



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *Aspergillus flavipes*
FP-500 Y EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN
LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

CHRISTIAN RAFAEL GARCÍA CRUZ



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	PROF. RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO
VOCAL	PROF. RODOLFO PASTELIN PALACIOS
SECRETARIO	PROF. JOSE GUILLERMO AGUILAR OSORIO
PRIMER SUPLENTE	PROF. FRANCISCO RUIZ TERAN
SEGUNDO SUPLENTE	PROF. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

LUGAR DE TRABAJO:

LABORATORIO DE FISIOLÓGIA DE HONGOS FILAMENTOSOS,
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO
“E” FACULTAD DE QUÍMICA
UNAM.

DIRECCIÓN:

Circuito de la Investigación Científica s/n
Conjunto E, Facultad de Química
Ciudad Universitaria
C.P. 04510
México, D. F.

TELÉFONO: 56225306 Correo electrónico: gao@servidor.unam.mx

Asesor: José Guillermo Aguilar Osorio

Sustentante: Christian Rafael García Cruz

El presente trabajo se desarrolló con el apoyo de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Proyecto N° IN207603 y del Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”, periodo 2005-2006 de la Facultad de Química, UNAM

**DEDICADO CON TODO MI AMOR
A MIS PADRES Y HERMANA**

RECONOCIMIENTOS

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Estoy muy agradecido con usted por todo el apoyo que me brinda desde el primer día que llegue al laboratorio, no solo en lo académico sino también en lo personal. Muchas gracias!!!

Blanca Trejo

Gracias por su ayuda en la revisión de este trabajo.

Beto, Carlos y Gina

Gracias por su compañía y por compartir conmigo esos momentos de alegría.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A mis padres Narciso y Esther

No tengo palabras que puedan resumir en unas líneas todo el amor y admiración que siento por ustedes.

Muchas gracias por cuidar de mi cuando lo he necesitado, por guiarme, escucharme, educarme y muchas muchas gracias por brindarme su apoyo y confianza de manera incondicional.

A mi hermana Lili

Por su compañía, por nuestras peleas, por escucharme y sobre todo por tu cariño. Te Quiero Mucho!

A mis Abuelos Narciso y Aurea

Por cuidar de mí, por consentirme, por hacerme reír y por motivarme siempre para salir adelante. Gracias!

A mis abuelos José y Felisa(q.e.p.d)

Por su atención y sus cuidados. Eso es algo que no se olvida.

A Tomás García

Por sus palabras de aliento que siempre me ha dado, por escucharme y ayudarme cuando lo he necesitado.

A Fernando Cruz

Gracias por esos momentos que pasamos juntos jugando, viendo caricaturas, estudiando y por tantas cosas que hicimos juntos.

A mi amada Anayely

Por llegar y ser parte de mi vida, por tu apoyo y compañía a lo largo de todo este tiempo.

A mis amigos Luis, Emanuel y Toño

Por ser incondicionales y por todos esos momentos de alegría que hemos y estoy seguro que seguiremos compartiendo.

A mis amigos de la Facultad

Por permitirme compartir con ustedes momentos inolvidables.

A mis primos

Por esas reuniones en las que nos divertimos tanto.

Introducción	11
I. Marco teórico	13
1. Generalidades de los hongos	13
1.1 El sistema micelial	14
1.2 Regulación metabólica	15
2. Género <i>Aspergillus</i>	16
2.1 Generalidades	16
2.2 Taxonomía y Morfología	17
2.3 Fisiología	19
2.3.1 Disponibilidad de agua	19
2.3.2 Temperatura	20
2.3.3 pH	20
3. Pectina	21
3.1 Estructura	21
3.2 Aplicaciones	22
3.3 Degradación de la pectina	23
3.3.1 Enzimas que degradan el Homogalacturonano	23
3.3.2 Enzimas que degradan el Ramnogalacturonano	23
4. Mutagénesis	25
4.1 Generalidades	25
4.2 Clasificación de las mutaciones	26
4.3 Mutación con luz Ultravioleta	27

II. Objetivos	29
1. Objetivo General	29
1.1 Objetivos particulares	29
III. Materiales y Métodos	30
1. Microorganismos	30
1.1 Propagación del inóculo	30
2. Medios y condiciones de cultivo	30
3. Determinación de Biomasa	31
4. Determinación de actividades enzimáticas	32
4.1 Actividad exopectinolítica	32
4.2 Actividad endopectinolítica	32
4.3 Actividad pectinliasa	33
5. Metodologías para la recuperación de mutantes	33
5.1 Método de enriquecimiento por filtración para el aislamiento de mutantes	33
5.2 Recuperación directa	34
5.3 Resistencia a la represión catabólica	34
6. Determinación de azúcares reductores	34
7. Medios de cultivo	35
7.1 Medios líquidos	35
7.2 Medios sólidos	35

IV. Resultados y Discusión	37
1. Influencia de las condiciones de fermentación	
en la producción enzimática	37
2. Determinación de las curvas Dosis-Respuesta	39
3. Tratamientos mutagénicos	41
3.1 Metodología de recuperación directa	42
3.1.1 Recuperación directa 1	42
3.1.2 Recuperación directa 2	47
3.1.3 Recuperación directa 3	51
3.2 Metodología de enriquecimiento por filtración	56
3.3 Aislamiento mediante resistencia a la represión catabólica	61
4. Evaluación de las mutantes seleccionadas de cada tratamiento	
mutagénico en cáscara de limón y pectina	65
V. Conclusiones	71
VI. Referencias	72

Los hongos son organismos eucariotas, que se reproducen mediante esporas generalmente con reproducción sexual y asexual, no tienen clorofila, su nutrición es mediante absorción; el cuerpo consiste generalmente de filamentos ramificados con pared celular quitinosa.

Estos organismos tienen muchas aplicaciones benéficas para el ser humano y de hecho se han utilizado desde hace más de 6000 años.

Constituyen uno de los grupos de organismos más importantes para la vida del hombre, ya que son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica; pueden ser comestibles, venenosos o psicotrópicos; muchos son patógenos; otros, producen ciertas sustancias benéficas o intervienen en procesos de elaboración de algunos comestibles.

Las enzimas de origen microbiano tienen muchas aplicaciones en particular las producidas por hongos filamentosos y especialmente por cepas del género *Aspergillus*.

Actualmente las pectinasas se utilizan en la industrialización de jugos de frutas y vegetales, para aumentar los rendimientos de extracción, reducir los tiempos de filtración y facilitar las operaciones de concentración; así mismo, son de gran utilidad en la clarificación de vinos y jugos. Estos problemas de clarificación se deben a la presencia de pectinas, las cuales pueden degradarse por la acción de enzimas pectinolíticas presentes en el propio jugo o bien obtenidas y añadidas de fuentes externas.

La finalidad de este proyecto es obtener mutantes alteradas en la producción de enzimas pectinolíticas mediante alteraciones inducidas por mutagénesis en la cepa silvestre por efecto de la luz ultravioleta, seguido de un método de selección adecuado.

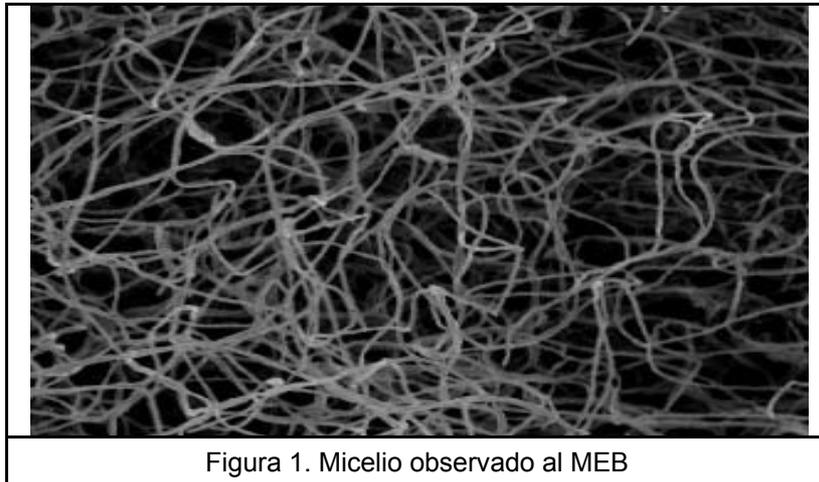
La obtención de mutantes alteradas en la producción de enzimas pectinolíticas resulta de importancia para el estudio de sus mecanismos de regulación.

1. Generalidades de los Hongos

Aunque se ha fragmentado bastante, aún la mayoría de las especies pertenecen al reino de los hongos, tienen características comunes de organización, nutrición, fisiología y reproducción.

Los integrantes del grupo son generalmente filamentosos, aunque hay unicelulares. El tipo unicelular es típico de las levaduras pero algunos hongos, especialmente algunos patógenos de animales, pueden existir tanto como filamentosos o como unicelulares.

Estos filamentos vegetativos de los hongos son denominados hifas y el conjunto de hifas se llama micelio.



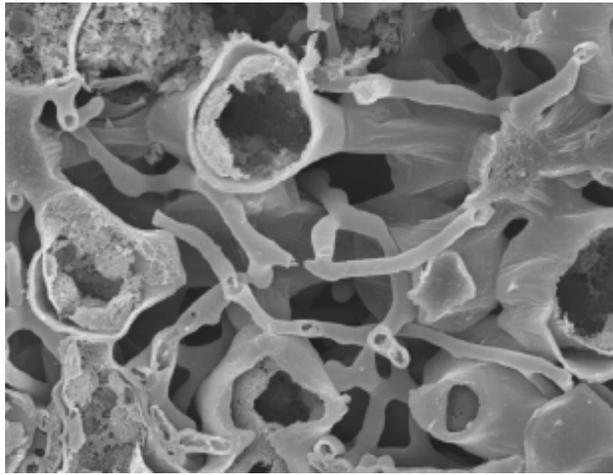


Figura 2. Hifas fúngicas en hoja de Guayaibí. MEB 1700x. Foto P.Dal Molin & A.M. González

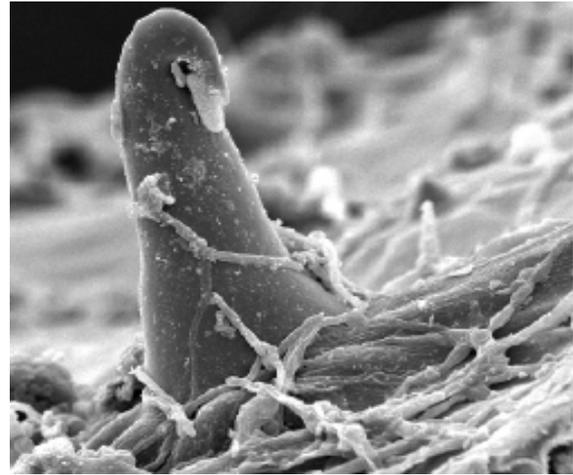


Figura 3. Hifas creciendo alrededor de un tricoma de *Mora* sp. MEB 800x. Foto P.Dal Molin & A.M. González

“El éxito evolutivo de los hongos puede ser atribuido básicamente a la capacidad de extensión y de penetrabilidad del micelio” (Bartnicki-García, 1987).

1.1 El Sistema Micelial

A lo largo de la mayor parte de su ciclo de vida, la mayoría de los hongos consta de hifas: células cilíndricas que se incrementan en longitud por crecimiento de uno de sus extremos. Puede considerarse que el ciclo de vida de un hongo comienza con la germinación de la espore. Esto ocurre generalmente con la aparición de un tubo germinal o hifa primaria que crece por extensión y dando lugar a ramificaciones. Así sucesivamente, se forma un complejo sistema radiante de hifas conocido como micelio (Carlile, 1995).

Para poder aprovechar los nutrientes presentes en los substratos, las hifas deben poder propagarse sobre ellos. Para esto, las partes viejas de las hifas se les adhieren y el alargamiento ocurre por el avance del ápice hifal; esta forma de crecimiento resulta muy efectiva ya que de ser intercalable conllevaría daños en las hifas por fricción y podría ser bloqueado por el choque del ápice con obstáculos. La

propagación del micelio se lleva a cabo de manera eficiente gracias al desarrollo de sus complejos y variados patrones de ramificación del micelio (Carlile, 1995).

El sistema micelial presenta características que pueden considerarse como desventajas, ya que resulta una estructura muy costosa en términos de sus requerimientos nutricionales ya que conforme crece, grandes cantidades de carbono y nitrógeno son abandonadas en sus partes viejas; además, el ápice hifal resulta una estructura vulnerable, constantemente expuesta a daño físico.

Se ha visto que una forma alterna altamente eficiente es la de las levaduras ya que la mayor economía en los materiales de la superficie se logra con células esféricas. Estas se reproducen por gemación, proceso en el que la célula madre no muere y la aparición de una yema toma un tiempo corto por lo que está menos expuesta a daño físico que el ápice hifal.

Las levaduras confieren ventajas cuando no hay necesidad de penetrar o extenderse sobre sustratos densos. Existen diversas especies fúngicas que son capaces de transformarse de una morfología a otra (dimórficas) en respuesta a estímulos ambientales (Carlile, 1995; Gow, 1995a).

1.2 Regulación metabólica

Los hongos responden a estímulos ambientales controlando la expresión genética y la secreción de enzimas particulares. Se ha demostrado, en estudios de producción de enzimas, que existen varios mecanismos para su regulación. En éstos se incluye la inducción, en donde la presencia de un sustrato adecuado (inductor) que puede ser metabolizado, activa o incrementa considerablemente la producción de enzimas; por ejemplo, la celobiosa, dímero formado por hidrólisis de la celulosa, actúa como inductor de celulasas.

En algunos casos la sustancia inductora no es necesariamente metabolizable (Archer y Wood, 1995).

La producción de enzimas puede también ser reprimida por crecer en presencia de compuestos que son los productos finales del metabolismo; por ejemplo, cuando los hongos celulolíticos crecen en presencia de compuestos como glucosa, ésta reprime la producción de celulasas. También hay sistemas constitutivos, es decir, sistemas en los cuales las enzimas siempre están presentes en las células, a diferencia de los sistemas que requieren necesariamente de un inductor.

Por otro lado, puede haber mecanismos de regulación en la actividad enzimática que consisten en la inhibición por retroalimentación, en donde el producto final de una vía metabólica regula la actividad de la primera enzima de esa vía. Por ejemplo, la glucosa inhibe la actividad de la endoglucanasa (Archer y Wood, 1995).

Estos son los principales mecanismos que administran los recursos celulares y que incrementan la eficiencia energética de la célula, permitiendo una respuesta relativamente rápida a cambios en la composición de nutrientes del medio (Archer y Wood, 1995).

2. *Genero Aspergillus*

2.1 Generalidades

Las especies de *Aspergillus* pertenecen a los primeros hongos que fueron cultivados en medios artificiales y estudiados por sus propiedades bioquímicas (Harvey and McNeil, 1994). Además de ser los que se presentan en mayor distribución geográfica, encontrándose desde regiones árticas hasta el Ecuador.

Los *Aspergillus* son de los hongos más omnívoros que existen, capaces de asimilar como alimento una enorme variedad de sustancias debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas (Hernández, 1995).

Varios de los productos producidos por algunas especies de *Aspergillus* (ejemplo *Aspergillus niger*) han obtenido el grado GRAS (Generalmente considerado como seguro), lo que permite sean usados en alimentos de consumo humano y animal. Entre otras características que han hecho que estos hongos sean utilizados en la industria y en alimentos, son: sus buenas capacidades fermentativas y altos niveles de secreción de proteína (pueden excretar hasta un 90% de las enzimas al medio de cultivo (Blandino et al, 2001)). Particularmente el amplio rango de enzimas producidas por *Aspergillus* para la degradación de polisacáridos de la pared celular de plantas (De Vries and Visser, 2001).

Actualmente, *Aspergillus* es utilizado en diversos procesos industriales para la elaboración de diversos productos que abarcan desde ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos y alimentos fermentados de varias clases. (Hernández, 1995)

2.2 Taxonomía y Morfología

El genero *Aspergillus* es un grupo de hongos filamentosos que tiene un gran número de especies. En 1926 la primera clasificación de estos hongos fue propuesta describiendo 11 grupos dentro del genero (Thom and Church, 1926). Una reexaminación del genero *Aspergillus* fue publicada por Thom y Raper (Thom and Raper, 1945), identificando 14 grupos distintos. Algunos de estos grupos son hongos patógenos (ejemplo: *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. parasiticus*), pero para fines de aplicación industrial son más importantes los miembros del grupo *Aspergillus* negros (*A. niger* y *A. tubingensis*). Adicionalmente de las técnicas

morfológicas tradicionales, las nuevas técnicas moleculares y bioquímicas se han usado en la reclasificación de este grupo. Estos análisis resultaron en la clara distinción de 8 subgrupos de *Aspergillus* negros (*A. niger*, *A. turbingensis*, *A. foetidus*, *A. carbonicus*, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. heteromorphus* y *A. ellipticus*) (De Vries and Visser, 2001).

Las especies de *Aspergillus niger* pertenecen a la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina (Hongo imperfecto), que comprenden a los hongos cuya reproducción es solamente asexual por medio de conidias. Dentro de Deuteromycotina, esta especie pertenece a la clase Hyphomycetos, la cual produce conidióforos en algunas partes del micelio (Parenicová, 2000).

A pesar de las técnicas nuevas tanto moleculares como bioquímicas, las estructuras morfológicas siguen siendo un importante criterio para la clasificación de *Aspergillus* (Harvey and McNeil, 1994). *Aspergillus* se caracteriza por una estructura típica: un conidióforo, que incluye un tallo y una cabeza conidial, que surge de la especialización de una estructura micelial llamada célula pie. Los conidióforos no son septados, se ensanchan hacia la punta y terminan en una estructura globosa, de incolora a amarillenta (vesículas).

Las vesículas tienen una superficie total de alrededor de 10 a 15 μm de largo. Las conidias son producidas sucesivamente desde las puntas de las filides, formando así cadenas no ramificadas y cada cadena contiene más de 100 conidias o esporas. Las conidias son más o menos globosas y tienen 4-5 μm de diámetro pero ocasionalmente son más pequeñas (Parenicová, 2000).

