

03072

13  
281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**FALLA DE ORIGEN**

**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES  
DE *Aspergillus nidulans* INCAPACES DE UTILIZAR  
LIPIDOS COMO FUENTE DE CARBONO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA**

**P R E S E N T A :**

**BIOL. LAURA KAWASAKI WATANABE**



## **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 está 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.

## *Agradecimientos*

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Dra. Alicia González Manjarrez

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

por sus valiosos comentarios y aportaciones a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Gracias al jurado formado por los doctores:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Dr. Jesús Aguirre Linares

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

por la rápida y eficiente revisión del trabajo.

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Química y en el Instituto de Fisiología Celular, bajo el asesoramiento de la Dra. Amelia Farrés y del Dr. Jesús Aguirre, contando para ello con beca de CONACyT.

## *Agradecimientos*

Agradezco muy especialmente al Dr. Jesús Aguirre por compartir conmigo un poco de lo mucho que conoce sobre *Aspergillus nidulans*, por darme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría y porque sin su ayuda, la realización de este trabajo no habría sido posible.

Agradezco a la Dra. Amelia Farrés por su gran ayuda y paciencia a lo largo de todo este tiempo. Gracias por brindarme tu valiosa amistad.

## *Agradecimientos*

Gracias a Lety García por todo su apoyo desde el inicio hasta la conclusión de este trabajo. Gracias también por ser una amiga tan especial.

Gracias Lety, mi hermanita querida, por su enorme ayuda en la elaboración de dibujos y en el arreglo de fotografías.

Agradezco también a todos los miembros del grupo de trabajo de Amelia por su amistad y apoyo: Paty, Luis Alberto, Pablo, Luisa, Alicia, Adelfo, Jesús, Ma. Luisa, Alicia, Enrique, Elsa, Rodolfo, Ismael, René, Noé.

Agradezco especialmente a Denhi, Isaac, Maura, Mónica, Olivia, Rosa y Rosalinda por haberme ayudado tanto, por hacerme sentir como en casa en su laboratorio y por darme la oportunidad de convivir con ellos haciendo el trabajo mas divertido.

Gracias a mis amigos de toda la vida: Ana Luz, Susi y Fernando.

**Dedico el presente trabajo**

**A mis padres, Amalia y Alfredo, a mis hermanos Silvia, Lety y Juan Carlos y a mi sobrinito Carlitos, por brindarme su apoyo incondicional.**

**A Carlos, con amor, por acompañarme todo este tiempo y apoyarme en los momentos mas difíciles**

**A mis padrinos Rosy y Roberto, con cariño.**

**A la memoria de mis queridos primos Makoto y Flavio**

No nos preguntamos qué propósito útil hay en el canto de los pájaros,  
cantar es su desco desde que fueron creados para cantar.  
Del mismo modo no debemos preguntarnos por qué la mente humana  
se preocupa por penetrar los secretos de los cielos.....  
La diversidad de los fenómenos de la Naturaleza es tan grande y los  
tesoros que encierran los cielos tan ricos, precisamente para que la  
mente del hombre nunca se encuentre carente de su alimento básico.

Johannes Kepler, *Mysterium Cosmographicum*

**INDICE**

<b>Introducción</b>	
1. Las lipasas	1
1.1. Definición, clasificación y distribución	1
1.2. Sus usos	2
1.3. Regulación de la síntesis de lipasas	4
1.4. Clonación y secuenciación	5
1.5. Importancia fisiológica de las lipasas	6
2. Metabolismo de los lípidos y del acetato	7
3. <i>Aspergillus nidulans</i>	
3.1. El ciclo de vida y las ventajas como modelo de experimentación	9
3.2. Las lipasas en <i>Aspergillus</i>	15
3.3. La represión catabólica por carbono y el papel del gen <i>creA</i>	15
<b>Objetivos</b>	16
<b>Materiales y Métodos</b>	
1. Cepas empleadas de <i>A. nidulans</i>	17
2. Los medios de cultivo	
2.1. El medio mínimo	17
2.2. Los medios con tributirina o aceite de olivo	19
3. La preparación de inóculo	19
4. Los cultivos en medio líquido	19
4.1. El procesamiento de las muestras de los cultivos líquidos	20
5. La medición de la actividad lipolítica, cuantificación de la protefna y la medición del pH	20
6. La genética	
6.1. La mutagénesis	21



6.2. La réplica con terciopelo	22
6.3. La obtención de diploides	23
6.4. Las cruza sexuales	23
6.5. El mapeo genético	24
6.6. La transformación genética	25
7. Los experimentos con celofán	26
8. Los geles de poli(acrilamida	
8.1. Las condiciones de electroforesis y la tinción	27
8.2. La medición de la actividad lipolítica en geles	27
9. Germinación de las cepas mutantes en diferentes fuentes de carbono	28
<b>Resultados y Discusión</b>	
1. Crecimiento de las cepas en lípidos	29
2. Mutagénesis	29
3. Genética	
3.1. Mapeo	30
3.2. Transformación	34
3.3. Crecimiento en tributirina después de germinar en glucosa. Definición de los grupos de complementación	35
4. Actividad lipolítica	40
5. Geles de proteínas	45
6. Germinación	46
<b>Conclusiones</b>	53
<b>Referencias</b>	54

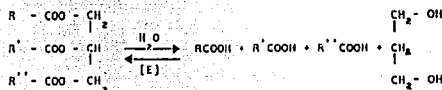
## INTRODUCCION

### 1. Lipasas.

#### 1.1. Definición, clasificación y distribución.

Las lipasas son enzimas distribuidas ampliamente, se encuentran en plantas, animales y microorganismos. Su función es la hidrólisis reversible de triglicéridos para formar como productos diglicéridos, monoglicéridos y glicerol (Figura 1). La característica principal de las lipasas es que su actividad es máxima solamente cuando la enzima está actuando en la interfase aceite-agua, propiedad conocida como activación en interfase. En este tipo de reacciones, como el sustrato es insoluble, se encuentra en forma de bicapa o de micelas (Derewenda y Sharp, 1993).

#### A) Lipasa no específica



#### B) Lipasa 1,3- específica

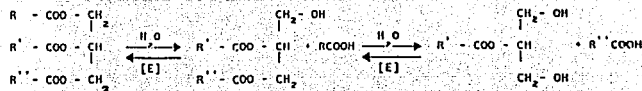


Figura 1. Reacción de una lipasa inespecífica (A) y de una específica (B) sobre un triglicérido.

Las lipasas se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo con su especificidad (MacRae y Hammond, 1985):

- El primero lo forman las lipasas inespecíficas, es decir, aquéllas que hidrolizan el enlace éster de cualquier posición en el triglicérido, sin importar la longitud ni la saturación de la cadena.
- El segundo está formado por las lipasas específicas en cuanto a la posición del enlace que hidrolizan, ya que sólo rompen los de las posiciones 1 y 3 del triglicérido.
- El tercer grupo está constituido por las lipasas que discriminan la longitud de la

cadena del ácido graso, tal como la lipasa de *Geotrichum candidum*, que es específica para cadena larga con un doble enlace en posición *cis* en el carbono 9. Hay algunas más como la de *Penicillium camembertii* (cepa U-15) que solamente hidrolizan ácidos grasos de mono y diglicéridos, pero no de triglicéridos. Algunos ejemplos de cada grupo de lipasas se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Ejemplos de lipasas microbianas agrupadas según su especificidad.  
(Sakaguchi, *et al.*, 1992; MacRae, 1983).

Inespecíficas	Específicas 1,3	Específicas en la longitud de cadena del ácido graso
<i>Candida cylindracea</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Corinebacterium acnes</i>	<i>Humicola lanuginosa</i> No.3	
<i>Penicillium cycloptium</i>	<i>Leptospirae pomana</i>	
<i>Penicillium roquefortii</i>	<i>Mucor miehei</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Mucor javanicus</i>	
	<i>Rhizopus delemar</i>	
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	
	<i>Rhizopus chinensis</i>	
	<i>Rhizopus javanicus</i>	
	<i>Rhizopus niveus</i>	

La masa molecular de estas enzimas es muy variable y se encuentra en el rango de 20 a 60 kDa. La mayoría de ellas son glicosiladas y el residuo más abundante es generalmente manosa (Kilara, 1985).

## 1.2. Usos.

En la Tabla 2 se enlistan algunos usos para las lipasas. Estas enzimas participan en reacciones llevadas a cabo con micelas reversas en disolventes orgánicos, lo cual es sumamente útil dentro de la industria química. Existen patentes y productos en el mercado internacional que contienen estas enzimas. Las patentes de alimentos generalmente se relacionan con la producción de alimentos tratados con lipasas para mejorar el sabor, o bien, para imitar ciertas características del producto original. Las

patentes que describen la utilización de lipasas se inician en 1939 y provienen principalmente de Estados Unidos, Gran Bretaña, Canadá y Japón (Kilara, 1985).

**Tabla 2.** Diversos usos de las lipasas (Arnold *et al.*, 1975; Kilara, 1985; Harwood, 1989; Langrand *et al.*, 1990; Charton y MacRae, 1993; Stamatis *et al.*, 1993)

Alimentos	Otros usos
Mezclas para hacer pasteles y galletas	Esterificación en disolventes orgánicos
Harinas para hacer hot cakes	Trans e interesterificación de aceites
Cereales	Síntesis de péptidos
Imitación de productos lácteos	Síntesis de ésteres
Rellenos de crema (dulces, chicolosos)	Detergentes
Cremas	
Salsas de queso, botanas	
Margarinas	
Aderezos de ensaladas, salsas	
Quesos madurados (italiano, azul, cheddar, provolone, romano, mozzarella)	
Yoghurt	

La mayoría de las lipasas sintetizadas por los hongos son extracelulares y algunos organismos tienen dos enzimas, como es el caso de *Geotrichum candidum* (Sugihara *et al.*, 1990; Veeraragavan *et al.*, 1990), *Rhizopus delemar* (Iwai y Tsujisaka, 1974), *Candida cylindracea* (Rúa *et al.*, 1993) y *Aspergillus niger* (Höfelmann *et al.*, 1985). Sin embargo, también las hay unidas a membrana como las de *Yarrowia lipolytica* que, de las tres lipasas que tiene, dos están precisamente en la membrana y la tercera es extracelular (Nga *et al.*, 1989).

Las lipasas de mayor interés industrial son aquellas que son:

- extracelulares, ya que son más fáciles de purificar y, por lo tanto, el costo de extracción disminuye considerablemente.
- de origen microbiano, particularmente de hongos, dadas las ventajas que confiere el manejo de estos organismos y, además, algunas cepas comerciales de hongos tienen altos niveles de secreción de lipasas.
- específica, ya que esto permite las reacciones de trans e interesterificación con un sustrato determinado y obtener únicamente el producto deseado.

Un ejemplo del uso de una lipasa específica 1,3 es la obtención de un sustituto de manteca de cacao a partir del aceite de palma, que es una materia prima barata. La lipasa de *Rhizopus arrhizus*, inmovilizada en celita, interesterifica triglicéridos en presencia de ácido esteárico en n-hexano, obteniéndose una mezcla de triglicéridos muy similar a la de la manteca de cacao (Mojovic, *et al.*, 1993)

En el mercado internacional existen proveedores de lipasas provenientes de diversos microorganismos. En la Tabla 3 se presentan algunos ejemplos de éstas.

**Tabla 3.** Ejemplos de lipasas comerciales. (Kilara, 1985; Vorderwulbecke, *et al.*, 1992)

Microorganismo	Proveedor
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Pseudomonas</i> . <i>fluorescens</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>Rhizopus</i> <i>javanicus</i> , <i>Rhizopus niveus</i>	Amano
<i>Candida lipolytica</i> , <i>Chromobacterium</i> <i>viscosum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Penicillium</i> <i>roquefortii</i>	Biocatalysts
<i>Candida lipolytica</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>Penicillium roquefortii</i> , <i>Rhizopus</i> <i>arrhizus</i> , <i>Rhizopus niveus</i>	Fluka
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Genzyme Biochemicals
<i>Mucor miehei</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i>	Gist-Brocades
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Hughes & Hughes, Ltd.
<i>Aspergillus niger</i>	John & E. Sturge, Ltd.
<i>Rhizopus</i>	Nagase
<i>Aspergillus niger</i>	Novo
<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Roehm
<i>Rhizopus sp.</i>	Serva
<i>Candida cylindracea</i>	Sigma

### 1.3. Regulación de la síntesis de lipasas.

En los microorganismos, el proceso de síntesis de las lipasas reacciona de diferente manera ante la presencia de aceites (inductores) en el medio de cultivo, ya que en algunos casos aumentan la producción, pero en otros la disminuyen. Probablemente los

lípidos no son las moléculas inductoras, ya que son muy poco solubles en agua. Tal vez el efector sea un producto de la degradación de lípidos, como podría ser el glicerol (Haas y Bailey, 1993). En *Rhizopus oligosporus* los aceites de algodón, soya, olivo y maíz adicionados en el medio como única fuente de carbono (al 0.5%), reducen considerablemente la producción. Los Tween 20 y 80, en cambio, tienen un efecto inductor (Nahas, 1988). Estos compuestos se degradan por la acción de las lipasas, liberando ácidos grasos que posteriormente se degradan por  $\beta$ -oxidación (Midgley, 1993). En el caso de *Mucor hiemalis*, se detecta actividad de lipasa solamente cuando la glucosa es la fuente de carbono, pero la adición de aceite de olivo desde el inicio de la fermentación permite un aumento en dicha producción. La lipasa de este hongo se considera, por lo tanto, inducible (Akhtar *et al.*, 1980).

*A. niger* sintetiza lipasas extracelulares pero, para ello, requiere de la presencia de un lípido en el medio de cultivo (Pal, *et al.*, 1978; Pokorny, *et al.*, 1994). El mejor lípido para este caso en particular, es el aceite de olivo, aunque otros aceites menos costosos como el aceite de girasol, ejercen un efecto similar. La concentración de estos lípidos, sin embargo, no cambia significativamente la producción de la enzima. Cuando además del aceite se adiciona almidón al 0.1% se mejora la producción (Pokorny, *et al.*, 1994).

El control de la síntesis de la enzima en *Mucor hiemalis* parece estar regulado por retroalimentación, ya que se ha observado que los ácidos grasos libres, uno de los productos de la reacción de la lipasa, inhiben su producción (Akhtar, *et al.*, 1977).

La glucosa reprime la producción de lipasas en varios hongos, como en *Geotrichum candidum* (Baillargeon, *et al.*, 1989), *Syncephalastrum racemosum* (Chopra y Chander, 1983), *Rhizopus delemar* (Kawasaki, 1991; Haas y Bailey, 1993) y *R. oligosporus* (Nahas, 1988). En la bacteria *Streptomyces coelicolor* solamente se detecta actividad de lipasa en el micelio en la fase estacionaria, cuando la glucosa está totalmente agotada (Olukoshi y Packer, 1994).

En algunos procariotes, como la bacteria *Pseudomonas cepacia*, se sabe que se requiere de una proteína que actúa como chaperona (LimA) para que su lipasa sea activa. LimA no afecta la transcripción ni la traducción de la enzima, sin embargo, ésta solo presenta actividad en presencia de Lim. Puede ser que haya una interacción entre estas proteínas provocando un cambio conformacional que activa a la lipasa (Hobson, *et al.*, 1993).

#### 1.4. Clonación y secuenciación.

Existen reportes sobre varias lipasas de diferente origen que se han clonado (Boel, *et al.*, 1988; Haas, *et al.*, 1991; Jorgensen, *et al.*, 1991; Yamaguchi, *et al.*, 1991; Chihara-

Siomi, *et al.*, 1992; Vernet, *et al.*, 1993; Arpigny, *et al.*, 1993; Pérez, *et al.*, 1993; Lotti, *et al.*, 1993). Otras lipasas se han cristalizado (Brady, *et al.*, 1990; Hata, *et al.*, 1979; Kohno, *et al.*, 1993). Estos datos, junto con el análisis de secuencias, han permitido establecer que existe un pentapéptido consenso en todas ellas. Este pentapéptido es G X<sub>1</sub> S X<sub>2</sub> G, donde G es glicina, S es serina, X<sub>1</sub> es tirosina o histidina y X<sub>2</sub> es cualquier aminoácido. El centro catalítico de estas enzimas está formado por una triada constituida por serina, histidina y aspartato (Brady, *et al.*, 1990).

