y 90%.

Para las 4 cepas diploides vemos que se inicia el consumo de sustrato en las primeras 6 h, sin embargo sólo la cepa AD96-3 inicia su fase de crecimiento exponencial a las 6 h, en este único caso coincide el consumo de sacarosa con el crecimiento acelerado de la cepa. También podemos apreciar que después de las 12 h AD96-3 muestra un descenso muy pronunciado de sacarosa y presenta la mejor eficiencia de consumo (95%).

En cuanto a las demás diploides pudimos ver que su fase de crecimiento exponencial inició alrededor de las 12 h, es decir, 6 h después de que inició el consumo de sacarosa. Sin embargo después de las 12 h el descenso en la cantidad de sacarosa se hace más notable en los tres casos.

En el gráfico 30 se muestran las cinéticas de desaparición de sustrato en las cepas diploides con A_w de 0.96.

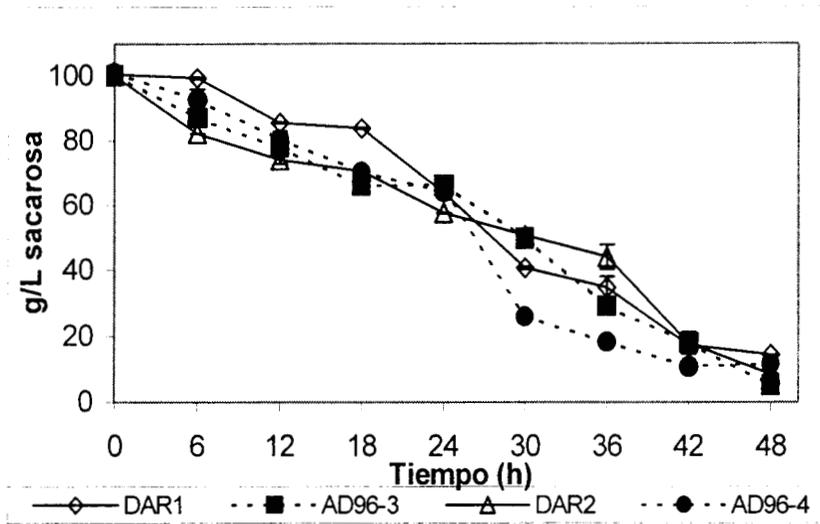


Gráfico 30.- Cinética de consumo de sustrato de las cepas diploides con A_w de 0.96

En este caso observamos que el consumo se realiza a la misma velocidad en las cepas DAR1, DAR2, y AD96-3. En el caso de la cepa AD96-4 se observan decrementos más marcados. En todas las cepas el descenso en el consumo de sustrato inicia durante las 6 primeras horas. Entre las 42 y 48 h se estabiliza el consumo de las cepas AD96-4, DAR2 y DAR1, mientras que en el caso de AD96-3 no se nota que el consumo es constante a lo largo de la fermentación. La eficiencia en el consumo de sustrato es de aproximadamente del 85 al 95% en las cuatro cepas.

En este sistema las cepas diploides muestran iniciar su fase exponencial de crecimiento a las 12 h y su consumo a las 6 h en el caso de DAR1 y durante las primeras 6 h en los otros tres casos. El consumo más notorio se observó a las 18 h en DAR1 y a las 24 h en DAR2 y los dos autodiploides. La cepa AD96-4 es la que muestra un descenso más pronunciado en la cantidad de sustrato pero parece que su consumo se mantiene constante a partir de las 42 h.

Como pudimos darnos cuenta en todos los gráficos, tanto de haploides como de diploides, el consumo inició antes de que iniciara la fase de crecimiento exponencial, pero este consumo no fue tan importante como el que se observó en horas después de que cada cepa estuvo creciendo exponencialmente. Esto se debe probablemente a que como se trata de un sustrato, que para su asimilación necesita de la expresión de una enzima que lo hidrolice en monómeros, el consumo inicial sirve como estímulo (inducción) para la liberación de la invertasa, la hidrólisis y posterior consumo de los monómeros (fase de consumo de sustrato notable).

En general, la cantidad de biomasa producida a las 48 h por las cepas haploides originales en ambos sistemas fue de entre 33 y 43 g/L, presentándose los mayores valores (41 - 43 g/L) en el sistema con A_w de 0.99 y los menores (33 - 40 g/L) en el sistema con A_w de 0.96.

En las cepas diploides, la cantidad de biomasa producida en los dos sistemas fue de 39 a 51g/L, teniéndose mayor cantidad en el sistema con A_w de 0.96 (40–51g/L) y menor en el sistema con A_w de 0.99 (39 – 44g/L).

Con estos resultados podemos observar primero, que la A_w afecta a la producción de biomasa en todas las cepas utilizadas (haploides y diploides) y segundo, que su efecto es contrario dependiendo de la cepa de que se trate ya que en las haploides a mayor valor de A_w , mayor cantidad de biomasa y a menor valor de A_w , menor cantidad de biomasa, en cambio en las diploides cuando se trabajó con un valor de A_w de 0.99, la cantidad de biomasa fue menor que cuando se trabajó con un valor de A_w de 0.96.

En cuanto al cambio de pH en los medios de fermentación, pudimos observar que el comportamiento del valor de pH en las cepas haploides y en ambos sistemas ($A_w=0.99$ y $A_w=0.96$) fue casi idéntico, los valores finales de pH a las 48 h varían de entre 2.1 y 2.5. En todas las cepas y en los dos sistemas el descenso inició a las 12 h, sin embargo fue más pronunciado en el sistema con A_w de 0.99.

De igual forma ocurrió en la fermentación con las cepas diploides. El valor de pH a las 48 h fluctuó entre 1.6 y 2.4 (mayor intervalo que el presentado por las haploides, lo que nos habla de su diferente metabolismo). En las 4 diploides inició el descenso a las 12 h y se pudo observar también un descenso en el valor de pH más pronunciado en el sistema con A_w de 0.99.

Finalmente en cuanto al consumo de sustrato, el por ciento de eficiencia en ambos sistemas, con las cepas haploides varió del 65 al 78%. Los mayores porcentajes de eficiencia se presentaron en el sistema con A_w de 0.99 (70 – 78%) y los porcentajes de eficiencia de consumo de sustrato menores se presentaron en el sistema con A_w de 0.96 (65 –76%). Este comportamiento concuerda con la producción obtenida de biomasa. El consumo inicia a las 6 h en el sistema con $A_w=0.99$ y a las 12 h en el sistema con $A_w=0.96$.

En las cepas diploides se obtuvieron eficiencias de consumo superiores a las observadas con las haploides. Los porcentajes van del 81 al 95% para los dos sistemas. Los porcentajes de eficiencia de consumo de sustrato encontrados en el sistema con A_w de 0.99 fueron del 81 al 95% y los encontrados en el sistema con A_w de 0.96 fueron desde el 85 al 95%. El consumo se inició a las 12 h en el sistema con A_w de 0.99 y a las 6 h en el sistema con A_w de 0.96, en todas las diploides.

4.8.- COMPARACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS ENTRE CEPAS DIPLOIDES Y SUS CEPAS PROGENITORAS.