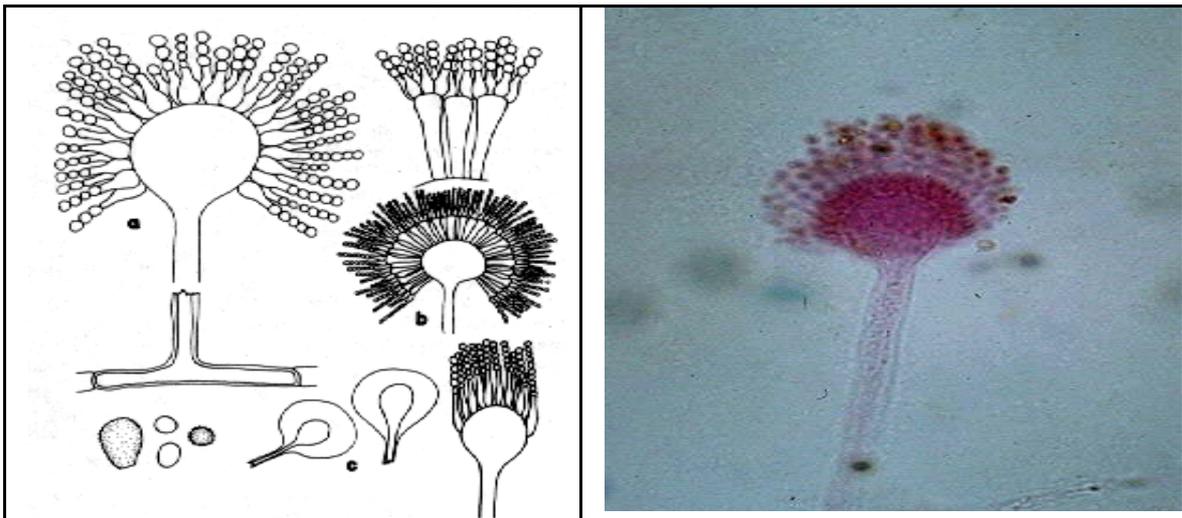


Figura 4. Representación esquemática y micrográfica de la estructura de *Aspergillus*.

2.3 Fisiología

Los miembros del género *Aspergillus* lo conforman una gran variedad de habitantes. Algunos de estos saprofitos viven en la tierra, otros en alimentos almacenados, y otros en vegetación en descomposición. Junto con *Penicillium*, son los géneros dominantes en productos almacenados, siendo capaces de crecer en situaciones de baja a_w y altas temperaturas (Harvey and McNeil, 1994).

2.3.1 Disponibilidad de agua

Las especies de *Aspergillus* difieren entre sí en sus requerimientos de a_w y por lo tanto la presencia de algunas especies en alimentos es frecuentemente un buen indicador de condiciones de almacenamiento.

El a_w puede afectar la germinación de diferentes maneras:

1. La mínima a_w para la germinación
2. El tiempo de la etapa de latencia (fase lag) antes de la germinación
3. La extensión del túbulo germinal

Por ejemplo germinación puede ocurrir a a_w baja pero sin crecimiento del micelio.

Con el descenso de a_w , el tiempo de etapa de latencia antes de la germinación se

incrementa. Los túbulos de germinación se elongan rápidamente a una alta a_w (Harvey and McNeil, 1994).

2.3.2 Temperatura

La mayoría de los hongos son mesófilos, siendo su rango de temperatura de 10-40°C. El genero *Aspergillus* crece con facilidad a temperaturas entre 15-30°C. Sin embargo, algunas especies crecen a temperaturas fuera de este rango; por ejemplo *A. flavipes* puede crecer de 6-40°C siendo su temperatura óptima de 26-28°C.

Las especies de *Aspergillus* pueden crecer a 4°C y además tener un buen crecimiento a 37°C. La sobrevivencia y tolerancia de *Aspergillus* a las bajas temperaturas significa que estas pueden ser conservadas en productos que incluso sean almacenados a temperaturas bajo cero (Harvey and McNeil, 1994).

2.3.3 pH

El nivel de pH es difícil de controlar, ya que desde que el hongo comienza a crecer se da un cambio del pH en el sustrato. Estos cambios pueden afectar directamente los procesos metabólicos modificando los límites de a_w en los cuales se lleva a cabo la germinación.

A. niger puede crecer en un rango de pH de 1.5-9.8, *A. candidus* entre 2.1-7.7 a una a_w de 1.0. Otros estudios han mostrado que algunas especies de *Aspergillus* con una a_w baja pueden crecer adecuadamente a un pH de 7.0 (Harvey and McNeil, 1994).

3. *Pectina*

3.1 Estructura

La pectina es un heteropolisacárido que se encuentra en la lámina media y en la pared celular primaria de las plantas superiores. La pectina funciona como pegamento que sostiene los otros polisacáridos de la pared celular, como la celulosa, hemicelulosa (ejemplo: xiloglucano o arabinoxilano) y proteínas como la glicoproteína rica en hidroxiprolina. La composición depende no solo de la especie, sino también del tejido, etapa de crecimiento, maduración, y las condiciones de crecimiento. Las pectinas son muy heterogéneas tanto en la estructura química como en el peso molecular (Parenicová, 2000).

Las pectinas contienen tres diferentes dominios: el Homogalacturonano (HG), el Ramnogalacturonano I (RG I) y el Ramnogalacturonano II (RG II). El homogalacturonano (HG) también llamado región lisa, consiste en una cadena principal de residuos de ácido D-galacturónico (GalA) unidos por enlaces α -1,4, los cuales pueden ser acetilados en el O-2 o O-3, o metilados en el O-6. Típicamente las cadenas de HG están formadas por 100 - 200 unidades de GalA y es la región más abundante de la pectina. Una modificación que se puede encontrar en este dominio es la substitución en C-3 del GalA con residuos de xilosa, produciendo xilogalacturonano (XGA). El ramnogalacturonano I (RG I) está formado por unidades del disacárido (1,2) α -L-ramnosa-(1,4)-ácido α -D-galacturónico. Este disacárido está unido con unidades idénticas por enlaces α -1,4 formando cadenas de aproximadamente 100 unidades. En general, del 20 a 80% de los residuos de ramnosa pueden estar unidos a cadenas largas (entre 50 o más residuos) de arabinano y galactano al 0-4. Las cadenas de arabinano consisten en una cadena de residuos de L-arabinosa unidos por enlace α -1,5, la cual a su vez puede estar

sustituida por residuos de L-arabinosa unidos por enlace α -1,3 y residuos feruloil unidos al O-2 de la arabinosa. Las cadenas laterales de galactano contienen residuos de D-galactosa unidos por enlace β -1,4, los cuales pueden estar sustituidos por residuos feruloil en el O-6. El RG II también es una región ramificada, formada por residuos de GalA unidos en α -1,4, substituidos con cadenas heteropoliméricas que contienen hasta 11 diferentes azúcares incluyendo apiosa, 2-O-metil-xilosa, 2-O-metil-fucosa, ácido acerínico y ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico. Al parecer tanto el RG I y el RG II están unidos al HG (Willats et al, 2001; De Vries and Visser, 2001)

3.2 Aplicaciones

Actualmente, las principales fuentes comerciales para la extracción de pectina son los residuos de manzana y cáscaras de cítricos. Esta es extraída con agua acidificada caliente y seguida de un proceso químico o enzimático (usando pectinasas).

Las pectinas son usadas en muchas industrias por su habilidad de formar geles. Sus aplicaciones van desde agente gelificante, espesante, modificador de textura, emulsificante, estabilizador, azúcar sustituto en alimentos de bajas calorías y como componente en varias medicinas. El grado de polimerización (DP) y el grado de metil esterificación (DE) determina las condiciones de uso. El DP de la molécula de pectina varía de unos cuantos cientos a miles de unidades de sacáridos, lo que corresponde a un peso molecular de entre 50,000 a 150,000.

De acuerdo al grado de metilesterificación de los residuos de ácido galacturónico, la pectina se clasifica de bajo (25-50%) y alto (50-80%) metoxilo. La pectina de bajo metoxilo (LM) se obtiene a partir de la de alto metoxilo (HM), usualmente con un

tratamiento en condiciones ligeramente alcalinas o ácidas. En el caso de que se use amonio, la pectina de bajo metoxilo puede contener algunos grupos amida en el C-6 de las unidades de GalA. El grado de metilación determina las propiedades para formar geles de la pectina. La pectina de bajo metoxilo forma geles en presencia de Ca^{2+} , en amplio rango de pH (1.0-7.0 o más alto). La pectina de alto metoxilo requiere de la presencia de sacarosa a una concentración mayor a 55% en peso y un rango de pH estrecho (alrededor de 3.0), para la formación de geles (Parenicová, 2000).

Aproximadamente 80% de la producción de pectina de alto metoxilo en el mundo se utiliza para la manufactura de mermeladas y jaleas. Otras aplicaciones son en bebidas concentradas de frutas y jugos de fruta. La pectina de HM previene la formación de grumos de caseína en lácteos acidificados. La pectina de LM en combinación con carragenina se usa para hacer mermeladas bajas de azúcar y preparaciones de fruta para yogurt para los diabéticos (Parenicová, 2000).

3.3 Degradación de la pectina

Las pectinasas muestran cierta especificidad dependiendo del sustrato, pero básicamente se clasifican en dos grupos: el grupo de pectinasas que degradan el homogalacturonano y aquellas que degradan tanto el ramnogalacturonano I como el ramnogalacturonano II.

3.3.1 Enzimas que degradan el homogalacturonano.

En la parte del homogalacturonano de la pectina participan enzimas como: la pectin metil- y acetil- esterasa, endopoligalacturonasa, pectato liasa, y pectin liasa. La pectin liasa utiliza como sustrato la pectina metilesterificada, que genera el

pectato (pectina de bajo metoxilo) como son sustrato para las poligalacturonasas y la pectato liasa (Parenicová, 2000).

a) Poligalacturonasas

Se dividen en tres grupos. Endopoligalacturonasas que atacan enlaces glucosídicos α -1,4 al azar de la cadena del polisacárido generando oligómeros de ácido galacturónico; exopoligalacturonasa tipo I, hidroliza GalA del extremo no reductor, exopoligalacturonasa tipo II libera digalacturonato del extremo no reductor del ácido poligalacturónico (Parenicová, 2000)

b) Pectin y pectato liasas

Las liasas catalizan la eliminación del enlace glucosídico α -1,4 entre los residuos de GalA en la pectina o pectato para dar oligosacáridos insaturados entre el C-4 y C-5 del extremo no reductor del producto (Parenicová, 2000).

c) Pectin metil- y acetil- esterasas

La pectin metil esterasa remueve el grupo metoxilo del grupo carbonilo de las unidades de galacturonato de la pectina y la acetil esterasa remueve los grupos acetilos del C-2 o C-3 en el galacturonato produciendo un alcohol y un acetato respectivamente (Parenicová, 2000).

3.3.2. Enzimas degradadoras del Ramnogalacturonano

En estas enzimas se encuentran la ramnogalacturonano hidrolasa, ramnogalacturonano liasa, exogalacturonasas, ramnogalacturonano ramnohidrolasa, ramnogalacturonano galactohidrolasa y α -ramnosidasa (Parenicová, 2000).

4. Mutagénesis

4.1 Generalidades

La mutación, se refiere a cualquier cambio del material genético de las células no debido a fenómenos de recombinación o segregación, que se transmite a las células hijas y, en su caso, a las generaciones sucesivas, dando lugar a células o individuos mutantes.

La mutación es la fuente primaria de variabilidad genética y como tal es indispensable para que se produzca el fenómeno evolutivo.

La información genética consiste en la secuencia de las cuatro bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina y citosina) que componen la molécula de ADN y que la ordenación de bases en el ADN determina la ordenación de aminoácidos en la proteína.

La radiación ultravioleta cataliza la unión de bases pirimídicas y esas bases unidas que forman dímeros usualmente dan como resultado mutaciones puntuales. Los fotoproductos más abundantes generados de la mutación con luz UV son dímeros de pirimidina. Las cuatro posibles combinaciones de dímeros se producen (T-T, T-C, C-T, y C-C) pero los dímeros de T-T son los más comunes.

Cada dímero actúa como un obstáculo provocando la inactivación de la DNA polimerasa. Aunque la DNA polimerasa en ocasiones continúa con la síntesis del dímero con la posterior inserción de la base errónea.

4.2 Clasificación de las mutaciones

Las mutaciones pueden clasificarse de diversas formas:

- Mutación somática

Las mutaciones pueden ocurrir en células somáticas, en cuyo caso el cambio sólo afecta al soma del individuo y, por tanto, no se transmitirá a su descendencia, desapareciendo de la población con la muerte del propio individuo en la que apareció.

- Mutación germinal

En las especies con reproducción sexual, la mutación que afecta a la línea celular germinal puede ser transmitida por los gametos a la descendencia.

- Mutaciones cromosómicas o génicas

Las mutaciones pueden ser cromosómicas (cuando afectan al número y/o a la estructura de los cromosomas) o génicas (cuando afectan a los genes).

- Mutación espontánea

La variabilidad genética producida en las poblaciones naturales se debe a posibles errores ocurridos a escala molecular -por ejemplo, durante la replicación de la molécula de ADN- así como a la acción del medio ambiente sobre el ADN.

- Mutación inducida

Se realizan con el propósito de inducir mutaciones en los seres vivos para llevar a cabo estudios de genética básica o aplicada.

4.3 Mutación con luz UV

La luz UV puede generar dos residuos adyacentes del pirimidina (citosina o timina) para formar un dímero, el cual puede ser detectado por una proteína que acciona el proceso de reparación. Sin embargo, si esta proteína no funciona adecuadamente el dímero del pirimidina puede conducir a la mutación.

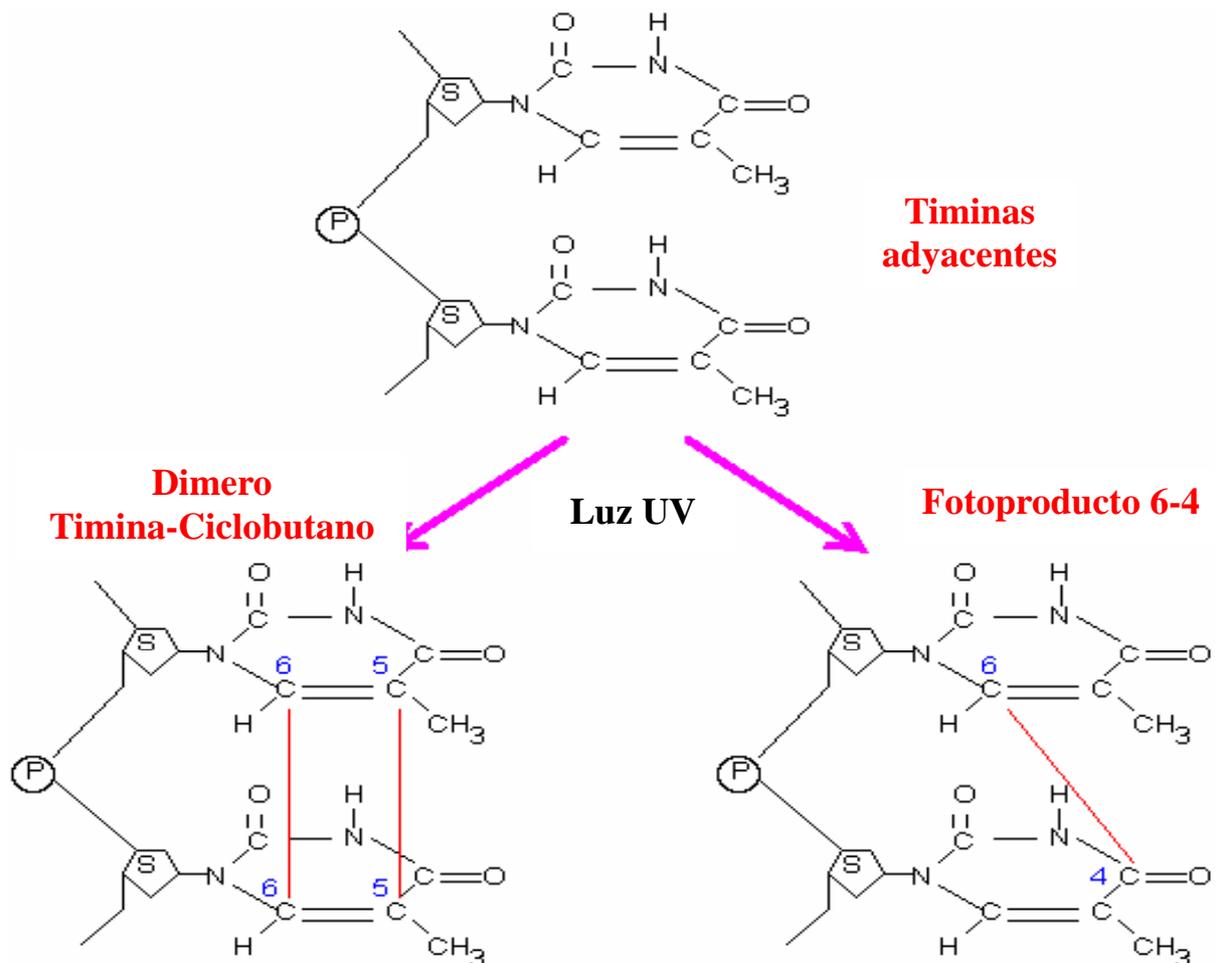


Figura 5. Dímero del pirimidina inducido por la luz UV. Esta figura utiliza timina como ejemplo. La citosina puede formar un dímero similar.