Otro aspecto importante es el hecho de que algunas lipasas de diferentes microorganismos se han expresado en *A. oryzae*. Este es el caso, por ejemplo, de las lipasas de *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa* y *Candida arctica* (Boel, *et al.*, 1988; Esper y Hüge-Jensen, 1988; Hüge-Jensen, *et al.*, 1989). En estos trabajos, se utilizó el promotor de la amilasa de *A. oryzae* y, por lo tanto, las lipasas clonadas se inducen en presencia de almidón como fuente de carbono. Las lipasas expresadas de esta manera se utilizan comercialmente como aditivos de detergentes (Sakaguchi, *et al.*, 1992).

### 1.5. Importancia fisiológica de las lipasas.

Las lipasas inician el metabolismo de grasas y aceites por lo que son importantes para la nutrición. En el caso de las semillas de plantas superiores, se sabe que las lipasas son generalmente específicas para el triglicérido que acumulan como material de reserva. En la mayoría de las especies, la actividad lipolítica está ausente en la semilla madura y aumenta durante la germinación. Una excepción es el ricino, cuya semilla sin germinar contiene una lipasa (Weete, 1981).

En algunos casos, la membrana del glioxisoma contiene una lipasa que es activa principalmente sobre monoglicéridos. En el maíz, la actividad lipolítica se detecta dos días después de la imbibición de la semilla, llegando a su máximo a los cinco o seis días. La enzima permanece activa en el tejido aunque ya se hayan terminado los lípidos. La lipasa se sintetiza *de novo* después de la germinación y la actividad es proporcional al contenido de lípidos (Huang, 1992).

En el caso de los hongos, se sabe que los lípidos más importantes cuantitativamente son los triglicéridos que se utilizan como reserva. El contenido de lípidos en la espora es de 5 a 17% de su peso seco (Weete, 1981). Existe evidencia de que durante la germinación primero se degradan los carbohidratos y posteriormente se utilizan los triglicéridos. En las uredosporas de *Puccinia graminis tritica* se puede observar bajo el microscopio la desaparición progresiva de los glóbulos de aceite. Hay cierta controversia en cuanto a la importancia de los lípidos en la germinación, ya que para algunos

investigadores son indispensables únicamente los carbohidratos. En el caso de *Neurospora crassa*, se purificó la lipasa de las conidias y se determinó que tiene preferencia por los triglicéridos de cadena larga, que son los más abundantes en los hongos (Kundu, *et al.*, 1987).

Las esporas contienen principalmente triglicéridos y fosfolípidos. Al germinar éstas, se rompen los enlaces éster y se liberan ácidos grasos que son oxidados para la obtención de energía. Los ácidos grasos forman acetyl-CoA cuando pasan por  $\beta$  oxidación. La acetyl-CoA puede entrar al ciclo de Krebs o ser convertida a malato y entrar al ciclo del glicoxalato. La energía así obtenida se utiliza para la síntesis de aminoácidos, proteínas y carbohidratos. Por otro lado, las enzimas propias del ciclo del glicoxalato (isocitrato liasa y malato sintetasa) se han detectado en algunas esporas (Weete, 1981). La isocitrato liasa de *Aspergillus nidulans* se ha clonado como un gen específico de la esporulación (Stringer y Timberlake, sin publicar).

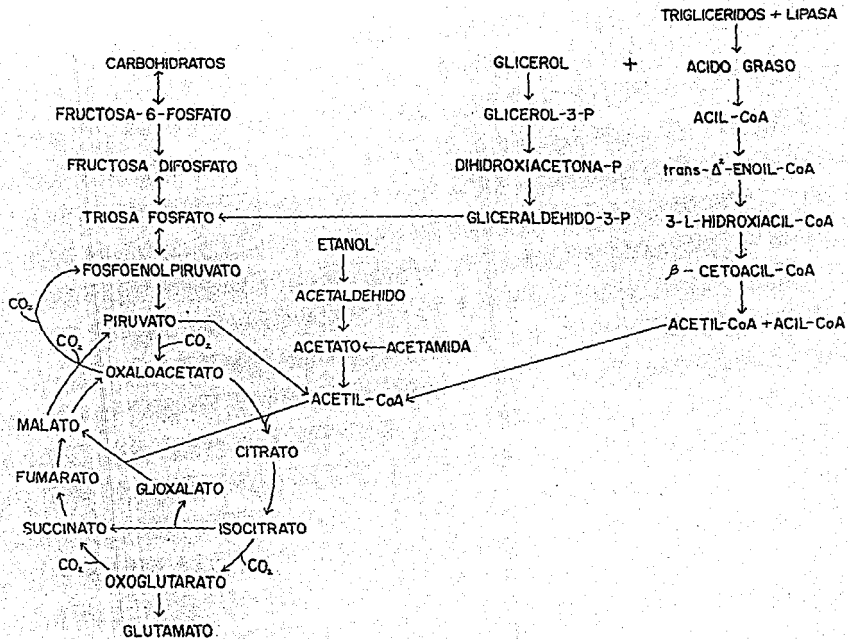
## 2. Metabolismo de los lípidos y del acetato.

Las lipasas son importantes dentro de la industria por las razones ya expuestas. Sin embargo, es interesante destacar que no se han hecho estudios de regulación y producción en un hongo genéticamente bien caracterizado como es *A. nidulans*. Al realizar estudios con este microorganismo como modelo se podría iniciar un investigación mas profunda sobre la importancia del metabolismo de lípidos en la fisiología de los hongos. A continuación se presenta una breve explicación del metabolismo de lípidos en general.

La Figura 2 muestra un esquema de las rutas metabólicas involucradas. Como puede verse el primer paso del catabolismo de lípidos es la degradación de triglicéridos por acción de la lipasa. Esta reacción ocurre fuera de la célula. En el peroxisoma se realiza la  $\beta$ - oxidación de los ácidos grasos para dar como productos finales acetyl-CoA o propionil-CoA y acetyl-CoA, dependiendo respectivamente, de si el ácido graso degradado tiene un número par o non de carbonos. Posteriormente, la acetyl-CoA entra al ciclo de Krebs o al del glicoxalato.

El acetato se convierte en acetyl-CoA y posteriormente entra al ciclo del glicoxalato. Cuando el hongo crece con esta fuente de carbono, aumentan los niveles de las enzimas específicas del ciclo mencionado, es decir, la isocitrato liasa y la malato sintetasa (Flavell y Fincham, 1968).





Intradoclin

Figura 2. Metabolismo de lípidos y acetato (Voet y Voet, 1990).

Se han aislado diversas mutantes en esta ruta metabólica, algunas como resistentes a fluoroacetato, que son las llamadas *fac* (Apirion, 1965), otras como incapaces de crecer en acetato como única fuente de carbono, que son las *acu* (Armitt, *et al.*, 1976), y otras resistentes a propionato (Sealy-Lewis, 1994). Todas estas mutaciones se han asignado a algún cromosoma y en algunos casos, se sabe cuál es la enzima afectada.

### 3. *Aspergillus nidulans*.

#### 3.1. Ciclo de vida y ventajas como modelo de experimentación.

Dentro de los hongos filamentosos, *Aspergillus nidulans* es uno de los modelos microbianos más empleados para experimentación porque posee varias ventajas (Aguirre, 1992) como son:

- a) formar colonias compactas en un medio sólido, lo cual facilita hacer réplica en placa.
- b) la existencia de un gran número de mutantes disponibles en colecciones y facilidad de obtener más en el laboratorio.
- c) contar con un mapa genético de sus ocho cromosomas en el cual se han localizado más de 400 genes.
- d) disponer de técnicas que permiten manipular el genoma a nivel de genética molecular.
- e) poder realizar estudios de expresión de genes por medio de fusiones entre regiones reguladoras y genes reporteros (como el de  $\beta$ -galactosidasa) y detectar la expresión en tipos celulares específicos.
- f) tener conidios uninucleados, lo que permite realizar mutagénesis directamente sobre ellos.

Los Aspergilli se han empleado como receptores para la clonación de enzimas de otros organismos o de otras especies del mismo género. Las especies más utilizadas para estos fines son *A. niger* y *A. oryzae*.

Las razones para haber elegido un *Aspergillus* para este estudio son:

- a) tener un alto nivel de secreción de enzimas y que tiene un patrón de glicosilación semejante al de los eucariontes superiores. Estos hongos son saprofitos y por lo tanto, necesitan degradar compuestos presentes en el exterior. Para ello, secretan enzimas que les permiten formar moléculas más simples que pueden usar como fuente de carbono o de nitrógeno. Un ejemplo de estas enzimas es la fitasa, que cataliza la conversión de ácido fítico a inositol y fosfato. Si se agrega dicha enzima al alimento de animales (los cuales no tienen fitasa), no se requiere adicionar fósforo y aumenta su valor nutritivo (van den Hondel, *et al.*, 1992).

- b) es un sistema en el cual se pueden expresar proteínas de otros organismos. Por ejemplo, en *A. nidulans* se han clonado la quimosina de bovino (Ward, *et al.*, 1990), la interleucina-6 humana (Contreras, *et al.*, 1991) y el activador de plasminógeno humano (Upshall, *et al.*, 1987).
- c) las enzimas se secretan al medio generalmente y por lo tanto es probable escalar el proceso. Otra ventaja es que hay experiencia en el manejo de estos organismos a nivel industrial.
- d) las cepas pueden mejorarse a través de mutagénesis.
- e) *A. niger* sintetiza productos generalmente considerados como seguros para consumo humano (GRAS) por la Administración de Alimentos y Drogas en Estados Unidos (FDA) (van den Hondel, *et al.*, 1992).

Para poder comprender algunas de las ventajas citadas, es necesario conocer el ciclo de vida de *A. nidulans*. En la Figura 3 se presenta un esquema de dicho ciclo. Como se puede apreciar, tiene tres fases: asexual, sexual y parasexual.

El ciclo asexual básicamente consiste en la germinación de un conidio que da lugar a una hifa multinucleada. Posteriormente se forma la hifa aérea que constituirá el conidióforo. En éste se forman cadenas de conidios que son haploides y uninucleados.

En el ciclo parasexual, las hifas de dos cepas padres se anastomosan originando un heterocariote, es decir, una hifa en cuyo citoplasma hay núcleos de ambas cepas. Esto constituye una ventaja porque no se tiene que pasar por el ciclo sexual para obtener este tipo de híbridos genéticos.

Al esporular el heterocariote, se pueden obtener esporas de cualquiera de los dos tipos de los padres. Sin embargo, hay ocasiones en que los núcleos se fusionan y entonces se forma un diploide. Este es un evento azaroso, pero una vez formado el diploide es bastante estable. El análisis de los diploides permite esclarecer si una mutación es dominante o recesiva; además, permite reconocer si dos cepas llevan una misma o diferente mutación, por medio de un estudio de complementación. En este caso, lo que se hace es obtener un diploide entre dos cepas que tienen aparentemente la misma mutación (fenotipos semejantes) pero que tienen marcadores diferentes que permitan su reconocimiento individual. Es importante aclarar que las mutaciones pueden producir una auxotrofia, pero también pueden tener diferente color o morfología. En la Figura 4 se presenta un esquema de cómo pueden utilizarse los diploides para definir si dos cepas tienen mutaciones alélicas o no y cómo se establecen diferentes grupos de complementación.

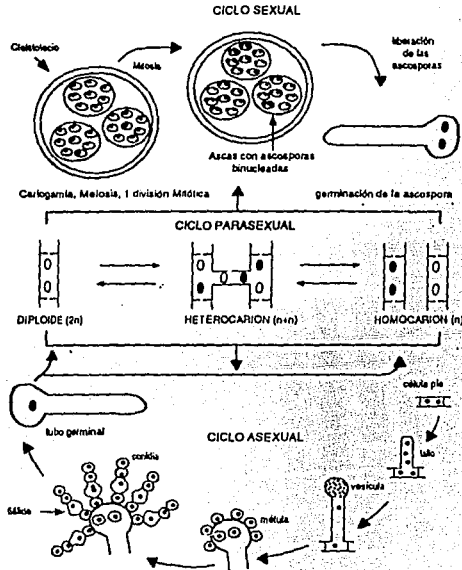
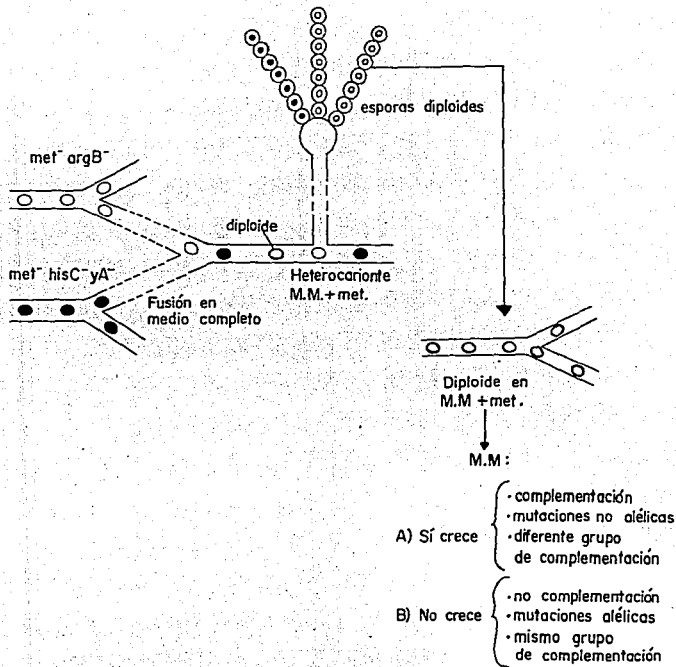


Figura 3. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* (Aguirre, 1992)



M.M. = Medio Mínimo

Figura 4. Formación de diploides y definición de grupos de complementación (Ward, 1991).

Los diploides son ligeramente inestables por lo que existe una tendencia hacia la haploidización. Este proceso se da como resultado de errores en la mitosis que provocan que los cromosomas no segreguen adecuadamente (no disyunción). Este evento constituye otra poderosa herramienta genética que permite asignar una mutación a un determinado cromosoma.

La Figura 5 muestra cómo pueden aislarse y analizarse los haploides para mapear una mutación desconocida. Como se puede observar, el primer paso consiste en realizar una cruce entre la cepa con la mutación problema y una cepa maestra, denominada así debido a que contiene un marcador en cada uno de los ocho cromosomas. Una vez obtenido el heterocariote, se colectan sus esporas y se plaquean en medio mínimo, de tal manera que solamente los diploides y heterocariotes crezcan. Después de incubar las placas, se pueden aislar los diploides ya que se reconocen fácilmente debido a que forman colonias bien definidas. El diploide se replica en medio con *p*-fluro-fenilalanina o benomyl para promover la haploidización y se vuelve a incubar por un tiempo de aproximadamente una semana. Los haploides pueden reconocerse porque van formando sectores de crecimiento vigoroso. Se forman entonces placas maestras con los haploides y se replican en los diferentes medios, preparados de acuerdo a los marcadores de la cepa maestra. El mapeo se logra observando la segregación de la mutación problema con respecto a cada uno de los marcadores de la cepa maestra. De este modo, se puede saber en qué cromosoma se encuentra la mutación (Ward, 1991). Posteriormente, se puede volver a cruzar la mutante con una cepa que tiene varios marcadores en ese cromosoma y, de este modo, se puede hacer un mapeo más fino.

*A. nidulans* es homotálico, es decir, no hay sexos separados. Durante el ciclo sexual, se fusionan las hifas de dos cepas y se forma un diploide transitorio. Posteriormente, se forma el cuerpo fructífero que, en este caso, es una estructura esférica llamada cleistotecio. Este se encuentra rodeado de células de Hülle y mide entre 100 y 200  $\mu$ m de diámetro. Dentro del cleistotecio están las ascas, cada una de las cuales contiene ocho ascosporas binucleadas.

