



03081
13
21

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**OBTENCION Y CARACTERIZACION DE HIBRIDOS
POR FUSION DE PROTOPLASTOS ENTRE CEPAS
DE *Aspergillus* PRODUCTORAS DE PECTINASAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
M. C. SARA ELENA SOLIS PEREIRA

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

JURADO

Presidente:	Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Primer vocal:	Dr. Carlos Huitrón Vargas
Segundo vocal:	Dr. Gustavo Viniestra González
Tercer vocal:	Dr. Luis Servín González
Secretario:	Dr. Jesús Aguirre Linares
Suplente:	Dra. Ma. Esperanza Martínez Romero
Suplente:	Dr. Edgardo Escamilla Marván

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Carlos Huitrón Vargas.

A mis padres

INDICE

	Página
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
OBJETIVO	21
RESULTADOS Y DISCUSION	27
"PROTOPLASTOS A PARTIR DE HONGOS PECTINOLITICOS : AISLAMIENTO, REGENERACION Y PRODUCCION DE PECTINASAS"	28
"MEJORAMIENTO EN LA PRODUCCION DE PECTINASAS POR HIBRIDOS INTERESPECIFICOS DE CEPAS DE <i>Aspergillus</i>"	35
"OBTENCION Y CARACTERIZACION DE SEGREGANTES INDUCIDOS POR LA <i>p</i>-FLUOROFENILALANINA EN HIBRIDOS INTERESPECIFICOS DE <i>Aspergillus</i>"	42
"PRODUCCION DE ENDOPECTINASAS POR HIBRIDOS INTRAESPECIFICOS DE <i>Aspergillus</i> sp. CH-Y-1043 OBTENIDOS POR FUSION DE PROTOPLASTOS"	51
DISCUSION GENERAL	59

I. RESUMEN

Las pectinasas microbianas son un grupo de enzimas que degradan las sustancias pécticas y tienen un papel importante en la industria alimentaria, principalmente en los procesos de extracción y clarificación de jugos de frutas. Las preparaciones comerciales de enzimas pectinolíticas usadas en los procesos de alimentos son de origen fúngico, particularmente del género *Aspergillus*. Nosotros hemos aislado la cepa pectinolítica *Aspergillus sp.* CH-Y-1043, que produce un sistema pectinolítico formado al menos por cuatro actividades pectinolíticas extracelulares: endopectinasa, exopectinas, pectina liasa y pectina esterasa cuando crece en pectina y desechos agroindustriales que la contienen. Esta cepa ha mostrado un potencial para la producción de estas enzimas en mayor escala, por lo que consideramos importante llevar a cabo el mejoramiento genético. La fusión de protoplastos, involucra múltiples eventos de entrecruzamiento entre largas regiones del genoma de las cepas fusionadas, dando lugar a la obtención de cepas recombinantes, lo cual es una ventaja digna de tomarse en consideración para llevar a cabo el mejoramiento de cepas productoras de sistemas multienzimáticos. Considerando el potencial del mejoramiento de cepas por fusión de protoplastos, decidimos llevar a cabo la fusión interespecie de *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 con *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 y la fusión intraespecie de *Aspergillus sp.* CH-Y-1043, para obtener híbridos mejorados en su capacidad de producir pectinasas.

En primer lugar, se obtuvieron cepas mutantes auxotróficas de cada especie, para poder identificar los híbridos después de la fusión de protoplastos. Las cepas auxotróficas obtenidas mostraron ser estables y no se afectó su capacidad para producir pectinasas con respecto a las cepas progenitoras. Se determinaron las condiciones de obtención de protoplastos, en cuanto al tipo de enzimas líticas, estabilizador osmótico y tiempos de incubación. Se establecieron condiciones diferentes entre las cepas, ya que las enzimas líticas comerciales de *Trichoderma harzanium* que contienen principalmente quitinasas, fueron las más eficientes para obtener protoplastos de *Aspergillus sp.* A13 ade⁻, mientras que la mezcla de enzimas del hongo celulolítico *Aureobasidium sp.* CH-M-1010 y las de *T. harzanium* fueron las más eficientes para obtener protoplastos de *A. flavipes* F7 lia⁻. También se observaron diferencias entre las cepas con respecto a la regeneración de los protoplastos. La mayor frecuencia de regeneración de *Aspergillus sp.* se obtuvo con KCl (83%), mientras que en *A. flavipes*, el sorbitol fue el estabilizador osmótico en donde se obtuvo el mayor porcentaje de regeneración. La producción de pectinasas tampoco se afectó por la formación y regeneración de protoplastos en ambas cepas.

Se seleccionaron cuatro híbridos interespecie después de la fusión de protoplastos en presencia de polietilenglicol, los cuales mostraron un incremento en la producción de endopectinasas de 130% (HH, HE, HF) y 150% (HJ). La producción de pectina liasas también se incrementó en los híbridos HE y HJ (211-220%) a las 48 h del cultivo y a las 72h, HJ, HE, HF y HH mostraron incrementos de 155, 138, 118, y 119% respectivamente, en relación a *Aspergillus sp. CH-Y-1043*. Debido a que los híbridos seleccionados mostraron ser inestables, se indujo la haploidización con *p*-fluorofenilalanina (PFA) para obtener cepas estables mejoradas en la producción de pectinasas. Se obtuvieron cepas que presentaron características que han sido descritas para heterocariones y cepas diploides. Las cepas tratadas con PFA dieron lugar a la aparición de cepas segregantes, de las cuales se seleccionaron tres cepas denominadas HP, HL, HV, las cuales mostraron un incremento en la producción de endopectinasas a 29°C y 37°C y el segregante HB que incrementó la producción de estas enzimas únicamente a 37°C. La producción de pectina liasas en el segregante HZ se incrementó 450% a 37°C y 275% a 29°C. Estas cepas se han mantenido estables durante muchas resiembras y no muestran capacidad de segregación cuando se crecen nuevamente en PFA. También se obtuvieron híbridos intraespecie de *Aspergillus sp. CH-Y-1043*, entre los cuales el híbrido H15 aumentó 190% la producción de endopectinasas.

El incremento en la producción de pectinasas observado en las cepas seleccionadas se debió en parte a un mayor crecimiento, aunque los incrementos en la actividad específica sugieren que otros factores tales como una mayor inducción o secreción, entre otros, pudieran estar involucrados. Estos resultados muestran que la fusión de protoplastos es una herramienta importante para el mejoramiento de cepas de hongos productoras de pectinasas.

II. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES MEDIATOS

Las sustancias pécticas son un grupo de polisacáridos que junto con la celulosa y la hemicelulosa son los compuestos más abundantes producidos por las plantas. Las sustancias pécticas se encuentran localizadas en la lamela media de las células vegetales por lo que están involucradas en la adhesión celular y contribuyen a dar estructura y firmeza a los tejidos vegetales. En la industria son aplicadas para la elaboración de mermeladas, jamones y también son utilizadas como aditivos en los fármacos por su acción detoxificante, hemostática, antifibrinolítica y como lubricante intestinal (Fogarty y Kelly, 1983 ; Van Buren, 1991). Las sustancias pécticas están constituidas por una cadena lineal de moléculas de ácido galacturónico unidas por enlaces $\alpha,1-4$, en donde los grupos carboxilo pueden estar parcial o totalmente esterificados con metanol. Cuando el grado de metoxilación de los grupos carboxilo es mayor del 50% se denominan pectinas altamente metoxiladas y si éste es menor del 50% se llaman pectinas de bajo contenido de metoxilos. Cuando menos del 10 % de grupos carboxilos son metoxilados se denomina ácido poligalacturónico o ácido péctico (Voragen et al. 1995). Dentro de las sustancias pécticas ha sido identificada la presencia de regiones no sustituidas que contienen exclusivamente unidades de ácido galacturónico metoxilado o no metoxilado, las cuales son más susceptibles a la acción pectinolítica y de regiones altamente sustituidas ("hairy") que son más difíciles de degradar por las pectinases. La L-ramnosa es el sustituyente más abundante de las sustancias pécticas, que se encuentra en un 2-4 % y está unida a las moléculas del galacturonato por enlaces $\alpha,1-2$. Las ramnosas unidas a la cadena principal de las sustancias pécticas constituyen los ramnogalacturonanos que varían en tamaño y composición, en donde han sido identificados azúcares neutros como la L-arabinosa, D-galactosa, D-xilosa y L-fucosa (Voragen et al. 1995, Pilnik y Voragen, 1993).

A un grupo complejo de enzimas que degradan las sustancias pécticas, se les denominan pectinasas. Estas enzimas son importantes desde el punto de vista biológico ya que intervienen en el ciclo del carbono, en la patogénesis de plantas en donde actúan como factores de virulencia (Collmer y Keen, 1988) y en los procesos de maduración y descomposición de frutas y vegetales (Van Buren, 1991). La aplicación práctica más importante de las pectinasas es en la industria alimentaria para la extracción y clarificación de jugos y en la elaboración de vinos (Voragen, 1989).

Las pectinasas se dividen en dos grupos, las pectinesterasas y las despolimerasas. Las pectinesterasas (PE) actúan removiendo los grupos metoxilo presentes en el carboxilo del ácido galacturónico, dando como producto final el ácido poligalacturónico y metanol (Fig. 1a). Las despolimerasas rompen los enlaces α ,1-4 de la cadena principal actuando en dos formas: por hidrólisis incorporando una molécula de agua a la pectina (polimetilgalacturonasas, PMG) (Fig. 1b) y al ácido poligalacturónico (poligalacturonasas PG) y por β -eliminación formando un doble enlace entre los átomos de carbono 4 y 5 de la molécula del galacturonato en la pectina (polimetilgalacturonato liasas, PMGL) (Fig. 1c) y el ácido poligalacturónico (poligalacturonato liasas PGL). Estas enzimas se clasifican asimismo de acuerdo a su sitio de acción, cuando actúan sobre el extremo no reductor de la molécula se denominan de tipo "exo" y cuando actúan aleatoriamente dentro de la molécula polimérica se denominan de tipo "endo". Otras enzimas que participan en la degradación de las sustancias pécticas son las oligogalacturonasas (OG) y las oligogalacturonato liasas (OGL) que actúan sobre dímeros y oligómeros. Todas estas enzimas forman entonces un complejo sistema multienzimático pectinolítico. Existen otras enzimas accesorias que actúan sobre las sustancias pécticas favoreciendo la acción de las pectinasas. Schols et al. reportaron en 1990 la identificación de una ramnogalacturonasa, que no es activa sobre el ácido poligalacturónico pero es capaz de degradar las regiones "hairy" dando lugar a tetrámeros de ácido galacturónico con ramnosa en el extremo no reductor.

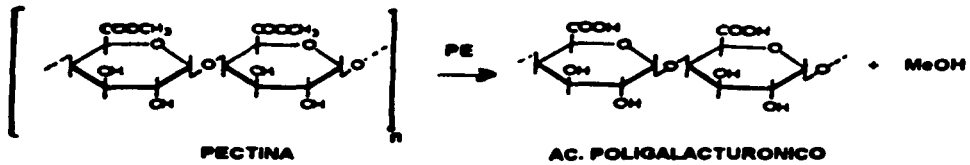


Fig. 1 a. Modo de acción de las Pectina Esterasas

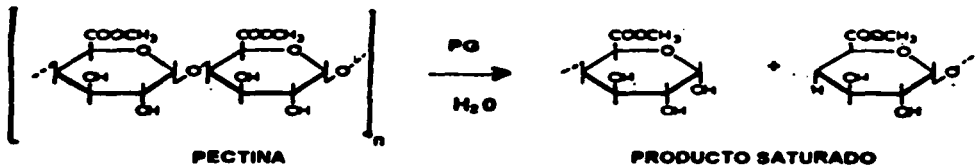


Fig. 1 b Modo de acción de las Poligalacturonasas

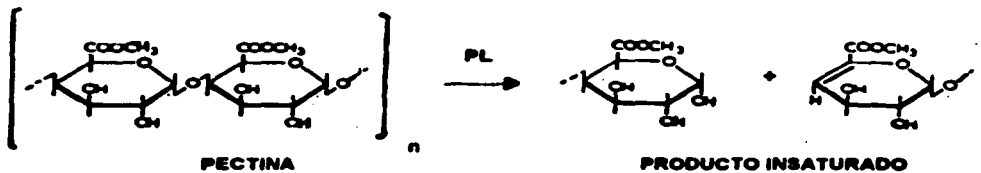


Fig. 1 c. Modo de acción de las Pectina liasas

Las pectinasas son generalmente enzimas extracelulares e inducibles, lo que hace necesaria la adición de pectina o de algún sustrato que la contenga para estimular su biosíntesis. Algunas de estas enzimas pueden ser producidas constitutivamente y también algunas son sensibles a represión catabólica (Aguilar y Huitrón, 1990; Maldonado et al., 1989).