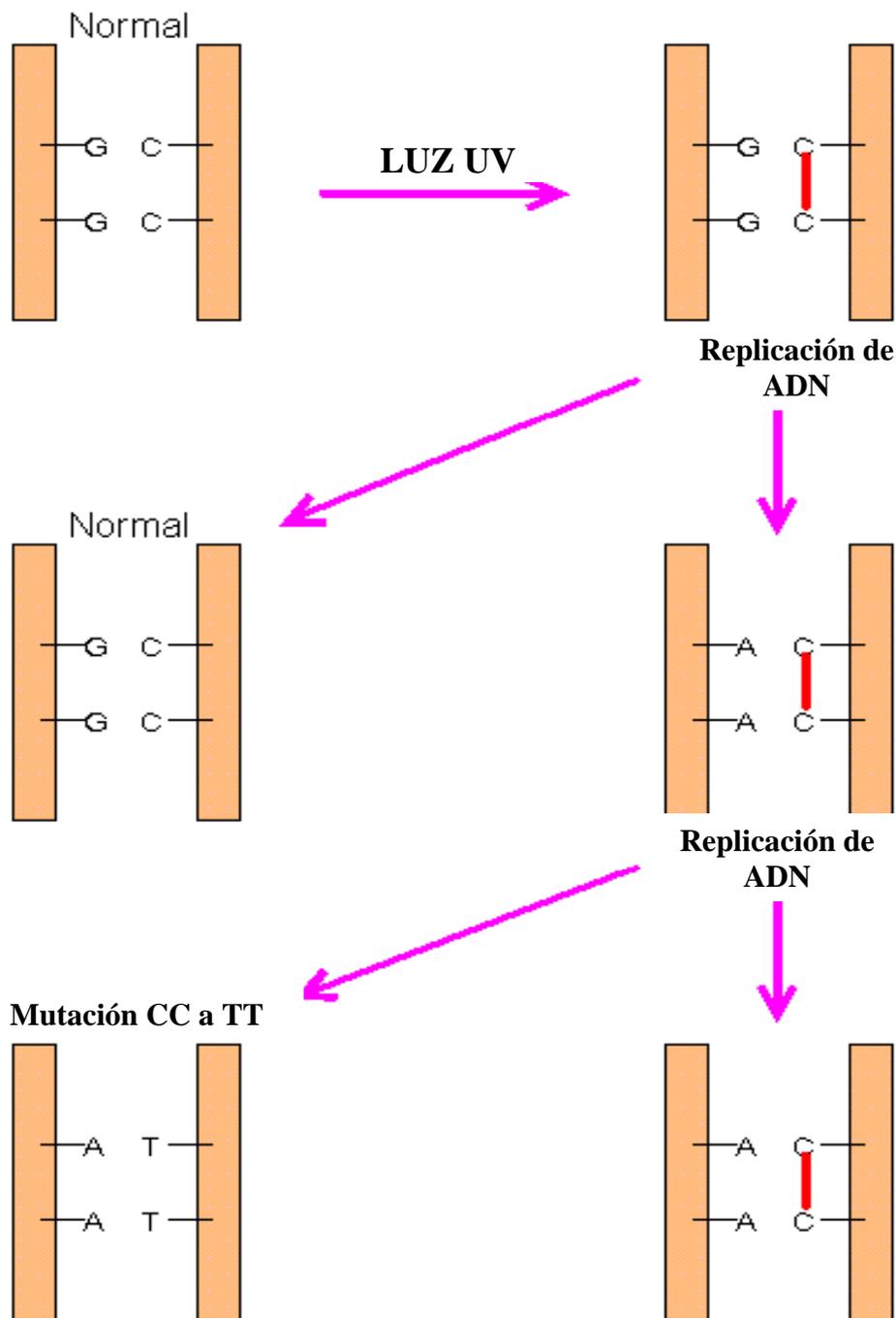


Figura 6. Un mecanismo posible para la mutación inducida por la luz UV. En la figura anterior, la luz UV primero hace dos residuos adyacentes del citosina formar un dímero. Durante la réplica del DNA, se utilizan ambos filamentos mientras que las plantillas sintetizan filamentos nuevos. El dímero de citosina podría incorporar la adenina (en vez de la guanina normal) en el filamento nuevo. La réplica subsecuente del DNA producirá el CC a la mutación del TT. Aunque el dímero de citosina puede ser corregido eventualmente, la mutación no se puede detectar por el sistema de la reparación del DNA.

1. Objetivo General

- Generar y seleccionar mutantes de *Aspergillus flavipes* FP-500 WT que presenten una producción aumentada de Pectinasas.

1.1 Objetivos particulares

- Determinar las condiciones de mutagénesis para cepas de *Aspergillus* con radiación ultravioleta en función de la distancia y tiempo de irradiación.
- Aplicar las técnicas de enriquecimiento por filtración, recuperación directa y resistencia a la represión catabólica para la selección de mutantes.
- Seleccionar de entre colonias irradiadas, mutantes productoras de pectinasas.
- Realizar mediciones de actividad enzimática.
- Generar protocolos de mutagénesis y recuperación con diferentes técnicas.

1. *Microorganismo*

Se utilizó la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 WT proveniente del cepario del grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos del departamento de alimentos y biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM (aislada de frutas en estado de descomposición). La cepa se mantuvo viable mediante resiembras periódicas en placa con medio agar papa dextrosa (PDA), manteniéndola a 4°C.

1.1. Propagación del inóculo

En condiciones estériles el microorganismo fue sembrado en placas de agar papa dextrosa (PDA) e incubado a 37°C durante 72h. Al término de este periodo de crecimiento y esporulación de la cepa, se procedió a la cosecha de esporas. Las esporas se suspendieron en 10 ml de solución salina (0.9% P/V) Tween 80 al 0.005V/V y se contaron en una cámara de Neubauer para determinar la concentración de esporas. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración final en el medio de cultivo de 10^6 esporas/ml y se guardó en refrigeración hasta su uso.

2. *Medios y condiciones de cultivo*

El medio de cultivo utilizado para selección, cultivo y mantenimiento de la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 WT fue en Agar papa dextrosa (PDA). Los cultivos en medio sólido se incubaron en una estufa a 37°C por 72 horas.

Para cultivar el microorganismo en medio sumergido y llevar a cabo la producción de enzimas pectinolíticas se utilizó medio basal, el cual está compuesto de: K_2HPO_4 al 0.2%, KH_2PO_4 al 0.2% y $(NH_4)_2SO_4$ al 0.5% y como fuente de carbono se utilizaron:

- Pectina de frutos cítricos Sigma-Aldrich® (85% de ácido galacturónico, 10% metoxilos y 5.2% de humedad).
- Residuos secos de cáscara de limón.

Las fuentes de carbono se adicionaron al 1% p/v. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizó agua destilada para la preparación de todos los medios.

Los cultivos sumergidos se incubaron a una temperatura de 37°C por 72 horas, con agitación orbital a 200 rpm. Se tomaron muestras de 5ml cada 24 horas para determinar el crecimiento celular, actividad enzimática, pH, etc.

La esterilización de todos los medios y otras soluciones se llevó a 121°C y una atmósfera durante 20 minutos.

Todos los experimentos de medición de actividad enzimática se realizaron por lo menos dos veces.

3. Determinación de biomasa

En medio líquido la biomasa fue determinada por la técnica de peso seco, para lo cual se tomaron muestras de 5 mL de cultivo cada 24 horas durante la fermentación y se filtraron a través de una membrana Milipore® de 5.0 μm , previamente pesada. La biomasa retenida en la membrana fue secada en una estufa hasta obtener un peso constante.

4. Determinación de actividades enzimáticas

4.1. Actividad Exopectinolítica

Se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados de pectina por el método de DNS utilizando una curva estándar de ácido galacturónico. El sistema de reacción consistió en 0.5 mL de una solución de pectina (1% p/v) a pH 5.0 disuelta en 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM a pH = 5.0 y 0.1 ml de filtrado enzimático libre de células a 45°C durante 20 min. Al término del tiempo se le adicionó 2 ml de DNS y se calentó la mezcla a ebullición por 5 min, se le añadió 5 ml de H₂O y se leyó a una $\lambda=575$ nm en el espectrofotómetro. Una unidad (U) de actividad exopectinolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1mmol de ácido galacturónico en 20 min a 45°C y pH = 5.0.

4.2. Actividad endopectinolítica

La actividad endopectinolítica producida en medio líquido se evalúa por el cambio de viscosidad de una solución de pectina al 1% p/v disuelta en una solución amortiguadora de acetatos – salina a pH de 4.2 y una temperatura de 30°C, en un viscosímetro Oswald (Kimax®). Se utilizan 500 μ L de filtrado libre de células en 10mL de solución de pectina durante diferentes tiempos de reacción. Se mide el tiempo de reacción y el tiempo que tarda en fluir la solución de pectina una distancia fija del viscosímetro. Una unidad de actividad endopectinolítica se define como la cantidad de enzima que redujo en un 50% la viscosidad de la solución de pectina, en un tiempo de 10 minutos Aguilar *et al*, 1991).

4.3. Actividad Pectinliasa

Se determinó por la absorción de las dobles ligaduras que se forma. El sistema de reacción consistió en 0.5 mL de una solución de pectina (1% p/v) pH 5.7 disuelta en 0.5 mL de buffer Tris-acetatos c/ CaCl₂ 24mM, se atempera a 40°C y se adicionan 0.2 ml de filtrado enzimático libre de células para que comience la reacción, inmediatamente se toman 0.2 mL de la mezcla y se agregan a 1.8 mL de HCl 10mM, este es el tiempo cero. La reacción se lleva a cabo por 1 hora y al termino del tiempo se toma una muestra de 0.2 mL y se agrega a 1.8 mL de HCl 10mM, este es el tiempo final. Se lleva a cabo la lectura tanto del tiempo cero como del tiempo final a una $\lambda=235$ nm en el espectrofotómetro.

5. Metodologías para la recuperación de mutantes

5.1 Método de enriquecimiento por filtración para el aislamiento de mutantes

Se prepara una suspensión de esporas, de la cual se toma un volumen que contenga aproximadamente 1×10^6 esporas para exponerlas a la luz UV el tiempo que corresponda para obtener la sobrevivencia deseada. Se transfiere 1 mL de la suspensión irradiada a 50ml de medio MML y se agita a 200 rpm por 12h a 37°C. Concluido el tiempo establecido, se filtra a través de gasa, el filtrado se centrifuga durante 15 min. a 4000 rpm, se desecha el sobrenadante, se resuspende el paquete de esporas con solución salina 0.9% (p/v), se centrifuga nuevamente, se desecha el sobrenadante y el paquete de esporas se transfiere a 50 mL de medio MML. Esta operación se realiza de tres a cuatro veces, y del último paquete de esporas obtenido se dispersa en cajas de medio MC mismas que se incuban a 37°C.

5.2 Recuperación directa

Se prepara una suspensión de esporas, de la cual se utiliza un volumen que contenga aproximadamente 1×10^6 esporas. Se establece el porcentaje de sobrevivencia que se desea obtener y se irradia con luz ultravioleta el tiempo que corresponda. Las esporas sobrevivientes se inoculan en medio MC y se incuban a 37°C .

5.3 Resistencia a la represión catabólica

Se prepara una suspensión de esporas, de la cual se utiliza un volumen que contenga aproximadamente 1×10^6 esporas. Se establece el porcentaje de sobrevivencia que se desea obtener y se irradia con luz ultravioleta el tiempo que corresponda. Las esporas sobrevivientes se inoculan en medio MML con 2DG al 1% y se incuban a 37°C para de esta manera obtener mutantes que sean resistentes a la represión catabólica.

6. *Determinación de azúcares reductores*

Los azúcares reductores se determinaron en los filtrados libres de células por el método de DNS (Miller, 1959), la mezcla de reacción constó de 0.05 ml de muestra + 0.95 ml de H_2O + 2 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS); la mezcla fue puesta en ebullición por 5 min, se le añadieron 5 ml de H_2O y se leyó a una $\lambda=575$ nm en el espectrofotómetro (Spectronic 20). La concentración de azúcares reductores fue calculada utilizando una curva estándar de glucosa.

7. Medios de cultivo

7.1 Medios líquidos

- Medio basal

KH_2PO_4 0.2%

K_2HPO_4 0.2%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%

- Medio mínimo (MML)

Medio basal adicionado de:

Pectina al 1.0%

7.2 Medios sólidos

- Medio completo (MC)

Medio basal

Extracto de levadura 0.3%

Peptona de carne 0.5%

Agar bacteriológico 1.5%

Fuente de carbono 1.0%

- Agar papa dextrosa (PDA)

Agar papa dextrosa 3.9%

- Agar Saboraud

Saboraud 6.5%

- Medio mínimo sólido (MMS)

Medio basal

Pectina 0.25%

Agar bacteriológico 1.5%

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Influencia de las condiciones de fermentación en la producción enzimática

Este primer experimento se realizó con la finalidad de determinar la influencia que tienen sobre la producción de la actividad enzimática de la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 WT el tipo de agitación, el tipo y volumen del matraz de fermentación y el volumen del medio de crecimiento utilizado, para establecer un protocolo que nos permitiera realizar una evaluación de un gran número de cepas productoras de enzimas en forma reproducible.

Tabla 1. Condiciones en las que se llevó a cabo el experimento

Categoría	Agitación a 200 rpm	Material de Fermentación	Volumen de medio (ml)
A	Orbital	Matraz Erlenmeyer 500 ml	200
B	Orbital	Matraz Erlenmeyer 500 ml	100
C	Orbital	Matraz Erlenmeyer 250 ml	50
D	Reciprocante	Matraz Erlenmeyer 500 ml	100
E	Reciprocante	Matraz Erlenmeyer 250 ml	50
F	Orbital	Frascos de 40 ml	10

Tabla 2. Resultados obtenidos

CONDICIÓN	ACTIVIDAD ENDO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	ACTIVIDAD LIASA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	ACTIVIDAD EXO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
A	0.35	0.0283	3.75	0.0990	2.36	0.2687
B	0.51	0.0424	3.46	0.4808	9.2	0.1273
C	2.1	0.2121	4.63	0.1697	11.14	0.2546
D	2.79	0.3536	3.89	0.1414	11.39	0.0849
E	2.75	0.0566	4.88	0.3111	11.16	0.1273
F	1.83	0.0849	3.99	0.0424	8.19	0.2828

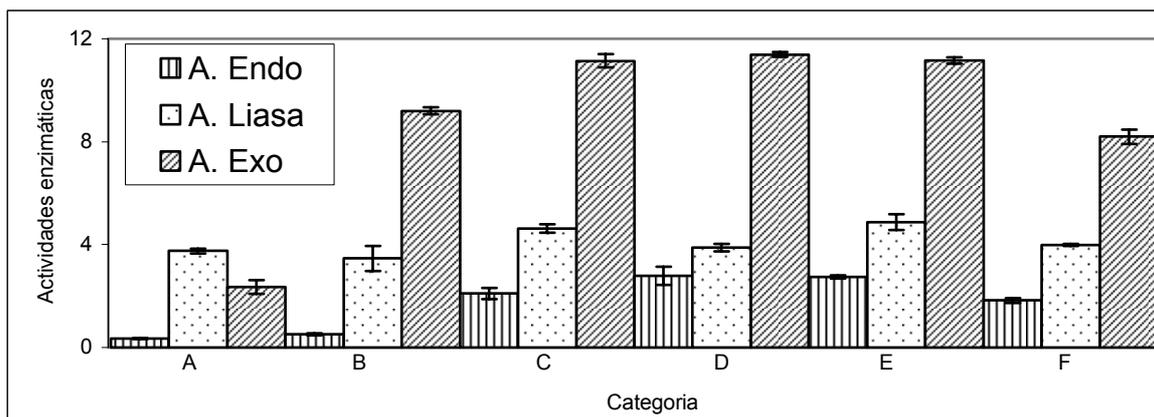


Fig. 1. Actividades enzimáticas producidas en los diferentes tipos de matraces de acuerdo a los datos de la tabla 1

Como se puede observar en la figura 1, de las condiciones evaluadas en agitación orbital, la condición C fue la que presentó los mejores niveles de producción, ya que al utilizar el matraz más pequeño y el menor volumen del medio, la superficie de intercambio de gases fue mayor que en los otros casos, lo cual demuestra que entre más favorecida sea la transferencia de oxígeno, mayor será la producción enzimática.

Las categorías A y B que tuvieron como variable el volumen del medio utilizado tuvieron resultados muy similares, en cuanto a las actividades endopectinolítica y pectinliasa. Solo la actividad exopectinolítica se vio un poco más favorecida en la categoría B.

Las categorías D y E que tuvieron una agitación recíprocante fueron las que presentaron los niveles de producción enzimática más elevados, lo cual nos indica que la producción enzimática es influenciada por el tipo de agitación, esto es debido principalmente a que con este tipo de agitación la transferencia de oxígeno se ve mucho más favorecida que en la agitación orbital.

Otro aspecto que se logró observar, fue que en la agitación recíprocante hay muy poca diferencia en la producción enzimática en relación al volumen del matraz.

En lo que respecta a la categoría F, como se puede observar en la figura 1, no fue la condición que presentó los mejores niveles de producción. Sin embargo, la ventaja de este sistema es que requiere muy poco volumen de medio y los niveles de producción solo se reducen en un 30% con respecto a la condición que presentó la mayor producción (E). En este caso no se buscaba tener una alta productividad sino encontrar un sistema que permitiera evaluar muchas cepas en forma reproducible con el menor costo posible y con una productividad razonable. Por otro lado, con este experimento se logró demostrar la gran influencia de las condiciones evaluadas sobre la producción enzimática.

Cabe mencionar que las desviaciones estándar obtenidas en cada medición nos permiten asegurar que los datos presentados son confiables.

2. Determinación de las curvas Dosis-respuesta

Las cepas a utilizar fueron *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541, *Aspergillus parasiticus* NRRL-502 y *Aspergillus flavipes* FP-500 esta última aislada a partir de desechos de frutas en estado de descomposición.

Con el fin de establecer las condiciones de mutagénesis se realizaron curvas dosis-respuesta para las cuatro cepas, evaluando el efecto de la intensidad y tiempo de exposición a la radiación de luz ultravioleta necesarias para alcanzar porcentajes variables de mortalidad.

La cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 ha mostrado en experimentos previos altos niveles de producción de pectinasas extracelulares, es por ello que se eligió esta cepa para realizar los procesos mutagénicos y buscar mejorar sus niveles de producción enzimática.

En relación a las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, estas se usaron para obtener datos comparativos.

El efecto en la sobrevivencia de las esporas de la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 al tener como variable la distancia de la fuente de radiación, se presenta en la Fig. 2. Como se puede ver a medida que la distancia entre las esporas y la fuente de radiación es menor la velocidad de muerte es mayor. Las constantes de muerte obtenidas fueron 0.1004, 0.2971 y 0.5802 para las distancias 66, 46 y 26 cm. respectivamente.

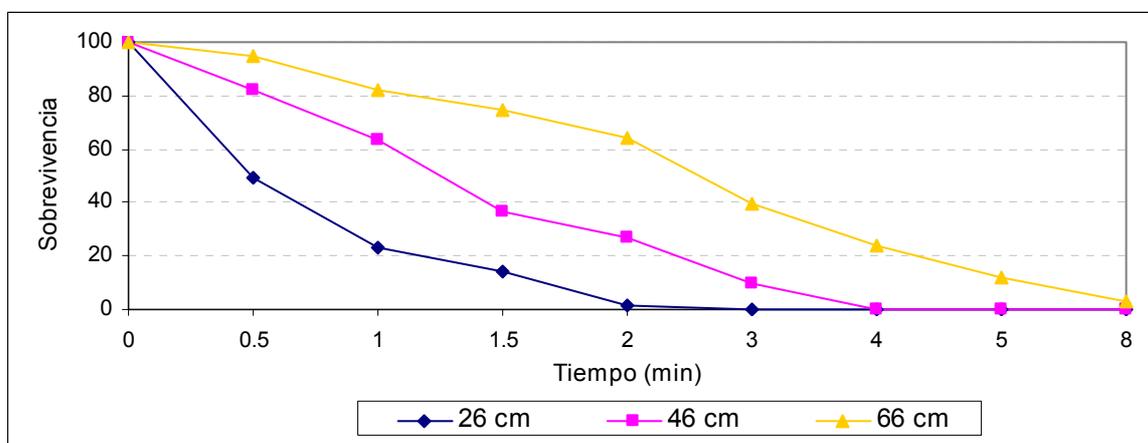


Fig. 2. Evaluación de la sobrevivencia de la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 sometida a radiación UV con una intensidad de 15J/s a diferentes tiempos y distancias.