En las tablas 9 y 10 se comparan los parámetros cinéticos $Y_{P/X}$ y μ entre las cepas parentales y las diploides en cada uno de los sistemas de fermentación.

CEPA	μ (h^{-1})	Rendimiento puntual $Y_{P/X}$ (UI/g de X)	Rendimiento por regresión $Y_{P/X}$ (UI/g de X)	Productividad real (UI/g.h)
C28B25	0.18	368 (6h)	64	43
Aw96-3	0.302	1046 (12h)	1601	57
Aw96-4	0.230	906 (12h)	1231	131
DAR1	0.22	14474 (12h)	19444	183
DAR2	0.24	18163 (12h)	14503	1311
AD96-3	0.28	1156 (24h)	1142	1613
AD96-4	0.41	19364 (18h)	22831	2722

Tabla 9.- Cuadro comparativo de parámetros cinéticos entre cepas haploides y diploides con Aw de 0.99.

En la tabla 9 se muestran los valores de μ (velocidad específica de crecimiento medida en la fase de crecimiento exponencial), los rendimientos $Y_{P/X}$ (cantidad de invertasa producida en UI por gramo de biomasa) y la productividad de enzima de las cepas (UI/hL), en un sistema con Aw de 0.99. El rendimiento se calculó de dos formas: puntual y por regresión, la primera se refiere a el máximo rendimiento obtenido durante la fermentación, por la que se especifica el tiempo en el que se obtuvo dicho máximo; la segunda, se calculó haciendo una regresión con los primeros puntos de la cinética, hasta donde aparece el punto máximo de actividad volumétrica. Podemos notar que las diferencias en los valores de rendimiento puntual y por regresión, sólo cambian en las cifras, y no en el orden de magnitud.

Podemos notar que existe una relación directa entre la μ y el rendimiento sólo en las cepas parentales (es decir, que al aumentar μ también lo hace $Y_{P/X}$) en este sistema con Aw de 0.99. Los rendimientos puntuales en estas cepas van desde 368 hasta 1046 UI/g de biomasa. Las cepas diploides tienen mayores rendimientos que las cepas haploides (de 1156 hasta 19364 UI/g de biomasa), pero en cuanto a los valores de μ no se presenta la misma relación directa con el rendimiento. Al respecto se presentaron tres casos, el primero se observa en las cepas DAR2 y AD96-4 que tienen valores de μ altos (0.24 y 0.41 h^{-1}) y su rendimiento también es el más alto (18163 y 19364 UI/g de biomasa), el segundo, que se presenta en la cepa DAR1, en la que se presenta el valor de μ más bajo (0.22 h^{-1}), pero su rendimiento se sigue considerando alto (14474 UI/g de biomasa) y el tercero que sucede con la cepa AD96-3 en la que observamos que el valor de μ es mayor que el de las cepas DAR1 y DAR2 (0.28 h^{-1}), sin embargo su rendimiento es el más bajo de todos (1156 UI/g de biomasa).

225555

A pesar de tener los mayores rendimientos con las cepas diploides, los tiempos en que se consiguen son mayores en un intervalo de 6 a 12 h, pero la magnitud de los rendimientos puede compensar este tiempo de retardo.

En cuanto a la productividad, ésta fue calculada dividiendo la producción volumétrica de la cepa entre el tiempo de mayor producción. En el primer sistema podemos observar que a excepción de DAR1, las cepas diploides incrementan su productividad en dos ordenes de magnitud en comparación con la cepa silvestre y una de las mutantes haploides originales (C28B25, $p=43$, Aw96-3, $p=57$; AD96-3, $p=1311$; DAR2, $p=1613$ y AD96-4, $p=2722$, UI/hL), y en un orden de magnitud en comparación con la cepa haploide original mutante (Aw96-4, $p=131$ UI/hL), siendo AD96-4 la que presentó mayor productividad. La productividad de la cepa DAR1, es sólo un orden de magnitud mayor que la productividad de la cepa silvestre y la cepa Aw96-3 y su productividad es del mismo orden que de la obtenida con la mutante haploide original Aw96-4 (DAR1, $p=183$; C28B25, $p=43$, Aw96-3, $p=57$ y Aw96-3, $p=131$, UI/hL) Por lo tanto en este sistema, las cepas diploides tienen, efectivamente, incrementos importantes en la productividad a diferencia de las cepas haploides originales.

CEPA	μ (h^{-1})	Rendimiento puntual Y P/X (UI/g de X)	Rendimiento por regresión Y P/X (UI/g de X)	Productividad real (UI/g.h)
C28B25	0.114	679 (24h)	766	441
Aw96-3	0.055	441 (24h)	348	254
Aw96-4	0.081	324 (18h)	629	140
DAR1	0.45	6333 (18h)	5255	1233
DAR2	0.10	26225 (12h)	58445	1324
AD96-3	0.18	1033 (24h)	1087	328
AD96-4	0.15	7967 (18h)	8634	2677

Tabla 10.- Cuadro comparativo de parámetros cinéticos entre cepas haploides y diploides a Aw de 0.96.

En la tabla 10 mostramos los valores de μ , Y P/X puntual y por regresión y productividad real, para las cepas haploides y para las cepas diploides, en un sistema con Aw de 0.96. En este caso es notable que la relación directa entre la μ y el rendimiento, que existió en las cepas parentales en el sistema con Aw de 0.99, no se observa en este sistema en ningún tipo de cepa (haploide o diploide). Las cepas diploides tienen mayores rendimientos que las cepas haploides, pero en menor magnitud que en sistema anterior, (con excepción de DAR2 que es la cepa que presenta mayor rendimiento y en un tiempo de 12 h). En cuanto a los valores de μ , disminuyen con respecto al sistema con Aw de 0.99, esto puede deberse a que la Aw baja causa un mayor estrés en las cepas y necesitan de mayor energía para su mantenimiento y crecimiento y no para la producción de enzimas, aunque eso sólo sucede con las cepas diploides, ya que en las parentales sucede lo contrario. En las cepas diploides la μ es mayor que en las cepas haploides, pero igual que en el sistema anterior, no tiene una relación directa o inversa con respecto al rendimiento.

En este caso la cepa DAR2, tiene el valor de μ más bajo (0.1 h^{-1}), pero el mayor rendimiento (26225 UI/g de biomasa), luego la cepa AD96-4 que tiene una μ de 0.15 h^{-1} es la que le sigue, a la cepa anterior, en el valor de rendimiento (7967 UI/g de biomasa). Sin embargo en la cepa AD96-3, ocurre que el valor de μ es de 0.18 h^{-1} y su rendimiento es de 1033 UI/g de biomasa y finalmente la cepa DAR1 presenta el mayor valor de μ (0.45 h^{-1}) y su rendimiento fue de 6333 UI/g de biomasa.