Las pectinasas son producidas por una gran variedad de organismos como las bacterias, levaduras, hongos y plantas (Pilnik y Rombouts, 1981), sin embargo no existe un organismo en la naturaleza capaz de producir todas las actividades pectinolíticas que se han reportado. Los hongos filamentosos son los organismos más empleados, debido a que sus enzimas son extracelulares y debido a que producen principalmente endopoligalacturonasas que son las que tienen mayor aplicación en la industria por su capacidad de facilitar la precipitación de las sustancias pécticas y de disminuir la viscosidad de los jugos de frutas. La producción comercial de pectinasas se lleva a cabo esencialmente con especies del género *Aspergillus*, siendo *Aspergillus niger* uno de los organismos más utilizados por su elevada producción de endopoligalacturonasas, además de que produce otras actividades que favorecen una mayor degradación de la pectina (Whitaker, 1990).

Es necesario enfatizar que la pectina presente en la naturaleza contiene regiones de ácido poligalacturónico no metoxilado, por lo cual requiere tanto de la acción de las poligalacturonasas como de las polimetilgalacturonasas para su degradación.

Posteriormente a la acción de las pectinasas extracelulares sobre las sustancias pécticas, los productos de su degradación son metabolizados en el interior de la célula. La ruta del metabolismo del galacturonato ha sido esclarecida únicamente en la bacteria *Erwinia chrysanthemi* (Figura 2), en donde los ácidos mono y digalacturónico saturados e insaturados atraviesan la pared celular por medio de dos sistemas de transporte: el del aldohexuronato (*axu7*)

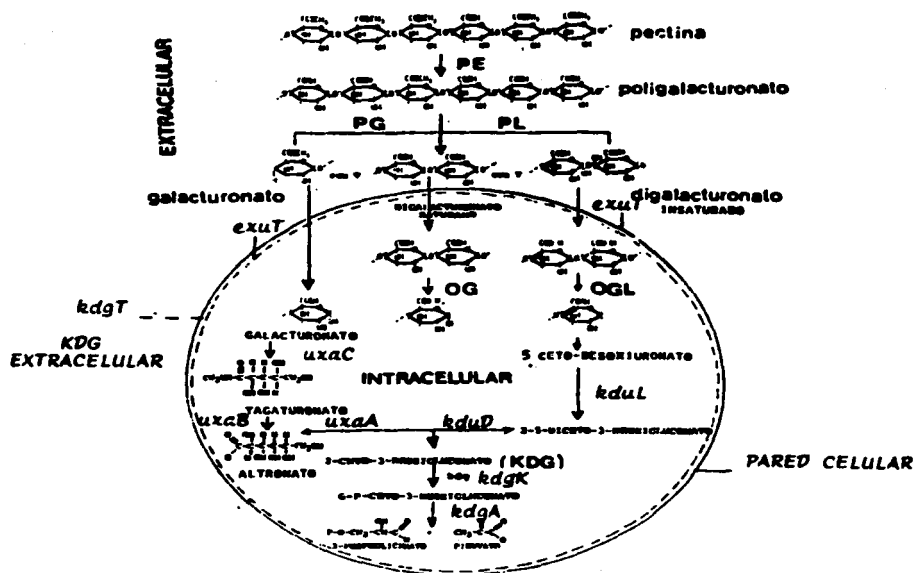


Figura 2. Ruta degradativa de la pectina y el ácido poligalacturónico en *Erwinia chrysanthemi*. Los pasos son catalizados por las enzimas: PE, pectina esterasa; PL, pectina liasa (5 genes, *pel* A-E); PG, poligalacturonasa; OG, oligogalacturonasa; OGL, oligogalacturonasa-liasa; *kduL*, 5-ceto-4-deoxiuronato isomerasa; *kduD*, KDG reductasa; *uxaC*, uronato isomerasa; *uxaB*, altronato oxido-reductasa; *uxaA*, altronato hidrolasa; *kdgK*, KDG cinasa; *kdgA*, 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogliconato aldolasa. Los sistemas de transporte de azúcares al interior de la célula son *exuT*, para el transporte de aldohexuronato y *kdgT*, para el transporte de KDG.

y del 2-ceto-3-deoxigluconato (*AdgT*). Las oligogalacturonasas intracelulares actúan sobre los dímeros para generar monómeros que son metabolizados por vías diferentes que convergen en el 2-ceto-3-deoxigluconato (KDG) y los productos finales de estas vías son el piruvato y el 3-fosfogliceraldehido (Hugouvieux-Cotte-Pattat y Robert-Badouy, 1987).

Aunque la ruta degradativa del galacturonato no ha sido establecida en hongos, algunos estudios realizados en *Aspergillus nidulans* indican que el galacturonato es catabolizado por una ruta no fosforilativa que da lugar al D-gliceraldehido y piruvato, pero no existen evidencias bioquímicas de la existencia de la misma ruta que se presenta en *Erwinia chrysanthemi* (Uitzetter et al. 1986 y Visser et al., 1988).

El avance en el estudio del sistema multienzimático pectinolítico ha sido lento, aunque en los últimos años se ha logrado un mayor conocimiento a nivel fisiológico y molecular de algunas de las enzimas que lo componen, principalmente en *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* y *Aspergillus niger*. Sin embargo aún faltan muchos estudios en éstos y en otros organismos que permitan un mayor entendimiento de los mecanismos de acción concertada, de los mecanismos regulatorios y de genética molecular que puedan conducir no solo al mejor conocimiento de este sistema multienzimático, sino que también permitan el planteamiento de nuevas estrategias de mejoramiento de cepas para lograr una mayor o mejor aplicación práctica.

La caracterización cinética de los componentes individuales del sistema pectinolítico presentes en los extractos crudos producidos por los microorganismos ha sido difícil, debido a que estas enzimas pueden actuar generando sustratos que son utilizados por las otras enzimas del mismo sistema pectinolítico y porque actualmente no están disponibles los sustratos para medir en forma individual a todas las actividades. Por otro lado, muchas de las pectinasas han sido difíciles de separar y purificar debido a que tienen diferente localización celular y propiedades muy

parecidas. De hecho, la presencia de una sola actividad enzimática no excluye la posibilidad de que más de una especie molecular esté presente. En este sentido, la multiplicidad de las pectinasas ha sido identificada por diferencias en los puntos isoelectrónicos de las pectina liasas producidas por *Erwinia chrysanthemi* (Ried y Collmer, 1985) y de las endopoligalacturonasas I y II de *Botrytis cinerea* (Johnston y Williamson, 1992). La multiplicidad también ha sido demostrada genéticamente y ha sido estudiada para obtener información acerca de la estructura de los genes que codifican para las pectinasas y estudiar la regulación de estos genes (Keen, N.T. y Tamaki, S. 1988; Kester, H.C.M. y Visser, J. 1990)

Los casos mejor estudiados de formas múltiples de pectinasas a nivel molecular, son el de las pectina liasas producidas por *Erwinia chrysanthemi*, las cuales son codificadas por diferentes genes que se agrupan en racimos (clusters), uno de éstos constituye la familia *pel BC* y el otro la familia *pel ADE* en donde cada gene *pel* de estas familias es transcrito individualmente (Tamaki et al. 1988). También en *Aspergillus niger* ha sido demostrado que la multiplicidad de las pectina liasas es debida a la presencia de una familia de genes denominados *pel A*, *pel B*, *pel C*, *pel D* y *pel E* que fueron aislados a partir de la hibridación heteróloga del gene *pel D* con la biblioteca genómica de *A. niger* (Harmsen et al. 1990; Kusters van Sommeren et al. 1992). Hasta el momento no se sabe el por qué de la existencia de varias enzimas similares en un solo organismo, algunos investigadores han especulado que la multiplicidad le confiere una mayor capacidad de adaptación al medio ambiente, que se refleja en una mayor probabilidad de sobrevivencia. El avance en el estudio de la multiplicidad de las pectinasas, podrá conducir a un mayor entendimiento del papel de estas enzimas en el proceso complejo de la degradación de la pectina. En la **Tabla 1** se presentan ejemplos de las actividades pectinolíticas que se presentan en algunos hongos.

Tabla 1. pectinasas producidas por hongos filamentosos.

Fuente	PE	PG	PL	endo-PG	endo-PM	exo-P
<i>Aspergillus niger</i>	39,000	42,000	42,000	54,000		
	49,000	49,000	54,000			
		32,000				
<i>Aspergillus sojae</i>				33,100	32,000	
<i>Aspergillus japonicus</i>				35,500	32,000	
<i>Sclerotium rolfsii</i>		28,000	24,000	46,000		
		31,000				48,000
<i>Corticarium rolfsii</i>	37,000			37,000		
				37,000		
<i>Botrytis cinerea</i>				36,000		
				36,000		
<i>Alternaria mali</i>						32,400
						42,100

Los fenómenos regulatorios asociados a la producción de pectinasas han sido estudiados más en bacterias que en hongos. Muchos de estos estudios fueron realizados adicionando compuestos al medio de cultivo para interpretar su efecto en la regulación, a través del incremento, la disminución o la desaparición de la actividad pectinolítica (Aguilar y Huitrón, 1987; Maldonado et al. 1989). De esta manera fue establecido que la mayoría de las enzimas pectinolíticas son inducidas por pectina, pectato o los productos de su degradación, sin embargo el verdadero inductor aún no se conoce. Phaff (1947) sugirió que el D-galactarato (ácido múcico), es el inductor directo de la síntesis de las pectinesterasas y poligalacturonasas de *Penicillium chrysogenum*. La pectina y el ácido galacturónico indujeron en forma diferencial la síntesis de pectinasas de *Fusarium roseum* (Parley y Page, 1971). Las endopolimetilgalacturonasas de

Aspergillus sp. CH-Y-1043 fueron inducidas por el ácido galacturónico (Aguilar y Huitrón, 1987). Las poligalacturonasas y pectinesterasas de *Aspergillus niger* son sensibles a represión catabólica por glucosa (Shinmyo et al. 1978; Maldonado et al. 1989). La síntesis de pectina liasa en *Fusarium* y *Verticillium* es también inducible por pectina y reprimida por azúcares reductores (Holz y Knox-Davies, 1986; Carder et al., 1989).

La tecnología de DNA recombinante ha sido poco aplicada en el estudio de sistemas multienzimáticos como el pectinolítico en hongos filamentosos. De hecho han sido clonados pocos genes de enzimas pectinolíticas. Sin embargo, la caracterización a nivel molecular de estos genes individuales en algunos microorganismos ha permitido obtener información más precisa de la regulación de la síntesis de enzimas pectinolíticas. En *Aspergillus nidulans* se demostró la represión catabólica de la pectato liasa, cuando los RNA mensajeros (RNAm) no fueron transcritos por efecto de la adición de la glucosa al medio con pectina (Dean y Timberlake, 1989). Debido a que el gene *creA* ha demostrado participar en la regulación por carbono en *Aspergillus nidulans*, en este mismo estudio, se expresó el gene de la pectato liasa en una cepa *creA* y también se presentó la represión catabólica por glucosa, lo cual sugiere que el gene *creA* no está involucrado en la represión que se presenta en esta cepa. La expresión del gene que codifica para la pectina liasa A de *Aspergillus niger* demostró que este gene es regulado a nivel de transcripción con una alta acumulación de RNAm cuando crecen en un medio con pectina y es sensible a represión catabólica por glucosa (Harmsen et al., 1990). La introducción de múltiples copias del gene *peIA* de *Aspergillus niger* en *Aspergillus nidulans* permitió la producción constitutiva de la pectina liasa A en las transformantes que fueron capaces de producir la enzima en ausencia del inductor (Kusters van Someren et al., 1991).