De acuerdo a estos resultados la distancia elegida para realizar los experimentos sucesivos de mutagénesis fue la de 46 cm. debido a que a esta distancia el tiempo que lleva realizar la mutagénesis es corto, además de tener un mayor control del proceso mutagénico.

Con las condiciones de mutagénesis establecidas se realizó este proceso para las otras 3 cepas *Aspergillus flavus* CECT-2687, *Aspergillus flavus* NRRL-6541 y *Aspergillus parasiticus* NRRL-502, obteniéndose los siguientes resultados:

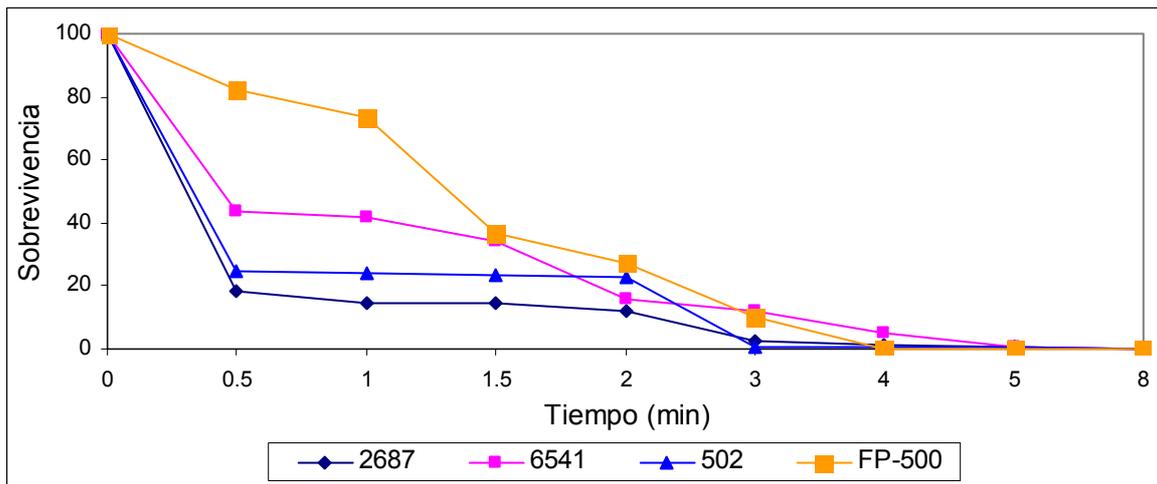


Fig. 3. Comportamiento de las 4 cepas utilizadas al someterlas a la radiación UV a 46 cm. de distancia y una intensidad de 15J/S a diferentes tiempos.

En la figura 3 se observa el comportamiento de las 4 cepas al ser sometidas a la radiación ultravioleta. A tiempos cortos *Aspergillus flavipes* FP-500 mostró una mayor tolerancia a la radiación, posterior al 1.5 minuto de exposición se puede observar que su resistencia comienza a disminuir de una forma considerable. Por su parte la cepa 6541 fue la segunda más resistente en tiempos cortos, pero lo relevante fue que su sobrevivencia llegó a 0 prácticamente hasta los 5 minutos de exposición, en cuanto a las cepas 2687 y 502, fueron las que mostraron menor resistencia ya que prácticamente a los 3 minutos de exposición su sobrevivencia fue nula.

3. Tratamientos mutagénicos

La metodología para llevar a cabo el análisis de las mutantes obtenidas de la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 por los diferentes métodos consistió en recuperar las mutantes en medio completo, para posteriormente realizar una evaluación del halo de hidrólisis producido en medio mínimo sólido y agruparlas de acuerdo a la Tabla 3.

Tabla 3. Grupos según el diámetro del halo de hidrólisis

Grupo	Diámetro del halo (cm.)
B	≤ 1.0
M	1.1 – 1.5
A	≥ 1.6

Otro aspecto que se evaluó fue su producción en medio líquido utilizando frascos de 40 ml con 10 ml de medio, de este experimento se seleccionaron las mutantes mejores productoras para realizarles una cinética de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio para finalmente seleccionar la que presentara mejores niveles de producción.

3.1 Metodología de recuperación directa

3.1.1 Recuperación directa 1.

En este tratamiento mutagénico se expusieron las esporas de la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 WT durante 3 minutos a la radiación ultravioleta para obtener una sobrevivencia aproximada del 10%. A continuación se muestra la distribución de los halos de hidrólisis que presentaron las 46 mutantes seleccionadas de este tratamiento mutagénico.

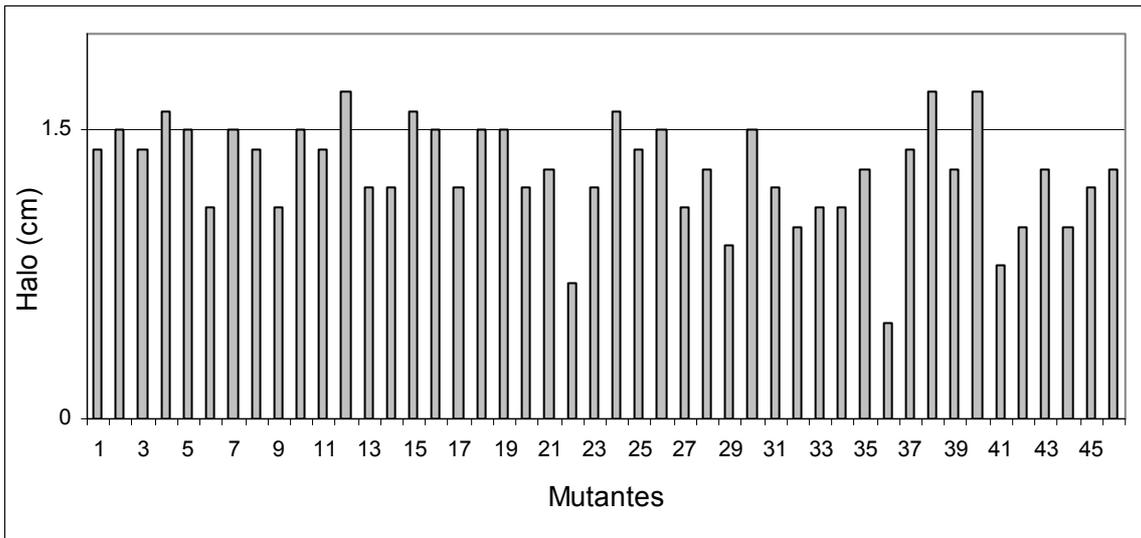


Fig. 4. Halos de hidrólisis obtenidos por las mutantes derivadas de la cepa silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500 mantenidas a 37°C durante 24 horas. La línea horizontal denota el halo de hidrólisis producido por la cepa silvestre

Como se observa en la figura 4, se obtuvieron algunas mutantes que produjeron un halo de hidrólisis ligeramente superior al de la cepa silvestre. Se agruparon de acuerdo a la tabla 3 y para realizar las pruebas en medio líquido en frasco se seleccionaron 6 mutantes de grupo B, 8 mutantes del grupo M y 5 mutantes del grupo A.

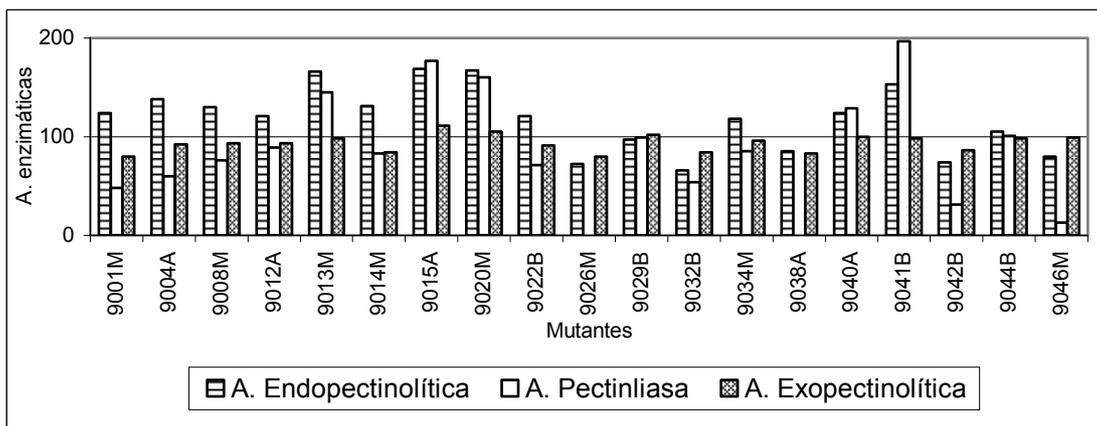


Fig. 5. Actividades enzimáticas producidas en frascos de 40 ml con 10 ml de medio a 37°C durante 72 horas en agitación orbital a 200 rpm

Como se puede observar en la figura 5 algunas de las mutantes probadas en medio líquido mostraron diferencias importantes con respecto a la cepa silvestre.

La mutante 9041B tuvo un incremento casi del 100% en actividad pectinliasa, la actividad endopectinolítica incrementó alrededor de un 50% y la actividad exopectinolítica prácticamente se mantuvo sin cambios, además es importante mencionar que esta mutante en las pruebas de medio sólido entró en el grupo B, lo cual nos indica claramente que el comportamiento y producción enzimática de un microorganismo depende en gran parte del medio en el que se encuentre, no solo por su composición sino por su estado (líquido o sólido).

La mutante 9020M mantuvo prácticamente igual la actividad exopectinolítica, sin embargo tuvo incrementos de alrededor del 50% en actividad pectinliasa y endopectinolítica, y de igual manera es interesante por el hecho de que en medio sólido no era de las más productoras.

Otra mutante con altos niveles de producción fue la 9015A, la cual fue la mutante que presentó la actividad exopectinolítica más alta, además de tener un incremento de alrededor del 70% en su actividad endopectinolítica y un 78% en actividad pectinliasa, por otro lado esta mutante fue de las pocas que tuvieron alta actividad tanto en sólido como en líquido.

Se hizo una selección de 7 cepas mutantes para realizar las cinéticas de producción, el criterio para realizar esta selección fue que en el análisis anterior hayan mostrado un incremento con respecto a la cepa silvestre, los resultados se muestran a continuación:

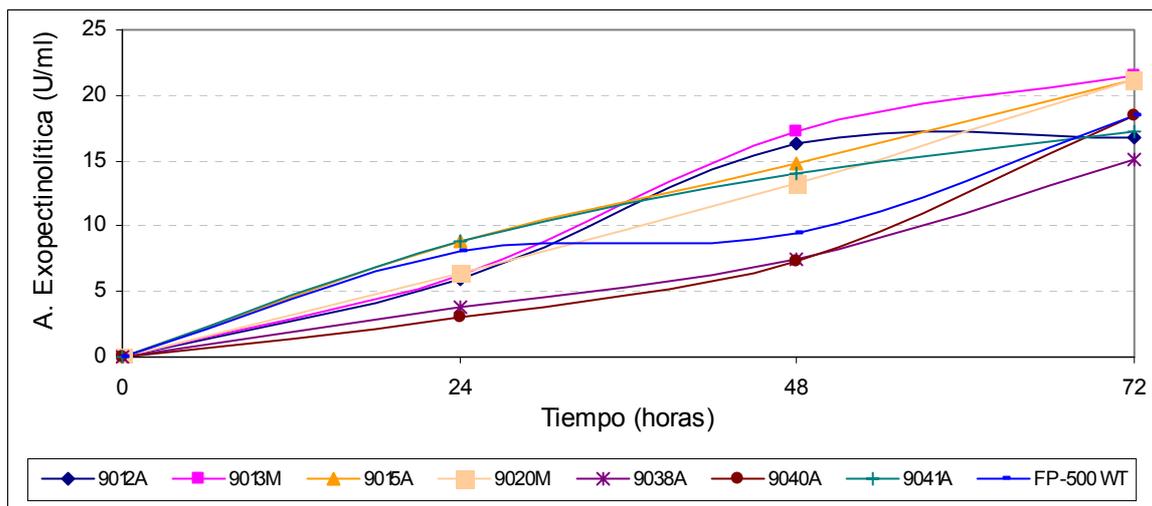


Fig. 6. Cinética de producción. Actividad exopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En la figura 6 se observa que realmente en esta actividad no podemos decir que se hayan encontrado variaciones muy significativas ya que solo 3 mutantes tuvieron un ligero incremento.

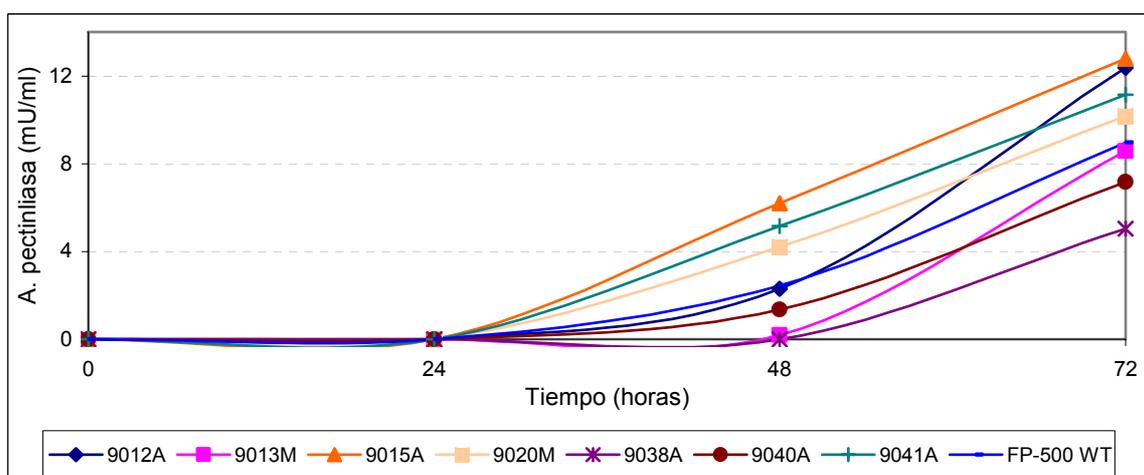


Fig. 7. Cinética de producción. Actividad pectiniasa producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En la figura 7 se observan incrementos importantes en las mutantes 9012A, 9041A, 9020M y la 9015A, siendo ésta última la que presenta una producción más alta. Otra característica importante que mostró la mutante 9015A fue que su producción superó a las otras a partir de las 48 horas.

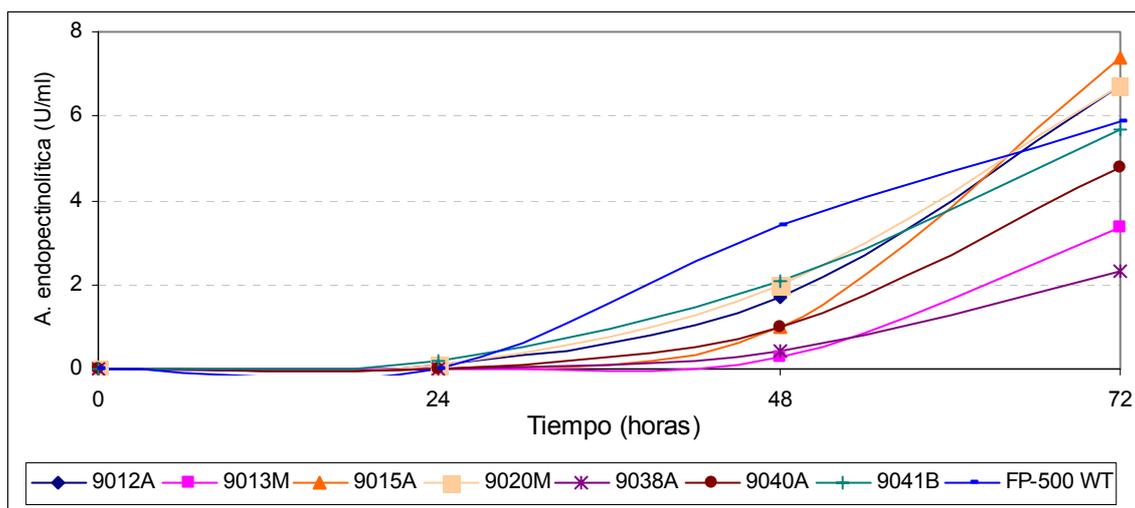


Fig. 8. Cinética de producción. Actividad endopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

La figura 8 muestra 3 mutantes con una actividad superior a la presentada por la cepa silvestre. Es importante notar que ninguna de las mutantes logró superar la producción de la cepa silvestre a las 48 horas.

Como se puede observar por los datos presentados anteriormente, la mutante 9015A es la que presentó niveles superiores de producción teniendo como referencia la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500, sobre todo en actividad pectinliasa y actividad endopectinolítica, es por ello que se eligió esta mutante para realizar el siguiente proceso de mutagénesis, la cual ahora recibió el nombre de UV-901.

Tabla 4. Resumen del incremento en las actividades por parte de la cepa UV-901

MUTANTE	% de incremento en A. Exopectinolítica	% de incremento en A. Pectinliasa	% de incremento en A. Endopectinolítica
UV-901 (antes 9015A)	14	43	35

3.1.2 Recuperación directa 2.

Este siguiente proceso de mutagénesis se realizó a partir de la mutante UV-901 exponiéndola a radiación ultravioleta durante tres minutos para obtener una sobrevivencia aproximada del 10%.