En este caso la productividad que presentan las cepas diploides DAR1, DAR2 y AD96-4, supera a la que poseen las cepas haploides por un orden de magnitud (C28B25, $p=441$; Aw96-3, $p=254$ y Aw96-4, $p=140$; DAR1, $p=1233$; DAR2, $p=1324$; AD96-4, $p=2677$, UI/hL). En cuanto a AD96-3, pudimos ver que en este sistema su productividad es mayor que en el sistema anterior y sólo incrementa su productividad, en comparación con las cepas mutantes haploides, Aw96-3 y Aw96-4 ($p=254$ y $p=140$ UI/hL, respectivamente), aunque tienen el mismo orden de magnitud (AD96-3, $p=328$ UI/hL). En este sistema la cepa con mayor productividad, fue también la cepa autodiploide AD96-4.

Al realizar un análisis con respecto a los rendimientos que se obtuvieron por la cepa AD96-3, que son muy parecidos a los rendimientos presentados por su cepa parental Aw96-3, en el sistema con Aw de 0.96, se podría creer que se trataba de una cepa haploide también (la misma cepa Aw96-3), sin embargo, al analizar otros datos obtenidos durante la fermentación pudimos concluir que se trataba de una cepa diploide y diferente de su haploide original, como lo fue la cantidad de biomasa, el pH y el perfil de consumo de sustrato. La cantidad de biomasa producida a las 48 h por AD96-3 con Aw de 0.99 fue de 37 g/L, mientras que para Aw96-3 fue de 42 g/L y con Aw de 0.96, AD96-3 produjo 42 g/L y Aw96-3, 35 g/L. Estos datos muestran la diferencia que existe en magnitud de la cantidad de biomasa así como el cambio en el comportamiento ya explicado anteriormente (con Aw mayor, mayor cantidad de biomasa y con Aw menor, menor cantidad de biomasa, en cepas parentales y lo contrario en las cepas diploides).

Otro dato con el que se podría probar que no se trataba de la misma cepa fue el consumo de sustrato. La eficiencia de consumo de sustrato de AD96-3 en un sistema con Aw de 0.99 fue del 95% mientras que la eficiencia de Aw96-3 en este sistema fue del 78%, es decir AD96-3 tiene una diferencia en la eficiencia de consumo de sustrato del 18% con Aw96-3. En el sistema con Aw de 0.96 la eficiencia de AD96-3 fue del 95% también y la de Aw96-3 fue del 66%, con lo que tenemos una diferencia del 29%.

Con los resultados obtenidos en la fermentación, pudimos concluir que la cepa AD96-3 y Aw96-3 son cepas distintas y AD96-3 es efectivamente una cepa diploide ya que como se mencionó antes, las pruebas de diploidia (tamaño de espora y haploidización) fueron positivas.

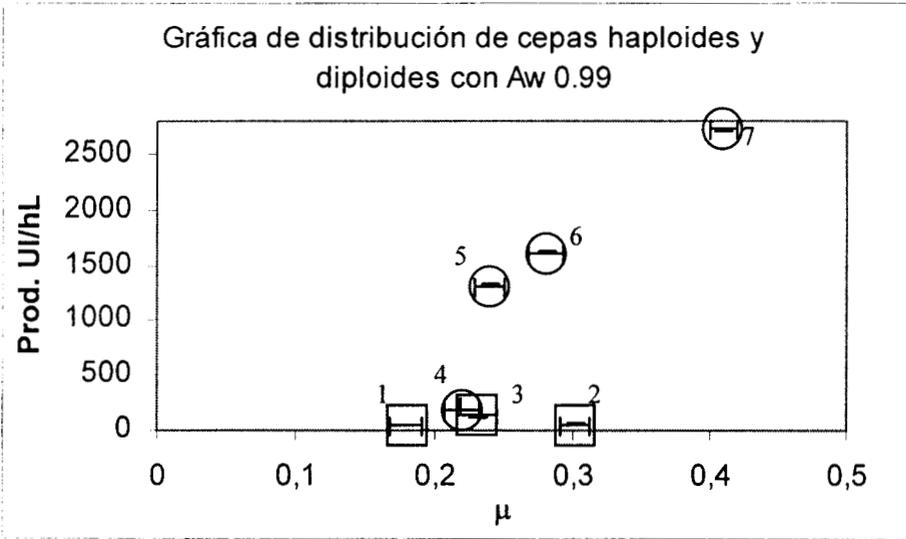
Como conclusión del análisis de estas tablas, podemos decir que, de las cuatro cepas, dos diploides y dos autodiplodes, obtenidas, dos de ellas muestran productividades mayores a las productividades de las cepas haploides originales hasta en dos ordenes de magnitud y en ambos sistemas, (DAR2 y AD96-4). Las cepas DAR1 Y AD96-3, muestran productividades superiores a las de las cepas parentales, pero en sólo uno de los dos sistemas probados, lo que nos indica que son más susceptibles a los cambios de Aw en el medio de cultivo. Sin embargo pudiera realizarse una optimización del medio de cultivo y las condiciones de fermentación y alcanzarse productividades elevadas, con lo que se podría usar esas cepas en fermentaciones específicas.

Al igual que los autores, Kirimura y col, 1988 y Sarangbin y col., 1994, hemos encontrado cepas con buenos niveles de productividad. Sin embargo la cepa con mayor productividad, es una cepa autodiploide (AD96-4), con lo que podemos corroborar que este fenómeno ocurre también en la producción de enzimas.

Aún no es conocida la razón por la que una cruce, y la formación de una cepa diploide o autodiploide, puede hacer que se eleven tanto los niveles de productividad. Una razón puede ser que la complementación de algunas mutaciones de las cepas cruzadas, pueda estar generando la desregulación en la producción de invertasa, en este caso particular. Otra causa de este fenómeno, puede ser la morfología de crecimiento de las cepas, en donde se ve diferencia en la longitud, la forma y el espesor de los micelios de las cepas haploides en comparación con las cepas diploides probadas en este trabajo (experimentos no mostrados).

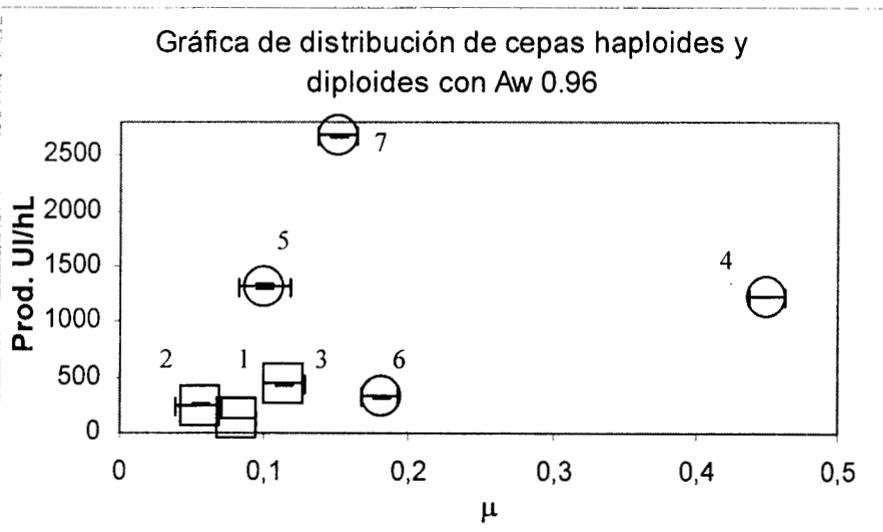
4.9.- DISTRIBUCION DE LAS CEPAS DE *A. niger* SOBRE UN PLANO FORMADO POR LOS VALORES DE μ Y PRODUCTIVIDAD

Para poder clasificar a las cepas por su eficiencia en la producción de invertasa se realizó un plano en el que se grafica la productividad medida, contra la velocidad específica de crecimiento, para cada uno de los sistemas de fermentación. Este plano se muestra en los gráficos 31 y 32.