La caracterización de genes pectinolíticos clonados en los microorganismos, también ha permitido un acercamiento al conocimiento de la estructura molecular. Las secuencias de nucleótidos y el análisis de aminoácidos en pectina liasas han mostrado la existencia de regiones

homólogas a través del alineamiento de las secuencias en *Erwinia carotovora* y *A. niger* (Gysler, 1990). La identificación de estas regiones conservadas junto con las modificaciones químicas descritas por van der Honderhoven (1975), han sugerido que dos residuos de aspartato en las posiciones 174 y 187 están involucradas en catálisis o enlace al sustrato (Kusters van Someren et al., 1992). El alineamiento de las secuencias de nucleótidos de las pectina esterases de *Aspergillus niger*, del tomate y del frijol, reveló la presencia de un solo residuo de histidina en una región conservada de las diferentes especies. El reemplazamiento del residuo histidina 137 por alanina a través mutagénesis dirigida, causó pérdida total en la actividad de la pectina esterasa de *A. niger*, lo cual indica que este residuo está localizado probablemente en el sitio activo (Duwe y Khanh, 1996). Existen solo dos reportes con datos preliminares de cristalografía de rayos X de las pectininas de *Erwinia* (Kim et al. 1989; Yoder et al., 1990). Estos estudios, así como los de modificación química, podrían ser de gran ayuda para esclarecer el papel de las secuencias conservadas y la relación estructura función de las pectininas.

Un objetivo importante en los organismos productores de compuestos de interés industrial es el mejoramiento genético de las cepas. Esta actividad ha estado dirigida principalmente a obtener cepas modificadas que incrementen los rendimientos del producto para reducir o mantener los costos del proceso. Aunque los mecanismos bioquímicos y genéticos que controlan la expresión de la síntesis de los productos usualmente son poco conocidos, la experiencia ha mostrado que el mejoramiento de cepas puede ser logrado aún en ausencia de un conocimiento detallado de dichos mecanismos. Un buen ejemplo de mejoramiento es el logrado en *Penicillium chrysogenum* en donde se incrementó hasta 500 veces la producción de penicilina con respecto a la cepa silvestre (Rowlands, 1984).

El mejoramiento de cepas también puede ser aplicado para modificar características específicas como la morfología p. ej. a través de mutagénesis y selección se han obtenido cepas a partir de hongos filamentosos que al perder su capacidad de formar pellets mejoraron el mezclado y la transferencia de oxígeno durante la fermentación (Gbewonyok y Wang, 1983).

También se puede evitar la contaminación del medio de cultivo por medio del uso de antibióticos y de cepas productoras resistentes a estos agentes. Por ejemplo, la cepa industrial *Streptomyces roseochromogenes* ATCC13406 se modificó para tener resistencia a la estreptomycin. Esta mutante ha sido utilizada para la biotransformación de esteroides a gran escala en presencia del antibiótico, para prevenir la contaminación bacteriana (Mazza et al., 1982). Estos estudios indican que la inclusión de estas propiedades en los organismos, también pueden representar un beneficio económico en el proceso.

La modificación o mejoramiento de las cepas ha sido realizada en gran parte utilizando el método tradicional de mutagénesis mediante el empleo de agentes físicos y químicos, como lo son entre otros, la nitrosoguanidina (NTG) y el metil etano sulfonato (MES) que se enlazan en diversos sitios del DNA, transfiriendo un grupo alquilo, causando transiciones (cambio de una purina por otra o de una pirimidina por otra) y transversiones (cambio de una purina por una pirimidina) (Eder et al, 1989; Brookes, 1990); el ácido nitroso (AN) causa desaminaciones oxidativas en la adenina, citosina y guanina que dan lugar a la hipoxantina, uracilo y xantina respectivamente (Schuster, 1960) y la luz ultravioleta (UV) provoca dimerizaciones entre pirimidinas adyacentes o de las pirimidinas que se encuentran entre cadenas complementarias causando entrecruzamiento (Glickman et al. 1996). La aplicación de un programa de mejoramiento genético en el hongo celulolítico *Penicillium pinophilum* 87160III, permitió seleccionar durante tratamientos sucesivos de mutagénesis con U.V. y NTG a la mutante NTGIII/6 que incrementó 5.0 veces la actividad de carboximetilcelulasa, 2.0 veces la actividad de xilanasas, 2.0 veces la actividad de β -glucosidasas y 3.0 veces la actividad en papel filtro con respecto a la cepa progenitora (Brown et al. 1987). Fue determinado también en este estudio, que las mutantes incrementaron la proteína extracelular y la actividad específica. La razón del incremento de varias enzimas por la acción de la NTG y la luz U.V. no fueron estudiadas, sin embargo, los autores atribuyeron este efecto a la mutación en genes que controlan la síntesis de varias enzimas.

En el sistema pectinolítico, hay poca información de trabajos sobre mejoramiento genético. Algunos estudios realizados con éxito han sido reportados por Sajer (1974), quien llevó a cabo la mutagénesis de *Penicillium* sp. 74/B con ultravioleta y etilenoimina y obtuvo mutantes hiperproductoras que incrementaron de 2-3 veces la producción de poligalacturonas al ser crecidas en pectina, aunque la producción de pectinesterasas fue disminuida. También han sido obtenidas mutantes insensibles a represión catabólica por glucosa en *Aspergillus niger* que incrementaron 3.8 veces la producción de endopectinasas en pectina (Antier et al. 1993) y las mutantes insensibles a la represión catabólica por glicerol de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 que produjeron mayor actividad de endopectinasas cuando crecieron en cáscara de limón pero no en pectina (Solís, et al. 1990).

La recombinación genética también ha sido empleada como un medio para lograr el mejoramiento de cepas (Stahl y Esser, 1993; Anné, 1993). Existen varios métodos de recombinación natural como la conjugación y transducción que se presentan en bacterias y la heterocariosis y el ciclo sexual que se presenta en los hongos filamentosos. Aunque todos estos procedimientos pueden ser aplicados en el contexto de mejoramiento de cepas, los sistemas más ampliamente estudiados en la transferencia de genes con el fin del mejoramiento genético son la tecnología de DNA recombinante, la fusión de protoplastos y el método parasexual (en hongos). (Peberdy, 1989)

La tecnología de DNA recombinante, ha permitido el mejoramiento de cepas mediante la manipulación de genes específicos y puede ser aplicada para aumentar la dosis génica, alterar el grado de expresión y llevar a cabo la mutagénesis de genes específicos. En *Aspergillus nidulans* se logró construir cepas sobreproductoras de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GDP), entre las cuales, la transformante A1 incrementó nueve veces la actividad GDP con respecto a la cepa silvestre y el incremento fue proporcional al número de copias estimado en la transformante (Henegraaf et al., 1991). Otros ejemplos importantes son la

expresión de lactoferrina humana en una transformante de *Aspergillus oryzae* que es capaz de secretarla al medio de cultivo como una proteína biológicamente activa (Ward et al., 1992) y la expresión y secreción de quimosina por una transformante de *Trichoderma reesei* (Harkki et al., 1989). En relación a sistemas enzimáticos complejos, a través de esta metodología solo se han clonado genes individuales de sus componentes enzimáticos. Se han logrado incrementar algunas de las actividades enzimáticas presentes en el sistema celulolítico, por ejemplo, el mejoramiento en la producción de la endoglucanasa EGI por una transformante de *T. reesei* obtenida a través de la introducción de un plásmido que contenía cDNA del gene *egl1* insertado en un cassette de expresión entre el promotor y las secuencias terminadoras del gene celobiohidrolasa I (*cbh1*) (Uusitalo et al. 1991).

Hasta donde sabemos, por ingeniería genética no se ha logrado el mejoramiento de todos los componentes de ningún sistema multienzimático. En el caso del sistema multienzimático pectinolítico, los estudios de clonación, han sido realizados principalmente por el interés de identificar los genes presentes en los organismos a fin de comparar la estructura, organización y regulación de estos genes (Harmsen et al. 1990; Gysler et al. 1990). Aunque estos resultados son muy importantes por el conocimiento que han generado, aún no son suficientes para tener un impacto en la práctica. Un ejemplo importante en el mejoramiento de cepas a través de este sistema, es el reportado por Bussink (1992), quien obtuvo cotransformantes de un gene pectinolítico, el de la *Aspergillus niger pyr A* con múltiples copias del gene poligalacturonasa (*pgal1*). La producción de esta enzima fue determinada en pulpa de remolacha, en donde la transformante T37 produjo una actividad PG medida por grupos reductores 50 veces mayor que el control *A. niger* N462.

Otra forma de llevar a cabo la recombinación genética es por el método parasexual a través de la anastomosis de las hifas de hongos filamentosos, ya que también tiene un potencial para llevar a cabo el mejoramiento de cepas en donde no se presenta el ciclo sexual (Stahl y

Esser, 1993). El ciclo parasexual en hongos ha sido bien estudiado en *Aspergillus nidulans* (Pontecorvo, 1953) y las principales etapas se presentan en la Figura 3. El primer paso es la fusión de hifas de dos individuos haploides (n) para dar lugar al heterocarión, en donde los núcleos de ambas cepas comparten el mismo citoplasma. El micelio heterocariótico es identificado en el medio mínimo que carece del marcador presente en cada individuo. En esta situación, solo las hifas que contienen ambos núcleos pueden crecer en dicho medio. Posteriormente ocurre la cariogamia, en donde se fusionan los núcleos presentes en el heterocarión, para dar lugar al diploide somático

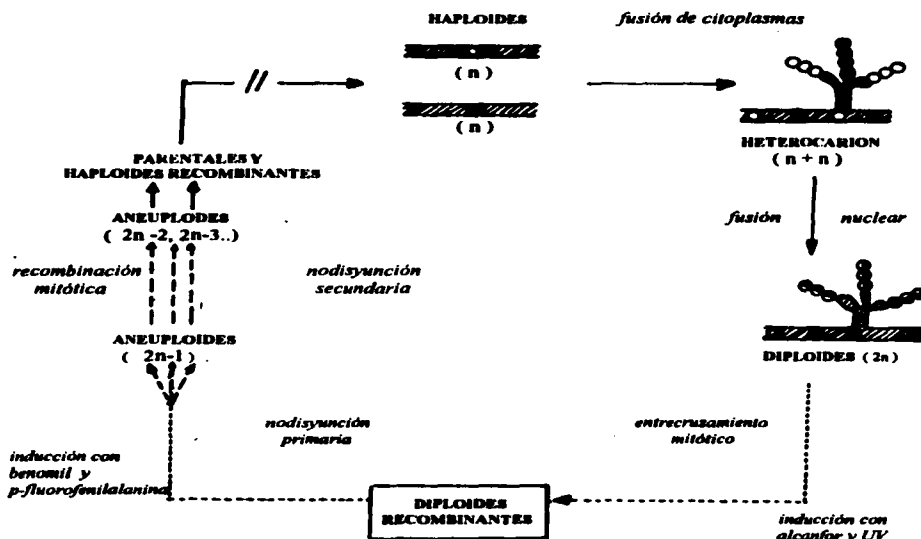


Figura 3. Esquema del ciclo parasexual que se presenta en *Aspergillus nidulans*
 (—) núcleos haploides n ; (— —) núcleos diploides $2n$; (- - -) núcleos aneuploides

(2n) que contiene el grupo de cromosomas completo de cada genotipo progenitor. Debido a que las fusiones nucleares para formar el diploide ocurren con bajas frecuencias, son utilizados ciertos agentes como el alcanfor y la luz ultravioleta que incrementan la formación del heterocigoto diploide (Caten, 1981). En esta etapa, puede ocurrir la recombinación genética a través del entrecruzamiento mitótico entre los cromosomas homólogos presentes en el diploide. Este evento involucra el intercambio recíproco entre cromátidas no hermanas, posteriormente los centrómeros se dividen y separan dando como resultado que una cromátida recombinante y una no recombinante pasen a cada polo. Para llegar al estado haploide, que es la condición más estable, el diploide pierde gradualmente cromosomas como un resultado de la nodisunción, en donde la nodisunción primaria da lugar a la formación de aneuploides (2n-1) y la no disyunción secundaria, involucra la pérdida de otros cromosomas que generan diferentes tipos de aneuploides 2n-2, 2n-3, etc. hasta alcanzar el nivel haploide (n). Este proceso puede ser acelerado utilizando agentes como la *p*-fluorofenilalanina, que es el análogo del aminoácido correspondiente y el fungicida benzimidazol llamado también benomil, que actúan sobre la subunidad β de la tubulina inhibiendo el ensamblaje de microtúbulos y causando pérdida de cromosomas al azar (Caten, 1981).