Las cruces sexuales permiten obtener cepas con características deseables de los dos padres. Estas cepas pueden a su vez ser útiles para otros fines genéticos.

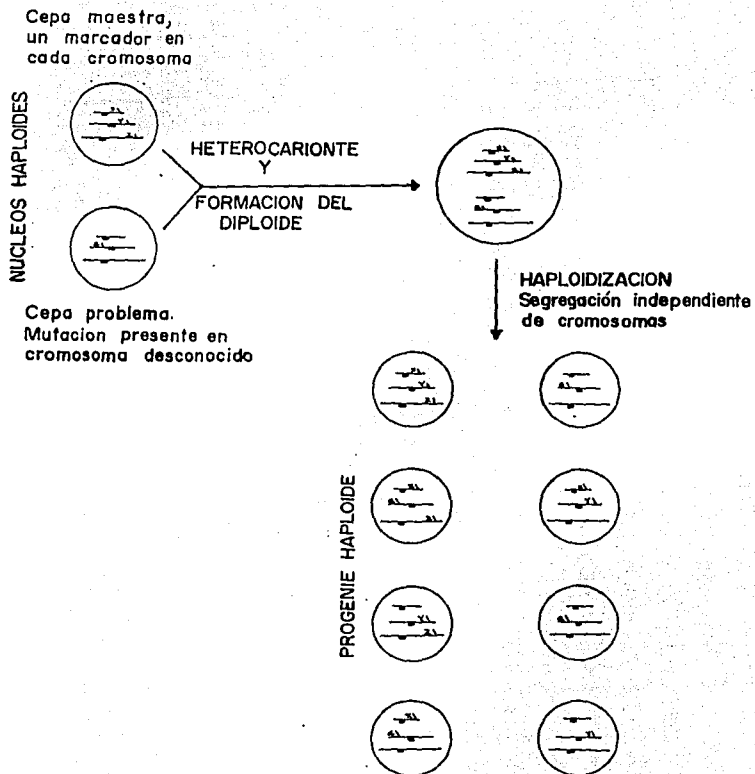


Figura 5. Mapeo de una mutación mediante el aislamiento y análisis de haploides obtenidos a partir de una cruce entre una cepa maestra y la cepa que lleva dicha mutación (Ward, 1991).

### 3.2. Las lipasas en *Aspergillus*.

Existen algunas especies de *Aspergillus* productoras de lipasas, entre las cuales se encuentran *A. niger*, *A. oryzae*, *A. wentii*, *A. foetidus*, *A. awamori*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. japonicus* y *A. sydowii* (Höfelmann, *et al.*, 1985; Arbige, *et al.*, 1986; Chander, *et al.*, 1980; Nair y Bone, 1987; Berka, *et al.*, 1992). En el caso particular de *A. niger*, se ha reportado la presencia de dos lipasas (Höfelmann, *et al.*, 1985).

Se han hecho estudios con respecto a las condiciones óptimas de cultivo y algunos sobre la purificación de la enzima. A nivel industrial, hay una patente de lipasa de *A. oryzae* que se utiliza para saborizante de queso manchego (Christian Hansen).

En *A. nidulans* se desconoce cuántas lipasas tiene y cómo es su regulación. Resulta interesante estudiar las características de estas enzimas en *A. nidulans* por las ventajas que tiene este hongo como modelo experimental. También es importante contar con mutantes deficientes en el metabolismo de lípidos porque con ellas se podría entender mejor dicha vía metabólica. Si se obtiene una mutante que no sintetice lipasas, se puede intentar hacer la clonación de las lipasas de otros microorganismos. Una vez estudiado en *A. nidulans*, se puede tratar de clonar en *A. niger*, que como ya se mencionó, se considera un organismo GRAS por la FDA, es decir, que puede ser utilizado para producir enzimas aplicadas a alimentos y, por lo tanto, puede emplearse para la modificación de los productos lácteos, que constituye uno de los usos de mayor potencial de las lipasas.

### 3.3. La represión catabólica por carbono y el papel del gen *creA*.

El gen *creA* codifica para un regulador negativo responsable de la represión catabólica por carbono. Este regulador es sensible a la presencia de glucosa en el medio de cultivo y funciona reprimiendo la síntesis de algunas enzimas encargadas de metabolizar otras fuentes de carbono menos fácilmente asimilables, como el etanol, la galactosa y la lactosa.

Este gen ha sido clonado (Dowzer y Kelly, 1989) y secuenciado (Dowzer y Kelly, 1991) y no tiene intrones. La proteína CREA se une al DNA en sitios ricos en guanina y citosina y se sabe que se une a los promotores de los genes *alcR* y *alcA* que intervienen en el metabolismo del etanol (Kulmborg, *et al.*, 1993).

Como se mencionó anteriormente hay algunos reportes sobre la represión por glucosa de las lipasas. Sin embargo, en *A. nidulans* no se sabe cómo está regulada y resulta interesante definir si CREA está involucrada o no en dicha regulación.



### **OBJETIVO GENERAL**

Obtención de mutantes de *Aspergillus nidulans* incapaces de crecer en lípidos como única fuente de carbono.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Observar el crecimiento de las diferentes cepas de *A. nidulans* en lípidos como única fuente de carbono y diseñar una técnica adecuada para medir la actividad lipolítica en este microorganismo.
2. En el caso de no encontrar una cepa sin actividad lipolítica, se hará una mutagénesis mediante agentes físicos para seleccionar mutantes incapaces de crecer en lípidos.
3. Caracterización genética de las mutantes obtenidas.
4. Caracterización parcial de la lipasa de *A. nidulans*.

**MATERIALES Y METODOS.****1. Cepas empleadas de *Aspergillus nidulans*.**

En la Tabla 4 se muestra la lista de cepas empleadas con sus respectivos genotipos.

**Tabla 4. Cepas de *Aspergillus nidulans***

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>
PW-1	<i>biA1, argB2, metG1, veA1</i>
CPG-1	<i>hrlA(2900 p-l)::lacZ(argB::CAT), biA1, metG1, riboB2, creA204, veA1</i>
CHA1	<i>biA1, creA<sup>-30</sup></i>
FGSC A411	<i>praA1, pabaA1, yA2</i>
CIS 17 A22	<i>pabaA1, yA2</i>
FGSC A4	<i>veA1</i>
FGSC A237	<i>pabaA1, yA2; trpC801</i>
FGSC A283	<i>suAadE20, yA2, adfE20; acvA; galA1; pyrA4; facA303; sB3; nicB8; riboB2</i>
FGSC A409	<i>pabaA1; facB101 chaA1</i>
FGSC A649	<i>pabaA1 yA2; acuD254</i>
FGSC A650	<i>pabaA1 yA2; acuE201</i>
FGSC A651	<i>pabaA1 yA2; acuF205</i>
FGSC A652	<i>pabaA1, yA2; acuG223</i>
FGSC A653	<i>pabaA1, yA2; acuH253</i>
FGSC A654	<i>acuJ211, pabaA1, yA2</i>
FGSC A655	<i>pabaA1 yA2; acuK248</i>
FGSC A656	<i>pabaA1, yA2; acuL217</i>

Todas las cepas se obtuvieron del Fungal Genetics Stock Center (University of Kansas), excepto PW-1 (de P. Weglenski), CHA-1 (de H. Arst), CPG-1 y CIS 17 A22 (de J. Aguirre).

**2. Medios de Cultivo.**

**2.1. Medio mínimo.** El medio de cultivo que se empleó fue el sugerido por Käfer (1977), que esencialmente contiene:

Compuesto	Cantidad por litro
Solución de sales 20X	50 ml
Elementos traza	1 ml
Glucosa	10 g
Agar	12.5 g

Se aforó con agua destilada, se ajustó el pH a 6.5 y se esterilizó 15 min a 121°C.

La solución de sales 20X se preparó con:

Compuesto	Cantidad por litro
NaNO <sub>3</sub>	120 g
KCl	10.4 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.4 g

Se aforó la solución a un litro con agua destilada y se guardó a temperatura ambiente.

La solución de elementos traza contiene:

Compuesto	Cantidad en gramos
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.1
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
CoCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.11
Na <sub>4</sub> EDTA	5.0

Los compuestos se disolvieron en el orden presentado en 80 ml de agua destilada. Se agregó cada compuesto hasta que el anterior quedó completamente disuelto. Se calentó la solución hasta que hirvió, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Los requerimientos de cada cepa se agregaron al medio de cultivo en las siguientes proporciones:

Compuesto	Solución Stock	Cantidad por litro de medio
Acirflavina (Sigma)	0.5%	5.0 ml
Arginina (Sigma)	16.8%	5.0 ml
Biotina (Sigma)	0.05%	0.5 ml
Metionina (Sigma)	0.6mM	1.25 ml
Nicotinamida (Sigma)	0.5 %	0.2 ml
PABA (Sigma)	0.17%	0.5 ml
Prolina (Sigma)	1%	5.0 ml
Piridoxina HCl (Sigma)	0.4%	0.2 ml
Riboflavina (Sigma)	0.05%	5.0 ml

La biotina se disolvió en etanol al 70%.

Todas estas soluciones se guardaron a 4°C.

La temperatura de incubación para todas las cepas empleadas fue de 37°C.

## 2.2. Los medios con tributirina o aceite de olivo.

El medio se preparó igual que el anterior pero, en vez de agregar glucosa, se puso tributirina (Sigma) o aceite de olivo (Ibarra) al 1% (v/v). Después de ajustar el pH, se agregó el agar y se calentó hasta que se disolvió bien. Se dejó enfriar unos cuantos minutos y entonces se adicionó la tributirina o el aceite de olivo. Se homogenizó en una licuadora (Osterizer) durante aproximadamente un minuto y se esterilizó.

## 3. La preparación de inóculo.

Se inoculó a confluencia una caja de Petri con la cepa deseada y se incubó a la temperatura indicada durante 5 días. La cosecha se hizo agregando aproximadamente 5 ml de agua destilada estéril con Tween 80 (Sigma) al 0.01% directamente sobre la caja. Las esporas se rasparon con un asa bacteriológica y se recuperaron en un tubo desechable Falcon de 15 ml. El tubo se centrifugó durante 10 minutos y las esporas se resuspendieron en agua destilada estéril. La suspensión de esporas se almacenó a 4°C.

La cuantificación de esporas se llevó a cabo en hemocitómetro.

## 4. Los cultivos en medio líquido.

Cuando se hicieron cultivos líquidos, el medio se preparó, como ya se indicó, con la excepción de que se utilizó glucosa al 0.5% y se adicionó aceite de olivo al 2% (v/v). Estos experimentos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio. El aceite de olivo se adicionó a cada matraz por separado.

El inóculo empleado fue de  $5 \times 10^5$  esporas por mililitro de medio de cultivo, la agitación fue de 300 rpm y la temperatura de 37°C. Las fermentaciones se hicieron en una incubadora New Brunswick Scientific con agitación orbital.

#### 4.1. Procesamiento de las muestras de los cultivos líquidos.

Se tomaron muestras de medio de cultivo (2 ml) a diferentes tiempos (12, 24 y 36 horas de incubación) para medir actividad lipolítica, pH y proteína extracelular. Otras muestras se guardaron en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf's que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C. Estas muestras se liofilizaron en un concentrador y se resuspendieron en 100  $\mu$ l (1/10 del volumen original) de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2. Al liofilizado también se le midió la actividad lipolítica y la proteína extracelular. Estas muestras concentradas se utilizaron posteriormente para los geles de proteínas.

Cuando se midió peso seco, el micelio se separó del medio de cultivo a través de embudos con filtros (Miracloth de Calbiochem, USA). Dicho micelio se exprimió en papel secante para tratar de quitar el exceso de líquido. Se guardó en tubos Eppendorf estériles procurando que la muestra no rebasara más de la mitad de la capacidad del tubo. Se congelaron en nitrógeno líquido, para posteriormente liofilizarse y pesarse en una balanza analítica (Ohaus).

#### 5. Medición de la actividad lipolítica, cuantificación de la proteína y medición del pH.

Se utilizó esencialmente el método de medición de actividad lipolítica sugerido por Isobe *et al.* (1988). La mezcla de reacción fue de 900  $\mu$ l que contenían 2.5  $\mu$ moles de *o*-nitrofenil-laurato, Tritón X100 al 2.1% y amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2. El sustrato se disolvió primero en el Tritón y posteriormente se agregó al amortiguador. El sustrato es insoluble en agua.

Se pusieron 900  $\mu$ l de sustrato en tubos Eppendorf y se adicionaron 100  $\mu$ l del filtrado que contiene a la enzima. Se mezclaron ligeramente en el vortex y se leyó la absorbencia en el espectrofotómetro (Shimadzu) a 410 nm. Como blanco se empleó la misma mezcla de sustrato sin enzima. Las actividades se midieron a los 2, 4 y 8 minutos de incubación a 30°C.

La actividad se reporta en unidades definidas como la cantidad de enzima que libera una micromol de *o*-nitrofenol por minuto. La actividad específica se expresa por miligramo de proteína y los cálculos se hicieron considerando que el coeficiente de extinción del *o*-nitrofenol en amortiguador neutro es de  $4.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Cuando se midió la actividad directamente en el filtrado se utilizaron 100  $\mu$ l para el ensayo. Al medir la actividad de las muestras liofilizadas, se utilizaron 10  $\mu$ l aforados a 100  $\mu$ l. En el caso de la actividad intracelular, el micelio seco se rompió mecánicamente con una aguja de disección. Se añadieron aproximadamente 800  $\mu$ l del amortiguador de fosfatos y se centrifugó. La actividad se midió en 50  $\mu$ l del sobrenadante obtenido después de haber molido y centrifugado el micelio.

Para cuantificar la proteína, se utilizó el método de Bradford (1976). A 800  $\mu$ l de medio se le adicionaron 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford (BioRad) y se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm. La curva patrón se hizo con albúmina de bovino (Sigma).

Con las muestras liofilizadas, se hizo una dilución 1:100 y se siguió el procedimiento ya descrito. Cuando se midió proteína intracelular (micelio molido), también se hizo una dilución 1:100.

El pH se midió con un potenciómetro Corning directamente en el filtrado.

## 6. Genética.

### 6.1. Mutagénesis.

Las mutagénesis se hicieron con la cepa PW1.

**6.1.1. Rayos gamma.** La irradiación se hizo en un Gamma Cell con fuente de cobalto 60. Se colocaron 5 ml de una suspensión de esporas con una densidad de  $1.3 \times 10^6$  por mililitro. Se utilizó un tubo independiente para cada una de las dosis empleadas. Inmediatamente después de la irradiación, los tubos se mantuvieron en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas (Grigorov *et al.*, 1983).

Las esporas irradiadas se extendieron sobre una caja Petri con medio patata dextrosa (Baker). Se hizo una curva de sobrevivencia para definir el tiempo óptimo para obtener 90% de muerte. Una vez definido éste, se realizó un enriquecimiento de las mutantes usando el antibiótico polifungina de acuerdo con Bal *et al.*, 1974. Para ello, se cultivaron las esporas irradiadas en un medio con tributirina como fuente única de carbono, a 37°C y 150 rpm. Después de cinco horas de incubación, se agregó la polifungina a una concentración de 50 mg/ml. Se tomaron muestras cada media hora, durante tres horas. Las esporas se lavaron con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 y se extendieron en medio papa dextrosa y en un medio selectivo con tributirina (Nga, *et al.*, 1988) donde se pueden detectar halos de claridad que son indicativos de la actividad lipolítica.

**6.1.2. Radiación ultravioleta.** La concentración de esporas empleada fue de  $1 \times 10^6$  esporas por mililitro y la radiación se administró con una lámpara modelo UVGL-25. La

distancia entre la lámpara y las esporas fue de 7.5 cms y corresponde a una dosis de 700  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

La suspensión de esporas se colocó dentro de una caja de Petri, estéril, de vidrio, junto con una barra magnética flameada previamente. Las esporas se mantuvieron en agitación durante la mutagénesis para asegurarse de que la dosis se distribuyera homogéneamente.