- 1.- C28B25
- 2.- Aw96-3
- 3.- Aw96-4
- 4.- DAR1
- 5.- DAR2
- 6.- AD96-3
- 7.- AD96-4

Gráfico 31.- Distribución de cepas haploides y diploides con Aw 0.99



- 1.- C28B25
- 2.- Aw96-3
- 3.- Aw96-4
- 4.- DAR1
- 5.- DAR2
- 6.- AD96-3
- 7.- AD96-4

Gráfico 32.- distribución de cepas haploides y diploides con Aw de 0.96

Con estas gráficas se pretende ubicar o encontrar una región en donde se ubican las cepas haploides y diploides, así como una tendencia en las relaciones de productividad y el valor de μ para los dos sistemas de Aw (0.99 y 0.96).

La parte central de la figura, corresponde al valor promedio sobre cada eje, la región ocupada por la figura, corresponde a las desviaciones estándar también en cada uno de los ejes.

Pudimos observar que la región superior del plano, es en la que se ubican tres de las cepas diploides y la región inferior, es en la que se ubican todas las cepas haploides y una diploide diferente para cada sistema. Como ya se ha mencionado, no pudimos, ni con este plano, establecer la relación (directa o inversa) entre la μ y la productividad, debido a que se identificaron cepas con comportamientos diversos en ambos sistemas, esto puede ser por el efecto que tengan otros factores sobre los parámetros medidos.

Para el sistema con A_w de 0.99, la cepa con mejores características de producción de invertasa y de velocidad específica de crecimiento es la AD96-4, ya que tiene una productividad elevada y una baja velocidad específica de crecimiento, al menos en el sistema con A_w de 0.96, que es lo más útil en los procesos de producción industrial. En el sistema con A_w 0.99 la mejor cepa es también AD96-4, que tiene una productividad de casi tres veces la de las cepas haploides y un valor de μ de 0.41 h^{-1} .

CAPÍTULO V

**CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES**

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

En este capítulo se puntualizan las observaciones más importantes de este trabajo, así como la conclusión que se obtuvo y se dan algunas recomendaciones que pueden servir como principios de trabajos posteriores a esta tesis.

5.1. OBSERVACIONES

- ❖ Se pudo observar que a pesar de provenir de una sola cepa silvestre, las mutantes Aw96-3 y Aw96-4, debido a la mutación a la que fueron expuestas, son en la actualidad, dos cepas completamente distintas con diferentes patrones de resistencia a la 2DG y distinta sensibilidad a la irradiación con luz UV.
- ❖ El proceso de enriquecimiento, utilizado para el aislamiento de cepas auxótrofas, probó tener un buen funcionamiento y acortar en gran medida el tiempo de obtención de dichas auxótrofas debido a que el número de colonias analizadas fue de aproximadamente 200.
- ❖ En cuanto a la formación de cepas diploides y autodiploides, el proceso usado fue efectivo y se tuvo una respuesta positiva a las dos pruebas de diploidía realizadas.
- ❖ Después de realizar pruebas de sensibilidad a 2DG, todas las cepas, incluyendo las auxótrofas, pudimos ver que sólo las cepas procedente de Aw96-4, son resistentes al análogo tóxico de la glucosa 2DG. Las cepas derivadas de Aw96-3 (o la propia Aw96-3), tienen por el contrario, fenotipo de sensibilidad a la 2DG.
- ❖ En los experimentos de fermentación sólida, con PUF como soporte, usando como inóculo a las cepas parentales, pudimos ver que, en cuanto a biomasa, pH y actividad enzimática, las cepas Aw96-3 y Aw96-4 son mutantes sólo de productividad, presentando un comportamiento normal en la producción de biomasa y pH.
- ❖ En las fermentaciones, tanto de las cepas haploides como de las cepas diploides, la Actividad de Agua (Aw) influye de manera importante sobre los perfiles de producción de invertasa. También influye sobre las velocidades específicas de crecimiento de todas las cepas.
- ❖ Las cepas diploides y autodiploides tienen fenotipo de sobreproducción de invertasa en medio sólido en los dos sistemas con diferente Aw, predominando los rendimientos obtenidos en el sistema con Aw0.99 frente a los de Aw 0.96, excepto para DAR2.

- ❖ La actividad de la enzima producida por la dioploide AD96-4, es más estable que la producida por las demás cepas, ya que en los gráficos de actividad invertasa, el punto más alto de producción no desciende tan rápidamente (Gráfico 26).
- ❖ La cepa AD96-4, en el sistema con A_w de 0.99, es la mejor productora de invertasa, (por su mayor velocidad específica de crecimiento y sus altos rendimientos) mientras que en el sistema con A_w de 0.96, la cepa DAR1 se puede considerar como la más productora, (debido a que, si bien su rendimiento es de aproximadamente la quinta parte de la que más produce, su velocidad específica de crecimiento es casi 5 veces mayor que la de DAR2).
- ❖ En este trabajo, no se pudo encontrar una relación directa o inversamente proporcional, entre el rendimiento (Y_P/X) y la velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas.
- ❖ Las condiciones óptimas de producción de la enzima invertasa varían entre las distintas cepas analizadas: en unos casos los niveles de producción fueron óptimos en sistemas con A_w de 0.99 (DAR1, AD96-3 y AD96-4, con rendimientos mayores que en el sistema de menor valor de A_w) y en otros casos el mejor sistema fue el de A_w de 0.96 (DAR2), por lo tanto dependiendo del sistema de cultivo, se debe considerar un tipo específico de cepa para asegurar los mejores niveles de producción. Es necesario, entonces, realizar estudios previos con las cepas a utilizar con el fin de determinar las condiciones de cultivo óptimas.
- ❖ Finalmente el hecho de que al bajar el valor de A_w en FES se eleven las actividades específicas, hace atractivo este criterio para obtener extractos crudos enzimáticos enriquecidos, lo que facilitaría procesos posteriores de purificación (además de que de esa forma se obtuvieron extractos más estables).

5.2. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que hemos corroborado la hipótesis principal de esta tesis: es posible elevar, en un orden de magnitud, la productividad de invertasa, mediante la obtención de cepas diploides y autodiploides, a partir de cepas haploides mejoradas por mutación al azar y selección por su resistencia a 2DG.