Aunque la cruce parasexual ha sido más aplicada para llevar a cabo estudios básicos (Furlaneto y Pizzirani-Kleiner, 1992), también ha sido utilizada con el objeto de mejorar la producción de amilasas, proteasas y lipasas en *Aspergillus nidulans* (Moscoso y Rosato, 1987), sin embargo, en este caso los híbridos no lograron incrementar la producción de enzimas. Un inconveniente importante en este procedimiento, es la incompatibilidad vegetativa que puede presentarse entre las cepas, la cual impide la formación del heterocarión (Hocart et al., 1993).

Otra alternativa para el mejoramiento de cepas es la fusión de protoplastos. La obtención de híbridos por fusión de protoplastos es un sistema que ha demostrado ser útil para realizar diferentes tipos de estudios con microorganismos y células vegetales, principalmente para lograr

recombinaciones genéticas intraespecie, interespecie e intergenéricas (Peberdy, 1989, 1991). Mediante la fusión de protoplastos se aumenta la probabilidad de recombinación de grandes segmentos de DNA de un organismo a otro (Peberdy, 1979). Es decir, se puede recombinar información genética que de otra forma no podría ocurrir en la naturaleza. Este sistema permite superar los problemas de incompatibilidad vegetativa que pudieran presentarse entre los hongos (Wagemann-Budde y Schauz, 1991) y las barreras biológicas que existen entre diferentes géneros y especies de plantas.

Para poder llevar a cabo los estudios de fusión es necesaria la obtención de protoplastos que son células desprovistas de pared por la acción de las enzimas líticas (Anné, 1993). Los protoplastos representan entidades organizadas con un metabolismo activo y transferencia de energía (Davis, 1985), por lo que ofrecen un modelo interesante para llevar a cabo estudios bioquímicos y morfológicos en los hongos. En estos organismos las poblaciones de protoplastos pueden ser heterogéneas con respecto a los organelos que contienen y son capaces de regenerar a células normales cuando se encuentran en los medios adecuados (Bos, 1985).

Ha sido observado que aún la sola formación y regeneración de protoplastos puede dar lugar a modificaciones en las cepas, como en el hongo *Robillarde sp.* en dónde se incrementó en una de las cepas regeneradas, 8 veces la producción de exoglucanasa, 20 veces la β -glucosidasa, 4 veces la xilanasas y 5 veces la amilasa, con incrementos en la producción de biomasa y también de la actividad específica (Kuwabara, 1989). También se obtuvo entre los protoplastos regenerados de *T. reesei* una cepa que incrementó 2.0 veces la producción de β -glucosidasas (Kolar et al., 1985).

Por la capacidad de regeneración de los protoplastos, también su obtención ha sido aplicada en la identificación bioquímica de los componentes de la pared celular de *Schizopharium commune*, (Sentandrew, 1983). Los protoplastos también son utilizados para introducir proteínas vía liposomas en *Hansenula polymorpha* (Duoma et al., 1990) y para estudiar las transmisiones

de virus entre hongos, de esta manera se demostró que los virus pueden ser transmitidos de una especie a otra en *Aspergillus* (Liang-Pingyan y Chen Kaiying, 1987)

La fusión de protoplastos es aplicada en estudios genéticos básicos. En *Aspergillus nidulans* se realizó la fusión de protoplastos entre cepas que presentaron incompatibilidad vegetativa, que es controlada por genes nucleares denominados *het*, a fin investigar su número y localización en los híbridos (Dales y Croft, 1990). La dominancia de las relaciones virulencia/avirulencia en híbridos intraespecie del hongo patógeno de plantas ha sido estudiada en el hongo *Fusaria fulva* (Talbot et al., 1985) y también se ha realizado el mapeo genético a través de la fusión interespecie de plantas del género *Nicotiana* (Medgyesy et al., 1985).

La aplicación práctica más importante de la fusión de protoplastos es el mejoramiento genético de cepas (Peberdy, 1991; Didek-Brumec et al., 1993). Llama la atención, un híbrido obtenido a través de la fusión intergenérica entre las bacterias *Celulomonas* sp. y *Bacillus subtilis*, que como característica nueva presenta la actividad de β -glucosidasa en forma extracelular que antes no tenía (Gokhale et al., 1984). En hongos filamentosos se ha llevado a cabo la fusión de protoplastos para mejorar la producción del antibiótico penicilina en híbridos interespecie de *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium stoloniferum* (Anné, 1982), la producción de β -glucosidasa en *Aspergillus niger* (Hoh et al. 1992), el mejoramiento de *Trichoderma harzanium* como agente biocontrol contra patógenos de plantas (Pe'er, y Chet, 1990) y la actividad lipolítica en híbridos intraespecie de *Penicillium caseolicolum* (Reymond, et al. 1986). También la fusión de protoplastos ha sido aplicada para el mejoramiento de cepas industriales que son utilizadas para la elaboración de alimentos fermentados como el sake, miso, y salsa de soya en donde se requiere la participación de varias enzimas (Ushijima, 1993). Se han obtenido híbridos que producen mayor actividad de proteasa, amilasa y peptidasa que cualquiera de las dos cepas progenitoras (Ushijima et al. 1990a). Es importante mencionar que en los estudios de la fusión de protoplastos se pueden identificar las etapas que se presentan durante el

ciclo parasexual como el heterocarión y el diploide que pueden ser estables o inestables (Ogawa et al. 1988 ; Ushijima et al., 1990b).

La fusión de protoplastos ha mostrado ventajas para lograr el mejoramiento de sistemas multienzimáticos, sin embargo, son escasos los reportes de su aplicación en sistemas como el celulolítico y el xilanolítico. En hongos pectinolíticos, no existen reportes concernientes específicamente a incrementar la producción del sistema pectinolítico por fusión de protoplastos.

Debido a que la fusión de protoplastos es una alternativa que no ha sido explorada para el mejoramiento de sistemas pectinolíticos en hongos, se propuso estudiar la fusión de protoplastos de *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 con otra especie del género *Aspergillus* productora de pectinasas, ya que de esta manera se podría hacer posible la obtención de nuevas cepas por fusión genética, que produjeran sistemas pectinolíticos con nuevas proporciones de componentes pectinolíticos.

ANTECEDENTES INMEDIATOS

En la cepa *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 han sido identificadas cuando menos cuatro actividades pectinolíticas extracelulares diferentes al ser cultivada en pectina y en materiales celulósicos. Se ha reportado la presencia de actividades de endopectinasa (endo-P), exopectinasa (exo-P), pectina-liasa (PL) y pectinaesterasa (PE) (Aguilar y Huitrón, 1986,1987,1990; Larios et al., 1989; Solís et al. 1990 y Delgado et al. 1993). Esta cepa ha demostrado tener potencial para la producción de pectinasas a mayor escala: presenta pocos requerimientos nutricionales, por lo que es capaz de crecer en un medio simple a base de sales industriales y agua de la llave; produce mayor actividad de endopoligalacturonasas, a 37 °C que a 29 °C, lo cual puede tener ventajas en procesos a gran escala, porque los costos de enfriamiento

pueden ser reducidos. Larios et al. (1989) demostró que *Aspergillus sp.* produce mayor actividad de endopectinasas cuando es crecido en desechos agroindustriales sin pretratamiento que cuando es crecido en sustratos puros y que la producción máxima de estas enzimas se lleva a cabo en valores extremos de pH (2.6), lo cual puede inhibir el crecimiento bacteriano. Además, la actividad específica de los filtrados libres de células es mayor que la que presentan algunas preparaciones comerciales (Saval et al. 1982; Saval y Huitrón, 1983). También se han obtenido pectinasas en fermentador de 1000 L con rendimientos mayores a los que se producen en matraz agitado.

Aspergillus sp. CH-Y-1043 fue aislado y seleccionado a partir de muestras de suelo de una zona henequenera del estado de Yucatán por su alta producción de endopectinasas ya que son las pectinasas de mayor aplicación industrial (Saval, 1985). La producción de endopectinasas y pectina lisas se favorece por el uso de pectinas altamente metoxiladas, lo cual indica que están presentes enzimas del grupo de las polimetilgalacturonasas (Aguilar et al. 1991; Delgado et al. 1993). La producción de exopoligalacturonasas ha sido detectada en el medio extracelular y también asociada a células (micelio o conidias). Entre un 35 % y un 50 % puede ser liberada al medio a diferentes valores de pH, por la adición de detergentes o de enzimas líticas (Aguilar y Huitrón, 1993). Se demostró una actividad constitutiva de exopoligalacturonasa cuando *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 se creció en glucosa, sacarosa, ácido galacturónico y glicerol (Aguilar y Huitrón, 1990). La producción de pectinasas en *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 ha demostrado ser inducible por pectina y sensible a represión catabólica por los productos de la degradación de la pectina que son acumulados durante la fermentación (Aguilar y Huitrón, 1987). La aplicación de un sistema de cultivo alimentado en donde se limitó el suministro de pectina y en consecuencia se evitó la acumulación de grupos reductores, incrementó 10 veces la producción de pectinasas (Aguilar y Huitrón, 1986). La glucosa, el ácido galacturónico y el glicerol ejercen una fuerte represión catabólica en la síntesis de endo y exopoligalacturonasas al ser adicionadas al medio con pectina (Aguilar y Huitrón, 1987; Solís et al., 1990.)

Debido al potencial que presenta *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 en la producción de pectinasas, en el laboratorio hay interés en su mejoramiento genético a fin de buscar nuevas cepas que estén mejoradas en su capacidad pectinolítica, a través de la fusión de protoplastos con *Aspergillus flavipes* ATCC-16795. Esta cepa también produce endopectinasas y exopectinasas, pero presenta mayor actividad de pectina lisa bajo ciertas condiciones del cultivo (Ortiz, 1991)

OBJETIVO

En base a lo anteriormente citado, el objetivo de este trabajo esta contrado en la obtención de híbridos interespecie de *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 y *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 que sean sobreproductores de pectinasas, en particular de aquellos que presenten una alta producción de endopectinasas y pectina lisas.

REFERENCIAS

- Antier, P; Minjares, A.; Roussos, S.; Raimbault, M. y Viniegra-González, G. (1993). Pectinase-Hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 254-259.
- Anné, J. (1982). Comparison of penicillins produced by inter-species hybrids from *Penicillium chrysogenum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15: 41-46.
- Anné, J. (1993). Cell fusion. In: *Biotechnology. Genetic Fundamentals and Genetic Engineering*. A. Pühler (Ed.) pp. 95-127. VCH:Weinheim.
- Aguilar, G. y Huitrón, C. (1986). Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus sp.* *Enzyme Microb. Technol.* 9: 541-545.
- Aguilar, G. y Huitrón, C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 690-696.
- Aguilar, G. y Huitrón, C. (1990). Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnol. Letters.* 12: 655-660.
- Aguilar, G.; Trejo, B.; García, J. y Huitrón, C. (1991). Influence of pH on endo and exo-pectinase production by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* 37: 912-917.

Aguilar, G. y Huitrón, C. (1993). Conidial and mycelial-bound exopectinase production of *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *FEMS Microbiol. Letters.* 108: 127-132.

Bos, C.J. (1986). Protoplasts from fungal spores. In: *Fungal protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics.* Peberdy, J. and Ferenczy, L. (Eds.) Marcel Dekker, Inc: New York.

Brookes, P. (1990). The early history of the biological alkylating agents. *Mutat. Res.* 233: 3-14.

Brown, J.; Collins, S. y Wood, T. (1987). Enhanced enzyme production by cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum* mutant strain NTG III/6. *Enzyme Microbiol. Technol.* 9: 176-180.

Bussink, H.J.; van den Homberg, J.P.; van den Ijssel y Visser, J. (1992). Characterization of polygalacturonase-overproducing *Aspergillus niger* transformants. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 37: 324-329.

Carder, J.H.; Hignett, R.C. y Swinburne, T.R. (1989). Relationship between the virulence of hop isolate of *Verticillium albo-atrum* and their *in vitro* secretion of cell-wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 441-452.

Caten, C.E. (1981). Parasexual processes in fungi. In: "The Fungal nucleus". K. Gull and S.G. Oliver (Eds.). Cambridge University Press. 191-214.

Colmer, A. y Keen, N.T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 383-409.