Se tomaron muestras de un mililitro a los 0, 30, 60, 75, 90, 105 y 120 segundos para hacer una curva de sobrevivencia. Las muestras en tubos Eppendorf de 1.5 ml se colocaron en una cubeta con hielo y se taparon para evitar el contacto con la luz.

Posteriormente, se plaqueó una dilución adecuada para obtener aproximadamente 1000 esporas por caja. Para este propósito se empleó medio mínimo mas requerimientos, pero adicionado con desoxicolato de sodio (Sigma) al 0.04% como inhibidor de crecimiento. Este compuesto permite obtener colonias compactas, lo cual facilita la cuantificación.

Una vez definido el tiempo óptimo para obtener el 90% de muerte, se irradió una nueva suspensión de esporas a ese tiempo y se hizo un enriquecimiento de mutantes en medio líquido con tributirina al 1% como única fuente de carbono. El procedimiento consistió en inocular las esporas irradiadas en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio. Este cultivo se agitó a 300 rpm a 37°C durante aproximadamente 55 horas. El cultivo se observó periódicamente y la filtración a través de Miracloth se realizó hasta que las esporas germinadas adquirieron un tamaño lo suficientemente grande como para no atravesar el poro del filtro.

Las esporas que atravesaron el filtro se recuperaron por centrifugación, se plaquearon en medio con desoxicolato de sodio y se incubaron hasta que esporularon. Posteriormente, se replicaron con terciopelo en medio selectivo (tributirina 1%).

## 6.2. Réplica con terciopelo.

Los terciopelos se esterilizaron envueltos en papel aluminio y papel estraza.

El replicador, ya con el terciopelo puesto, se humedeció en una caja de Petri estéril que contenía el mismo medio que se utilizó para la réplica.

Posteriormente, se colocó sobre la placa con las colonias a replicar. Estas cajas se numeraron previamente al igual que las cajas a donde se va a replicar de tal modo que se puedan comparar posteriormente.

Con el terciopelo hacia arriba y cerca del mechero para evitar que las esporas cayeran en desorden sobre la placa receptora, se colocó ésta sobre el terciopelo presionando ligeramente.

Después de hacer la réplica, el terciopelo se sumergió en un vaso con agua para evitar la dispersión de esporas y posteriormente se esterilizó. La réplica se incubó a 37°C.

### 6.3. Obtención de diploides.

Los experimentos de genética se hicieron esencialmente de acuerdo con Pontecorvo, *et al.*, (1953). Se hizo una cruz a inoculando con palillos estériles las cepas en un medio mínimo con los requerimientos de ambas cepas. Los inóculos deben estar a una distancia aproximada de 3 mm. Las cajas se incubaron de dos a tres días.

Se transfirieron pequeños fragmentos de agar con micelio de ambas cepas a medio mínimo para obtener los heterocariotes. Las cajas se incubaron durante 6-7 días. Una vez que creció el heterocariote, se hizo una cosecha raspando las esporas y éstas se recuperaron en un tubo Eppendorf.

Se inocularon en cajas de Petri aproximadamente 30 µl de la suspensión de esporas, previamente homogeneizadas en un vortex, y sobre ellas se añadió agar suave (7 g/l) con medio mínimo tibio (aproximadamente 42°C). Inmediatamente después se agitaron las cajas en forma circular para distribuir las esporas en toda el área. Se dejaron solidificar a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron a 37°C durante 3 días. Transcurrido este tiempo, los diploides son fácilmente distinguibles porque crecen como colonias verdes (generalmente se utilizan haploides parentales verde y amarillo). Dichas colonias se ven redondas y sanas, a diferencia de los heterocariotes que tienen crecimiento y color irregulares.

Se seleccionó un diploide y se estrió en medio mínimo para aislar una colonia.

### 6.4. Cruzas sexuales.

La aplicación del ciclo sexual se presenta cuando se desea saber si la segregación de una mutación es o no mendeliana. En este trabajo se hicieron cruza sexuales entre la cepa PW-1 y las mutantes obtenidas para definir si la segregación de las mutaciones es mendeliana.

El procedimiento para hacer una cruz sexual es similar al ya descrito para los diploides hasta el paso de la obtención del heterocariote. Una vez que se tiene éste, la caja de Petri se sella con cinta adhesiva para generar un ambiente parcialmente anaerobio. Esta condición favorece la formación de cleistotecios, que son los cuerpos fructíferos de la cruz sexual. La caja se mantuvo en incubación durante 5 días aproximadamente.



Los cleistotecios se buscaron bajo el microscopio estereoscópico en la zona que dio origen al heterocariote. Estos cuerpos fructíferos son redondos, negros y están cubiertos por hifas y por células Hülle. Con ayuda de una aguja de disección flameada y observando bajo el microscopio, se extrajo un cleistotecio y se colocó en una caja de Petri con medio mínimo. Debe elegirse un cleistotecio grande para aumentar las posibilidades de que se trate de un híbrido. El cleistotecio se limpió rodándolo suavemente en el agar hasta que quedó de un color negro brillante, sin nada en la superficie. Se colocó entonces en un tubo Eppendorf.

Con la aguja de disección se rompió el cleistotecio y se añadieron aproximadamente 800  $\mu$ l de agua para resuspender las ascosporas agitando en un vortex. Las esporas pueden guardarse a 4°C.

En medio mínimo adicionado con todos los requerimientos de ambos padres, se plaquearon aproximadamente 25  $\mu$ l de ascosporas y se incubaron. La forma de comprobar que el cleistotecio elegido es un híbrido se da una vez que esporulan, ya que deben verse colonias con los colores de las cepas padres.

Se plaquearon varias cajas de cada cleistotecio para obtener un buen número de colonias. Una vez que éstas esporularon, se hicieron placas maestras inoculando con palillos cada colonia en un orden definido. Estas placas contenían medio con los requerimientos de los padres. Caben 24 colonias por caja.

Para saber si una mutación desconocida segrega mendelianamente, se hace este tipo de cruce y se analiza la progenie (placas maestras) en el medio selectivo adecuado. En general, se analiza la progenie y se espera que el 50% contenga la mutación a analizar. Es importante señalar que no todas las mutaciones tienen este tipo de segregación.

#### 6.5. Mapeo genético.

Para mapear una mutación desconocida, se obtuvieron diploides entre la cepa a analizarse y una cepa maestra (MSF). Esta última tiene un marcador selectivo en cada uno de los ocho cromosomas de *Aspergillus nidulans*.

Para hacer el mapeo, se indujo la haploidización del diploide y posteriormente se analizaron los haploides en medios selectivos para cada uno de los marcadores de la cepa maestra. El mapeo consiste en establecer una relación entre los marcadores mencionados y la mutación de tal manera que se deduzca en qué cromosoma está la mutación mencionada.

Para inducir los haploides a partir del diploide, se procedió de la siguiente manera: Se prepararon cajas de Petri con medio mínimo y con los requerimientos de ambos padres. Una vez que el medio se esterilizó y llegó a una temperatura de aproximadamente 45°C, se adicionó *p*-fluoro-fenilalanina (Sigma) a una concentración de 50 mg/l. Este compuesto se descompone con el calor por lo que no se puede esterilizar. Se preparó una solución concentrada con agua estéril y se adicionó posteriormente al medio.

Las cajas así preparadas se dividieron en sectores y en cada uno de ellos se inoculó el mismo diploide con un palillo y se incubó, durante una semana o más, hasta que empezaron a aparecer sectores de crecimiento vigoroso correspondientes a los haploides. En algunas ocasiones los sectores no se reconocen fácilmente a simple vista por lo que se sugiere revisarlos bajo el microscopio estereoscópico. Se prepararon placas maestras con diferentes sectores y éstas se replicaron en los medios selectivos para cada marcador.

#### 6.6. Transformación genética

a) Se inocularon 400 ml de medio de cultivo con  $10^9$  esporas y se incubaron a 30°C con agitación de 300 rpm durante aproximadamente 14 horas.

b) El micelio se pasó a través de un embudo con un filtro (Miracloth) y se colocó en un tubo Falcon estéril. Se recuperó aproximadamente 1 g y se colocó en hielo.

c) Se resuspendió el micelio en 5 ml de medio osmótico (1.2 M  $MgSO_4$ , 10 mM  $NaH_2PO_4$ , pH 5.8), se transfirió a un matraz de 250 ml y se agregaron 500  $\mu$ l de una solución de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* de Sigma (5mg/500  $\mu$ l). Se mezcló y se incubó en hielo 5 minutos y se agregaron 500  $\mu$ l de albúmina (Sigma; 12 mg/ml).

d) Se incubó a 30°C con agitación de 80 rpm y se hicieron revisiones periódicas bajo el microscopio para determinar en qué momento se debía detener la acción de las enzimas líticas.

e) Se transfirieron los protoplastos a un tubo Corex con tapa de rosca y se incubaron en hielo. Se agregaron suavemente 10 ml. de buffer de atrapamiento frío (Sorbitol 0.6 M, Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0).

f) Se centrifugó a 5000 rpm durante 12 minutos con un rotor Sorvall HS-4, a 4°C. Se recuperaron de la interfase con una pipeta Pasteur estéril en un tubo Falcon de 15 ml. Se quitó el resto de amortiguador y resuspendió el botón en medio osmótico limpio (6ml). Se repitió el procedimiento agregando 10 ml de amortiguador de atrapamiento y se centrifugó de nuevo, para recuperar protoplastos que hayan quedado en el botón.

g) Se diluyeron los protoplastos con por lo menos un volumen de STC (Sorbitol 1.2 M,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos en el rotor HS-4.

h) Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 10 ml de STC. Se centrifugó de nuevo bajo las condiciones indicadas anteriormente.

i) Se resuspendieron los protoplastos en 1 ml de STC y se incubaron en hielo.

j) Se diluyó una muestra 1:100 en STC y se contaron los protoplastos en la cámara de Newbauer.

Para hacer la transformación, se hizo lo siguiente:

a) Se utilizaron de 5 a 10  $\mu\text{g}$  de DNA (plásmido, cósmido) y se diluyeron con un volumen de STC. Se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml.

b) Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de protoplastos y se incubaron 25 minutos a temperatura ambiente.

c) Se agregaron 350  $\mu\text{l}$  de PEG (PEG 4000 al 60%,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 disueltos en STC) y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron otras dos veces 350  $\mu\text{l}$  de PEG, incubando después de cada adición 5 y 15 minutos respectivamente.

d) Se centrifugó a 5000 rpm durante 12 minutos a 4°C en el rotor HS-4 para recuperar los protoplastos. Puede agregarse 1 ml de STC, mezclar y plaquear los protoplastos en vez de centrifugarlos.

e) Se secaron los tubos por inversión para eliminar cualquier resto de PEG.

f) Se resuspendieron bien en 1 ml de STC.

g) Los protoplastos se plaquearon en medio mínimo con sorbitol 1.2M y los suplementos necesarios para seleccionar transformantes.

h) Controles:

1. Se plaquearon protoplastos sin agregar DNA en el mismo medio anterior. Esto detecta posibles revertantes o contaminantes.

2. Se plaquearon protoplastos sin PEG en medio con todos los suplementos y sorbitol 1.2M para determinar viabilidad.

3. Se plaquearon protoplastos sin transformar pero después de adicionar el PEG en el mismo medio anterior para determinar la viabilidad después de agregar el PEG.

7. Experimentos con celofán.

Se recortó papel celofán del tamaño de una caja de Petri y se esterilizó sumergido en agua a 121°C durante 15 minutos.

Se prepararon placas de medio con los requerimientos de las cepas que se vayan a sembrar. La fuente de carbono fue glucosa o tributirina.

A partir de colonias aisladas de las cepas requeridas se hizo una cosecha de esporas y se guardó en un eppendorf estéril.

Se colocó el celofán sobre la caja con glucosa. Por la parte posterior, se señalaron con un marcador los puntos en los que se sembraron las esporas. Se inoculó un microlitro de esporas por cepa sobre el celofán y se incubó a 37°C, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se transfirió el celofán bajo condiciones estériles a la placa con tributirina y se volvió a incubar durante 24 o 48 horas a la misma temperatura.

## 8. Geles de Poliacrílida.

### 8.1. Condiciones de electroforesis y tinción.

Se utilizó un gel concentrador al 4% y un gel separador al 10% (Laemmli, 1970) La cámara de electroforesis empleada es marca Hófer y los reactivos de BioRad.

Los geles se corrieron a 30 mA y a 4°C. Los marcadores de peso molecular (pesos de 33.5 a 190 kDa) fueron de Sigma.

La tinción se hizo con plata (BioRad).

### 8.2. Medición de actividad lipolítica en geles.

Se prepararon 50 ml de un gel de agarosa al 0.8% disolviendo ésta en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.2. Se esperó a que enfriara un poco la solución y se adicionó  $\alpha$ -nitrofenil-laurato (Sigma) a una concentración de 2.5  $\mu$ mol/ml disuelto previamente en 1ml de Tritón X100 (Fisher). Se agitó ligeramente para homogenizar el substrato y se vació rápidamente en el recipiente para este propósito. Se esperó a que solidificara.

El gel de proteína se lavó de la siguiente manera (Cevallos, *et al.*, 1992):

- Se sumergió totalmente el gel de proteína en amortiguador de fosfatos con Tritón X100 al 5% y cloruro de sodio 0.15 M. Se agitó suavemente durante 30 minutos.
- Se cambió la solución a amortiguador de fosfatos con Tritón X100 al 0.5%, sin cloruro de sodio y se agitó otros 30 minutos.
- Se lavó finalmente en amortiguador de fosfatos durante 30 minutos.

El gel de proteínas así tratado se colocó sobre el gel de substrato y se incubó durante aproximadamente 45 minutos en cámara húmeda y a 37°C. En el gel de proteínas se hizo una marca con una pipeta pasteur para señalar el sitio exacto en que se detectó actividad de lipasa y se tiñó con plata.

9. Germinación de las cepas mutantes en diferentes fuentes de carbono.

Se prepararon cajas de Petri con los suplementos necesarios y con las diferentes fuentes de carbono al 0.01% (glucosa, arabinosa, glicerol) o 1 mM (acetato). Se prepararon también tubos de ensayo con 4 ml de medio igual al de las cajas, pero con menos agar (6 g/l). Una vez esterilizados, se mantuvieron en un baño a 40°C para evitar que solidificaran muy pronto.

Se inocularon los tubos con aproximadamente  $8 \times 10^5$  esporas cada uno, se agitó en un vortex y se vació sobre la caja de Petri con el mismo medio. Se incubaron a 37°C durante 9 a 10 horas. Se colocó un cubreobjetos directamente sobre la caja de Petri y se observó en el microscopio en campo claro y con un aumento de 40X.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Crecimiento de las cepas en lípidos.

Se sembraron varias cepas en tributirina para probar si alguna de ellas no formaba halo de hidrólisis. Todas las cepas probadas (PW-1, A4 y A237) crecieron bien y formaron halos en este medio. Sin embargo, en este trabajo se decidió utilizar la cepa PW-1 porque tiene el marcador de arginina que para el caso de una futura clonación de la enzima permita emplear un plásmido, como el pDHG25 que, no solamente complementa esta auxotrofia, sino que, además, es de replicación autónoma. Un posible inconveniente es el hecho de que la arginina puede ser utilizada como fuente de carbono y, por lo tanto, influir en el tipo de mutantes aisladas, ya que el medio de selección contiene dicho aminoácido y pueden aislarse mutantes incapaces de crecer en arginina como fuente de carbono además de las que no puedan crecer en lípidos.

La cepa también se sembró en aceite de olivo, aunque en este caso no se apreció un halo. Cabe destacar, además, que en tributirina el crecimiento resultó ser más compacto que en aceite. A partir de estos datos, se decidió intentar obtener una cepa deficiente en asimilación de lípidos y se decidió utilizar el medio con tributirina al 1% como medio selectivo para aislar las mutantes.