5.3. RECOMENDACIONES

- ❖ Con los resultados obtenidos, es necesario optimizar las condiciones de producción de invertasa para cada una de las cepas diploides obtenidas, ya que no se puede generalizar.
- ❖ En este trabajo, sólo se determinó la estabilidad de las cepas diploides, con la prueba de haploidización, pero no es directa. Para determinar la estabilidad de las diploides es necesario hacer pruebas de resiembra y asegurar que siguen siendo diploides (ausencia de sectores distintos morfológicamente) y mantienen su productividad de invertasa.
- ❖ Para determinar la versatilidad metabólica que poseen las cepas diploides y autodiploides obtenidas, es necesario realizar pruebas cualitativas en placa, por detección de halos de hidrólisis, del potencial de excreción de otros complejos enzimáticos que se sabe son característicos de la especie *Aspergillus niger*.
- ❖ Durante este trabajo se hizo un estudio preliminar de la morfología de crecimiento del micelio de las cepas y se encontraron diferencias entre los micelios de las cepas diploides y los de las cepas haploides, esto podría desarrollarse más a fondo para encontrar una relación entre la forma de crecimiento del micelio y la sobreproducción de enzimas con el fin de tener una forma más sencilla de identificar y clasificar a distintas cepas.
- ❖ Existen trabajos anteriores, en los que se relaciona el índice de esporulación de las colonias con la producción de enzimas. Este estudio podría seguirse con las cepas diploides obtenidas y encontrar si caen dentro de esta relación (Minjares y col., 1997).
- ❖ Sería de gran interés que las cepas obtenidas, después de tener ya sus parámetros metabólicos, fueran probadas en sistemas sólidos pero utilizando como soporte algún residuo agroindustrial para ver si la expresión de los fenotipos de sobreproducción de invertasa son similares o se induce la producción de otro tipo de metabolitos como enzimas y ácidos orgánicos.

CAPÍTULO VI

ANEXOS

6.- ANEXOS

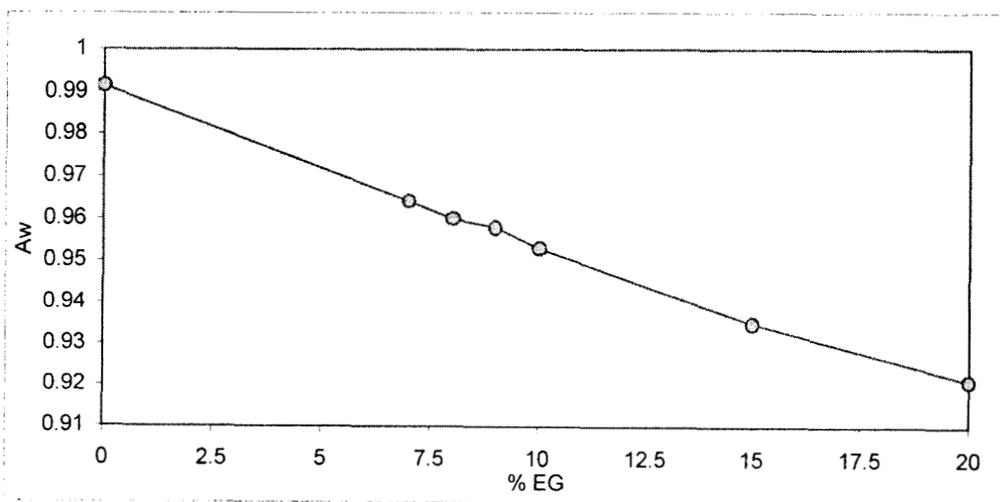
En este capítulo se presentan las curvas patrón que se realizaron para las determinaciones de actividad invertasa, proteína y azúcares totales en cada una de las fermentaciones realizadas en este trabajo.

6.1 ANEXO 1

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ETILENGLICOL SOBRE LA A_w DEL MEDIO DE CULTIVO

Con el fin de encontrar la proporción de etilenglicol que debía adicionarse al medio para que su valor de A_w fuera de 0.96, se realizó el siguiente gráfico en el que se agregaron distintos porcentajes de etilenglicol al medio. Posteriormente, con las distintas mezclas se embebieron cubos de poliuretano de 0.125 cm^3 y se les midió la A_w en un equipo Acualat. Los resultados son los siguientes:

% ETILENGLICOL	TEMPERATURA	A_w	VALOR PROMEDIO DE A_w
0	21.7	0.992	0.9915
0	28.2	0.991	
7	28.5	0.964	0.964
7	28.1	0.964	
8	27.6	0.960	0.96
8	27.2	0.960	
9	26.7	0.957	0.958
9	31.5	0.959	
10	31.6	0.954	0.953
10	31.5	0.953	
15	31.3	0.934	0.935
15	30.6	0.936	
20	30.9	0.921	0.921
20	31.2	0.921	



Efecto de la concentración de etilenglicol sobre la A_w del medio de cultivo

Con esos resultados pudimos encontrar que el porcentaje de etilenglicol que se debería adicionar al medio para modificar su valor de actividad de agua de 0.99 a 0.96 fue del 8%

6.2. ANEXO 2

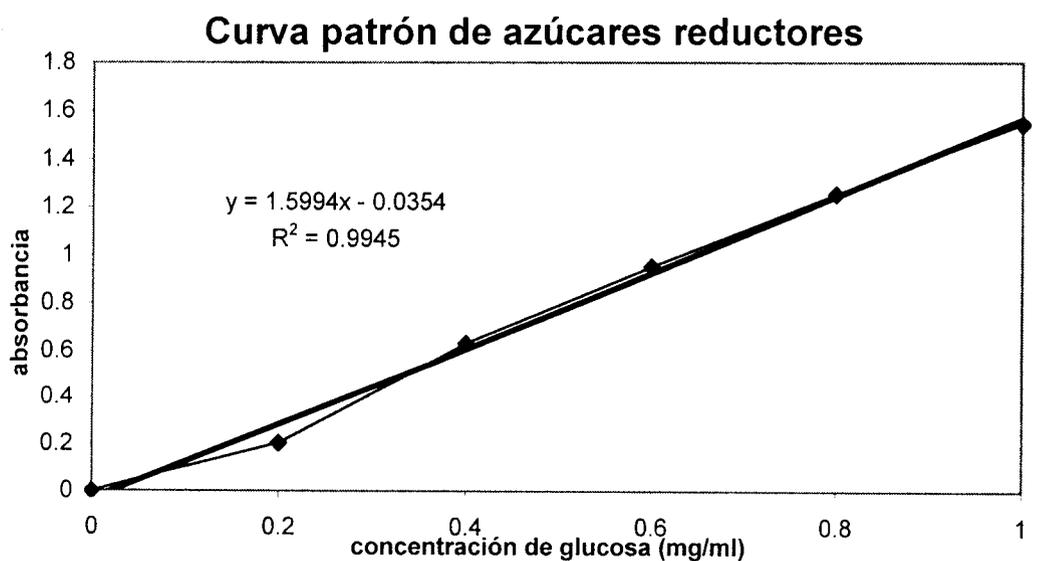
CURVA PATRON PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DE DNS.

Para determinar la cantidad de azúcares reductores presentes en las muestras se necesitó construir una curva patrón utilizando glucosa como referencia.