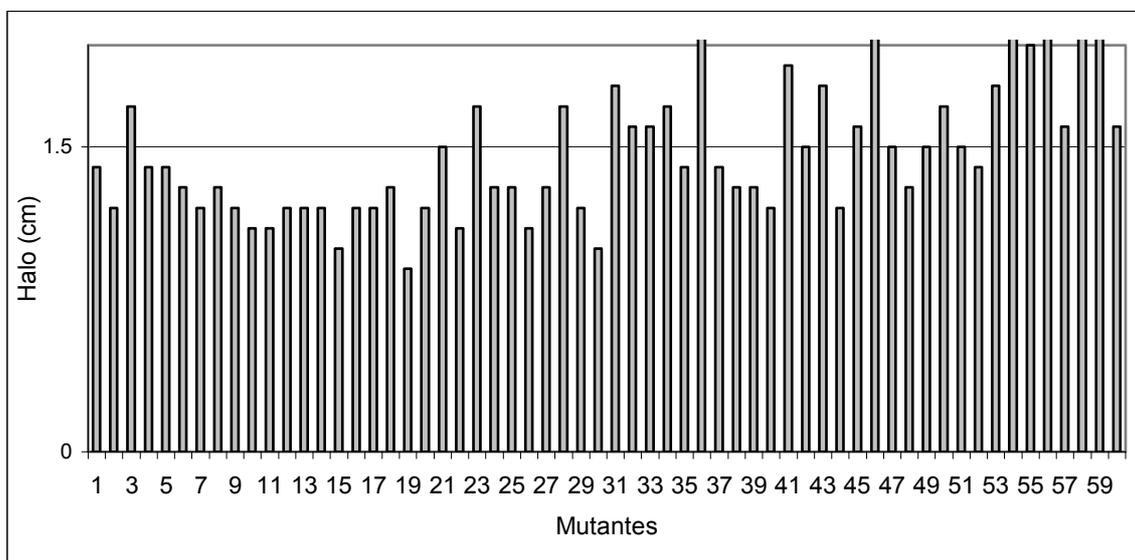


Fig. 9. Halos de hidrólisis obtenidos por las mutantes derivadas de la mutante UV-901 mantenidas a 37°C durante 24 horas. La línea horizontal denota el halo de hidrólisis producido por la cepa silvestre

Como se observa en la figura 9 varias mutantes obtenidas presentaron un halo de hidrólisis superior al que generaron las referencias (FP-500 y UV-901), posteriormente se agruparon de acuerdo a la tabla 3.

Para realizar pruebas en medio líquido se seleccionaron 3 mutantes de grupo B, 9 mutantes del grupo M y 8 mutantes del grupo A.

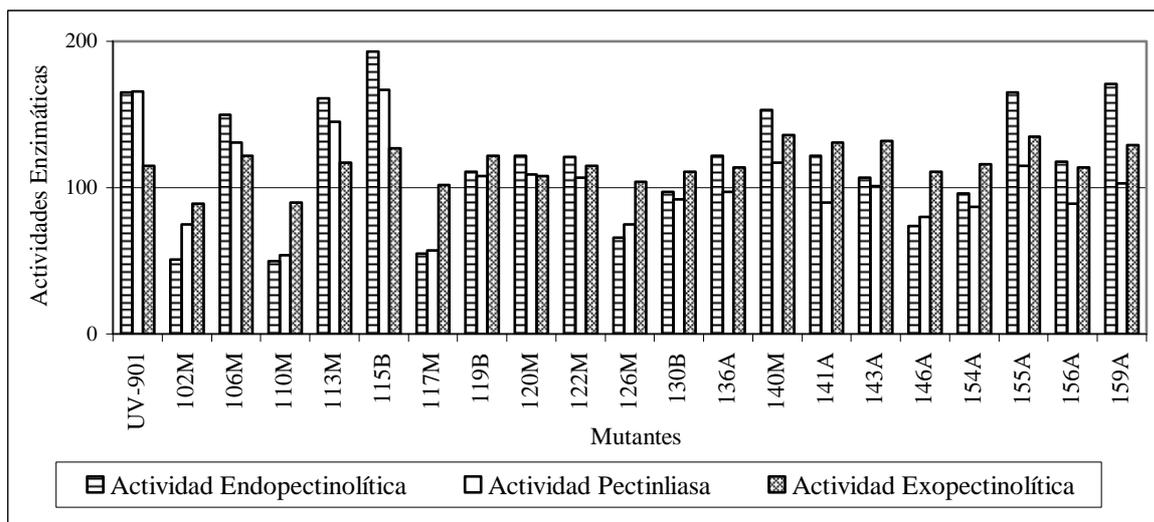


Fig. 10. Actividades enzimáticas producidas en frascos de 40 ml con 10 ml de medio a 37°C durante 72 horas en agitación orbital a 200 rpm

Ahora para realizar el análisis debemos partir de la producción que tiene la cepa UV-901, y se observa en la figura 10 que solo la mutante 115B presenta niveles de producción ligeramente superiores a los de la cepa de referencia, es importante hacer hincapié que esta mutante pertenece al grupo B, lo cual nos indica que en medio sólido no es una de las mejores productoras, sin embargo en medio líquido se obtienen otros resultados.

Se realizó la cinética de producción para la cepa silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500, la mutante UV-901 y la mutante 115B obtenida en esta ronda de mutagénesis, ya que esta última fue la única que presentó niveles de producción ligeramente superiores a las de las otras 2 referencias.

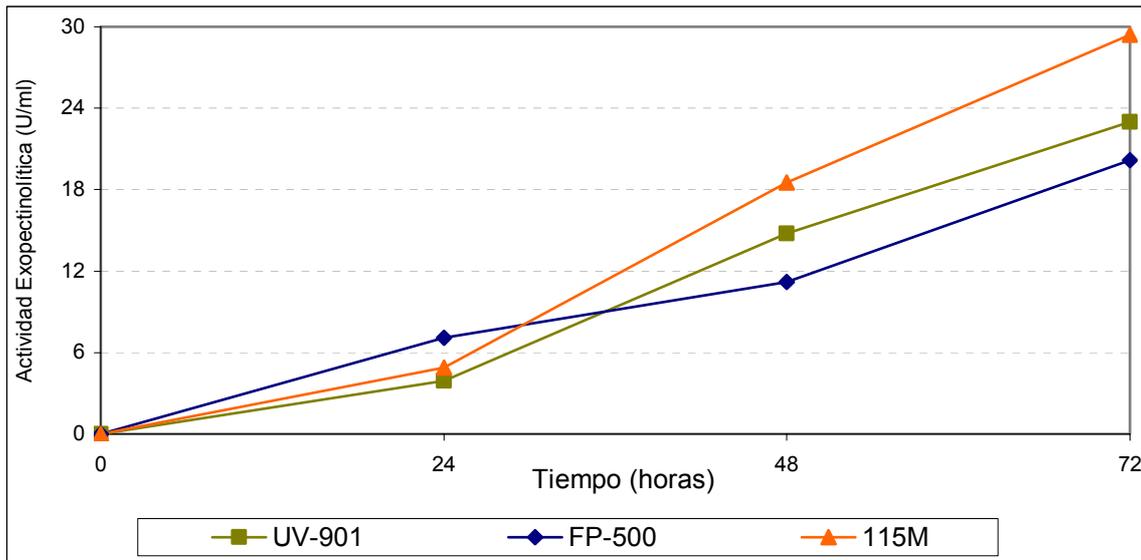


Fig. 11. Cinética de producción. Actividad exopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

Como se puede observar en la figura 11 la mutante generada en este proceso mutagénico presentó una actividad exopectinolítica superior a la de la cepa silvestre y a la de la mutante UV-901, este comportamiento se comenzó a observar a partir de las 48 horas logrando su máxima producción a las 72 horas de fermentación con un incremento del 46% con respecto a la cepa silvestre.

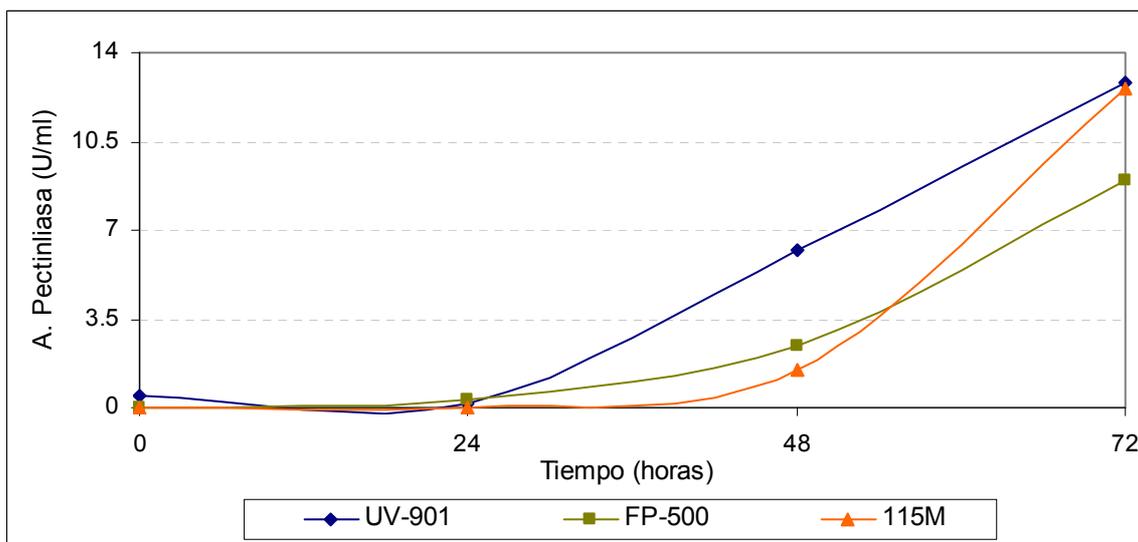


Fig. 12. Cinética de producción. Actividad pectinliasa producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En cuanto a la actividad pectinliasa mostrada en la figura 12, la nueva mutante 115M a las 72 horas tuvo la misma producción que la mutante UV-901 superando a la cepa silvestre en aproximadamente un 40%. Sin embargo, la diferencia entre la mutante UV-901 y la generada en este tratamiento mutagénico 115M se observa claramente a las 48 horas, ya que la nueva mutante 115M produce incluso menos que la silvestre.

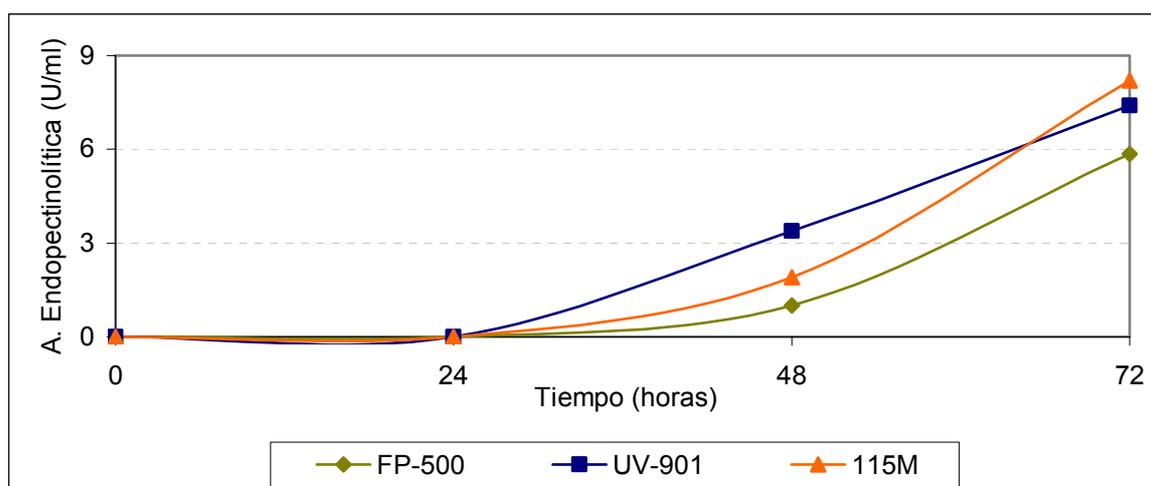


Fig. 13. Cinética de producción. Actividad endopectinólítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En la figura 13 se observa que la mutante 115M presentó una actividad endopectinólítica ligeramente mayor que las otras 2 cepas de referencia. Sin embargo, tanto en la actividad pectinliasa como en la endopectinólítica su incremento en la producción se hace más notable después de las 48 horas.

A esta nueva mutante se le nombró UV-902

Tabla 5. Resumen de los incrementos en actividades enzimáticas por parte de las cepas UV-901 y UV-902

MUTANTES	% de incremento en A. Exopectinólítica	% de incremento en A. Pectinliasa	% de incremento en A. Endopectinólítica
UV-901 (antes 9015A)	14	43	35
UV-902 (antes 115B)	46	41	40

3.1.3 Recuperación directa 3

Esta nueva ronda de mutagénesis se realizó a partir de la cepa silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500 WT exponiéndola a la radiación ultravioleta durante cuatro minutos para obtener una sobrevivencia aproximada del 1%.

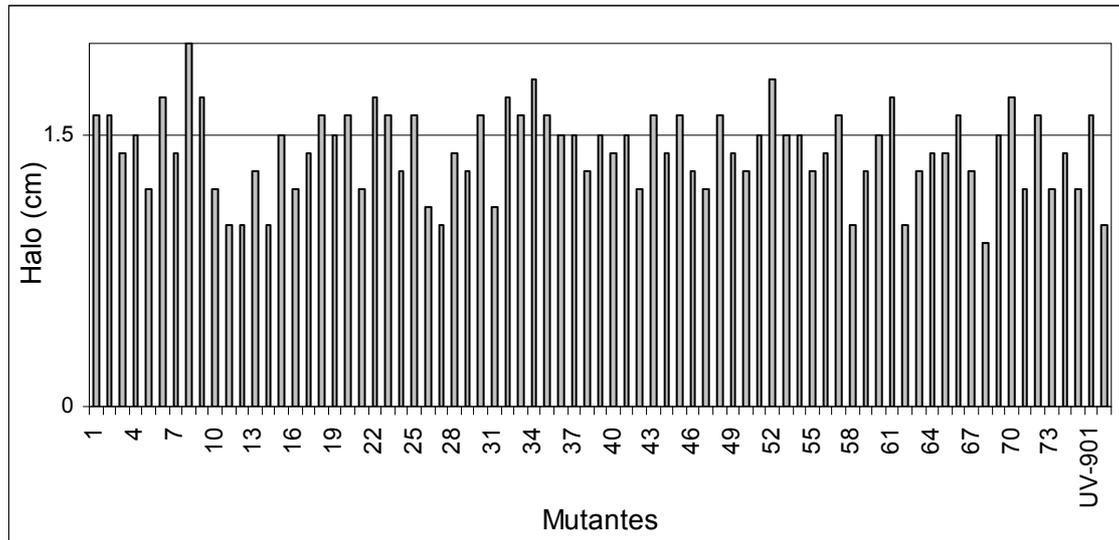


Fig. 14. Halos de hidrólisis obtenidos por las mutantes derivadas de la cepa silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500 mantenidas a 37°C durante 24 horas. La línea horizontal denota el halo de hidrólisis producido por la cepa silvestre

Ahora se tienen como referencia 3 cepas (FP-500, UV-901 y UV-902) en la figura 14 se observa que varias mutantes obtenidas presentaron un halo de hidrólisis superior al que generaron las referencias. Las 75 mutantes obtenidas se agruparon de acuerdo a la tabla 3 y se seleccionaron seis mutantes de cada grupo para su evaluación en medio líquido.

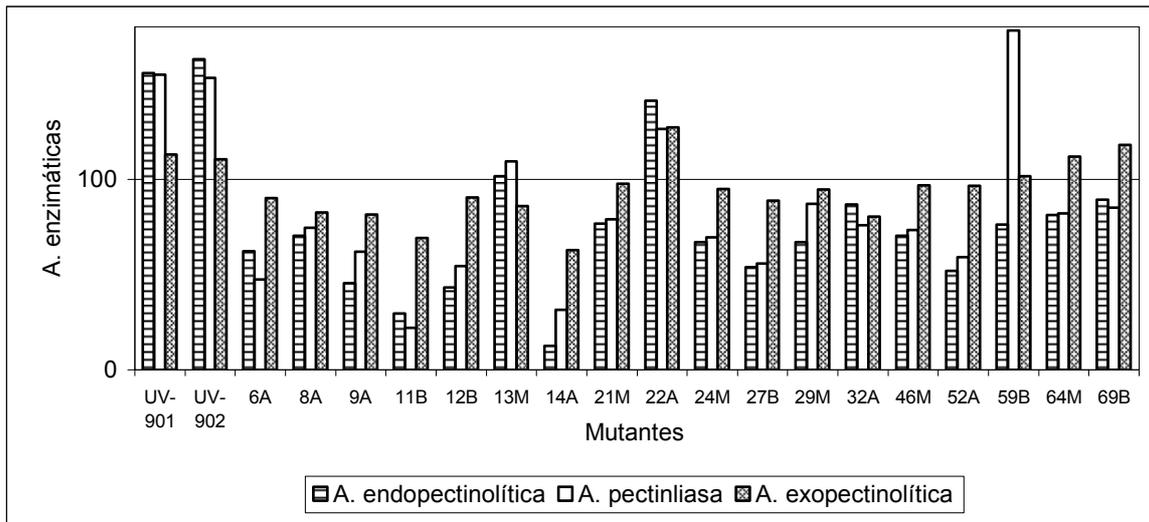


Fig. 15. Actividades enzimáticas producidas en frascos de 40 ml con 10 ml de medio a 37°C durante 72 horas en agitación orbital a 200 rpm

Para realizar el análisis de lo anterior debemos tomar en cuenta que ahora se tienen tres referencias la cepa silvestre, la mutante UV-901 y la UV-902, en la figura 15 se observa que solo la mutante 22A presenta incremento en las tres actividades enzimáticas medidas, ya que otras mutantes como las 59B, la 69B incrementaron su producción pero solo en una de sus actividades, como se puede observar la mutante que presentó mejores niveles de producción fue la 22A, la cual pertenece a las mutantes que en medio sólido tuvo un halo de hidrólisis grande y que por ello pertenece al grupo A.

Se realizó la cinética de producción de las 3 cepas de referencia, la silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500, la UV-901 y la UV-902, además de las 2 nuevas mutantes, la 22A y la 59B.