### 2. Mutagénesis

Se decidió emplear agentes mutagénicos físicos, particularmente, las radiaciones ultravioleta y gamma. La radiación ultravioleta fue utilizada por Nga *et al.*, 1988 para obtener mutantes de *Yarrowia lipolytica* incapaces de crecer en tributirina; este agente, además, ha sido utilizado anteriormente en *A. nidulans* para obtener una gran cantidad de mutantes. La radiación gamma se empleó porque también ha sido usada en otros hongos como *Humicola lutea* para aislamiento de mutantes (Grigorov *et al.*, 1983).

La Figura 6 muestra la curva de sobrevivencia obtenida después de la radiación gamma. Como se puede observar, con una dosis de 80 krad se tiene un porcentaje de muerte de 90%, que es el normalmente utilizado para la búsqueda de mutantes.

Con la dosis de radiación elegida, se hizo otra mutagénesis y se utilizó un método de enriquecimiento por filtración con el antibiótico polifungina. Este compuesto pertenece al grupo de antibióticos poliélicos que forman complejos con los esteroides de la pared celular, provocando un daño considerable en la permeabilidad y, por lo tanto, las células afectadas son sensibles a los cambios en la presión osmótica. El antibiótico sólo elimina las células en crecimiento pero es inocuo en las esporas. De este modo, todas aquellas

esporas que resultaron capaces de crecer en tributirina, se eliminan con la polifungina. Al filtrar, solamente se recuperaron las conidias que no germinaron. Se hicieron diluciones del filtrado y las mutantes se sembraron en medio mínimo con glucosa y posteriormente se replicaron en tributirina. Se seleccionaron las colonias que no germinaron en este último medio.

El total de colonias analizadas fue de 481 y se obtuvieron tres cepas que aparentemente no crecían en tributirina. Estas colonias se estiraron para aislar las colonias y se volvieron a probar en el medio selectivo. Después de esto, sólo una resultó ser incapaz de crecer en tributirina. La cepa así obtenida se nombró CLK1. Fenotípicamente resultó ser muy similar a la cepa PW1. Creció perfectamente bien en medio mínimo y también posee el genotipo *biA1, argB2, metG1*.

Se hizo otra mutagénesis con luz ultravioleta para obtener más mutantes, requeridas para poder hacer un análisis genético más completo y, de esta manera, no depender de una sola mutante.

La curva de sobrevivencia obtenida se muestra en la Figura 7. En este caso, el 90% de muerte se logró a los 75 segundos de irradiación.

El enriquecimiento se hizo en medio líquido con tributirina al 1% como única fuente de carbono. Las esporas no germinadas se filtraron, se diluyeron y sembraron en un medio mínimo con desoxicolato de sodio y posteriormente se replicaron con terciopelo en medio con tributirina.

El total de colonias analizadas fue de 4510 y se obtuvieron ocho mutantes (CLK3 a CLK10) que se estiraron para aislar las colonias y se volvieron a crecer en medio selectivo. Todas ellas fueron fenotípicamente similares a la cepa PW-1 y conservaron los mismos marcadores genéticos.

En la Figura 10 (página 38) se puede ver el crecimiento que presentan la cepa silvestre PW-1 y las mutantes en glucosa, tributirina y aceite de olivo.

### 3. Genética.

#### 3.1. Mapeo

Se intentó asignar la mutación contenida en la cepa CLK1 a un cromosoma. Para ello, se obtuvo un diploide de ésta con la cepa maestra MSF (que contiene un marcador en cada cromosoma), se hizo la haploidización y finalmente el análisis de haploides. Los

Figura 6. Curva de supervivencia de PW-1 con radiación gamma

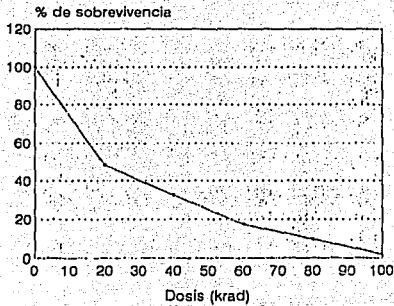
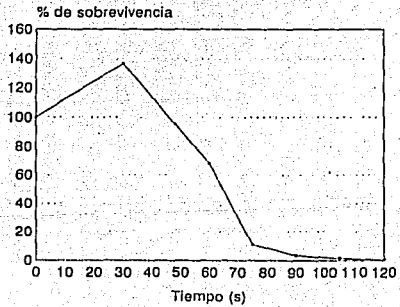


Figura 7. Curva de supervivencia para PW-1 con radiación ultravioleta





resultados obtenidos después de realizar el análisis fueron confusos y no se pudo deducir en cual cromosoma estaba la mutación.

Se procedió entonces a hacer una cruce con otra cepa para ver si la segregación de la mutación era mendeliana. Se eligió la cepa FGSC411 porque tiene un marcador visual (color amarillo) y sus requerimientos (PABA y prolina) son diferentes a los de las mutantes CLK, lo que constituye una ventaja para hacer las cruces. Los resultados indicaron que efectivamente la mutación segrega de manera mendeliana, ya que aproximadamente el 50% de las colonias son incapaces de crecer en tributirina. Una observación interesante de este experimento fue que la mayoría de las colonias que crecieron en el medio selectivo eran amarillas, es decir, presentaban el fenotipo de la cepa paterna FGSC411 (amarilla, capaz de crecer en tributirina). Esto llevó a la conclusión de que la mutación de CLK1 se encuentra en el cromosoma I, ligada al marcador  $\nu A2$ , que es el responsable del color amarillo. Los porcentajes de recombinación con respecto a  $\nu A2$ , *pabaA1* y *biA1* pueden observarse en la Tabla 5. La mutación de CLK1 resultó ser, por lo tanto, monogénica y se decidió denominar *dula* (deficiente en la utilización de lípidos) al gen correspondiente.

Para corroborar este mapeo, se hizo una cruce independiente entre CLK1 y CIS17. En la misma tabla se muestra el porcentaje de recombinación con respecto a  $\nu A2$ . Con esta cruce también se observó que la capacidad de crecer en tributirina se relacionó con las colonias amarillas. Un esquema de un posible mapa, diseñado de acuerdo a los porcentajes de recombinación obtenidos de la Tabla 5, se presenta en la Figura 8.

Las demás mutantes se cruzaron también con la cepa FGSC411 con el mismo objetivo y para aclarar si alguna de ellas era alélica a CLK1. Esto es, si en alguna de estas cruces resultara que, al igual que CLK1, la incapacidad para crecer en tributirina estuviese ligada al color de las esporas, la mutación estaría también en el cromosoma I y, por lo tanto, sería probable que fueran alélicas.

La segregación de todas las mutaciones fue mendeliana, pero ninguna mostró ligamento al gen  $\nu A2$ , cuya mutación produce esporas amarillas.

Tabla 5. Mapco de *lipA*.

Cruzas	Padres		Recombinantes		Total Progenie	% de Recombinantes
	Genotipo	No. de progenie	Genotipo	No. de progenie		
CLK1 X FGSC411	<i>dulA1<sup>-</sup>;biA1<sup>-</sup></i>	63	<i>dulA1<sup>+</sup>;biA1<sup>+</sup></i>	5	136	7.35
	<i>dulA1<sup>+</sup>;biA1<sup>+</sup></i>	63	<i>dulA1<sup>+</sup>;biA<sup>-</sup></i>	5		
CLK1 X FGSC411	<i>dulA1<sup>-</sup>;paba<sup>+</sup></i>	52	<i>dulA1<sup>-</sup>;paba<sup>-</sup></i>	16	136	25.0
	<i>dulA1<sup>+</sup>;paba<sup>-</sup></i>	50	<i>dulA1<sup>+</sup>;paba<sup>+</sup></i>	18		
CLK1 X FGSC411	<i>dulA1<sup>-</sup>;yA2<sup>+</sup></i>	64	<i>dulA1<sup>-</sup>;yA2<sup>-</sup></i>	6	136	7.35
	<i>lipA1<sup>+</sup>;yA2<sup>-</sup></i>	62	<i>dulA1<sup>+</sup>;yA2<sup>+</sup></i>	4		
CLK1 X CIS 17	<i>dulA1<sup>-</sup>;yA2<sup>+</sup></i>	77	<i>dulA1<sup>-</sup>;yA2<sup>-</sup></i>	2	176	7.38
	<i>dulA1<sup>+</sup>;yA2<sup>-</sup></i>	86	<i>dulA1<sup>+</sup>;yA2<sup>+</sup></i>	11		

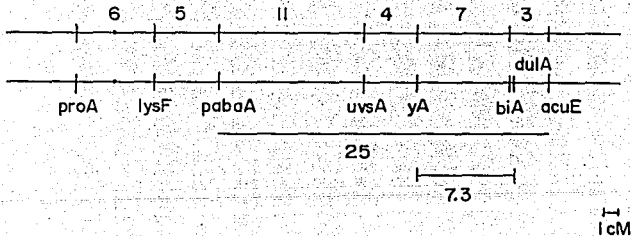


Figura 8. Mapa propuesto para *dulA*.

### 3.2. Transformación.

La mutación en CLK1 mapeó cerca de *yA2* y de *pabaA1*, por lo que se planteó la posibilidad de clonar el gen *dulA* en *A. nidulans* a partir de un cósmido proveniente de una biblioteca genómica separada por cromosomas (Brody, *et al.*, 1991). Los cósmidos elegidos contienen el gen *yA2* por lo que se supuso que en alguno de ellos podría estar el gen *dulA* de CLK1, ya que, de acuerdo al mapa, se localiza a aproximadamente siete unidades de mapa de *yA2*. También se eligió un cósmido con el gen de *pabaA1*.

Se hizo una cotransformación utilizando además de los cósmidos L11C4, L18E5 y L26C8, el plásmido pDHG25, que complementa la auxotrofia de arginina. La cepa que se transformó fue una derivada de la cruce de CLK1 con FGSC411, denominada CLK2 y que tenía el siguiente genotipo: *pabaA1, yA2, dulA, argB, metG1, proA1*. Se hizo la transformación con los cósmidos que contenían *yA2*, en un medio selectivo que carece de arginina, de tal modo que solo aquellas que incorporaron el pDHG25 fueran capaces de crecer. La forma de reconocer las transformantes que incorporaron el cósmido fue exclusivamente por complementación del gen *yA2*, es decir, se seleccionarían colonias verdes. Para el caso del cósmido que contenía el gen de *pabaA1*, el medio utilizado carece de este requerimiento y de arginina.

Primero se hizo una transformación con cada uno de los cósmidos por separado. Al observar los resultados se obtuvieron varias transformantes, pero sólo incorporaron el plásmido y ninguno de los cósmidos porque ya no requerían arginina, pero seguían siendo amarillas. El gen *yA2* no es indispensable para el crecimiento del hongo, por lo que no es posible ejercer ningún tipo de presión selectiva sobre las transformantes.

Dado que con la metodología anterior no se obtuvieron colonias verdes, se decidió repetir el experimento, pero, en este caso, se agregó una preparación con todos los cósmidos que tenían *yA2* (L11C4, L18E5 y L26C8). Se hizo la transformación con (10 µg) y sin plásmido. En ésta última condición el medio donde se sembró contenía todos los requerimientos, inclusive arginina. Se esperaba que en el experimento sin plásmido se obtuviera un tapete de colonias amarillas y que probablemente en algún caso se detectara alguna colonia verde.

La cotransformación con el plásmido pDHG25 y los cósmidos mencionados, dio lugar a un gran número de transformantes, de las cuales siete se estiraron para aislar una colonia. Sin plásmido no se aislaron transformantes verdes.

Se recuperaron tres colonias verdes. A todas ellas se les comprobó el genotipo para ver si eran descendientes de la cepa original. (Se sembraron en un medio con todos los requerimientos menos uno).

Los genotipos de dos de ellas indicaron que efectivamente provenían de la cepa CLK2. Es importante señalar que el crecimiento de las transformantes en el medio selectivo (sin arginina) se veía irregular en los bordes. Esto es indicativo de que contenían el plásmido pDHG25, ya que éste es inestable mitóticamente (Gems, *et al.*, 1991) por lo que el número de copias de éste varía en cada zona, provocando esta morfología.

Las dos transformantes se sembraron en medio con tributirina más los requerimientos (excepto arginina) para ver si alguna de ellas incorporó el gen de *dulA* y por lo tanto, recuperará la capacidad de crecer en esta fuente de carbono.

Ninguna de las dos pudo crecer en tributirina, por lo que se llegó a la conclusión de que el gen *lipA* no se encuentra en ninguno de los cósmidos que transformaron dichas cepas. Se decidió continuar con el análisis genético de las mutantes.

### 3.3. Crecimiento en tributirina después de germinar en glucosa. Definición de los grupos de complementación.

Para seguir con el análisis genético, se obtuvieron diploides entre una cepa derivada de CLK1 (*ya2, pabaA1, dulA*) y las demás mutantes (CLK3 a CLK10). Estos diploides se utilizaron para tratar de obtener más datos en cuanto a crecimiento en lípidos como única fuente de carbono.

Se diseñó un experimento para eliminar la posibilidad de que las deficiencias en las mutantes fueran en la germinación y no en su incapacidad para utilizar lípidos como fuente de carbono. Para esto, se inocularon las mutantes y los diploides encima de papel celofán y este a su vez, sobre medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. Se incubó durante 24 horas y posteriormente se transfirió el papel a un medio con tributirina o con aceite de olivo y se prosiguió la incubación por 48 horas más.

La Figura 9 (A y C) muestra el crecimiento en tributirina a las 24 y 48 horas después de la transferencia, respectivamente. Todos los diploides crecieron bien, incluso a nivel de la PW1 que se sembró como control. Las mutantes también crecieron, pero a diferentes niveles. La CLK1 a las 48 horas esporuló y creció de forma regular, pero no llegó al tamaño de la PW1. Las cepas CLK4 y CLK9 también esporularon, pero tuvieron un color amarillo oscuro y no crecieron bien. Las mutantes CLK5 a CLK8 tuvieron un crecimiento similar entre sí, pero tampoco llegaron al tamaño de PW1. En aceite de olivo se observaron resultados similares, pero, como el crecimiento no es tan compacto como en tributirina, no se pudieron apreciar diferencias tan claras como en ésta.

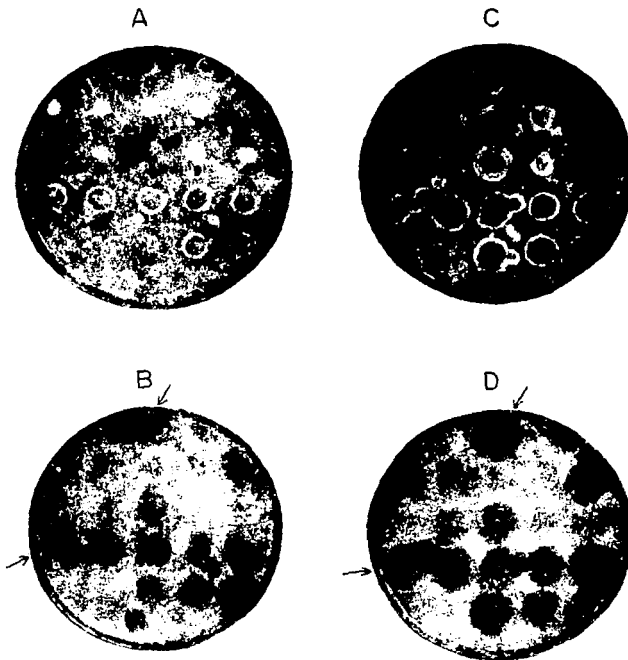
Cuando se retiró el celofán de la caja de Petri, se observó que el medio con tributirina estaba claro bajo los diploides y la cepa PW-1 (Figura 9, B y D). En el caso de las mutantes, el medio se veía ligeramente manchado, pero no llegó a formarse un halo, lo que parecía indicar que no tenían actividad de lipasa. En aceite de olivo no se detectaron halos.

El experimento demostró, en primer lugar, que las mutantes ya germinadas no fueron capaces de crecer normalmente en un medio con lípidos como única fuente de carbono. Por otro lado, también parece indicar que hay tres grupos definidos por sus similitudes y diferencias en cuanto a su crecimiento. Las cepas CLK3 y CLK10 crecieron de manera semejante a PW-1.