Se preparó una solución de glucosa (1g/L) y se hicieron las siguientes diluciones.

Agua destilada (ml)	Solución de glucosa (ml)	Volumen de análisis (ml)	Concentración de glucosa (mg/ml)
1.0	0	1.0	0
0.8	0.2	1.0	0.2
0.6	0.4	1.0	0.4
0.4	0.6	1.0	0.6
0.2	0.8	1.0	0.8
0	1.0	1.0	1.0

A cada tubo con la correspondiente dilución se le adicionó 1 ml del reactivo de DNS, se homogenizaron y se colocaron en un baño metabólico a 30°C durante 30 minutos, junto con los tubos de las muestras. Después se llevaron a ebulición (a baño María) por 5 minutos y se enfriaron en hielo. Finalmente se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 575 nm, la determinación se hizo por triplicado. La curva fue la siguiente:



A partir de este gráfico se obtuvo la línea de tendencia y los parámetros de la pendiente y ordenada al origen de la ecuación de la recta:

$$y = mx + b.$$

Donde:

y= absorbancia

x= concentración de azúcares reductores

b= ordenada al origen

Mediante el despeje de la concentración de esta ecuación se puede, teniendo la absorbancia, encontrar la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra (Miller, 1959).

6.3 ANEXO 3

CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DEL COLORANTE LIGADO A LA PROTEÍNA DE BRADFORD.

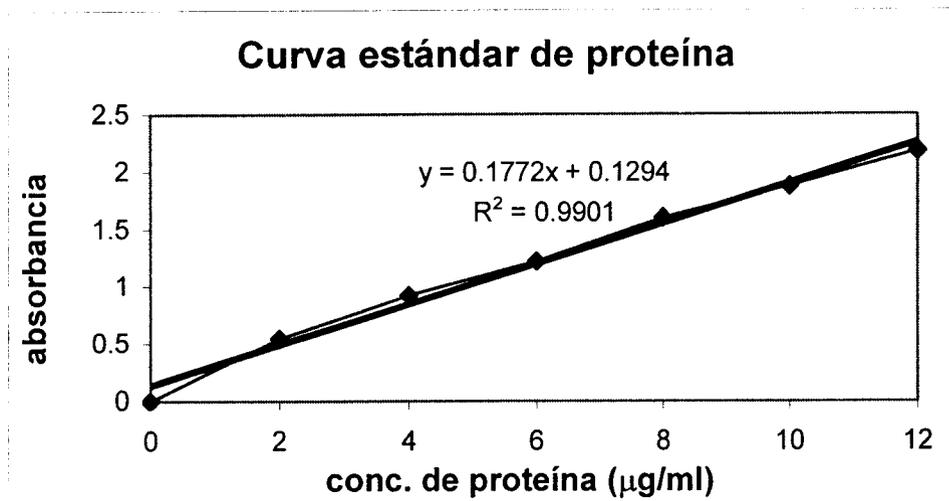
En este anexo se muestra la preparación de la curva estándar para la determinación de las proteínas totales, usando como referencia la seroalbúmina bovina.

Se preparó una solución de seroalbúmina bovina (100µg/ml), y se utilizó el reactivo de Bradfor. La construcción de la curva se realizó con las siguientes diluciones .

Solución de seroalbúmina bovina (µl)	Agua destilada (µl)	Volumen de análisis (µl)	Concentración final de proteína p/tubo. (µg/ml)
0	800	800	0
20	780	800	2
40	760	800	4
60	740	800	6
80	720	800	8
100	700	800	10
120	680	800	12

Cada dilución se hizo por triplicado. A cada tubo con la dilución correspondiente se le adicionaron 200

µl del reactivo de Bradfor, se homogenizaron en un vórtex y se dejaron estabilizar durante 5 minutos, después de este tiempo se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. La curva es la siguiente.



Al igual que en el procedimiento anterior, se obtuvieron los parámetros de la pendiente y la ordenada al origen a partir de esta curva y su línea de tendencia. De la misma forma se utilizó la ecuación de la recta

$$y = mx + b,$$

Donde:

y = Absorbancia

x = Concentración de proteína

b = Ordenada al origen

despejando x, para obtener la concentración de proteína de las muestras.

6.4.- ANEXO 4

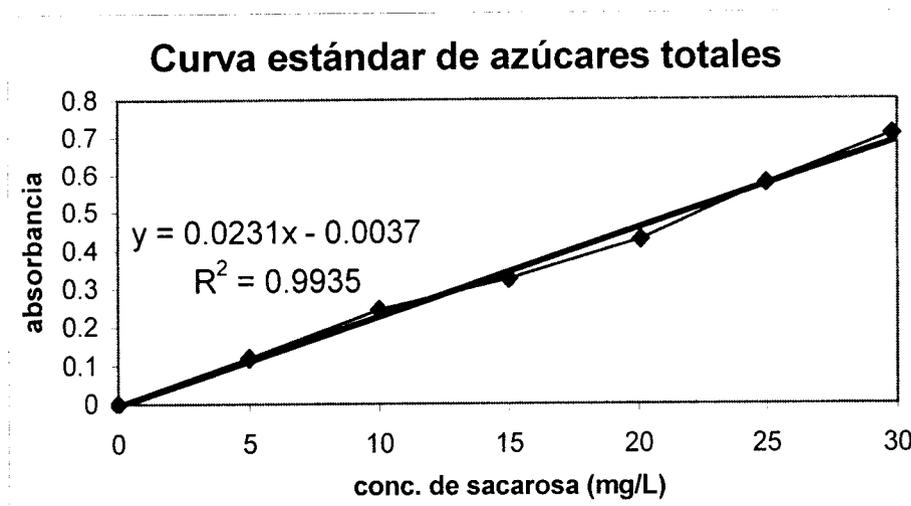
CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE SUSTRATO (AZÚCARES TOTALES) POR EL MÉTODO DE ANTRONA.

El sustrato utilizado en las fermentaciones realizadas en este trabajo fue la sacarosa. Para determinar su consumo se utilizó el método de determinación de azúcares totales de antrona (Trevelyan, 1952) y se usó precisamente la sacarosa como referencia.

Se preparó una solución de sacarosa (50 mg/L) y el reactivo de antrona. La curva se determinó mediante las siguientes diluciones.