Dales, R.B.G. y Croft, J.H. (1990). Investigation of the *hef* genes that control heterokaryon incompatibility between members of the heterokaryon-compatibility (h-c) groups A and G1 of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1717-1724.

Davis, B. (1988). Factors influencing protoplast isolation. In: *Fungal protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics.* J. Peberdy and L. Ferenczy (Eds.). Marcel Dekker, Inc.: New York.

Dean, R.A. y Timberlake, W.E. (1989). Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase (*pel* A). *The plant cell.* 1: 275-284.

Delgado, L.; Trejo, B.; Huitrón, C. y Aguilar, G. (1993). Pectin-lyase from *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 515-519.

Didek-Brumec, M.; Gaberk-Porekar, V.; Alacevic, M. y Socic, H. (1993). Strain improvement of *C. purpurea* by protoplast fusion without introducing auxotrophic markers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 746-749.

Duoma, A.C.; Veenhuis, M., Diresen, A.J. y Harder, W. (1990). Liposome mediated introduction of proteins into protoplasts of the yeast *Hansenula polymorpha* as a possible tool to study peroxisome biogenesis. *Yeast.* 6: 99-105.

Duwe, B. y Khanh, N. (1996). Site mutagenesis of the active site of pectin methylsterase from *Aspergillus niger* RH5444. *Biotechnol. Letters.* 18: 621-626.

Eder, E.; Favre, A.; Deininger, C.; Hahn, H. y Kütt, W. (1989). Induction of SOS repair by monofunctional methanesulfonates in various *Escherichia coli* strains. Structure-activity relationships in comparison with mutagenicity in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis.* 4: 179-186.

- Fogarty, W.M. y Kelly, C.T. (1983).** Pectic enzymes. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Fogarty, W.M. (Ed.). pp. 131-182. Applied Science Publishers.
- Furlaneto, M. y Pizzirani-Kleiner, A.A. (1992).** Intraspecific hybridization of *Trichoderma pseudokoningii* by anastomosis and by protoplast fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 90:191-196.
- Gbewonyok, K. y Wang, D.I.C. (1983).** Induction of mutation in fungal strains. *Biotechnol. Bioengineering.* 25:967-983.
- Glickman, B.; Schaefer, R.M.; Haseltine, W.A.; Dunn, R.L. y Brash, D.E. (1986).** The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6945-6949.
- Gokhale, D.V.; Sou-Man, E.; Srinivasan, V. y Deobagkar, D. (1984).** Transfer of DNA coding for cellulases from *Cellulomonas* species to *B. subtilis* by protoplast fusion. *Biotechnol. Letters.* 6: 627-63 .
- Gyler, C.; Harmsen, J.A.M.; Kester, H.C.M.; Visser, J. y Heim, J.C. (1990).** Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*. *Gene.* 89: 101-108.
- Hanegraaf, P.P.F.; Punt, P.J.; van den Hondel, M.J.; Dekker, J.; Yap, W.; van Verseveld, H.W. y Stouthamer, A.H. (1991).** Construction and physiological characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase overproducing transformants of *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 765-771.
- Harkki, A.; Uusitalo, J.; Bailey, M.; Penttila, M. y Knowles, J.K. (1989).** A novel fungal expression system secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology.* 7: 96-101.
- Harmsen, J.A.; Kusters-van Someren, M.; Kester, H.C.M. y Visser, J. (1990).** Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin Lyase gene (pelA):. Indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*. *Curr. Genetics.* 18 :161-166.
- Holz, G. y Knox-Davies, P.S. (1986).** Possible involvement of apoplast sugar in endo-pectin-transeliminase synthesis and onion bulb rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepeae*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 28 : 403-410.
- Hocart, M.J.; Lucas, A.J. y Peberdy, J.F. (1993).** Parasexual recombination between W and R pahotypes of *Pseudocercospora herpotrichoides* through protoplast fusion. *Mycol. Res.* 97: 977-983.
- Hoh, Y.K.; Tan, T.K. y Yeo, H.H. (1992).** Protoplast fusion of β -glucosidase-producing *Aspergillus niger* strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37: 81-88.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. y Robert-Baudouy, J. (1987).** Hexuronate Catabolism in *Erwinia chrysanthemi*. *J. of Bacteriology.* 169: 1223-1231.
- Johnston, D.J. y Williamson, B. (1992).** An immunological study of the induction of polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol.* 50: 615-622.
- Kim, C.Y.; Mosser, V.; Kaen, N. y Jumak, F. (1989).** Preliminary crystallographic analysis of a plant pathogenic factor pectate lyase. *J. Mol. Biol.* 208:365-367.
- Kolar, H.; Mischak, H.; Kammei, N.P. y Kubicek, C.P. (1988).** CMCase and β -glucosidase secretion by protoplasts of *T. reesei*. *J. Gen Microbiol.* 131: 1339-1347.

Kusters-van Someren, M.A.; Harmsen, J.A.M.; Kester, H.C.M. y Visser, J. (1991). Structure of the *Aspergillus niger* pel A gene and its expression in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 20: 293-299.

Kusters-van Someren, M.A.; Flipphi, M.; Graff, L.; van der Broeck, H y Kester, H.; Hinnen, A. y Visser, J. (1992). Characterization of an *Aspergillus niger* pectin lyase gene family: structure and regulation of expression. *Mol. Gen. Genet.* 244: 113-120.

Kuwabara, H.; Magac, Y.; Kashiwagi, Y.; Okedu, G. y Sasaki, T. (1989). Characterization of enzyme productivity of protoplast from the cellulase producing fungus *Robillarda Y-20*. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 696-699.

Larios, G.; García, J.M. y Huitrón, C. (1989). Endopolygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *Biotechnology letters.* 11: 729-734.

Liang-Pingyan y Chen-Kaiying (1987). Virus transmission through interspecies protoplast fusion in *Aspergillus*. *Transactions of the British Mycological Society.* 80: 73-81.

Maldonado, M.C.; Strasser de Saad, A.M. y Callieri, D. (1989). Catabolite repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger sp.* *Curr. Microbiol.* 18: 303-306.

Mazza, G.; De Paoli, A.; Martinelli, E. y Cassani, G. (1982). One step 16 α -hydroxylation of 16-hydroxydeoxycorticosterone by *Streptomyces roseochromogenes*. II. *Farmaco Ed., Sci.* 37: 55-60.

Medgyesy, P.; Fejes, E. y Maliga, P. (1985). Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 6960-6964.

Moscoso, I. y Rosato, Y. (1987). Extracellular enzyme production by haploids, heterokaryons and diploids of *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 365-368.

Ogawa, K.; Ohara, H. y Toyama, N. (1988). Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* 52: 337-342.

Ortiz, G. (1991). Estudio comparativo sobre el crecimiento y producción de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus sp.* CH-Y-1043, *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 y *Aspergillus versicolor* ATCC-16853. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Pe'er, S. y Chet, I. (1990). *Trichoderma* protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents. *Can. J. Microbiol.* 36: 6-9.

Peberdy, J.F. (1979). Fungal protoplasts, isolation, reversion y fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 21-39.

Peberdy, J.F. (1989). Presidential address: Fungi without coats protoplasts as tools for mycological research. *Mycol. Res.* 93: 1-20.

Peberdy, J.F. (1991). Fungal protoplasts. In: *More manipulations in fungi.* Bennett, J.W. (Ed.). Academic Press. 307-318.

Phaff, H.J. (1947). The production of exocellular pectic enzymes by *Penicillium chrysogenum* on the formation and adaptative nature of polygalacturonase and pectin esterase. *Arch. Biochem.* 13: 67-81.

- Perley, A.F. y Page, O.T. (1971).** Differential induction of pectolytic enzymes of *Fusarium roseum* (*k*) emend. Snyder y Hansen. *Can. J. Microbiology*. 117: 415-420.
- Pilnik, W. y Rombouts, F.M. (1981).** Pectic enzymes. In: *Enzymes and Food processing*. Birch G.G., Blakebrough, N., Paker, K.J. (Eds.). Appl. Sci. Publish. Ltd. London pp. 105-126.
- Pilnik, W. y Voragen, A. (1983).** Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture In: *Enzymes in food processing*. Ed. by Nagodwithana G. (Ed.). Academic Press. Inc. 363-399.
- Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hammons, L.M.; Mac Donald, K.D. y Burton, A. (1963).** The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*. 5: 141-238.
- Reymond, P.; Veau, P. y Favre, M. (1986).** Production by protoplast fusion of new strains of *Penicillium caseicola* for use in the dairy industry. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 45-47.
- Ried, J.L. y Colfmer, A. (1985).** Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfatate-polyacrylamide gels. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 615-622.
- Rowlands, R.T. (1984).** Industrial strain improvement: rational screens and genetic recombination techniques. *Enzyme Microbiol. Technol.* 6: 290-300.
- Sajer, I. (1974).** Activity of polygalacturonase and pectinesterase of *Penicillium sp. 7/4B* after ethylenimine and UV treatment. *Acta Microbiol. Polon.* 3: 119-123.
- Saval, S. y Huitrón, C. (1983).** Microbial pectinases from henequen pulp. *Developments in Industrial Microbiology*. 24: 547-551.
- Saval, S.; Solórzano R.; Alpizar, L.; Cea, A. y Huitrón, C. (1982).** Production of pectinases from henequen pulp. In: *Developments in Industrial Microbiology*. Dupuy, P. (Ed.). Technique et Documentation Lavoisier: France. pp. 531-535.
- Saval, S. (1985).** Producción de pectinasas de *Aspergillus sp.* por fermentación sumergida de la pulpa de henequén. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schols, H.A. ; Geraeds, C.C. ; Searle-van Leeuwen, M.F.; Kormelink, F.J.M. y Voragen, A.G.J. (1990).** Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrade the hairy regions of pectins. *Carbohydr. Res.* 208: 105-115.
- Schuster, H. (1960).** The reaction of nitrous acid with deoxyribanucleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2: 320-323.
- Sentandrew, R.; Herrero, E.; Ebrza, M.V.; Rico, H. y Pastor, J. (1983).** Synthesis and assembly of wall polymers on regenerating yeast protoplasts. In: *Protoplasts*. Potrykus, T. Harms, A. Hinnen, R. Hutter, P.J. King and Shillito, R.D. (Eds.) Bslie: Birkhauser, Verlag. pp. 187-195.
- Shinmyo, A.; Davis, I.K.; Nomomoto, F.; Tahara, T. y Enatsu, T. (1976).** Catabolite repression of hydrolases. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 5: 59-68.
- Solis, S.; Flores, M.E. y Huitrón, C. (1990).** Isolation of endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *Biotechnol. Letters* 12: 751-756.
- Stahl, U. y Esser, K. (1993).** Genetic exchange processes in lower eucaryotes. In: *Biotechnology. Genetic Fundamentals and Genetic Engineering*. A. Pühler ed. pp.73-91. VCH:Weinheim