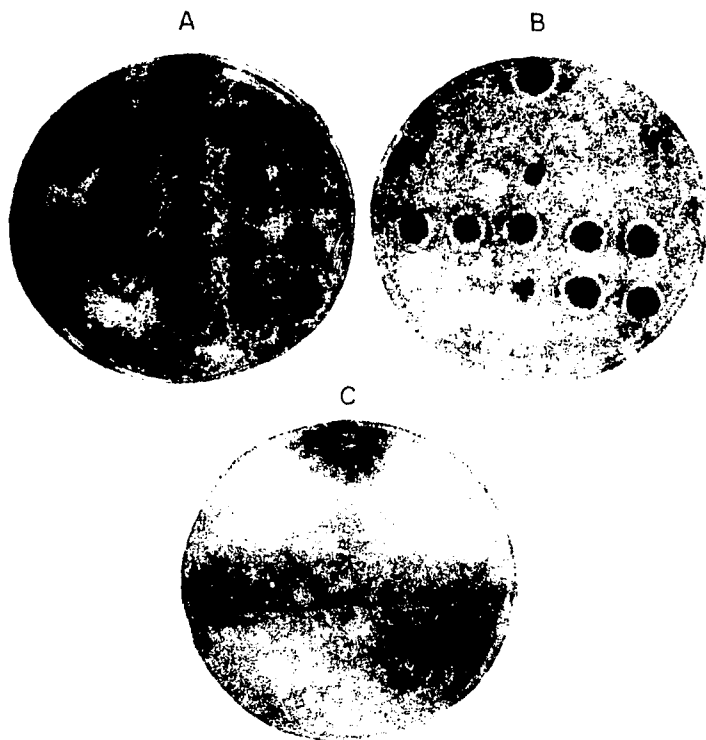
Para definir los diferentes grupos de complementación, se obtuvieron diploides entre una cepa derivada de CLK1 (*yA2, pabaA1, lipA*) y las otras mutantes (CLK3 a CLK10). La Figura 10 muestra el crecimiento de las mutantes y sus respectivos diploides en glucosa, tributirina y aceite de olivo. Cuando las cepas crecen en el triglicérido, forman un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. Todos los diploides crecieron bien. Por lo tanto, se concluyó que CLK1 define un grupo de complementación distinto del de las otras mutantes. Las cepas CLK3 y CLK10 no se analizaron más porque son mutantes parciales ("leaky"), es decir, crecieron ligeramente en el medio con tributirina.

Se continuó haciendo cruza para obtener diploides entre las mutantes que quedaban. Se cruzó una derivada de CLK4 (*yA2, pabaA1, proA1*) con todas las demás. El resultado se muestra en la Figura 11. Solamente el diploide entre CLK4 y CLK9 fue incapaz de crecer. Por lo tanto, estas dos cepas definen el segundo grupo de complementación, que se designó *dulB*.

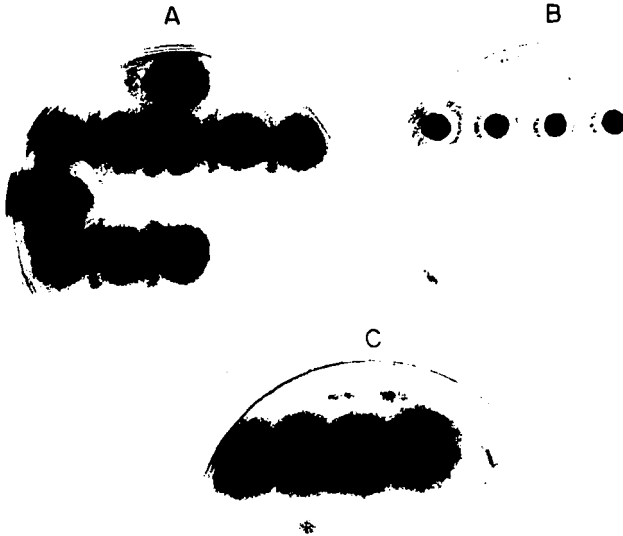
Las cepas restantes se cruzaron con una derivada de CLK6 (*yA2, biA1, pabaA1, proA1*). La misma Figura 11 muestra los resultados. Ninguno de los diploides obtenidos creció en el medio selectivo y por lo tanto, CLK5, CLK6, CLK7 y CLK8 definen un tercer grupo de complementación, designado *dulC* (Tabla 6).



**Figura 9.** Las mutantes y los diploides precrecidos en glucosa durante 24 horas y transferidas a tributirina. La incubación posterior a la transferencia fue de 24 horas (A,B) y de 48 horas (C,D). A y C: Medio con celofán en tributirina. B y D: Halos de hidrólisis evidentes bajo el celofán para la cepa PW-1 y los diploides (flechas). Orden de las cepas, de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha: PW-1/CLK7, CLK6, CLK5, CLK4, CLK3/CLK1, CLK10, CLK9, CLK8/ diploides 7/1, 6/1, 5/1, 4/1, 3/1 diploides 10/1, 9/1, 8/1.



**Figura 10.** Definición del primer grupo de complementación. Cepas y diploides (CLK1 con CLK3-CLK10) crecidos en glucosa (A), tributirina (B) y aceite de olivo (C) durante 48 horas. Todos los diploides crecen por lo que CLK1 forma el primer grupo de complementación. El orden de las cepas es el de la Figura 9.



**Figura 11.** Definición del segundo y tercer grupo de complementación. Cepas y diploides en glucosa (A), tributirina (B) y aceite de olivo (C).  
Orden de las cepas: CLK4/ diploides 4/5, 4/6, 4/7, 4/8, 4/9/ CLK6/ diploides 6/5, 6/7, 6/8.



**Tabla 6.** Clasificación de las mutantes por su crecimiento en tributirina como única fuente de carbono.

Grupo	Cepas
I	CLK1
II	CLK4, CLK9
III	CLK5, CLK6, CLK7, CLK8

Nga *et al.* (1989) obtuvieron un total de catorce mutantes de *Y. lipolytica* con una actividad lipolítica reducida, que varió entre 0 y 4% de la actividad del control. A tres de ellas no se les detectó lipasa. En su estudio, se obtuvieron dos grupos de complementación y proponen que uno corresponde al gen estructural de la lipasa y el otro a algún gen que afecta la regulación de enzima.

En el presente trabajo, puede pensarse que se presenta un caso similar, es decir, que un grupo de mutantes esté afectada en el gen estructural y otro en algún regulador de la actividad.

En *Pseudomonas cepacia*, la lipasa se activa por efecto de una proteína conocida como Lim que tiene una función de chaperona. No se requiere para la transcripción ni la traducción del gen de la lipasa, pero ésta es inactiva en ausencia de Lim. Una posible función de Lim es el transporte de la lipasa a través de membranas (Hobson *et al.*, 1993). Tal vez el tercer grupo de complementación obtenido corresponda a una función similar a esta.

#### 4. Actividad lipolítica.

Hay reportes de la existencia de lipasas en varias especies de *Aspergillus* (Berka, *et al.*, 1992) pero para el caso particular de *A. nidulans* no se encontró ningún reporte. Por esta razón, primero se procedió a determinar las condiciones que permiten medir la actividad lipolítica en el medio de cultivo. Para esto, se hizo una fermentación con diferente lipido como fuente de carbono. En un caso se utilizó glucosa al 0.5% y aceite de olivo al 2% y en el otro caso, tributirina al 2%. Este hongo consume la glucosa en las primeras 30 horas de crecimiento cuando ésta se encuentra a una concentración inicial del 1%. Después de transcurrido este tiempo es factible detectar actividad lipolítica porque se inicia el consumo del aceite. La fermentación se dejó durante 48 horas, pero también se tomó una muestra a las 30 para medir actividad lipolítica.

A las 30 horas, se pusieron diferentes volúmenes de filtrado con *o*-nitrofenil laurato como sustrato y se incubaron a temperatura ambiente durante tiempo indefinido, haciendo observaciones periódicas para determinar si se apreciaba un cambio en el color de la mezcla de reacción de transparente a amarillo, color característico con este sustrato.

Se usaron 50, 100, 500 y 1000 µl de filtrado en 1 ml de mezcla de reacción que contenía el sustrato disuelto en amortiguador de fosfatos pH 7.2. A los cinco minutos, se detectó un color amarillo en las muestras de aceite de olivo con 500 y 1000 µl y a tiempos más largos, todos las muestras tenían color. En el caso del filtrado del experimento con tributirina no se vio ningún cambio, a pesar de que se dejaron incubando durante más de una hora.

El aceite de olivo contiene triglicéridos que tienen principalmente ácido oleico pero también contiene otros ácidos grasos que pueden utilizarse como fuente de carbono. Probablemente, algunos de estos compuestos son más fácilmente asimilados que la tributirina (triglicérido con tres residuos de ácido butírico) y probablemente a esto se deba el escaso crecimiento y la falta de actividad lipolítica en este medio. Además en el caso de la tributirina no se agregó glucosa como fuente inicial de carbono, lo cual contribuyó al retraso en el crecimiento del hongo. A las 48 horas, no se detectó actividad lipolítica ni con aceite de olivo ni con tributirina.

Con estos datos se concluyó que puede detectarse actividad lipolítica a las 30 horas de cultivo pero ésta es lábil, ya que transcurrido este tiempo, no se pudo detectar actividad en el filtrado. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Chander *et al.*, (1980) con *A. wentii*, donde la mayor producción de enzima se obtuvo a los tres días de incubación a 30°C y en ausencia de lípidos en el medio. La presencia de éstos (aceite de olivo en particular) provocó una disminución en la actividad hasta en un 63%.

Se decidió entonces hacer otro cultivo líquido con PW-1 y una mutante de cada grupo de complementación (CLK1, CLK4 y CLK5).

Como fuente de carbono, se empleó glucosa al 0.5% en presencia de aceite de olivo (2%) o en su ausencia. Estas condiciones permitieron definir si la producción de enzima requiere la presencia del aceite. Se tomaron muestras a las 12, 24 y 36 horas de cultivo.

En un principio, para medir la actividad lipolítica, se utilizó como blanco la misma muestra hervida previamente durante 10 minutos en baño de agua. Con las muestras hervidas la reacción siguió llevándose a cabo, ya que se apreciaba un color amarillo a simple vista. Este resultado indica que la enzima de *A. nidulans* es termoresistente. Esta característica puede conferirle importancia industrial a esta lipasa, ya que en la

formulación de detergentes se busque las enzimas toleren altas temperatura. Para definir claramente el patrón de estabilidad térmica, se requiere medir la actividad residual a lo largo de un rango amplio de temperaturas. Sin embargo, para los fines del ensayo de la actividad, se decidió utilizar como blanco la propia mezcla de reacción, pero sin añadirle el filtrado.

Los resultados que se presentan en la Tabla 7 indican que la actividad lipolítica existe en todas las cepas incluyendo las mutantes CLK y que la lipasa es inducible, dado que, cuando no hay aceite presente en el medio de cultivo, la actividad resultó aproximadamente de 3 a 5% de la actividad que se encuentra en presencia de lípido. Por otro lado, la inducción fue similar en todos los casos. Después de transcurrido este tiempo, la actividad disminuye considerablemente, a diferencia de los datos obtenidos por Pokorny, *et al.*, (1994) con *A. niger*. Estos autores llegan a detectar actividad sin aceite y hasta las 94 horas de cultivo, utilizando almidón al 2% como única fuente de carbono.

**Tabla 7.** Actividad lipolítica ( $\Delta$  DO/min mg) de la cepa PW-1 y mutantes CLK en medio con glucosa al 0.5%, con o sin aceite de olivo al 2%.

Horas	Sin aceite de olivo			Con aceite de olivo		
	12	24	36	12	24	36
Cepas						
PW-1	0	1.97	0	0	19.12	9.15
CLK1	0	2.1	0	0	15.97	2.63
CLK4	0	3.3	0	0	18.21	6.64
CLK5	0	1.9	0	0	24.34	3.64

El aceite ejerce un efecto positivo sobre la síntesis de la lipasa de *A. nidulans*, a diferencia de otros organismos, donde se ha reportado que dicho efecto es negativo. Por ejemplo, en *Rhizopus oligosporus*, los aceites al 0.5%, por el contrario, disminuyen la actividad lipolítica (Nahas, 1988). En *A. niger*, en cambio, el comportamiento es parecido al que se obtuvo con *A. nidulans*, dado que se requiere un aceite (olivo, girasol, ricino) para que aumenten los niveles de actividad. Sin embargo, *A. niger* no requiere forzosamente de la presencia de un lípido para sintetizar la enzima, ya que se detecta actividad con almidón y con sacarosa como únicas fuentes de carbono. Con almidón, se detecta actividad desde las 24 horas de fermentación. En este organismo, sin embargo, la

máxima actividad en presencia de aceite de olivo se presentó a las 72 horas y con almidón al 0.1% y aceite al 2%, a las 48 horas (Pokorny, *et al.*, 1994).

En *A. nidulans* la actividad lipolítica, en los tiempos considerados en estos experimentos, es mayor a las 24 horas de fermentación. Al llegar a este tiempo, la glucosa inicial seguramente ya se consumió (Skromne, *et al.*, 1995) y por ello se sintetiza la lipasa y se empieza a utilizar el aceite como fuente de carbono. No se midió el consumo del aceite, pero en el medio se veían gotas de éste aún a las 36 horas. Como se utilizó aceite de olivo comercial, éste puede tener contaminantes que se podrían emplear como fuente de carbono. El consumo de los ácidos grasos libres no requiere de la participación de lipasas. El que no se haya detectado actividad lipolítica a las 36 horas de cultivo no significa que en tiempos posteriores no pueda haber un aumento de la misma. En este trabajo, sin embargo, ya no se midió la actividad en esos tiempos porque la finalidad no era entender la cinética completa sino simplemente definir un punto en el que era posible medir la actividad.

Los cultivos sin aceite de olivo esporularon a las 48 horas de incubación y en ellos se llegó a detectar los pigmentos de la esporulación. Como crecieron en glucosa al 0.5% como fuente de carbono, ésta se consume rápidamente y el hongo esporula al verse limitado de carbono, y tal vez sintetice metabolitos secundarios como los pigmentos observados. El cultivo que se veía más oscuro fue el de CLK1, seguido por CLK5. Por otra parte, PW1 y CLK4 habían esporulado, pero no al nivel de los anteriores.

El pH del medio se alcaliniza durante la fermentación en presencia y en ausencia de aceite. Probablemente, esta variación en el pH puede ser importante para la detección de la actividad de lipasa después de las 24 horas de cultivo.

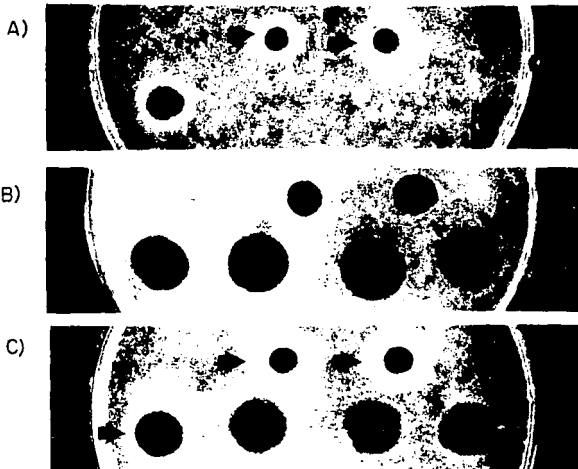
La actividad intracelular se midió en el micelio molido (Tabla 8). Como se puede observar, prácticamente no hay actividad intracelular, por lo que se concluyó que la actividad lipolítica detectada se debe principalmente a una enzima extracelular. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad, de que haya una enzima unida a la membrana, como es el caso de *Y. lipolytica*, en la que se ha detectado una lipasa extracelular y dos unidas a la membrana (Ota, *et al.*, 1982).