Agua destilada (µl)	Solución de sacarosa (µl)	Volumen de análisis (µl)	Concentración de sacarosa (mg/l)
1000	0	1000	0
900	100	1000	5
800	200	1000	10
700	300	1000	15
600	400	1000	20
500	500	1000	25
400	600	1000	30

Se colocaron los 1000 μl de cada dilución en tubos de ensayo, por triplicado, y se colocaron en una gradilla dentro de agua con hielo, en ese momento se les adicionaron 2 ml del reactivo de antrona se homogenizaron con un vórtex y se llevaron a ebullición (a baño María) durante 10 minutos. Después de este tiempo se dejaron enfriar en agua con hielo y se leyeron sus absorbancias a 625 nm. La curva obtenida fue la siguiente:

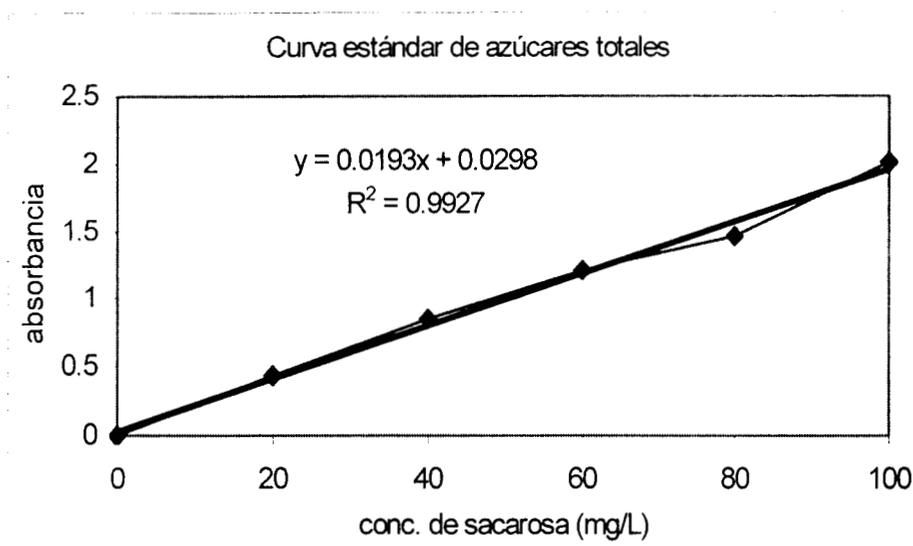


Como podemos observar con el coeficiente de determinación (R^2), la regresión es buena, sin embargo, si utilizáramos esta curva para comparar nuestras muestras, tendríamos que hacer diluciones de 1:10000, pero si aumentáramos la concentración final de la curva a 100 mg/L, entonces sólo se harían diluciones de las muestras de 1:1000. Se realizó este cambio para verificar que no se alteraba la linealidad de la curva con estas nuevas condiciones. Las diluciones fueron las siguientes.

Agua destilada (μl)	Solución de sacarosa (μl)	Volumen de análisis (μl)	Concentración de sacarosa (mg/l)
1000	0	1000	0
800	200	1000	20
600	400	1000	40
400	600	1000	60
200	800	1000	80
0	1000	1000	100

Se realizó el mismo procedimiento para la determinación, por triplicado y la curva obtenida fue:

225555



Con estos resultados pudimos verificar que era factible el aumento en la concentración de la solución de sacarosa, ya que el coeficiente de determinación (R^2) se considera bueno para esta regresión, por lo que en la determinación de azúcares totales de las muestras se usó esta curva.

El procedimiento matemático para determinar la concentración de azúcares totales en las muestras es el mismo que se ha utilizado en los anexos anteriores, se usó la ecuación de la recta despejando x , que es la concentración de azúcares totales, y tomando y como la absorbancia de las muestras.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Allen, K. E., MacNally, M. T., Lowendorf, H. S., Slayman, C. W., Free, S. J. (1989). Deoxiglucose-Resistance Mutants of *Neurospora crassa*: isolation, Mapping and Biochemical Characterisation. J. Bacteriol. 171:53-58.

Antier P., Minjares A., Roussos S., Raimbault M. and Viniestra González G. (1993). Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. Enzyme Microbial Technology. 15:254-260

Aquiáhutl, M. A., Raimbault, M., Roussos, S and Trejo, M. R. (1987). In Solid-State Fermentation in Biocomversion of Agroindustrial Raw Materials. Proceedings of the Seminar ORSTOM-Montpellier, France. 13-26.

Aranda-Tamaura, C., y Loera, O.(1999). Producción de xilanasas por una cepa diploide de *Aspergillus niger*. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería, Huatulco, Oax., Septiembre

Barredo, J. L.; Alvarez, E.; Cantoral, J. M.; Díaz, B. y Mautía, J. F. (1988). Glucokinase-deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* is derepressed in glucose catabolite regulation of both β -galactosidase and penicillin biosynthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 32:1061-1067.

Bennett, J. W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in Biotechnology. Journal of Biotechnology. 66:101-107.

Boddy L. M., Berges T., Barreau C., Vainstein M.H., Dobson M. J., Ballance D. J. and Peberdy J. F.. (1993). Purification and characterisation of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. Curr Genet 24:60-66

Bodie E. A., Armstrong G. L. and Dunn-Coleman, N. S.(1994).Strain improvement of chymosin-producing strain of *Aspergillus niger* var. Awamori using parasexual recombination. Enzyme and Microbial Technology. 16:5: 376-382.

Bradford, M. (1976). A quick and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Crueger, W. y Crueger, A. (1989). Biotecnología. 3ª edición. Edit. Acribia. España.

Debets, Fons.(1990).Genetic analysis of *Aspergillus niger*. Tesis doctoral. Universidad de Wageningen.

Demain, L. Arnold y Solorno Nadine A. (1986). Solid-State Fermentations. Edit. Manual of industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Díaz-Godínez G. (1997). Producción de exopoligalacturonasas por fermentación en medio sólido utilizando como soporte espuma de poliuretano. Tesis de Maestría, departamento de Biotecnología. UAM-I, México.
- El-Ghaouth Ahmed, Wilson Charles L. and Wisniewski Michael. (1997). Antifungal activity of 2-deoxy-D-glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Rizophus stolonifer*: Ultrastructural and cytochemical aspects. Biochemistry and Cell Biology. Phytopathology. 87 :772-779.
- Fisher, L. J., Bittman, S., Mir, Z., Mir, P. And Shelford, J. A. (1993). Nutritional evaluation of ensilage made from intercrop ped corn and sunflowers. Can. J. Anim. Sci. 73:539-545.
- Hoh K Y. Tan T K. and Yeoh H H . (1992). Protoplast fusion of beta glucosidasa producing *Aspergillus niger* strains. Applied Biochemistry & Biotechnology 37:1: 81-88.
- Hrubant, G. R. (1985). Fermentative upgrading of wastes for animal feeding in microbiology of fermented foods. By Wood Brian, J. B. Vol.2 Edit. Elsevier Applied Science Publishers. New York, USA. pp.113-131.
- Ilczuk Z. And Fiedurek J. (1985). Synthesis of glucoamylase by somatic diploids of *Aspergillus niger* in submerged culture conditions. Starch Staerke. 37:12:428-431.
- Kirimura K, Lee S. P. Nakajima I. Kawabe S. and Usami S. (1988a). Citric acid production by the diploid strains of *Aspergillus niger* obtained by protoplast fusion. Applied Microbiology and Biotechnology. 27:5-6:504-506.
- Kirimura K, Lee S. P. Nakajima I. Kawabe S. and Usami S. (1988b). Improvement in citric acid production by haploidization of *Aspergillus niger* diploid strains. Journal of Fermentation Technology. 66:4:375-382.
- Loera Corral O. (1994). Caracterización de Mutantes de *Aspergillus niger* Sobreproductoras de Pectinasas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México. D. F.
- Loera O., Aguirre J. and Viniegra-González G. (1999). Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. Enzyme and Microbial Technology. 25:103-108
- Loera O. and Viniegra-González G.(1998). Identification of growth phenotypes in *Aspergillus niger* pectinase over-producing mutants using image analysis procedures. Biotechnology Techniques. 12:11: 801-804.
- Meng-Chen H., Michael P. W., Thomas E. C. and Ralph A. D. (1995). Sequence analysis of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase *pelA* gene and evidence for binding of promoter regions to CREA, a regulator of carbon catabolite repression. Curr Genet 27:142-149.
- Miller, L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31:426-428.