- Talbot, N.J.; Coddington, A.; Roberts, I.N. y Oliver, R.P. (1988). Diploid construction by protoplast fusion in *Fulvia fulva* (syn. *Cladosporium fulvum*): genetic analysis of an imperfect fungal plant pathogen. *Curr. Genet.* 14: 567-572.
- Tamaki, S.J.; Gold, S.; Robeson, M.; Manulis, S. y Keen, N.T. (1988). Structure and organization of the *pel* genes from *E. chrysantemi* EC16. *J. Bacteriol.* 170: 3488-3478.
- Uitzetter, J.A.; Boss, J.C. y Visser, J. (1986). Characterization of *Aspergillus nidulans* mutants isolated after D-galacturonate enrichment. *J. Gen. Microbiol.* 134: 655-659.
- Ushijima, S.; Nakadai, T. y Uchida, K. (1990b). Breeding of new *Koji*-moulds through interspecific hybridization between *A. oryzae* and *A. sojae* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1667-1676.
- Ushijima, S.; Nakadai, T. y Uchida, K. (1990a). Further evidence on the interspecific protoplast fusion between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* and subsequent haploidization, with special reference to their production of some hydrolyzing enzymes. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2393-2399.
- Ushijima, S. (1993). Improvement of industrial *Aspergillus* fungi. In: *Biotechnology Handbooks*. ed. Smith, J.E. pp. 41-64. N.Y. Plenum Press.
- Uusitalo, J.M.; Nevalainen, K.M.; Harkki, A.M.; Knowles, J. y Penttila, M. (1991). Enzyme production by recombinant *T. reesei* strains. *J. of Biotechnology.* 17: 35-50.
- Van Buren, J.P. (1991). Function of pectin in plant tissue structure and firmness. In: *The Chemistry and Technology of Pectin*. Reginal W.H. (Ed.). pp. 1-36. Academic Press.
- van der Honderhoven, F.E.A. (1975). Studies on pectin lyase In: Thesis Agricultural University Wageningen. The Netherlands.
- Visser, J.; van Rooijen, R.; Dijkema, C.; Swart K. y Sealy-Lewis, H.M.C. (1986). Glycerol uptake mutants of the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 655-659.
- Voragen, A. (1989). Food Enzymes: Prospects and limitations. In: *Food Science. Basic research for Technological Progress. Proceedings of the Symposium in honor of Professor W. Pilnik*. J.P. Rosszen, F.M. Rombouts and A.G.J. Voragen (Eds.) pp. 59-81. Wageningen pp.
- Voragen, A.; Pilnik, W.; Thibault, J.F.; Axelos, M.A. y Renard, C.P. (1995). Pectins. In: *Food polysaccharides and their applications*. Ed. Stephen, A.M. pp. 287-289. Marcel Dekker.
- Wangemann-Sudde, M. y Scheuz, K. (1991). Intraspecific hybridization of *Ustilago maydis* haploids with compatible and incompatible mating type by electrofusion and genetic analysis of the the fusion products. *Experimental Mycology.* 15: 159-166.
- Ward, P.; Lo, J.; Duke, M.; May, G.; Denis, R.H. y Conneely, O.M. (1992). Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *A. oryzae*. *Biotechnology.* 10: 784-789.
- Whitaker, J. (1990). Microbial pectolytic enzymes. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Fogarty, W.M. and Kelly, T.C. (Eds.). Academic Press. pp. 133.
- Yoder, M.; De Chaina, D. y Jurnak, F. (1990). Preliminary crystallographic analysis of the plant pathogenic factor, pectate lyase C from *Erwinia chrysantemi*. *J. Biol. Chem.* 265: 11431-11492.

RESULTADOS Y DISCUSION

**"PROTOPLASTOS DE HONGOS PECTINOLITICOS:
AISLAMIENTO, REGENERACION Y
PRODUCCION DE PECTINASAS".**

Solis, S.; Flores, M.E y Huitrón, C.

Letters in Applied Microbiology. (1996). vol. 23, 36-42.

Protoplasts from pectinolytic fungi: isolation, regeneration and pectinolytic enzyme production

S. Solís, M.E. Flores and C. Huitrón

Department of Biotechnology, Institute of Biomedical Research, National University of Mexico, México City, México

FS296; received 12 October 1995 and accepted 15 December 1995

S. SOLÍS, M.E. FLORES AND C. HUITRÓN. 1996. Protoplast release in pectinolytic strain mutants of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (A13) and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 (F7) is described. Optimum yield of protoplasts A13 was obtained in a lapse of 1 h when commercially lytic enzymes of *Trichoderma harzianum* (2 mg ml^{-1}) were added in 0.05 mol l^{-1} citrate-phosphate buffer pH 5.0 containing 0.7 mol l^{-1} KCl and 10 mg ml^{-1} BSA. Best results in F7 were obtained when the protoplasting system of A13 was supplemented with 10 mg ml^{-1} *Aureobasidium* sp. lytic enzymes. Isolated protoplasts in A13 and F7 were capable of a high regeneration frequency of 87% and 53% when 0.7 mol l^{-1} KCl and sorbitol were used as osmotic stabilizers. Endo-P, Exo-P and pectin lyase production were not modified during the process of regeneration.

INTRODUCTION

Microbial pectinases play an important role within the food industry. Their use is essential in the process of extraction and clarification of fruit juices (Fogarty and Kelly 1983; Pilknik and Voragen 1993). Commercial preparations of pectic enzymes used in food processing mainly come from fungal sources, particularly from the genus *Aspergillus*. We have previously reported the production of extracellular pectinases from the fungus *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 which we isolated from the Mayan state of Yucatan (Saval *et al.* 1982; Saval and Huitrón 1983; Huitrón *et al.* 1984). This micro-organism grows better at 37°C (Saval and Huitrón 1983; Larios *et al.* 1989) on pectin or materials containing pectin, and produces a pectinolytic system formed by at least four extracellular types of pectinolytic enzymes: endo-pectinases, exo-pectinases, pectin lyase and pectin esterase (Saval and Huitrón 1983; Aguilar and Huitrón 1987; Larios *et al.* 1989; Aguilar *et al.* 1991; Delgado *et al.* 1993).

Strain improvement programs for industrially relevant species have traditionally involved mutagenesis and selection. Currently, the use of protoplasts is important for genetic fusion (Peberdy 1991) and transformation (Cúrragh *et al.* 1992) and often plays an essential role in strain improvement (Ogawa *et al.* 1989; Pe'er and Chet 1990). We are interested in protoplast isolation from pectinolytic fungi because the

pectinolytic system is complex and consists of different enzymatic components. Then it might be possible to obtain new strains by genetic fusion producing pectinolytic systems consisting of novel proportions of enzymatic components.

Protoplast fusion requires an efficient procedure for protoplast isolation and regeneration (Anjani-Kumari and Panda 1992; Hashiba 1992). On the other hand, as far as we know, there are no reports on the isolation of protoplasts from pectinolytic fungi. The present report describes the conditions for the isolation, regeneration and pectinase production of protoplasts regenerated from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795.

MATERIALS AND METHODS

Micro-organisms

The micro-organisms used in this work were *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 wild-type strain previously isolated in our laboratory (Saval and Huitrón 1983) and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 wild-type strain. Both produce extracellular pectinolytic activities. *Aspergillus* A13 (adenosine auxotrophic mutant) and *A. flavipes* F7 were derived from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and from *A. flavipes* ATCC-16795 respectively.

Media

Potato dextrose agar medium (PDA) was used for wild strain propagation. Minimal medium (MM) contained (w/v): 2%

Correspondence to: Dr Carlos Huitrón, Department of Biotechnology, Institute of Biomedical Research, National University of Mexico, C.N.A.M. A.P. 70228, México, D.F. 04510, México.

unit was defined as the amount of enzyme which reduced the initial viscosity of the pectin solution by 50%. Exo-pectinase activity was determined by quantification of the liberated reducing groups from pectin as was previously reported (Aguilar and Huitrón 1987). One unit (U) was defined as the amount of enzyme which catalyses the formation of a μmol of galacturonic acid equivalents h^{-1} pH 5.0. Pectin lyase activity was determined by monitoring the increase in absorbance at 235. One unit (U) was defined as the amount of enzyme that produces an increase in absorbance of 0.1 at 235 nm in the reaction mixture under the reported assay conditions (Delgado *et al.* 1993).

RESULTS AND DISCUSSION

With the aim of obtaining genetic markers to be used in future protoplast fusion experiments, we mutagenized *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 spores with NTG. One adenosine requiring mutant was selected from *Aspergillus* sp. and named A13, and one lysine auxotroph was obtained from *A. flavipes* and named F7. Both mutants were stable since they presented low reversion frequencies, 2×10^{-7} and 4×10^{-7} , respectively. The strains *Aspergillus* sp. and *A. flavipes* were selected as good pectinolytic enzyme producers and therefore we considered it important to evaluate the production of endo-pectinases (endo-P) of auxotrophic mutants, since these are of major importance in industry. As shown in Figs 1a and 1b, A13 mutant yield was slightly lower than that obtained with *Aspergillus* sp. and the

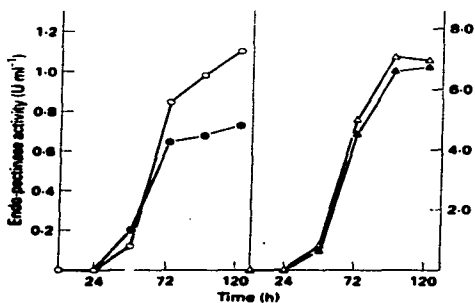


Fig. 1. Comparison of endo-pectinase activity production by wild strains and auxotrophic mutants growing on pectin. \circ , *Aspergillus* sp. CH-Y-1043; \bullet , A13 mutant; Δ , *Aspergillus flavipes* ATCC-16795; \blacktriangle , F7 mutant.

F7 mutant production profile was similar to the wild-type strain. They were grown under the same culture conditions (pectin supplemented with adenosine or lysine). These results, together with the observation that mutants show similar growth to parental strains (data not shown), indicated that the mutants preserved their growth and endopectinolytic production capacity.

There are a number of important factors which influence

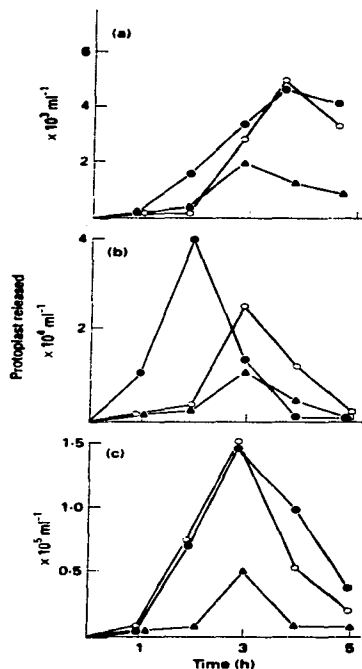


Fig. 2. Effect of the lytic enzymes and osmotic stabilizers on protoplast release from *Aspergillus* sp. (A13). Lytic enzymes used were from: (a) *Aspergillus* species; (b) *Arthro bacter luteus*; and (c) *Trichoderma harzianum*. Osmotic stabilizers 0.7 mol l^{-1} used were: \circ , KCl; \bullet , MgSO_4 ; \blacktriangle , NH_4Cl .

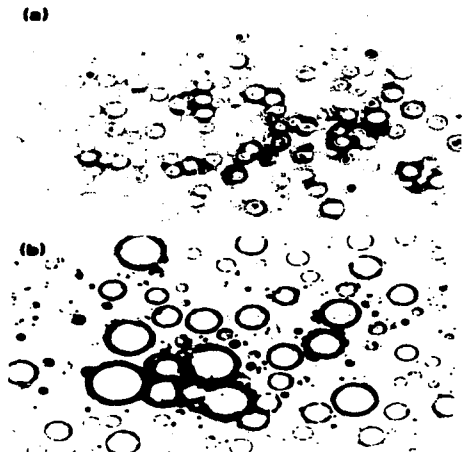


Fig. 3 Microphotographs in phase-contrast (at $40\times$) of protoplast released from (a) *Aspergillus* sp. (A13) and (b) *Aspergillus flavipes* (F7).

fungal protoplast isolation, i.e. organisms, lytic enzyme systems, osmotic stabilizers and others. In this sense, we established the conditions for protoplast obtention and regeneration for *Aspergillus* sp. *ade*⁻ and *A. flavipes* *lys*⁻ mutants. Figure 2 shows the number of protoplasts released from A13 mycelium treated with three lytic enzyme systems and KCl, MgSO₄ and NH₄Cl as osmotic stabilizers. Maximum release of protoplasts was obtained with *Trichoderma harzianum* enzymes which yielded 1.5×10^8 protoplasts ml⁻¹ after 3 h incubation with KCl or MgSO₄ (Fig. 2c), *Arthrobacter luteus* enzymes produced 4×10^8 ml⁻¹ protoplasts with KCl in 2 h (Fig. 2b) and the highest yield with *Aspergillus* enzymes was 5×10^8 ml⁻¹ with KCl or MgSO₄ (Fig. 2a). Some authors have reported that proteolytic activity present in lytic enzyme systems affects protoplast yield and regeneration capacity (Mann and Jeffery 1986; Kitamoto 1988). In our case, the addition of 10 mg ml⁻¹ of bovine serum albumin (BSA) to the protoplast forming system increased from 0.28×10^8 ml⁻¹ to 8.5×10^8 ml⁻¹ released in 1 h from A13 mycelium.

Our results agree with other studies in which *Tr. harzianum* enzymes, commonly known as Novozym 234, proved to be very efficient in the obtention of fungal protoplasts (Collings

et al. 1988). Previous reports state that fungal protoplast obtention requires the presence of chitinases (Shandu *et al.* 1989; Hashiba 1992), which could explain the satisfactory function of the *Trichoderma* enzyme mixture, since the chitinase content of this mixture is high.