Para averiguar un poco más sobre la regulación de la lipasa en *A. nidulans* se hizo el siguiente experimento. Se crecieron las cepas PW1 (control), CPG1 (que contiene la mutación *creA204*), CHA1 (*creA<sup>d</sup>-30*) y las mutantes CLK en medio con tributirina sola, tributirina más 0.5% de glucosa (concentración no represora) y tributirina más 1% de glucosa (concentración represora).

**Tabla 8.** Actividad lipolítica intracelular de PW-1 y las mutantes con *o*-nitrofenil laurato como sustrato.

Cepa	Actividad intracelular ( $\mu$ moles/min mg)
PW1	0.017
CLK1	0.016
CLK4	0.002
CLK5	0.072

Las cepas CPG1 y CHA1 son insensibles a la represión catabólica por carbono mediada por la proteína CREA. El alelo más extremo de *creA* es *creAd-30* y por ello se decidió probar una cepa con esta característica. La Figura 12 muestra los resultados obtenidos. En presencia de glucosa al 1% (Figura 12 B), ninguna de las cepas formó un halo de hidrólisis mientras que en ausencia de ésta (Figura 12A), sólo crecieron CPG1, CHA1 y PW1 y el halo fue evidente.

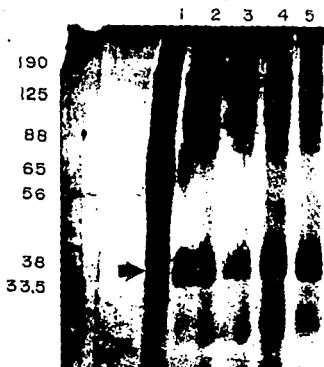


**Figura 12.** Crecimiento en tributirina 1% (A), en tributirina 1% más glucosa 1% (B) y tributirina más glucosa al 0.5% (C). Nótese la formación de halo únicamente en A y en C (flechas). Orden de las cepas: Primera fila: CPG-1, CHA1; segunda fila: PW-1, CLK1, CLK4, CLK5.

Con glucosa al 0.5% (Figura 12 C) todas crecieron y las mismas cepas mencionadas formaron halo. Estos resultados demuestran que la lipasa se reprime por carbono pero por medio de un mecanismo independiente de CREA. En *Rhizopus delemar*, la producción de lipasa también está reprimida por glucosa, pero en este caso se requiere una concentración del 4% para que el efecto sea evidente en la actividad lipolítica obtenida en el medio líquido (Espinosa, 1990; Kawasaki, 1991).

### 5. Geles de proteínas

Se liofilizaron muestras del medio de cultivo filtrado después de las 24 horas de crecimiento de cada cepa y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, sin  $\beta$ -mercaptoetanol (Laemmli, 1970). Después, se colocó sobre otro gel con *o*-nitrofenil laurato disuelto en tritón X100 y agarosa al 0.8% y se incubaron a 37°C durante 45 minutos. En el gel con sustrato se observó una mancha amarilla indicando actividad lipolítica. A esa altura, correspondiente a la actividad, se marcó con una pipeta pasteur el gel con la proteína e inmediatamente después se tiñó con plata. La Figura 13 (carriles 2 a 5) muestra el gel de proteína obtenido y se indica la banda que comigró con la actividad detectada en el gel con sustrato



**Figura 13.** Gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, teñido con plata. Se colocaron 23  $\mu$ g de proteína en cada carril, excepto en el caso de los marcadores de peso molecular, donde se pusieron 7  $\mu$ l (Sigma). Las flechas señalan el sitio correspondiente a la actividad detectada en el gel de sustrato. Carril 1: marcadores de peso molecular (kDa). Carriles 2 al 8: PW-1, CLK1, CLK4, CLK5

*A. nidulans* presentó una sola zona con actividad lipolítica detectable sobre un gel con *o*-nitrofenil laurato. Esta zona fue la misma en todas las cepas, ya que las manchas amarillas se presentaron a la misma altura. El peso molecular aproximado a esta altura fue de 35 kDa.

El resultado obtenido con este gel indica que *A. nidulans* probablemente tenga una sola proteína, sintetizada bajo las condiciones indicadas, capaz de utilizar *o*-nitrofenil laurato como sustrato.

En contraste con estos resultados, en *A. niger* (Höfelmann, *et al.*, 1985) se reportaron dos lipasas con pesos moleculares de 31 kDa y 19 kDa. En otras especies de *Aspergillus* no se ha reportado si hay más de una lipasa.

## 6. Germinación.

La forma para seleccionar las mutantes consistió en crecerlas en un medio con tributirina como única fuente de carbono y elegir las cepas que no crecieron. Dadas las condiciones de esta selección, surgió la duda de que las cepas puedan tener problemas de germinación, no sólo en lípidos, sino también en otras fuentes de carbono.

En el caso de las semillas, se sabe que tienen aceites y carbohidratos como sustancias de reserva. Para poder germinar, requieren de la actividad de varias lipasas y  $\alpha$ -amilasas, que les permiten utilizar sus reservas. De manera similar en las esporas, es posible que la lipasa juegue un papel indispensable en el momento de la germinación.

En las esporas, además de triglicéridos, hay fosfolípidos, por lo que también participan las fosfolipasas en el proceso de degradación. En el caso particular de *A. niger*, se sabe que durante la germinación de los conidios va disminuyendo la cantidad de fosfolípido. Al mismo tiempo, aumentan los azúcares fosfatados y los nucleótidos. Parte del fósforo se incorpora al RNA (Nishi, 1961).

Para tratar de aclarar el papel de la lipasa durante la germinación se sembraron las cepas en varias fuentes de carbono para observar su germinación. Se empleó glucosa (control), acetato, arabinosa y glicerol a una concentración 100 veces menor de la normal con el objetivo de permitir la observación de la germinación de cada espora. También se utilizó una condición sin fuente de carbono exógena.

Después de aproximadamente 10 horas, se observó bajo el microscopio que todas las cepas germinaron en glucosa y glicerol; en arabinosa, la CLK1 y la CLK5 germinaron más lento que la PW-1 y la CLK4. La CLK5 no germinó, sin embargo el dato más interesante, resultó la condición de acetato, en donde únicamente la PW-1 germinó bien. Este mismo patrón se presentó en la condición de ausencia de glucosa. (Figura 14).

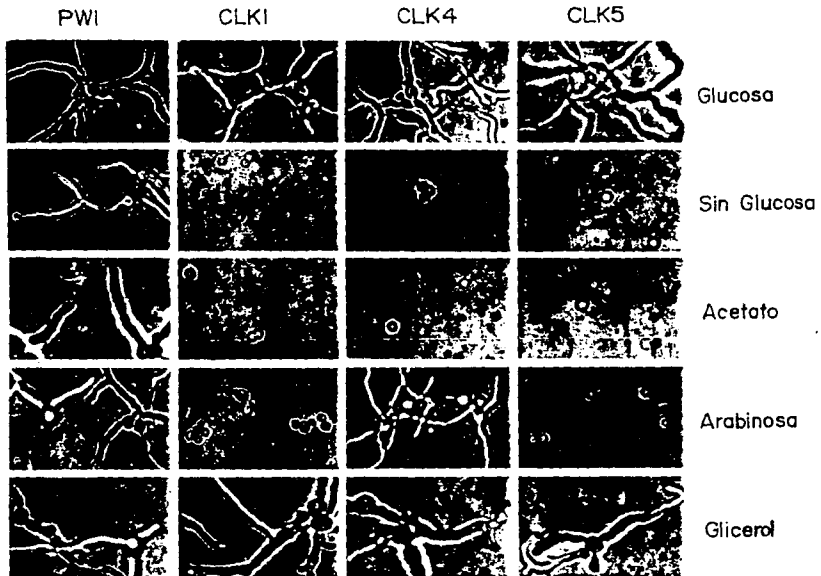


Figura 14. Germinación de la cepa PW-1 y las mutantes CLK1, CLK4 y CLK5 en diferentes fuentes de carbono. Observaciones hechas a las 10 horas de incubación a 37°C (aumento 40X). Todas las fuentes de carbono al 0.01%, excepto acetato, que está 1mM.



Por otro lado, las cepas se estiraron para aislar colonias en diferentes fuentes de carbono (1% en todas y acetato 100 mM). En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 9.** Crecimiento de las diferentes cepas en medio sólido con diversas fuentes de carbono al 1%.

Donde hay tributirina o acetato con glucosa, ésta última se empleó al 0.01%.  
 (++++, crece muy bien, esporula; +++ , crece bien, esporula;  
 +; crece pero no esporula; -, no crece)

Cepa	Glucosa	Glicerol	Arabin	Trib.	Acetato	Trib/Glu	Acet/Glu	Butírico
PW-1	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++
CLK1	++++	++++	+++	-	-	+	+	-
CLK4	++++	++++	+++	-	-	+	+	-
CLK5	++++	++++	+++	-	-	+	+	-

Los resultados del experimento de germinación junto con los del crecimiento en diferentes fuentes de carbono indican que las mutantes tienen un comportamiento similar en lípidos y en acetato. En ambos casos, las cepas no germinan (Figura 14) y no crecen bien en colonia aislada (Tabla 9). Estos datos concuerdan con los de Armit et al., (1976), que reportaron el crecimiento de diez mutantes en el metabolismo del acetato en diferentes fuentes de carbono. En este trabajo sólo una de las cepas crece ligeramente en butírico; ninguna en acetato. Estos autores proponen que algunas cepas pueden germinar sin fuente de carbono porque el agar contiene lípidos contaminantes que pueden utilizarse para crecer. Estos lípidos se deradan por vías metabólicas de los compuestos de dos carbonos como la del acetato. Anteriormente se había pensado que los contaminantes del agar eran hexosas pero, si éste fuera el caso, todas las cepas habrían crecido sin fuente de carbono. Sykes (1956) propuso que el agar contiene lípidos como ácidos grasos de cadena larga. Esto puede explicar por qué la cepa PW-1 sí germina sin glucosa y las demás cepas no.

Estos resultados indicaron que las mutantes tienen problemas para asimilar lípidos (contaminantes del agar) y también acetato. Los ácidos grasos deben convertirse a acetyl-CoA y por lo tanto convergen con el catabolismo de acetato. Por lo tanto, las mutantes aisladas pueden ser deficientes en la degradación de lípidos en vez de en la producción

de lipasas. La mutación de CLK1, mapeada con respecto a los marcadores *bia1*, *pabaA1* y *yA2*, resultó estar muy cerca de otro marcador, conocido como *acuE*, que es una deficiencia en la malato sintasa. Esta enzima es indispensable para el ciclo del glioxalato que, a su vez, se requiere para degradar el acetato. De hecho, si se consideran los CM que hay en el mapa de la Figura 8 (página 33) entre *pabaA1* y *dulA* resulta exactamente el sitio de *acuE*.

La actividad lipolítica de las mutantes es ligeramente menor en algunos casos pero nunca resultó ser nula (Tabla 7). En el gel en el que se separaron las proteínas del medio de cultivo siempre se detectó una banda de actividad (Figura 13).

Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que probablemente los tres grupos de mutantes que se aislaron son en algún paso de la degradación de los lípidos y no en la síntesis de las lipasas.

Para comprobar si esta conclusión era la correcta, se formaron diploides entre las mutantes y todas las cepas de nuestra colección que tuvieran una mutación *acu* o *fac*, ya que éstas tienen deficiencias para utilizar acetato como única fuente de carbono.

Los diploides se crecieron en acetato y en tributirina. Los diploides, como su nombre lo indica, tienen la información genética de las dos cepas padres. Si no pueden crecer en el medio selectivo, quiere decir que no hay complementación y es posible que el mismo gen pueda estar alterado (mutaciones alélicas). De presentarse el resultado contrario, significa que sí hay complementación, es decir, que la mutación en cada cepa padre es distinta.

Como se puede observar en la Tabla 10, de los diploides probados, sólo tres no mostraron complementación: CLK1/A649, CLK4/A651 y CLK5/A650. Para corroborar este resultado, se hicieron cruza sexuales entre estos pares de cepas. Se probaron por lo menos 100 individuos de cada cruce y no se obtuvieron colonias recombinantes capaces de crecer en acetato.

Estos resultados indicaron que la mutación de CLK1 es alélica a *acuE* (malato sintasa); la de CLK4 es alélica a *acuE* (PEP carboxicinasa) y la CLK5 es alélica a *acuE* (isocitrato liasa).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**Tabla 10.** Diploides obtenidos entre las cepas indicadas.  
La X indica que no crece en acetato ni en tributirina como fuente de carbono

	A409 <i>facB</i>	A649 <i>acuD</i>	A650 <i>acuE</i>	A651 <i>acuF</i>	A652 <i>acuG</i>	A653 <i>acuH</i>	A654 <i>acuJ</i>	A655 <i>acuK</i>	A656 <i>acuL</i>
CLK1			X						
CLK4				X					
CLK5		X							

En el experimento de germinación, el crecimiento de las mutantes en glicerol puede explicarse porque el catabolismo de éste se realiza por su conversión a gliceraldehído-3-fosfato para, posteriormente, entrar al ciclo de Krebs. En este caso, no hay acumulación de acetyl-CoA, por lo que la falta del ciclo del glioxalato no afecta demasiado. El gliceraldehído-3-fosfato se utiliza tanto en glicólisis como en gluconeogénesis. Para el caso particular de *acuD*, se sabe que la isocitrato liasa se induce en presencia de acetato, pero no cuando crece en hexosas (glucosa, sacarosa, fructosa) o en glicerol (Bowyer, *et al.*, 1994). En ésta última fuente de carbono, la enzima no es indispensable para el crecimiento de la cepa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el experimento de germinación.

La degradación del acetato, por otro lado, provoca un aumento en la poza de acetyl-CoA, por lo que resulta muy importante el ciclo del glioxalato. Este permite el flujo de la acetyl-CoA para formar intermediarios del ciclo de Krebs.

Las mutantes *acuD* (Armitt, *et al.*, 1976) tienen cierta actividad de malato sintasa, cuando crecen en sacarosa y acetato. Tanto las mutantes *acuD* (isocitrato liasa) como *acuE* (malato sintasa) tienen alterados los genes específicos de las enzimas del ciclo del glioxalato, pero pueden formar enzimas gluconeogénicas (PEP carboxicinasa, fructosa-1,6-difosfato) si primero se hacen crecer en sacarosa y luego se transfieren a acetato.

Al transferir las mutantes de glucosa a tributirina en el experimento de la Figura 9, probablemente crecieron en tributirina porque pueden formar glucosa vía gluconeogénesis. El crecimiento es menor que la cepa PW-1, que sí degrada tributirina y puede obtener ácido butírico como fuente de carbono y degradarlo por la vía de la  $\beta$ -oxidación, además de la utilización del glicerol, en caso de que la lipasa de esta cepa no sea específica.

Las cepas que crecen en acetato como única fuente de carbono sintetizan glucosa a partir de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La primera enzima que interviene en este proceso es la PEP carboxinasasa. Las mutantes *acul<sup>-</sup>* afectadas precisamente en esta enzima, son incapaces de crecer en acetato o en glutamato, pero crecen bien en glicerol (Armitt, *et al.*, 1976). Los resultados obtenidos con la cepa CLK4 (*acul<sup>-</sup>*) concuerdan con lo anterior, ya que efectivamente no germinó en acetato mientras que en glicerol sí lo hizo (Tabla 9). Las cepas *acul<sup>-</sup>* (CLK4 y CLK9) fueron las que presentaron más problemas para crecer en tributirina después de haber germinado en glucosa (Figura 9).

Analizando los resultados, es sorprendente el hecho de que Nga, *et al.* (1988) hayan logrado obtener mutantes no productoras de lipasas en *Yarrowia lipolytica*, ya que en nuestro trabajo seguimos su método de selección y no logramos aislar ninguna en el gen estructural de la lipasa *A. nidulans*. La actividad lipolítica en todas las cepas aisladas fue muy similar a la del control, por lo que no se puede hablar de una reducción en los niveles de producción de lipasas.