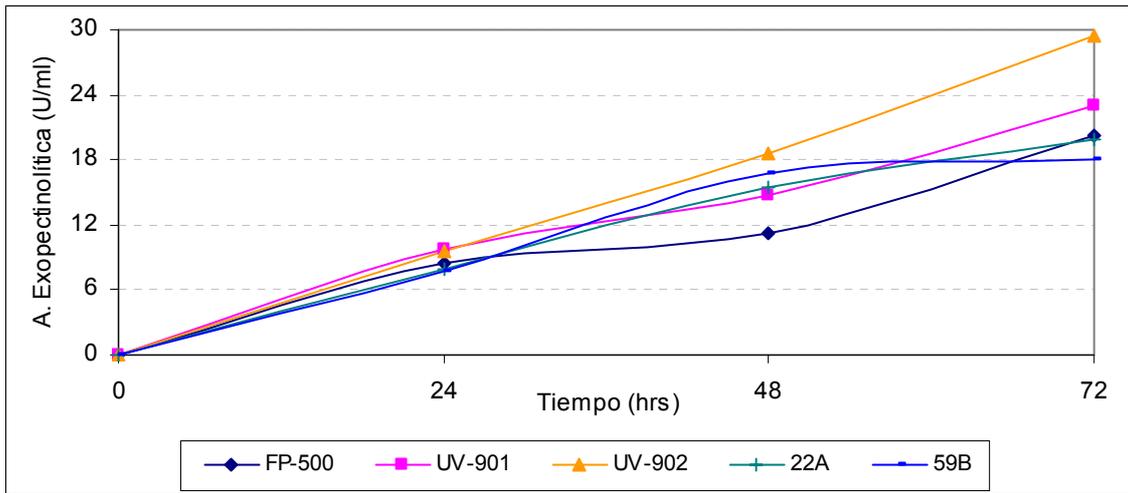


Fig. 16. Cinética de producción. Actividad exopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

Como se puede observar en la figura 16 las mutantes UV-901 y UV-902 fueron las que presentaron una mayor actividad tomando como referencia la cepa silvestre, las otras dos mutantes obtenidas de este proceso mutagénico no presentaron mejores resultados, ya que la mejor de ellas solo logró producir lo mismo que la cepa silvestre.

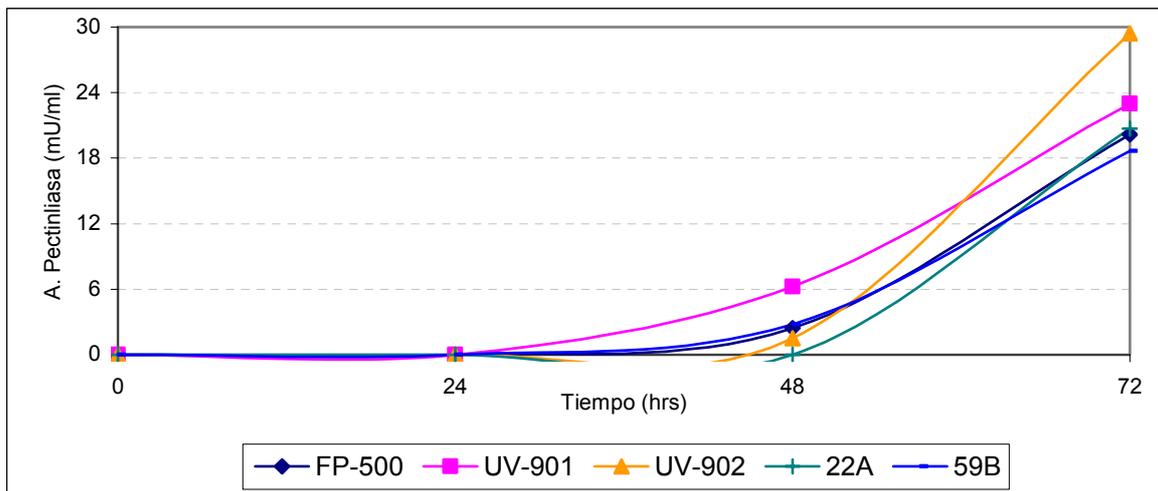


Fig. 17. Cinética de producción. Actividad pectinlasi producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En cuanto a la actividad pectinliasa, las mutantes UV-901 y UV-902 presentaron los mejores niveles de producción. Es importante mencionar que la mutante UV-901 no fue la que presentó la mayor producción a las 72 horas. Sin embargo, la producción que presentó a las 48 horas fue superior a las otras. En cuanto a las mutantes de esta última ronda de mutagénesis, se observa en la figura 17 que ninguna de ellas logró superar la producción de la cepa silvestre, siendo la mutante 22A la que resultó mejor produciendo prácticamente lo mismo que la cepa silvestre.

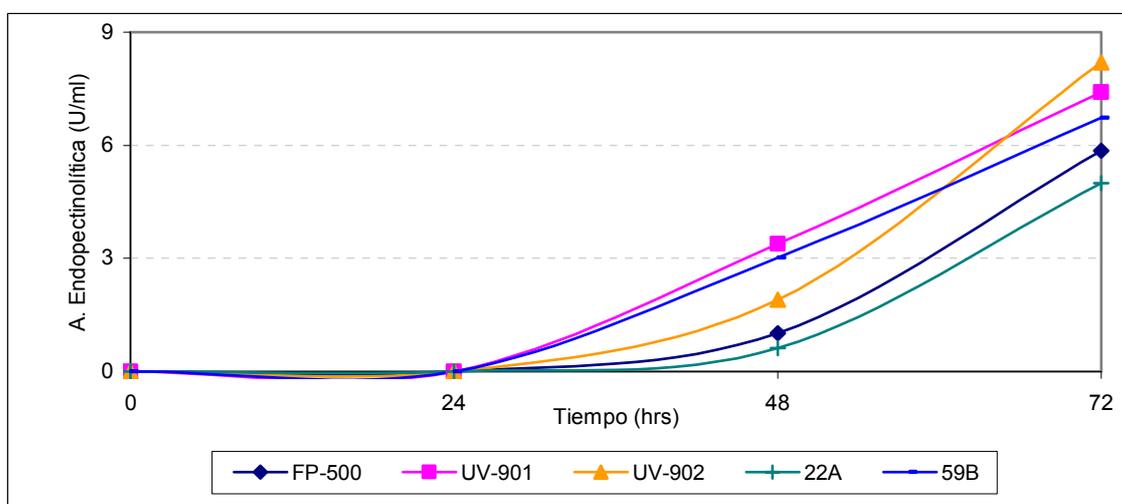


Fig. 18. Cinética de producción. Actividad endopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En esta imagen nuevamente se observa que las mutantes UV-901 y UV-902 son las que presentaron incrementos en la producción con respecto a la cepa silvestre, las nuevas mutantes no superaron su producción.

A pesar de que no se logró obtener ninguna mejoría en la producción por parte de las mutantes obtenidas, se eligió la 22A como la mejor de este tratamiento y se le nombró UV-993.

Tabla 6. Resumen de los incrementos en actividades enzimáticas por parte de las cepas UV-901, UV-902 y UV-993.

MUTANTES	% de incremento en A. Exopectinolítica	% de incremento en A. Pectinliasa	% de incremento en A. Endopectinolítica
UV-901 (antes 9015A)	14	43	35
UV-902 (antes 115B)	46	41	40
UV-993 (antes 22A)	0	-4	-15

3.2 Metodología de Enriquecimiento por filtración

Este tratamiento mutagénico se realizó a partir de la cepa silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500. La forma en la que se llevó a cabo este tratamiento mutagénico esta descrito en el punto 4.3.

La diferencia con los tratamientos mutagénicos anteriores es el método de recuperación de las mutantes obtenidas, ya que antes de crecerlas en medio completo se ponen las esporas irradiadas a germinar en medio basal líquido durante 24 horas para posteriormente filtrarlas, este procedimiento se realizó 3 veces. Finalmente se crecen como en los tratamientos mutagénicos anteriores en medio completo. Para este tratamiento de mutagénesis se expusieron las esporas durante un minuto y medio con la finalidad de obtener una sobrevivencia del 40%.

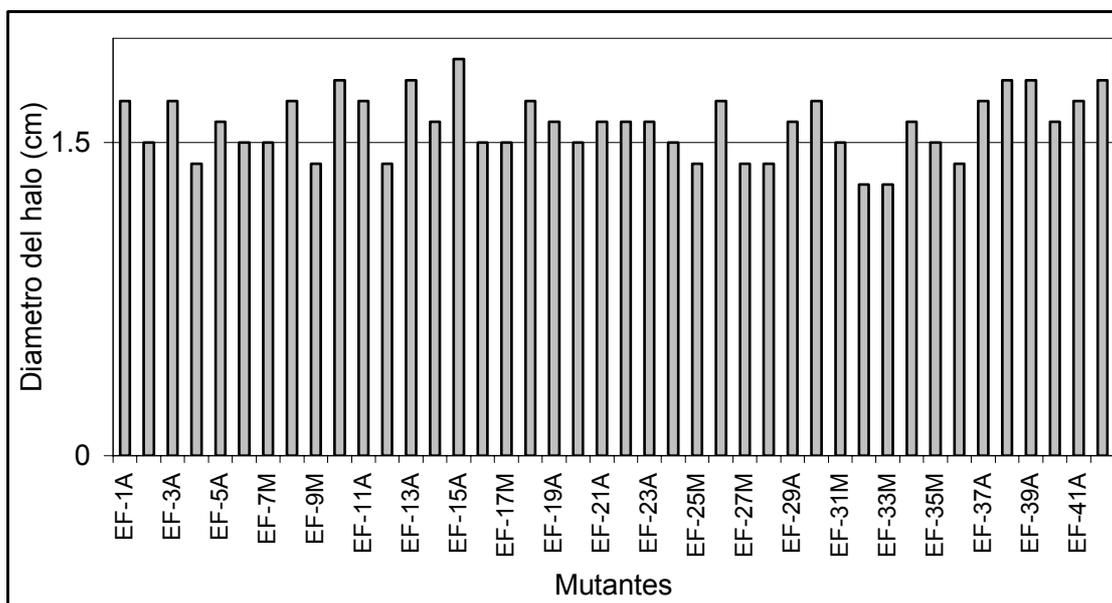


Fig. 19. Halos de hidrólisis obtenidos por las mutantes derivadas de la cepa silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500 mantenidas a 37°C durante 24 horas. La línea horizontal denota el halo de hidrólisis producido por la cepa silvestre

En la figura 19 se observan los halos de hidrólisis producidos por algunas de las mutantes obtenidas. Sin embargo, ninguno muestra una diferencia muy significativa, para tener una correcta identificación de cada una de las mutantes se agruparon de acuerdo a la tabla 3.

Una vez evaluadas las mutantes en medio sólido se realizaron pruebas en medio líquido, para lo cual se seleccionaron 8 mutantes del grupo M y 10 mutantes del grupo A.

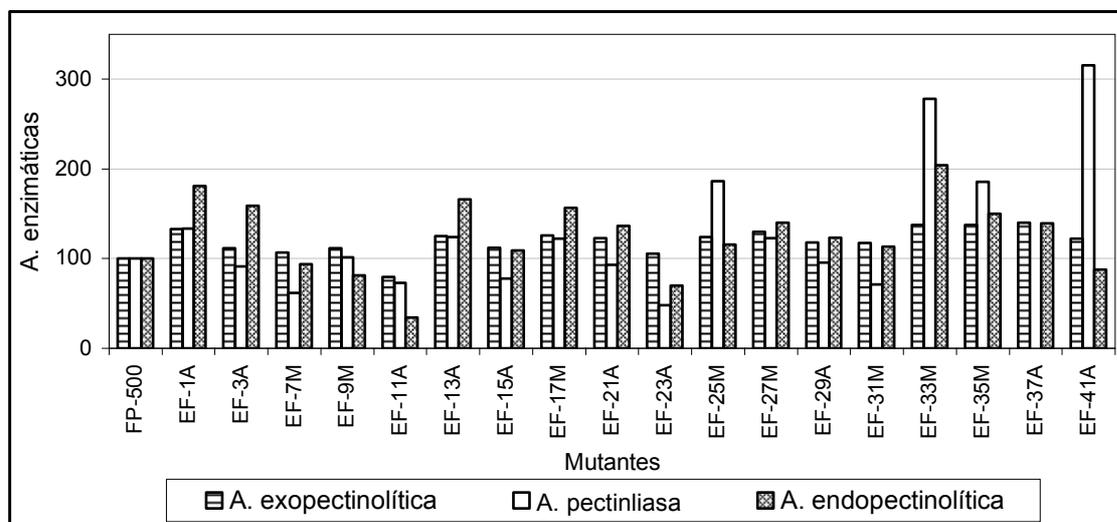


Fig. 20. Actividades enzimáticas producidas en frascos de 40 ml con 10 ml de medio a 37°C durante 72 horas en agitación orbital a 200 rpm

En la figura 20 podemos observar que la mayoría de las mutantes seleccionadas presentaron incrementos en al menos una de las actividades medidas. La mutante EF-33M es la que se observa con una producción mucho más elevada con respecto a la cepa silvestre, ya que en la actividad exopectinolítica tiene un incremento del 40%, en actividad pectinliasa del 178% y en actividad endopectinolítica del 100%, lo cual nos da un indicio de que puede ser una mutante que si tenga alterado su metabolismo y su producción enzimática sea elevada, es importante tener en cuenta que esta mutante pertenece al grupo M lo cual indica que en medio sólido no es de las que producen un halo de hidrólisis grande.

Otra mutante que se mostró interesante fue la EF-41A ya que a pesar de que su actividad endopectinolítica fue menor que la de la cepa silvestre su actividad exopectinolítica tuvo un incremento del 22%, pero sobre todo la actividad pectinliasa resulta importante en esta mutante debido a que el incremento fue de mas del 200%, lo cual no logró ninguna otra mutante.

De las mutantes que se evaluaron, se seleccionaron siete que mostraran resultados interesantes en términos de producción enzimática para realizarles una cinética de producción, los resultados de la evaluación de tres de ellas se muestra a continuación:

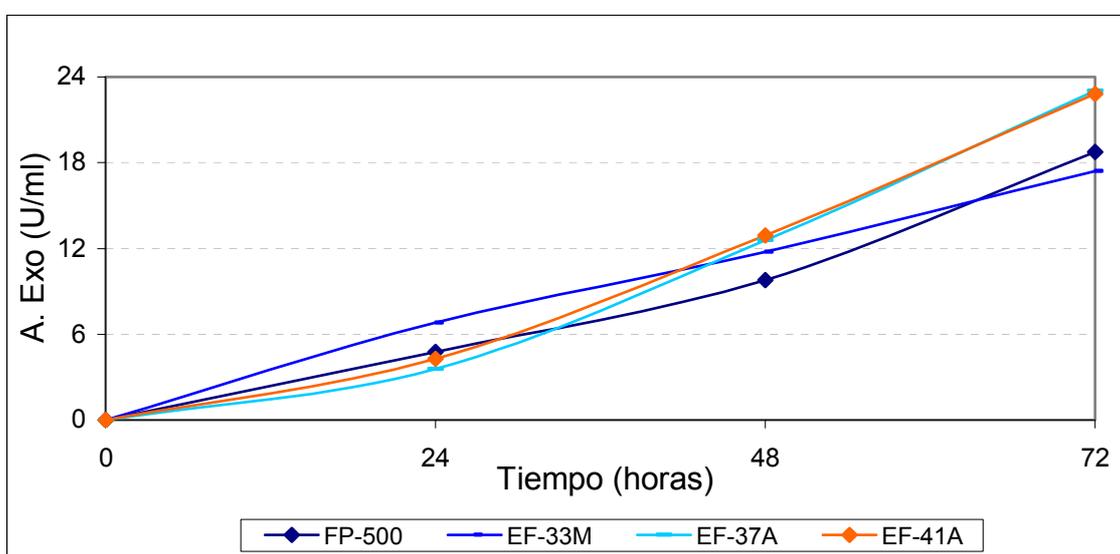


Fig. 21. Cinética de producción. Actividad exopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

Los resultados obtenidos no mostraron cambios muy relevantes entre las mutantes al compararlas con la cepa silvestre, ya que como se puede observar en la figura anterior solo las mutantes EF-37A y EF-41A mostraron un muy ligero incremento en su producción. En lo que respecta a la mutante EF-33M, ésta tuvo una producción ligeramente menor con respecto a la cepa silvestre.

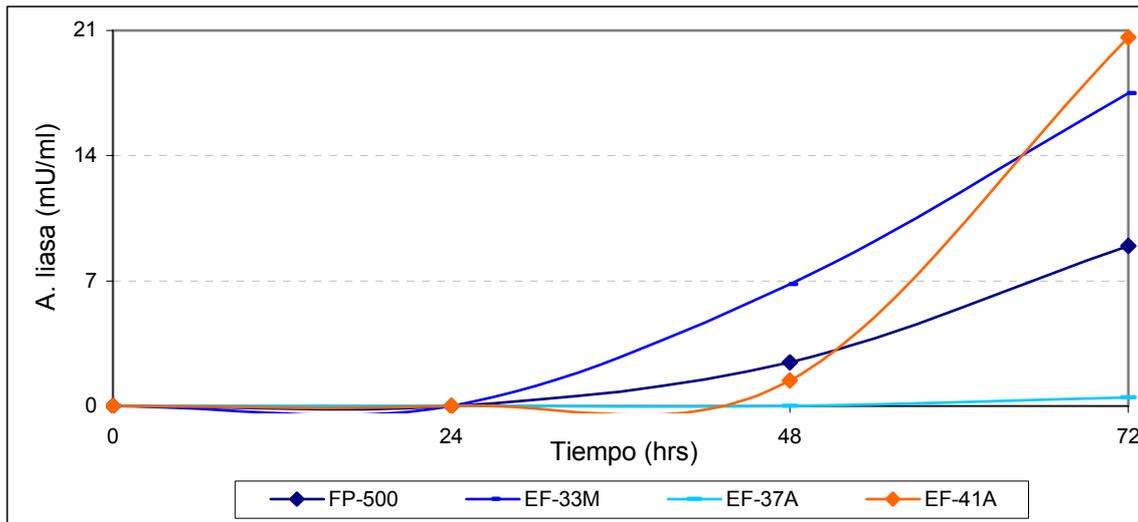


Fig. 22. Cinética de producción. Actividad pectinliasa producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En la figura 22 se observan incrementos importantes, sobre todo para la mutante EF-41A, ya que presentó un incremento de aproximadamente un 125% a las 72 horas, la mutante EF-33M incremento su producción en un 95% a las 72 horas, además de que a las 48 horas su actividad prácticamente ya era la misma que presenta la silvestre pero a las 72 horas. En lo que respecta a la mutante EF-37A se puede considerar como una mutante que no tuvo actividad pectinliasa.