Table 1 presents the results obtained during the protoplast formation of the *A. flavipes* F7 strain. These were more difficult to release and we had to use seven lytic enzyme mixtures. We obtained 2.75×10^7 protoplasts ml⁻¹ with lytic enzymes from the cellulolytic yeast-like fungus, *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 (10 mg ml⁻¹) produced in this laboratory. No significant differences were observed between added osmotic stabilizers. This number increased to 2×10^8 ml⁻¹ with the addition of *Tr. harzianum* enzymes (2 mg ml⁻¹) for 2 h. It should also be mentioned that when *Tr. harzianum* enzymes were added on their own to F7 mycelium, no protoplasts were observed even after 5 h of incubation. Both A13 and F7 protoplasts were observed with a phase contrast microscope and photographed (Fig. 3) and, as shown, *Aspergillus* sp. A13 protoplasts are smaller than *A. flavipes* F7 protoplasts. The fact that *Aureobasidium* enzymes were efficient to obtain *Aspergillus flavipes* F7 protoplasts is interesting, since there

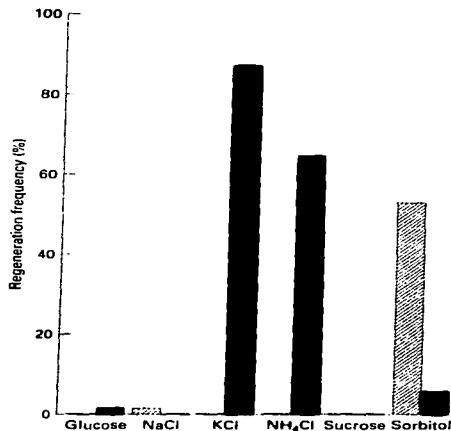


Fig. 4 Effect of osmotic stabilizers on regeneration frequency of protoplasts from *Aspergillus* sp. (A13) (■) and *Aspergillus flavipes* (F7) (▨). Protoplasts from both strains were regenerated on SMM media at 37°C and 29°C respectively.

Lytic enzyme source	Concentration (mg ml ⁻¹)	Osmotic stabilizers (0.7 mol l ⁻¹)	Incubation time (h)	Protoplasts released (× ml ⁻¹)
<i>Aureobasidium</i> sp. CH-M-1018 + <i>Trichoderma harzianum</i>	10 + 2	KCl	2	2.0 × 10 ⁶
<i>Aureobasidium</i> sp. CH-M-1018	10	KCl	3	2.75 × 10 ⁵
		MgSO ₄	3	2.4 × 10 ⁵
		NH ₄ Cl	3	2.1 × 10 ⁵
<i>A. niger</i> + <i>Helix pomatia</i>	30 + 10	KCl	4	2.2 × 10 ⁵
		MgSO ₄	4	1.8 × 10 ⁵
		NH ₄ Cl	4	1.5 × 10 ⁵
<i>Aspergillus</i> species	2	KCl	5	0
		MgSO ₄	5	0
		NH ₄ Cl	5	0
<i>Tr. harzianum</i>	2	KCl	0	0
		MgSO ₄	0	0
		NH ₄ Cl	0	0
<i>Tr. harzianum</i>	4	KCl	5	0
		MgSO ₄	5	0
		NH ₄ Cl	5	0
<i>Arthro bacter luteus</i>	4	KCl	5	0
		MgSO ₄	5	0
		NH ₄ Cl	5	0

Mycelia (200 mg) were incubated in 0.05 mol l⁻¹ citrate-phosphate buffer (pH 5.0) containing lytic enzymes and different osmotic stabilizer at 37°C and 100 rev min⁻¹.

are no previous reports to our knowledge on the application of lytic enzymes of the yeast-like fungus *Aureobasidium* to the production of filamentous fungi protoplasts. We have detected in cell-free filtrates of this organism extracellular enzymes such as cellulases measured as CMCase and filter paper activity, xylanases and β -glucosidases (Larios *et al.* 1982). Recently we have also detected endo- and exo-pectinolytic activity.

Protoplast regeneration frequency differences between strains and species are often found and regeneration is also affected by several physical factors including the nature of the culture medium and the osmotic stabilizer (Hashiba 1992). In this sense, we established the conditions for regeneration of A13 and F7 protoplasts. These were regenerated in MM containing different osmotic stabilizers. As shown in Fig. 4, *Aspergillus* sp. A13 protoplasts did not regenerate in the presence of glucose, sodium chloride or sucrose, while in KCl regeneration rose to 87%, and in NH₄Cl regeneration was 65%. On the contrary, the only osmotic stabilizer which

Table 1 Influence of lytic system and osmotic stabilizer on protoplast release from *Aspergillus flavipes* (F7)

promoted regeneration of the F7 strain was sorbitol (53%). It must be emphasized that the regeneration frequencies obtained in the present study are higher than those reported for other species of *Aspergillus*, such as *A. oryzae*, *A. awamori* and *A. sojae*, which oscillate between 10 and 30% (Ogawa *et al.* 1988; Kiyohara *et al.* 1990; Ushigima *et al.* 1990). The causes for these frequency variations of regeneration among fungi of different genera, species or strains, have not been discovered yet; however, it has been observed that protoplasts obtained in short exposure times to lytic enzymes have greater capacity to regenerate than those which have been in contact with these enzymes for longer periods, since the membrane is liable to be damaged (Lakshmi and Chandra 1993). The colonies obtained after regenerating protoplasts were also analysed as to their reversion frequency to the original phenotype and these were of the order of 10⁻⁷ for A13 and F7, very similar to those obtained for spores, which indicates that the formation and regeneration process of protoplasts has no effect on the stability of the mutation in both strains.

Table 2 Endo-pectinase (Endo-P), exo-pectinase (Exo-P) and pectin lyase (PL) production by A-13 mutant, regenerated A-13 mutant, F-7 mutant, regenerated F-7 mutant, *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *A. flavipes* ATCC-16795 grown on 1% lemon peel as sole carbon source

Strains	Requirements	Pectinolytic activity		
		Endo-P (U ml ⁻¹)	Exo-P (U ml ⁻¹)	PL (U ml ⁻¹)
<i>Aspergillus</i> sp. CH-Y-1043	Prototroph	3.12	8.41	490
A-13	adc ⁻	3.29	8.80	385
Regenerated A-13	adc ⁻	2.99	8.29	400
<i>A. flavipes</i> ATCC-16795	Prototroph	7.91	7.91	726
F-7	lys ⁻	7.80	6.80	700
Regenerated F-7	lys ⁻	7.64	7.64	741

Micro-organisms were grown in lemon peel and incubated at 37°C or 29°C as specified in Materials and Methods. Enzyme determinations were performed at 120 h for Endo-P and Exo-P, and at 72 h for PL.

It has been reported that the simple event of protoplast formation and regeneration can modify a strain either by increasing or diminishing its resistance to antibiotics, by causing a genetic variation or by increasing the production of an antibiotic (Yamashita *et al.* 1985; Hotta *et al.* 1988). On the other hand, the improvement in cellulase production by regenerated protoplasts of *Robillarda* Y-20 has also been reported (Kuwabara *et al.* 1989). It is for these reasons that we considered it important to assess the production of endo-pectinase, exo-pectinase and pectin lyase for the A13 mutant, regenerated A13 mutant, the F7 mutant and the regenerated F7 mutant and to compare them with the parental strain production using lemon peel as the only carbon source and inducer, our interest being in the production of enzymes from this agroindustrial waste. Results in Table 2 show that the production of these pectinolytic enzymes was similar in all strains, both for *Aspergillus* sp. and *A. flavipes*, which indicated that the events which occur during regeneration do not modify endo-P, exo-P and pectin lyase production.

Results presented herein confirm the necessity of establishing the protoplast formation and regeneration conditions for a given micro-organism, since these processes are affected by multiple factors and, thus, it is not recommendable to consider values established for other micro-organisms as reference, even if they are of the same genus or species. Therefore, we defined an adequate procedure to attain rapid isolation and high regeneration frequency of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 pectinolytic protoplasts as an essential prerequisite for protoplast fusion.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express gratitude to I. Pérez-Montfort for translation of the manuscript, A. López for secretarial assistance.

R. Pérez for cellulolytic enzyme production. Thanks are extended to J. Avilés and E. Vázquez for photographic and graphic work. This work was supported in part by a grant from Programa de Apoyo a las divisiones de Posgrado, UNAN, project D/CCH/9262.

REFERENCES

- Aguilar, G. and Huitrón, C. (1987) Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme and Microbial Technology* **9**, 690-696.
- Aguilar, G., Trejo, B., Garcia, J. and Huitrón, C. (1991) Influence of pH on endo and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Canadian Journal of Microbiology* **37**, 912-917.
- Anjani-Kumari, J. and Panda, T. (1992) Studies on critical analyses of factors influencing improved production from *Trichoderma reesei* mycelium. *Enzyme and Microbial Technology* **14**, 241-248.
- Collings, A., Davis, B. and Mills, J. (1988) Factors affecting protoplast release from some mesophilic, thermophilic and thermotolerant species of filamentous fungi using Nuvozym 234. *Microbios* **53**, 197-210.
- Currage, J.H., Mouibroek, H., Weesels, G.H.J., Marchant, R. and Mullan, E. (1992) Protoplast formation and DNA-transformation mediated of *Fusarium culmorum* to hygromycin B resistance. *Mycology Research* **97**, 313-317.
- Delgado, L., Trejo, A.B., Huitrón, C. and Aguilar, G. (1993) Pectinase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**, 515-519.
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. (1983) Pectic enzymes. In *Microbial Enzymes and Biotechnology* ed. Fogarty, W.M. pp. 131-182. London: Elsevier Applied Science.
- Hashiba, T. (1992) Isolation of fungal protoplasts. In *Handbook of Applied Mycology: Fungal Biotechnology* ed. Arora, K.D., Elander, P.R. and Mukerji, G.K. pp. 129-149. Marcel Dekker.
- Hotta, K., Ishikawa, J., Ichikawa, M., Naganawa, H. and Misuno, N. (1988) Mechanisms of increased kanamycin resistance generated

- by protoplast regeneration of *Streptomyces griseus*. *Journal of Antibiotics* 41, 94-103.
- Huitron, C., Saval, S. and Acuña, M.E. (1984) Production of microbial enzymes from agroindustrial by-products. *Annals of New York Academy of Sciences* 434, 110-114.
- Kitamoto, Y., Mio, N., Ohiwa, T. and Ichikawa, Y. (1988) A simple method for protoplast formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28, 445-450.
- Kiyohara, H., Watanabe, T., Imai, J., Takizawa, N., Haba, T., Nagao, K. and Yamamoto, A. (1990) Intergenic hybridization between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 671-676.
- Kuwabara, H., Magae, Y., Kashiwagi, Okada, G. and Sasaki, T. (1989) Characterization of enzyme productivity of protoplast regenerants from the cellulase-producing fungus *Robillarda Y-20*. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 699-702.
- Lakshmi, B.R. and Chandra, T.S. (1993) Rapid release of protoplast from *Eremothecium ashbyi* in comparison with *Trichoderma reesei* and *Penicillium chrysogenum* using Novozym and Funclase. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 699-702.
- Larios, G., Gilbon, A., Lara, Y. and Huitron, C. (1982) Extracellular cellulases produced by a yeast-like fungus. *Enzyme Engineering* 6, 353-354.
- Larios, G., Garcia, J.M. and Huitron, C. (1990) Endopolygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Biotechnology Letters* 11, 729-734.
- Mann, W. and Jeffery, J. (1986) Yeast in molecular biology. Spheroplast preparation with *Candida utilis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BioScience Reports* 6, 597-602.
- Ogawa, K., Ohara, H. and Toyama, N. (1988) Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *karachi* by protoplast fusion. *Agricultural and Biological Chemistry* 52, 337-342.
- Ogawa, K., Tsuchimochi, M., Taniguchi, K. and Nakatsu, S. (1989) Interspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *shirousami* and *Aspergillus niger* by protoplast fusion. *Agricultural and Biological Chemistry* 52, 337-342.
- Peberdy, J.F. (1991) Fungal protoplasts. In *More Gene Manipulations in Fungi* ed. Bennett, J.W. and Leland, L.L., pp. 307-318. Academic Press.
- Pe'er, S. and Chet, I. (1990) *Trichoderma* protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents. *Canadian Journal of Microbiology* 36, 6-9.
- Pilknik, W. and Voragen, G.J.A. (1993) Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. In *Enzymes in Food Processing* ed. Tilaknagadawithana, S. and Reed, G. p. 363. Academic Press.
- Saval, S. and Huitron, C. (1983) Microbial pectinases from benecuen pulp. *Developments in Industrial Microbiology* 24, 547-551.
- Saval, S., Solórzano, R., Alpizar, L., Cza, A. and Huitron, C. (1982) Production of pectinases by submerged fermentation of benecuen pulp. In *Developments in Industrial Microbiology* ed. Duppy, P. pp. 531-535. France: Technique et Documentation Lavoisier.
- Shandu, D., Wadhwa, V. and Bagga, P. (1989) Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme and Microbial Technology* 11, 21-25.
- Solis, S., Flores, M.E. and Huitron, C. (1990) Isolation of endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Biotechnology Letters* 12, 751-756.
- Ushigima, S.H., Nakada, T. and Uchida, K. (1990) Breeding of New Koji-moulds through interspecific hybridization between *A. oryzae* and *A. sazei* by protoplast fusion. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 1667-1676.
- Yamashita, F., Hotta, K., Okami, Y. and Umezawa, H. (1985) The generation of additional antibiotic resistance by protoplast regeneration of a *Streptomyces griseus* strain. *Journal of Antibiotics* 38, 126-127.