- Minjares-Carranco, A., Trejo-Aguilar, B. A., Aguilar, G., and Viniegra-González G. (1997). Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 21: 25-31.
- Monroy H., O. y Viniegra G., G. (1981). Biología para el aprovechamiento de desperdicios orgánicos. A. G. T. Editor, México.
- Moo-Yong, M., Morreira, A. R. And Tengerdy (1981). Principles of solid-substrate fermentation. In *Advances in Biochemical Engineering*. Herhtred 19:1-69.
- Paredes López, O. y Alpuche Solís, A. G. (1992). Biología, Nutrición y Medio Ambiente. 5° Simposium sobre nutrición. Dr. Salvador Zubirán. Interfase de la Nutrición con la Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Parvez S., Rajoka M. I., Ahmed M. N., Latif F., Shahid R. and Malik K. A. (1998). Citric acid production from sugar cane molasses by 2-Deoxyglucose-Resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 43:1:59-62.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Forbes, E. (1953). Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* 8:198-210
- Ruiz Pavón Lorena B. (1999). Estudio de la regulación de la producción de la invertasa por diferentes cepas de *Aspergillus niger* en medio líquido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México D. F.
- Sarangbin S., Morikawa S., Kirimura K. And Usami S. (1994). Formation of autodiploid strains in *Aspergillus niger* and their application to citric acid production from starch. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 77:5: 474-478.
- Solís-Pereira S., Favela Torres E., Viniegra González G., Gutierrez-Rojas M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 39:36-41.
- Solís S., Flores M. E. and Huitrón C. (1996). Protoplasts from pectinolytic fungi: isolation, regeneration and pectinolytic enzyme production.. *Letters in Applied Microbiology.* 23: 36-42.
- Solís S., Flores M. E. and Huitrón C. (1997). Improvement of pectinase production by interspecific hybrids of *Aspergillus* strains. *Letters in Applied Microbiology.* 24: 77-81.
- Smith, John E. and Berry, David R. (1975). The Filamentous Fungi. Vol. 1. *Industrial Mycology.* Edit. Edward Arnold. London, Great Britain.
- Susuki A., Sarangbin S., Kirimura K. and Usami S. (1996). Direct production of citric acid from starch by a 2-Deoxyglucose-Resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 4: 320-323.

Trevelyan, W. E. and Harrison, J. S. (1952). Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. Biochem. J. 50:298.

Ward Owen, P. (1989). Biología de la fermentación, principios, procesos y productos. Edit. Acribia. Zaragoza. España. pp 17,19,35, 128-132, 172-177.

Wiggins Philippa M.. (1990). Role of water in some Biological processes. Microbiological Reviews. Pp 432-449.

Zimmermann, F. K. y Scheel, I. (1977). Mutants of *Sacharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. Molec. Gen. Genet. 154:75-82.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Boyer, Paul D. (1972). The enzymes. 3ª edición. Vol. VII. Edit. Academic Press. New York.

De Abreu Pires, L. T., Zucchi, T. M. A. D. (1998). Ribonucleic acid treatment alters gene expression in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. Cellular and Molecular biology, 44:2: 303-313.

Dickman, M. B., Yarden, O. (1999). Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. Fungal Genetics and biology. 26:2:99-117.

Kundu P. N. Das A. (1985). A note on crossing experiments with *Aspergillus niger* for the production of calcium gluconate. Journal of Applied Bacteriology 59 :1: 1-6.

Masiero M. Bonatelli Junior R. (1989). Genetic study of auxotrophic and resistant mutants of *Aspergillus niger* and their glucoamylase production. Revista Brasileira de Genetica 12 :4:1989. 707-718.

Martínez T. A, Sánchez M. J., Rivas M. M. D., Barrera G. J. A., Yañez R. A., Ruipérez H. F. (1996). Uso de forrajes y subproductos en las explotaciones de vacuno de leche de la región de Murcia. Departamento de producción animal. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30071. Murcia, España.

Martinko Parker Madigan. (1998). Brock, Biología de los Microorganismos. 8ª edición. Edit. Prentice Hall, España.

Mongomery, C. Douglas.(1991). Diseño y análisis de experimentos. Edit. Grupo Editorial Iberoamérica.

Montiel-González, A. M., Pérez-Gil Romo, F. y Carmona, J. (1998). Utilización de bacterias lácticas en la conservación de subproducto de flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*) para la alimentación de rumiantes. Tesis de licenciatura. Departamento de Química y Bioquímica. TESE.

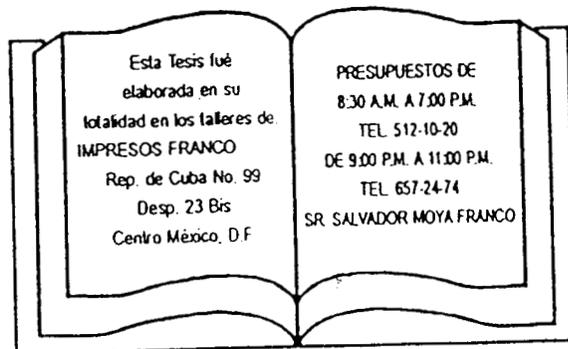
Ortíz Ortiz, L. V. Y Saldaña Jiménez L. I. (1984). Ensilado a partir de los subproductos fermentables de la caña de azúcar. Universidad la Salle. Méx. D.F.

Pandit A. and Maheshwart R. (1996). Brief Note:A demonstration of the role of Het genes in Heterokaryon formation in *Neurospora* under simulated field conditions. Fungal Genetics and Biology. 20:99-102.

Pinpinelli, S., Marini, A., Babudri, N., Morpugo, G.(1997). 6-N-hidroxilaminopurine (HAP)-induced accumulation of variability in haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans*. Current Genetics, 32:65:331-336.

Visser J., Bussink H. J., Witteveen C.(1995). Gene expression in filamentous fungi. Expression of pectinases and glucose oxidase in *Aspergillus niger*. Bioprocess Technol, 22:241-38.

Voet D. y Voet G. J.(1995). Biochemistry. 2ª. Edición Wiley, U.S.A. pp.1361.



Esta Tesis fué
elaborada en su
totalidad en los talleres de
IMPRESOS FRANCO
Rep. de Cuba No. 99
Desp. 23 Bis
Centro México, D.F.

PRESUPUESTOS DE
8:30 A.M. A 7:00 P.M.
TEL. 512-10-20
DE 9:00 P.M. A 11:00 P.M.
TEL. 657-24-74
SR. SALVADOR MOYA FRANCO