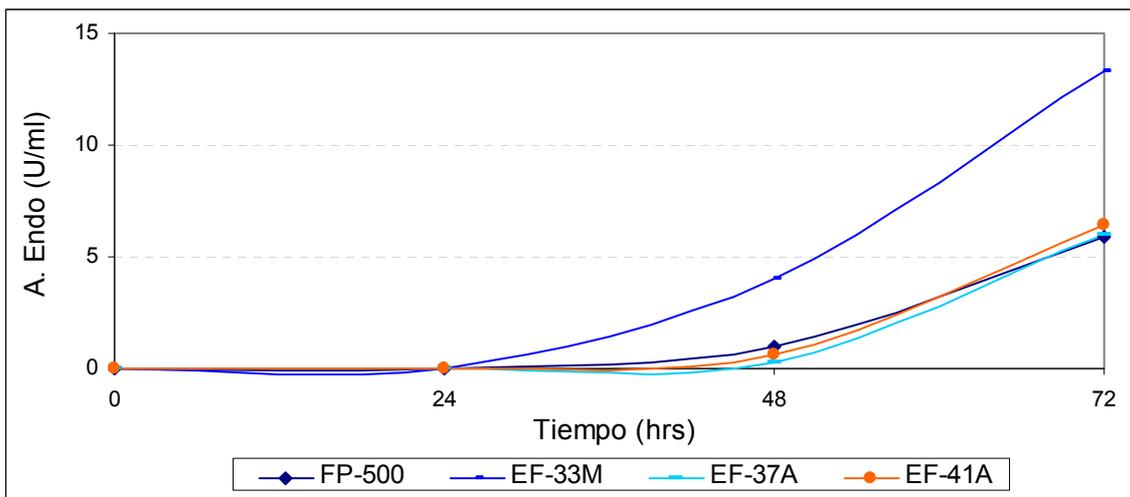


Fig. 23. Cinética de producción. Actividad endopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

La figura 23 muestra que las mutantes EF-37A y EF-41A tienen una producción prácticamente igual a la de la cepa silvestre. La mutante EF-33M resulta interesante ya que su producción se comienza a incrementar a partir de las 48 horas, logrando un aumento del 128% a las 72 horas.

Como se puede observar por los datos presentados anteriormente, la mutante EF-33M es la que presentó niveles superiores de producción en actividad pectinliasa y sobretodo en actividad endopectinolíctica, a pesar de que en actividad exopectinolíctica tuvo un ligero descenso en comparación con la cepa silvestre se opto por esta mutante ya que sus incrementos en la producción fueron muy considerables incluso a partir de las 48 horas.

A esta mutante se le nombró EF-601

Tabla 7. Resumen del incremento en las actividades por parte de la cepa EF-601

MUTANTES	% de incremento en A. Exopectinolíctica	% de incremento en A. Pectinliasa	% de incremento en A. Endopectinolíctica
UV-901 (antes 9015A)	14	43	35
UV-902 (antes 115B)	46	41	40
UV-993 (antes 22A)	0	-4	-15
EF-601 (antes EF-33M)	-7	95	128

3.2 Aislamiento mediante resistencia a la Represión catabólica

Este tratamiento mutagénico se realizó a partir de la cepa silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500. La forma en la que se llevó a cabo este tratamiento mutagénico esta descrito en el punto 4.3. La diferencia con los tratamientos mutagénicos anteriores fue que las mutantes seleccionadas se recuperaron en medio con 2-Desoxiglucosa para de esta manera obtener mutantes resistentes a la represión catabólica. Para este tratamiento de mutagénesis se expusieron las esporas durante cuatro minutos con la finalidad de obtener una sobrevivencia aproximada del 1%.

Los resultados son los siguientes:

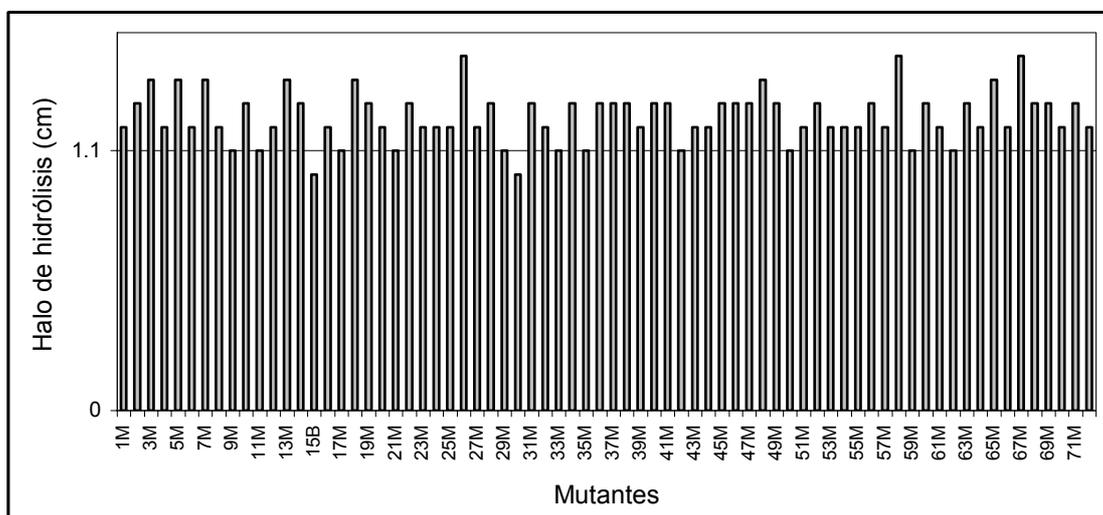


Fig. 24. Halos de hidrólisis obtenidos por las mutantes derivadas de la cepa silvestre *Aspergillus* FP-500 en presencia de 2DG mantenidas a 37°C durante 24 horas. La línea horizontal denota el halo de hidrólisis producido por la cepa silvestre.

Como se puede observar en la figura 24, si existe un cambio en el tamaño del halo de hidrólisis producido tanto por la cepa silvestre como por las mutantes, esto debido a que su recuperación se llevo a cabo en presencia de 2DG al 1%.

Cabe mencionar que el único efecto que se produjo fue una ligera reducción en el tamaño de halo, sin embargo esta reducción no es tan importante, ya que al agruparlas por el diámetro del halo de hidrólisis que produjeron, caso todas entrarían en el grupo M, solo dos pertenecen al grupo B.

Una vez evaluadas las mutantes en medio sólido en presencia de 2DG se realizaron pruebas en medio líquido, para lo cual se seleccionaron las mutantes que con 2DG produjeron los halos más pequeños y más grandes, teniendo una selección final de 20 mutantes.

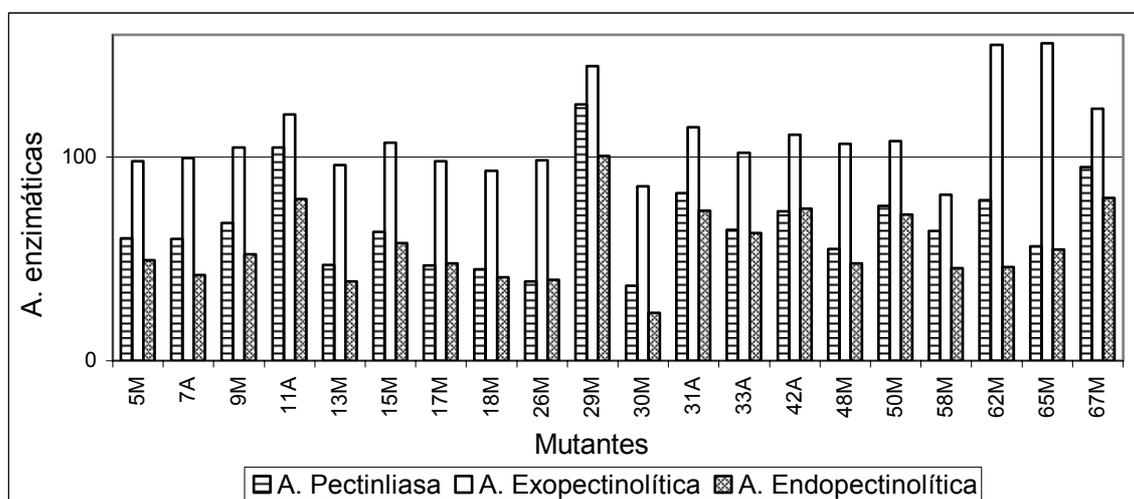


Fig. 25. Actividades enzimáticas producidas en frascos de 40 ml con 10 ml de medio a 37°C durante 72 horas en agitación orbital a 200 rpm

En la figura 25 se observa que la mayoría de las mutantes evaluadas tiene una producción enzimática inferior a la de la cepa silvestre, sobretodo en lo que se refiere a la actividad endopectinolíftica y pectinliasa. La mutante 11A tuvo un incremento en la actividad exopectinolíftica del 20% y un 5% en la actividad pectinliasa, sin embargo su actividad endopectinolíftica se redujo en un 20%.

La mutante 29M fue la que dio resultados más interesantes, ya que incrementó su actividad exopectinolíftica en un 45%, la actividad pectinliasa tuvo un incremento del 25% y la actividad endopectinolíftica prácticamente no tuvo cambios.

Otras mutantes que mostraron incrementos en la actividad exopectinolítica fueron la 62M, 65M y 67M.

Hecha la evaluación de las mutantes se seleccionaron las 5 que mostraron una mayor producción y la 30M, la cual produce menos, para realizarles una cinética de producción

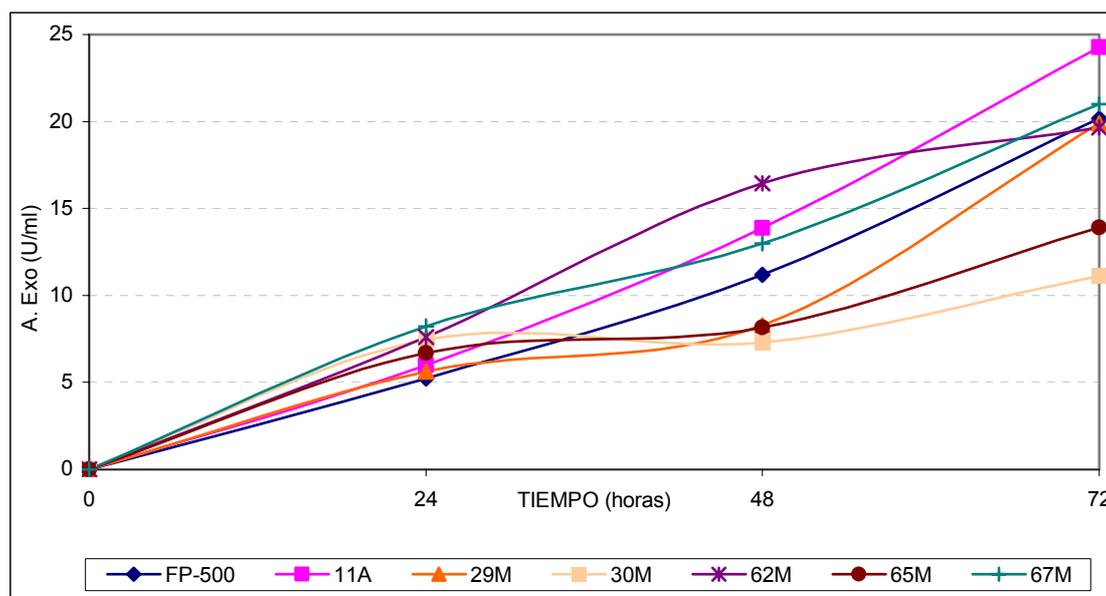


Fig. 26. Cinética de producción. Actividad exopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En la grafica 26 se puede observar que si a las 48 horas de fermentación se tuviera que hacer una selección de las mejores productoras, se elegirían la 11A, 62M y 67M, ya que su producción es superior a la cepa silvestre. La mutante 62M resulta interesante, ya que su actividad a las 48 horas es muy superior a la cepa silvestre. La mutante 11A que a las 48 horas mostró un incrementó importante también lo tiene a las 72 horas, ya que continúo incrementando su producción y logró superar a la silvestre en aproximadamente un 25%.

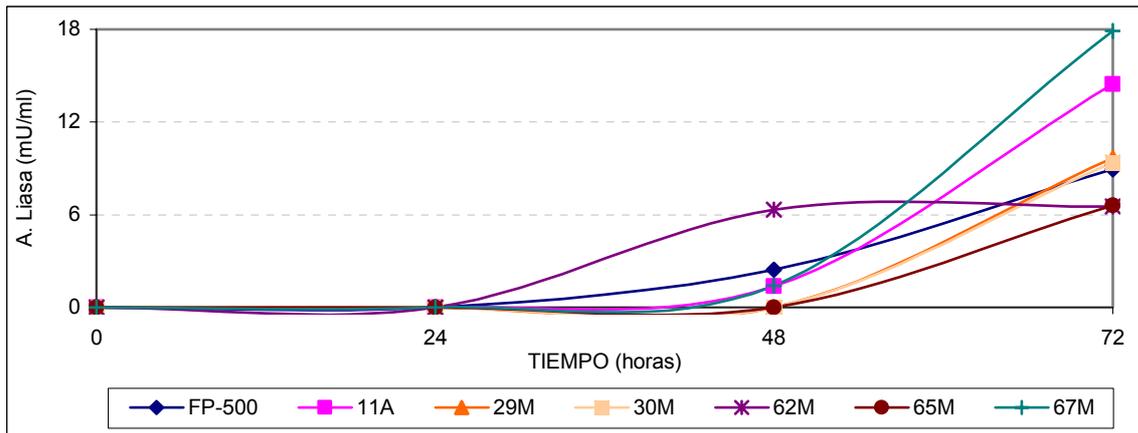


Fig. 27. Cinética de producción. Actividad pectinliasa producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En la figura 27 se puede observar que las mutantes 65M y 62M tienen una producción inferior a la de la cepa silvestre a las 72 horas, sin embargo esta última a las 48 horas presenta su actividad máxima, la cual es cercana a la obtenida con la cepa silvestre a las 72 horas.

Las mutantes 29M y 30M aumentaron muy ligeramente su producción, sin embargo su comportamiento y producción es muy parecida a la de la cepa silvestre. La mutante 11A es interesante ya que a las 72 horas de fermentación tiene un incremento en su producción de casi el 90% con respecto a la cepa silvestre. La mutante 67M fue la que mostró cambios más importantes ya que tuvo un incremento en su producción fue cercano al 100% a las 72 horas.

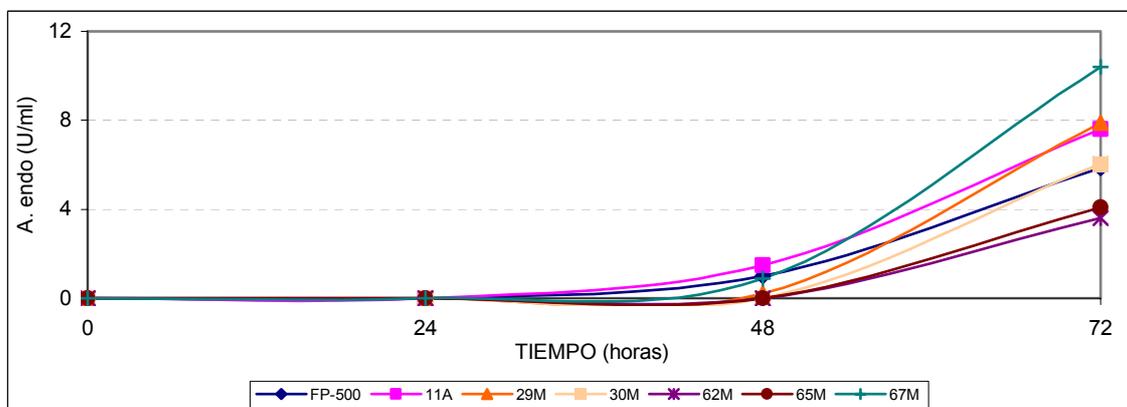


Fig. 28. Cinética de producción. Actividad endopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm

En la figura 28 se puede observar que las mutantes 65M y 62M tuvieron una menor producción que la cepa silvestre, la mutante 30M a pesar de que tuvo un ligero incremento no resulta de gran importancia ya que prácticamente tiene el mismo comportamiento que la silvestre a lo largo del experimento.

Las mutantes 29M y 11A mostraron un incremento cercano al 40%, cabe mencionar que la 11A comenzó a incrementar su producción desde las 48 horas, lo cual no sucedió con el resto de las mutantes. La mutante que tuvo un comportamiento interesante fue la 67M, ya que a las 72 horas su actividad se incremento en casi un 80%, siendo esta la mejor mutante de este tratamiento.

A esta mutante se le nombró 99DG-1

Tabla 8. Resumen del incremento en las actividades por parte de la cepa 99DG-1

MUTANTES	% de incremento en A. Exopectinolítica	% de incremento en A. Pectinlisa	% de incremento en A. Endopectinolítica
UV-901 (antes 9015A)	14	43	35
UV-902 (antes 115B)	46	41	40
UV-993 (antes 22A)	0	-4	-15
EF-601 (antes EF- 33M)	-7	95	128
99DG-1 (antes 67M)	4	100	77

4. Evaluación de las mutantes seleccionadas de cada tratamiento mutagénico en cáscara de limón y pectina.

Habiendo obtenido la mejor mutante de cada tratamiento mutagénico, se realizó un experimento en el cual se evaluó la producción de cada mutante junto con la cepa silvestre *Aspergillus flavipes* FP-500 teniendo como sustrato pectina y cáscara de limón, con el fin de evaluar su producción al tener como fuente de carbono un residuo agroindustrial.