Por el gel de actividad, sabemos que *A. nidulans* PW-1 tiene una sola banda que comigra con la mancha amarilla detectada en el gel con sustrato. Podría ser por lo tanto, que únicamente haya un gen estructural y la posibilidad de dañarlo con algún mutágeno debería ser posible. *Y. lipolytica* tiene tres lipasas, una extracelular y dos unidas a la membrana (Ota, *et al.*, 1982) y según los resultados de Nga, *et al.* (1989), obtuvieron por lo menos tres mutantes que carecen de actividad extracelular. No mencionan nada con respecto a actividad de lipasas unidas a membrana, pero hubiera sido interesante saber si sus mutantes están afectadas también en estas enzimas.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, resultaría recomendable, considerar los siguientes aspectos:

1. Al intentar aislar mutantes deficientes en producción de lipasas, hay que utilizar dos medios selectivos, tributirina y acetato, de tal manera que se puedan elegir aquellas colonias que no crezcan en el primero y sí en el segundo.

Otra recomendación es elegir colonias sin halos o con halos pequeños y después medirles actividad lipolítica. Una vez escogidas las colonias con baja actividad se podría repetir la mutagénesis sobre ellas hasta aislar una mutante total.

2. Usar una cepa que no tenga como requerimiento un aminoácido que pueda emplearse como fuente de carbono, de tal modo que no haya interferencia con el método de selección.

3. No es recomendable utilizar un método de enriquecimiento por filtración porque la lipasa es extracelular. En el medio líquido, puede haber lipasas que provienen de las esporas que sí germinan, lo cual proporcionaría los precursores para aquellas que no puedan hacerlo. Las esporas seleccionadas, por lo tanto, no tendrán las características deseadas.

## CONCLUSIONES.

1. Se aislaron un total de siete mutantes incapaces de crecer en tributirina como fuente de carbono. Dichas mutantes fueron capaces de producir una actividad lipolítica extracelular y su deficiencia resultó ser en el metabolismo de acetato. El medio selectivo empleado puede utilizarse para aislar mutantes en acetato, pero no mutantes incapaces de sintetizar lipasas.
2. Se definieron tres grupos de complementación: [CLK1]; [CLK4, CLK9]; [CLK5, CLK6, CLK7, CLK8].
3. Por análisis de los diploides entre las cepas mutantes y las cepas *acu* conocidas, se definió que estos grupos de complementación pertenecen, respectivamente, a las mutaciones *acuE*, *acuF* y *acuD*.
4. Al medir la actividad lipolítica en un gel de poliacrilamida, se detectó solamente una zona que comigró con el área que indicaba actividad en el gel con sustrato. Esta zona corresponde a un peso molecular de aproximadamente 35 kDa.
5. La actividad lipolítica extracelular de *A. nidulans* se reprime por glucosa, por un mecanismo independiente del represor CREA. Esta enzima es inducible, ya que se detecta más actividad en presencia de aceite de olivo que en su ausencia.

## REFERENCIAS

1. Aguirre, J. 1992. *Aspergillus nidulans* como sistema experimental y la esporulación como modelo de diferenciación celular y regulación genética. *Ciencia* 43: 445-50.
2. Akhtar, M.W., Mirza, Q.A., y Chughtai, M.I.D. 1980. Lipase induction in *Mucor hiemalis*. *Appl Env Microbiol* 40(2): 257-263.
3. Apirion, D. 1965. The two-way selection of mutants and revertants in respect of acetate utilisation and resistance to fluoroacetate in *Aspergillus nidulans*. *Genet Res* 6: 317-329.
4. Arbigé, M.V., Freund, P.R., Silver, S.C., y Zelko, J.T. 1986. Novel lipase for cheddar cheese flavor development. *Food Technol* (abril): 91-98.
5. Armit, S., McCullough, W. y Roberts, C.F. 1976. Analysis of acetate non-utilising (acu) mutants in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 92: 263-282.
6. Arnold, R.G., Shahani, K.M., y Swivedi, B.K. 1975. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. *J Dairy Sci* 58(8): 1127-143.
7. Arpigny, J.L., Feller, G., y Gerday, C. 1993. Cloning, sequence, and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochem et Biophys Acta* 1171: 331-333.
8. Baillargeon, M.W., Bristline, R.G., Jr. y Sonnet, P. E. 1989. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 92-96.
9. Bal, J., Balbin, E., y Pienazek, N.J. 1974. Method for isolating auxotrophic mutants in *Aspergillus nidulans* using N-glycosyl-polifungin. *J Gen Microbiol* 84: 111-116.
10. Berka, R.M., Dunn-Coleman, N., y Ward, M. 1992. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. en *Aspergillus Biology and Industrial Applications*. Bennett, J.W. y Klich, M.A. (eds): 155-202.
11. Boel, E., Høge-Jensen, B., Christensen, M., Thim, L., y Fiil, N.P. 1988. *Rhizomucor michei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids* 23: 701-706.
12. Bowyer, P., De Lucas, J.R., y Turner, G. 1994. Regulation of the expression of the isocitrate lyase gene (*acuD*) of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 242: 484-489.
13. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
14. Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L. y Menge, U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343: 767-770.
15. Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J. y Timberlake, W.E. 1991. Chromosome specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 19(11): 3105-3109.
16. Cevallos, M.A., Navarro-Duque, C., Varela, J.M. y Alagón, A.C. 1992. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicol* 301(8): 925-930.

17. Chander, H., Batish, V.K., Sannabhadti, S.S., y Srinivasan, R.A. 1980. Factors affecting lipase production in *Aspergillus wentii*. *J Food Sci* 45: 598-600.
18. Charton, E., y Macrae, A.R. 1993. Specificities of immobilized *Geotrichum candidum* CMICC 335426 lipases A and B in hydrolysis and ester synthesis reactions in organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 15: 489-493.
19. Chihara-Siomi, M., Yoshikawa, K., Oshima-Hirayama, N., Yamamoto, K., Sobabe, Y., Nakatani, T., Nishioka, T., y Od, J. 1992. Purification, molecular cloning, and expression of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biochem Biophys* 296(2): 505-513.
20. Chopra, A.K., y Chander, H. 1983. Factors affecting lipase production in *Syncephalastrum racemosum*. *J Appl Bacteriol* 54: 163-169.
21. Contreras, R., Carréz, D., Kinghorn, J.R., van den Hondel, C.A.M.J.J. y Fiers, W. 1991. Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. *Bio Technology* 9: 378-381.
22. Clutterbuck, A.J. 1986. *Aspergillus nidulans*. en Genetic Maps: 325-337.
23. Dowzer, C.E.A. y Kelly, J.M. 1989. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr Technol* 15: 457-459.
24. Dowzer, C.E.A. y Kelly, J.M. 1991. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cel Biol* 11(11): 5701-5709.
25. Esper, B. y Høge-Jensen, I.B. 1988. European Patent application 0305216A1.
26. Espinosa, E. 1990. Mejoramiento de las condiciones de producción de lipasas de *Rhizopus delemar* destinada a la modificación de un sustrato lácteo. Tesis de Maestría en Biotecnología, UNAM, IIBM. 76 pp.
27. Fernández-García, E., Olano, A., Cabezedo, D., Marín-Alvarez, P.J., y Ramos, M. 1993. Accelerated ripening of Manchego type cheese by added commercial enzyme preparation from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb Technol* 158: 519-524.
28. Flavell, R.B., y Fincham, J.R.S. 1968. Acetate-nonutilizing mutants of *Neurospora crassa*. I. Mutant Isolation, Complementation Studies, and Linkage Relationships. *J Bacteriol* 95: 1056-1062.
29. Flavell, R.B., y Fincham, J.R.S. 1968. Acetate-nonutilizing mutants of *Neurospora crassa*. II. Biochemical Deficiencies and the Roles of Certain Enzymes. *J Bacteriol* 95: 1063-1068.
30. Gems, D.H., Johnstone, I., y Clutterbuck, A.J. 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98: 61-67.
31. Gilbert, E.J., Drozd, J.W. y Jones, C.W. 1991. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J Gen Microbiol* 137: 2215-2221.
32. Givskov, M., y Molin, S. 1992. Expression of extracellular phospholipase from *Serratia liquefaciens* is growth-phase-dependent, catabolite-repressed and regulated by anaerobiosis. *Mol Microbiol* 6(10): 1363-1374.
33. Grigorov, I., Aleksieva, P., Djerova, A., Sheremetska, P. y Tchobanov, G. 1983. Selection of gamma-ray mutants from a strain of *Humicola lutea* 72, producing acid proteases. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 17: 355-357.



34. Haas, M.J., Allen, J., y Berka, T.R. 1991. Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. *Gene* 109: 107-113.
35. Haas, M.J. y Bailey, D.G. 1993. Glycerol as carbon source for lipase production by the fungus *Rhizopus delemar*. *Food Biotech* 7(1): 49-73.
36. Harwood, J. 1989. The versatility of lipases for industrial uses. *TIBS* 14: 125-126.
37. Hata, Y., Matsura, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Sugihara, A., Iwai, M. y Tsujisaka, Y. 1979. Low resolution crystal structure of lipase from *Geotrichum candidum* (ATCC34614) *J Biochem* 86: 1821-1827.
38. Hobson, A.H., Buckley, C.M., Aamand, J. L., Jorgensen, S.T., Diderichsen, B., y McConnell, D.J. 1993. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc Natl Acad Sci* 90: 5682-5686.
39. Höfelmann, M., Hartmann, J., Zink, A. y Schreier, P. 1985. Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. *J Food Sci* 50: 1721-1725.
40. Huang, A.H.C. 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 177-200.
41. Høge-Jensen, B., Andreasen, F., Christensen, T., Christensen, M., Thim, L. y Boel, E. 1989. *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*. *Lipids* 24(9): 781.
42. Isobe, K., Akiba, T., y Yamaguchi, S. 1988. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agric Biol Chem* 52(1): 41-47.
43. Iwai, M. y Tsujisaka, Y. 1974. Interconversion of two lipases from *Rhizopus delemar*. *Agric Biol Chem* 38(6): 1249-1254.
44. Jorgensen, S., Skov, K.W., y Diderichsen, B. 1991. Cloning, sequence, and expression of a lipase from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J Bacteriol* 173(2): 559-567.
45. Kawasaki, L. 1991. Efecto de glucosa sobre la producción de lipasas en *Rhizopus delemar* en fermentación sumergida. Tesis para obtener grado de Bióloga. Facultad de Ciencias, UNAM.
46. Kilara, A. 1985. Enzyme modified lipid food ingredients. *Process Biochem* (abril): 35-44.
47. Kulmberg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J y Felenbok, B. 1993. Specific binding sites in the alcR and alcA promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 7(6): 847-857.
48. Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y. y Morita, Y. 1993. Preliminary investigation of crystals of lipase I from *Rhizopus niveus*. *J Mol Biol* 229(3): 785-786.
49. Kundu, M., Basu, J., Güchhait, M., y Chakravarti, P. 1987. Isolation and characterization of an extracellular lipase from the conidia of *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 133: 149-153.
50. Langrand, G., Rondot, N., Triantaphylides, L., y Baratti, J. 1990. Short chain flavour ester synthesis by microbial lipases. *Biotechnol Lett* 12(8): 581-586.
51. Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

52. MacRae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *JAOCs* 60(2): 291-294.
53. MacRae, A.R. y Hammond, R.C. 1985. Present and future applications of lipases. *Biotechnol. Genet. Eng Rev* 3: 193-217.
54. McCullough, W., Payton, M.A., Roberts, C.F. 1977. Carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*. en *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Smith, J.E. y Pateman, J.A. (eds.), Academic Press, U.K.: 97-129.
55. McCully, K.S. y Forebes, E. 1965. The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genet Res, Camb* 6: 352-359.
56. Midgley, M. 1993. Carnitine acetyltransferase is absent from *acuI* mutants of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* 108: 7-10.
57. Mojovic, L., Siler-Marinkovic, S., Kukic, G. y Vunjak-Novakovic, G. 1993. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to cocoa butter equivalent fat. *Enzyme Microb Technol* 15: 438-442.
58. Nahas, E. 1988. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J Gen Microbiol* 134: 227-233.
59. Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S. y Morikawa, H. 1988. Culture conditions for extracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *J Ferment Technol* 66(4): 4441-4448.
60. Nga, B.H., Heslot, H., Gaillardin, C.M., Fournier, P., Chan, K., Chan, Y.N., Lim, E.W., y Nai, P.c. 1988. Use of nystatin for selection of tributyrin non-utilising mutants in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* 7: 83-86.
61. Nga, B.H., Gaillardin, C.M., Fournier, P., y Heslot, H. 1989. Genetic analysis of lipase low-producing mutants of *Yarrowia lipolytica*. *J Gen Microbiol* 135: 2459-2443.
62. Olukoshi, E.R. y Packter, N.M. 1994. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* 140: 931-943.
63. Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T. y Minoda, Y. 1982. Purification and some properties of cell-bound-lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric Biol Chem* 46: 2885-2893.
64. Pal, N., Das, S., y Kundu, A.K. 1978. Influence of culture and nutritional conditions in the production of lipase by submerged culture of *Aspergillus niger*. *J Ferment Technol* 56(6): 593-598.
65. Pérez, C., Juárez, K., García-Castells, E., Soberón, G. y Servín-González, L. 1993. Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp M11. *Gene* 123: 109-114.
66. Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D., y Bulton, A.W.J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5: 141-238.
67. Pokorny, d., Friedrich, J. y cimernan, A. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* 16(4): 363-366.
68. Rúa, M.L., Diaz-Mauriño, T., Fernández, V.M., Otero, C., Ballesteros, A. 1993. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochem et Biophys Acta* 1156: 181-189.

69. Sakaguchi, K., Gomi, K., Takagi, M. y Horiuchi, H. 1992. Fungal enzymes used in oriental food and beverage industries. en *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. J.R. Kinghorn y G. Turner (eds): 75-81.
70. Sealy-Lewis, H.M.: 1994. A new selection method for isolating mutants defective in acetate utilization in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 25: 47-48.
71. Skromne, I., Sánchez, O., y Aguirre, J. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans briA* regulatory gene. *Microbiology* 141(1): 21-28.
72. Stamatis, H., Xenakis, A., Provelegiov, M., y Kolisis, F.N. 1993. Esterification reactions catalyzed by lipases in microemulsions: the role of enzyme localization in relation to its selectivity. *Biotechnol and Bioeng.* 42: 103-110.
73. Sugihara, A., Shimada, Y., y Tominaga, Y. 1990. Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. *J Biochem* 107: 426-430.
74. Upshall, A., Kumar, A.A., Bailey, M.C., Parker, M.D., Favreau, M.A., Lewison, K.P., Joseph, M.L., Maragonore, J.M. y McKnight, G.L. 1987. Secretion of active human tissue plasminogen activator from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Bio/technology* 5: 1301-1304.
75. van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. y van Gorcom, R.F.M. 1992. Production of extracellular proteins by the filamentous fungus *Aspergillus*. *A. van Leeuwenhoek* 61: 153-160.
76. Veeraragavan, K., Colpitts, T., y Gibbs, B.F. 1990. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochem et Biophys Acta* 1044: 26-33.
77. Vemett, T., Ziomek, E., Recktenwald, A., Schrag, J.D., de Montigny, C., Tessier, D.C., Thomas, D.Y., y Cygler, M. 1993. cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. *J Biol Chem* 268(35): 26212-26219.
78. Voet, D., y Voet, J.G. 1990. Biochemistry. John Wiley and sons, N.Y. 1223 pp.
79. Vordervulbecke, T., Kieslich, K., y Erdmann, H. 1992. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb Technol* 14: 631-639.
80. Yamaguchi, S., Mase, T. y Takeuchi, K. 1991. Cloning and structure of the mono- and diglyceride lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150. *Gene* 103: 61-67.
81. Ward, M., Wilson, L.J., Kodama, K.H., Rey, M.W. y Berka, R.M. 1990. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a glucoamylase-chymosin fusion. *Bio Technology* 8: 435-440.
82. Ward, M. 1991. *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. en *Modern Microbial Genetics* (Wiley-Liss, Inc): 455-496.
83. Weete, J.D. 1981. Lipids in fungal growth and reproduction. in *The Fungal Spore*. Turian, G. y Hohl, H.R. (eds) Academic Press, U.K. 463-485.