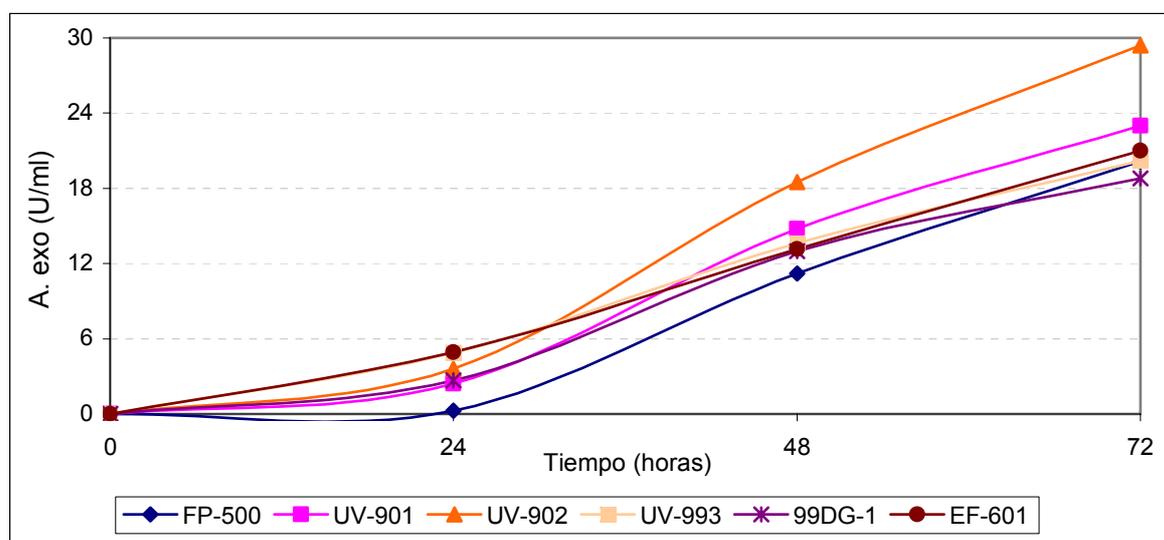


Fig. 29. Actividad exopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm utilizando pectina como fuente de carbono

En la figura 29 se puede observar que las mutantes UV-901, UV-993, 99DG-1 y la EF-601 presentan un comportamiento similar a la cepa silvestre sobre todo a las 72 horas. Sin embargo, lo que las diferencia de la silvestre es que su producción comienza desde las 24 horas. La mutante UV-902 mostró resultados interesantes, ya que su actividad se comienza a observar diferente de las otras mutantes desde las 48 horas, e incluso su actividad fue mayor que la de la cepa silvestre a las 72 horas, al llegar al final de la fermentación esta mutante logró incrementar su producción en un 46%.

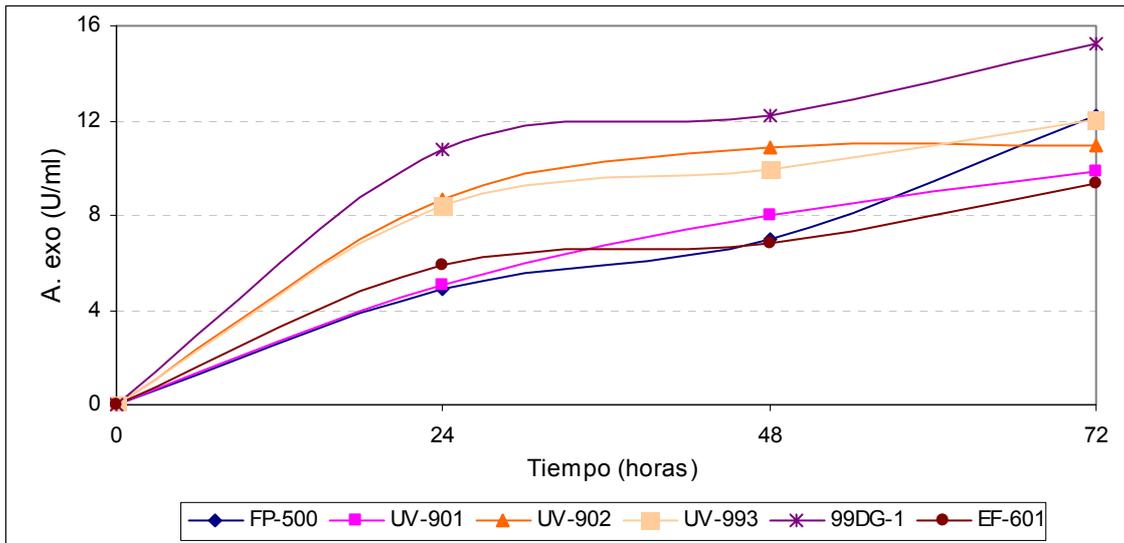


Fig. 30. Actividad exopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm utilizando cáscara de limón como fuente de carbono

En la figura 30 se puede observar que la mutante 99DG-1 es la que presentó la mayor actividad. Es importante tomar en cuenta que desde las 24 horas su producción ya se comienza a ver superior a las otras, y a las 48 horas ya supero la actividad que presentan las otras a las 72 horas.

A pesar de que en la figura 29 y 30 se esta midiendo la misma actividad, esta es diferente, ya que en la figura 30 se observa que a excepción de la mutante 99DG-1, las otras mutantes tuvieron una menor actividad enzimática.

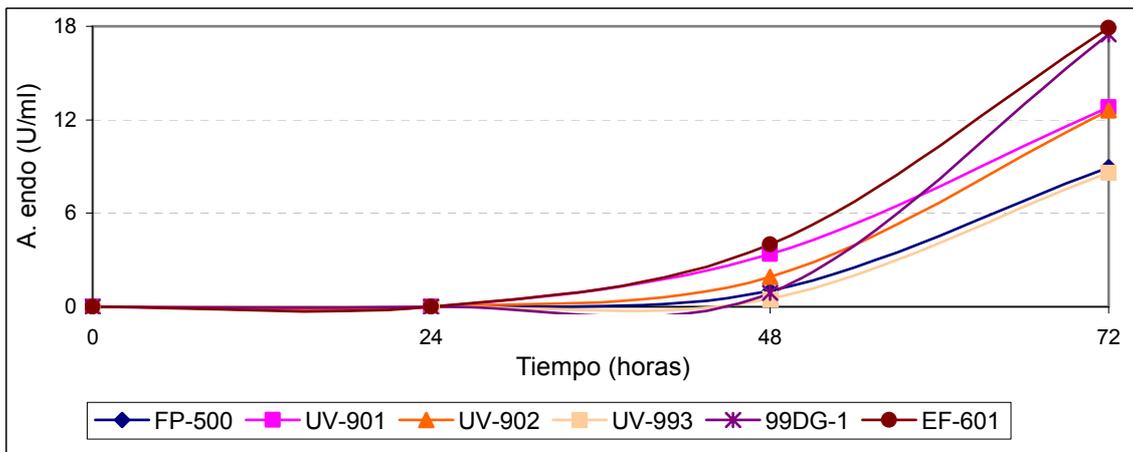


Fig. 31. Cinética de producción. Actividad endopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm utilizando pectina como fuente de carbono

En la figura 31 se puede observar que solo la mutante UV-993 presentó casi la misma actividad que la cepa silvestre, ya que las otras mutantes mostraron un incremento, sobretodo destaca la mutante EF-601 ya que su incremento se comenzó a ver desde las 48 horas y a las 72 horas su incremento fue superior al 100% con respecto a la cepa silvestre.

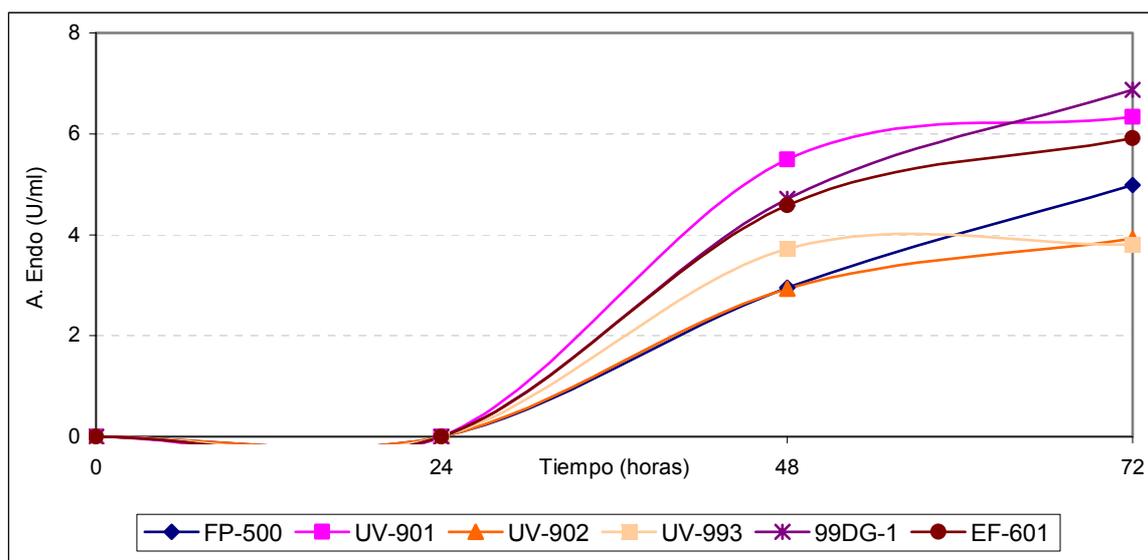


Fig. 32. Cinética de producción. Actividad endopectinolítica producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm utilizando cáscara de limón como fuente de carbono

En la figura 32 se observa que las mutantes UV-902 y UV-903 tuvieron una menor actividad que la cepa silvestre, las otras tres mutantes tuvieron una mayor actividad, siendo la mutante 99DG-1 la que produjo más a las 72 horas seguida de la UV-901, sin embargo esta última presentó una mayor producción a las 48 horas.

Se observan diferencias claras entre la figura 30 y 31, ya que la mutante que en pectina producía más, no lo hace en cáscara de limón.

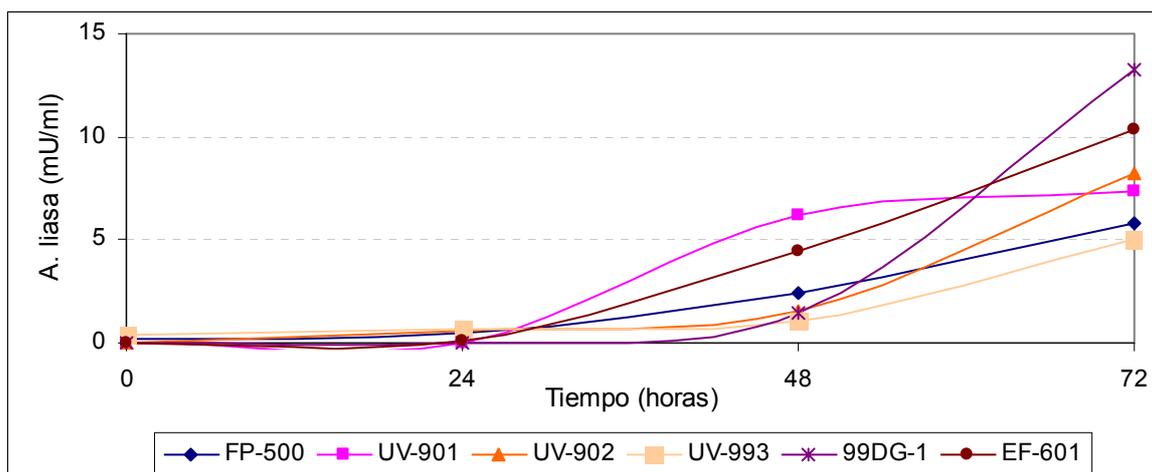


Fig. 33. Cinética de producción. Actividad pectinliasa producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm utilizando pectina como fuente de carbono.

En la figura 33 se observa que todas las mutantes obtenidas presentaron algún incremento en su actividad enzimática, es importante mencionar que la UV-901 alcanza su máximo de actividad a las 48 horas, la 99DG-1 logró aumentar su producción en un 100% a las 72 horas. Sin embargo, su actividad a las 48 horas era muy baja. La mutante EF-601 desde las 48 horas comenzó a incrementar su producción enzimática logrando alcanzar a las 72 horas su máxima producción y superando a la silvestre en un 95%.

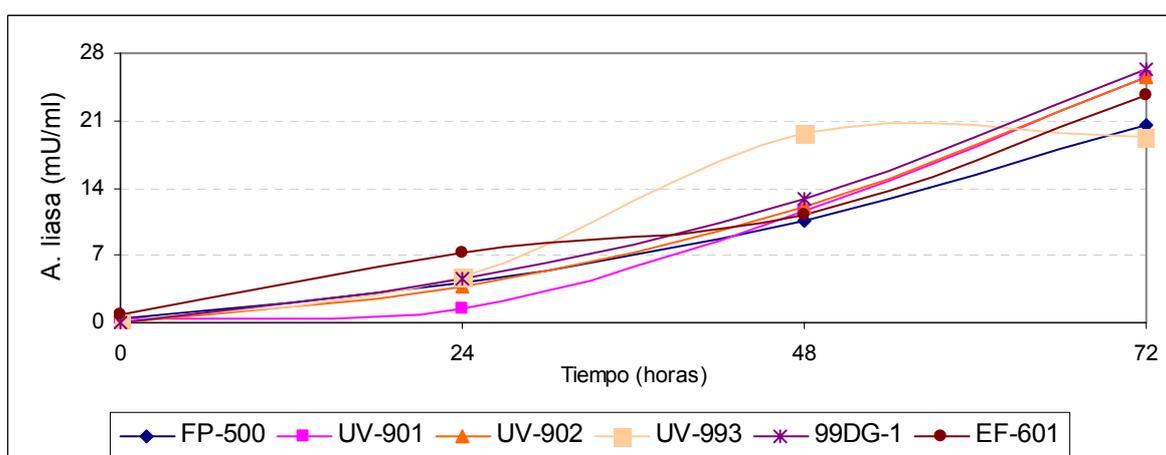


Fig. 34. Cinética de producción. Actividad pectinliasa producida en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C en agitación orbital a 200 rpm utilizando cáscara de limón como fuente de carbono.

En la gráfica anterior podemos observar que cuatro mutantes lograron incrementar su actividad con respecto a la cepa silvestre, siendo la 99DG-1 la que logró el mayor incremento, el cual fue del 30%.

Entre la figura 33 y 34 se pueden observar algunas diferencias, ya que el incremento que tuvieron las mutantes teniendo como sustrato pectina fue mayor, la mutante EF-601 logró superar el 100% y como se puede ver en la figura 34 su incremento fue de tan solo el 15% con respecto a la cepa silvestre, además de que ya no fue la que produjo mas.

Tabla 9. Incremento en las actividades enzimáticas de las mutantes seleccionadas

PECTINA COMO FUENTE DE CARBONO						
Mutantes	A. Exopectinolítica		A. Pectinlisa		A. Endopectinolítica	
FP-500 WT	20.2	$\rho = 1.714$	8.9	$\rho = 0.805$	5.85	$\rho = 0.551$
UV-901	23.0	$\rho = 2.296$	12.8	$\rho = 1.506$	7.4	$\rho = 0.900$
UV-902	29.4	$\rho = 0.812$	12.6	$\rho = 1.263$	8.2	$\rho = 0.754$
UV-993	20.2	$\rho = 2.410$	8.6	$\rho = 0.569$	5.0	$\rho = 0.806$
99DG-1	18.8	$\rho = 1.697$	17.5	$\rho = 0.269$	13.3	$\rho = 0.565$
EF-601	21.0	$\rho = 1.569$	17.9	$\rho = 0.382$	10.4	$\rho = 0.763$
CÁSCARA DE LIMÓN COMO FUENTE DE CARBONO						
Mutantes	A. Exopectinolítica		A. Pectinlisa		A. Endopectinolítica	
FP-500 WT	12.21	$\rho = 0.395$	4.99	$\rho = 0.608$	20.55	$\rho = 0.678$
UV-901	9.84	$\rho = 0.254$	6.33	$\rho = 0.169$	25.53	$\rho = 0.820$
UV-902	10.96	$\rho = 0.664$	3.92	$\rho = 0.565$	25.58	$\rho = 1.074$
UV-993	12.06	$\rho = 0.282$	3.80	$\rho = 0.155$	19.37	$\rho = 2.093$
99DG-1	15.21	$\rho = 0.876$	6.87	$\rho = 0.820$	26.41	$\rho = 0.749$
EF-601	9.36	$\rho = 0.537$	5.91	$\rho = 0.197$	23.72	$\rho = 1.117$

ρ = Desviación estándar

- Se obtuvieron mutantes de la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500 WT con una mayor producción de pectinasas.
- Se desarrolló un protocolo para la obtención de mutantes de *Aspergillus flavipes* FP-500.
- Se estableció una metodología sencilla para el análisis y selección de mutantes con una alta producción enzimática.
- Se identificó la influencia que las condiciones de fermentación tienen sobre la producción enzimática.
- La mutante obtenida mediante la metodología de resistencia a la represión catabólica 99DG-1 que incremento su producción un 127% en actividad endopectinolítica y un 96% en actividad pectinliasa fue la más productiva.
- Se observó que la producción enzimática depende de la fuente de carbono.
- Se mostró que las mutantes no producen igual en medio líquido que en medio sólido.

- Aguilar, G., Trejo, B., Visser, J. (1996). Pectinase secretion by *Aspergillus* FP-180 and *Aspergillus niger* N-402 growing under stress induced by the pH of culture medium. *Pectins and Pectinases*. 915-920.
- Archer, D.B. y D.A. Wood. (1995). Fungal exoenzymes. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The Growing fungus*. Chapman and may. Londres. pp 135-162.
- Bartnicki-García, S. The cell wall: a crucial structure in fungal evolution. En: Rayner, A.D.M., C.M. Brasier y D. Moore (Eds). *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge University Press Cambridge. pp 389-403.
- Blandino, A., Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S.S., Webb, C. (2001). Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochemistry*. 37:497-503
- Carlile, M.J. (1995). The success of the hypha and mycelium. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman and may. Londres. pp 3-19.
- Cassiolato, A., Soares, Itamar., (1999). Filtration enrichment method for isolation of auxotrophic mutants of *Trichoderma harzianum* rifai. *Revista de Microbiología.*, 30; 43-46.

- De Vries, R.P., and Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(4): 497-522.
- Fiedurek, J., Pielecki, J., Skowronek, M., (2000). Direct methods for selecting mutants with increased production of invertase from mutagenized cultures of *Aspergillus fumigatus*. *J. Basic Microbiol.*, 40; 111-118.
- Gow, N.A.R. (1995). Yeast-hyphal dimorphism. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman and Hall. Londres. pp 403-422.
- Hadj, N., Ayadi, M., Trigui, S., Bouabdallah, F., Gargouri, A., (2002). Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme Microb. Technol.*, 30; 662-666.
- Harvey, L.M., McNeil, B. (1994). Liquid Fermentation System and Product Recovery of *Aspergillus*. Pp 141-176. En Smith J.E. *Biotechnology Handbooks 7: Aspergillus*. Plenum Press. New York.
- Hernández, A.M. (1995). Evaluación del efecto del pH y la fuente de carbono sobre la producción de xilanasas en cepas de *Aspergillus* creciendo a 45°C. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. 1-18.

- Loera, O., González, V., Aguirre, J., (1999). Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. *Enzyme Microb. Technol.*, 25; 103-108.
- Parenicová, L. (2000) Pectinases of *Aspergillus niger*. A molecular and biochemical characterization. Tesis de Doctorado. Wageningen Agricultural University. Holanda. 2-28.
- Smith, J.E., *Aspergillus*. Biotechnology handbooks, Vol.7. United States of America. 1994. New York.