**"MEJORAMIENTO EN LA PRODUCCION DE PECTINASAS
POR HIBRIDOS INTERESPECIFICOS DE
CEPAS DE *Aspergillus*".**

Solis, S.; Flores M.E. y Huitrón, C.

Letters in Applied Microbiology. (1997). En prensa.

Improvement of pectinase production by interspecific hybrids of *Aspergillus* strains

S. Solís, M.E. Flores and C. Huitrón

Department of Biotechnology, Institute of Biomedical Research, National University of Mexico, UNAM, Mexico

PS/21: received 12 March 1986 and accepted 28 May 1986

S. SOLÍS, M.E. FLORES AND C. HUITRÓN. 1987. Protoplast fusion induced by polyethylene glycol and Ca^{2+} was performed between auxotrophic mutants of pectinolytic fungi *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (A13) *ade*⁻ and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 (F7) *lys*⁻. Prototrophic colonies were developed on minimal medium with a fusion frequency of 1.0×10^{-3} . The reversion frequency of the mutation in spores and protoplasts was low and ranged from 2.0 to 4.0×10^{-7} . Four prototrophic hybrids (HH, HE, HF and HJ) exhibited enhanced production of endo-pectinase and pectin-lyase. The highest production was observed in HJ; maximum activities were 150 and 160% respectively, whereas the exo-pectinase production was similar to the wild-type strain *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. Hybrid HJ showed the greatest growth; nevertheless, specific endo-pectinase and pectin-lyase activities were higher in all hybrids than those produced by the wild-type strains.

INTRODUCTION

Degradation of the polysaccharide pectin requires the participation of different enzymes which compose the pectinolytic multi-enzymatic system. Pectinases are widely used in the industrial processing of fruits and vegetables (Fogarty and Kelly 1983; Pilnik and Voragen 1993). *Aspergillus* species are used for pectinase production on commercial scale, especially *Aspergillus niger*, because it produces several enzymatic components such as endo- and exo-polygalacturonase (PG), pectin-lyase (PL), pectin esterase (PE) and oligogalacturonase (OG).

We have been working with the fungus *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 isolated from a tropical zone in the southeast of Mexico. This strain grows better at 37°C in a simple medium containing pectin or lemon peel as sole carbon source (Saval *et al.* 1983; Aguilar and Huitrón 1986; Larios *et al.* 1989) and produces an extracellular pectinolytic system which shows at least four activities: endo and exo PG, PL, and PE (Aguilar and Huitrón 1987, 1990; Aguilar *et al.* 1991; Delgado *et al.* 1993). Since *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 produces higher extracellular endo-pectinase activity when it grows on lemon peel than on pectin, it is potentially useful for large scale production of pectinases from agroindustrial wastes. Therefore, the genetic improvement of this strain is important.

Protoplast fusion has been established as a means of transferring genetic information, and provides an adequate method for genetic analysis and strain improvement (Peberdy 1989, 1991). Obtaining new strains through protoplast fusion, particularly of the genus *Aspergillus*, with better production of proteases, β -glucosidases, as well as citric acid, has been reported (Hoh *et al.* 1992; Ushijima 1993), but as far as we know there are not reports specifically concerning the increase of pectinolytic system production by protoplast fusion. As mentioned before, we are interested in improving the pectinase production by protoplast fusion between *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795. We recently reported the isolation and regeneration of protoplasts from these two strains (Solís *et al.* 1996). The present study reports the results of interspecific protoplast fusion between *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 and the characterization of hybrids with respect to their pectinase production profiles.

MATERIALS AND METHODS

Strains

Aspergillus sp. CH-Y-1043 wild-type strain (white spores) and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 wild-type strain (brown spores) were used as prototrophic strains. The auxotrophic mutants derived from them were *Aspergillus* A13 *ade*⁻ and *A. flavipes* F7 *lys*⁻ (Solís *et al.* 1996).

Correspondence to: Dr Carlos Huitrón, Department of Biotechnology, Institute of Biomedical Research, National University of Mexico, UNAM, Apdo. Postal 70226, 04516 México, D.F.

Media and culture conditions

For propagation, parental cells were routinely grown on potato dextrose agar plates (PDA) at 37°C (*Aspergillus* sp.) and 29°C (*A. flavipes*). The mutant strains were grown on complete medium (CM) containing (w/v): 2% glucose, 0.3% yeast extract (Difco) and 0.3% bactopeptone (Difco) and 2% bactogarg.

Minimal medium (MM) contained (w/v): 2% glucose, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄, 0.3% NaNO₃ and 2% bactogarg. The pH was adjusted to 4.5 with 2 mol l⁻¹ H₂SO₄. Enzyme production medium (EP) contained (w/v): 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.2% KH₂PO₄ and 0.2% K₂HPO₄ and 1% lemon peel as sole carbon source (sterilized separately). The initial pH was 3.0.

Protoplast isolation and fusion

Mutant spores A13 *ade*⁻ and F7 *lys*⁻ (10⁶) were used to inoculate 100 ml of liquid CM contained in 500 ml flasks and incubated at 200 rev min⁻¹ for 18 h (A13) and 24 h (F7). Mycelia were harvested by centrifugation and washed twice with distilled water. Protoplasting was performed using 200 mg of wet mycelia in 5.0 ml of citrate-phosphate buffer (0.05 mol l⁻¹), pH 5.0 supplemented with 0.7 mol l⁻¹ KCl as osmotic stabilizer. *Trichoderma harzianum* lytic enzymes were added at concentration 2 mg ml⁻¹; after that, mycelium suspensions were incubated at 37°C on a shaking incubator at 100 rev min⁻¹. Protoplast formation was examined with phase contrast microscopy (Nikkon microscope) at a magnification of ×40. After enzyme cell wall digestion, protoplasts were filtered through cotton, washed with buffer citrate-phosphate with KCl and centrifuged for 10 min at 100 g. Protoplasts were resuspended in 1.0 ml of the same buffer. Protoplast fusion was carried out as follows: protoplast suspensions (10⁷) of each auxotroph were mixed and centrifuged for 10 min at 500 g. Pelleted protoplasts were resuspended in 1.0 ml of a solution containing (w/v) 30% polyethylene glycol (PEG) MW 3335 and 0.01 mol l⁻¹ CaCl₂ in 0.05 mol l⁻¹ glycine-NaOH buffer, pH 7.5. After 10 min of incubation at room temperature, the suspension was washed with 0.05 mol l⁻¹ citrate-phosphate buffer pH 5.0 with 0.7 mol l⁻¹ KCl, and centrifuged for 10 min at 500 g. The sedimented protoplasts were resuspended in the same buffer and serial dilutions were prepared and plated for regeneration on MM and CM containing 0.35 mol l⁻¹ for both KCl and sorbitol. These plates were incubated at 29°C for 5 d. Fusion frequency was defined as the ratio of number of colonies which developed on MM with respect to CM plates.

Enzyme production conditions

Experiments were performed with parental and hybrid strains in 500 ml Erlenmeyer flasks, each containing 200 ml of EP

medium and were inoculated with 4.0 ml of a spore suspension of each strain (5.0 total optical density at 540 nm). All strains were grown in a shaking incubator (New Brunswick, Scientific Co., USA), 200 rev min⁻¹ for 120 h at 37°C, and *A. flavipes* at 29°C. Samples of 10.0 ml were withdrawn each 24 h during fermentation and immediately filtered through Millipore membranes of 0.45 µm pore size. These cell-free filtrates were used for enzymatic assays. The pellet was used for mycelial protein determinations.

Enzymatic assays

Endo-pectinases were determined by reduction of viscosity of a 1% pectin solution at 30°C and pH 4.2, using an Ostwald Viscosimeter as previously described (Larios *et al.* 1989). One unit (U) was defined as the amount of enzyme which reduces the initial viscosity of the pectin solution by 50%. Exo-pectinase activity was determined by quantification of the liberated reducing groups from pectin as previously reported (Aguilar and Huitrón 1986). One unit (U) was defined as the amount of enzyme which catalyses the formation of 1 µmol of galacturonic acid equivalents h⁻¹ at pH 5.0. Pectin lyase activity was determined by monitoring the increase in absorbance at 235 nm under the reported assay conditions: 1% pectin, Tris-HCl buffer pH 8.8, 40°C, 2 h (Delgado *et al.* 1993). One unit (U) was defined as the amount of enzyme which produces an increase in absorbance of 0.1 at 235 nm in the reaction mixture.

Mycelial protein

The mycelial pellet was resuspended in 2.0 ml of 10% trichloroacetic acid and stored overnight at 4°C. The samples were homogenized for 15 min, and later centrifuged for 15 min at 1400 g. Precipitate was resuspended in 0.66 mol l⁻¹ NaOH. Aliquots of 0.2 ml were used for protein determination by the Lowry method with bovine serum albumin (BSA) as standard (Lowry *et al.* 1951). After reaction, samples were centrifuged for 10 min at 1400 g and their absorbance at 590 nm was measured.

RESULTS AND DISCUSSION

To improve pectinolytic enzyme production interspecific protoplast fusion between *Aspergillus* sp. A13 (*ade*⁻) and *Aspergillus flavipes* F7 (*lys*⁻) with polyethylene glycol (PEG 3335) was performed. Figure 1 shows a microphotography of the fusion mixture and protoplasts of both strains which remained together during membrane fusion. After fusion, auxotrophic marker complementation was found since prototrophic colonies appeared and were isolated on minimal medium containing KCl and sorbitol. Colonies appearing were presumed to be hybrids, since both parental strains were



Fig. 1 Microphotography of the fusion mixture between protoplasts from *Aspergillus* sp. A13 and *Aspergillus flavipes* F7 in phase-contrast microscopy. Amplification was: (a) $\times 40$, and (b) $\times 100$

auxotrophic and could not grow on minimal medium. The possibility that prototrophic colony development may be due to reversion of auxotrophic protoplasts is not very likely, since the reversion frequency in both strains was very low ($2.0\text{--}4.0 \times 10^{-7}$) as shown in Table 1. We obtained an interspecific fusion frequency of 1.0×10^{-2} (Table 1), which is higher than reported in other protoplast fusions of several *Aspergillus* species, for example a fusion frequency of $0.2\text{--}2.1 \times 10^{-5}$ was obtained between *A. oryzae* and *A. sajar* auxotrophic mutants (Ushijima 1991). Also, $10^{-5}\text{--}10^{-8}$ fusion frequencies between *A. niger* and *A. oryzae* have been reported (Pingyan and Kaiying 1987). The interspecific protoplast fusion frequency between *A. nidulans* and *A. fumigatus* was of the order of 10^{-5} (Ferenczy *et al.* 1977). In contrast, the frequencies obtained in this study are similar to those reported for interspecific fusions between *Aspergillus nidulans* FGSC 407 and seven strains of *Aspergillus rugulosus* ($2\text{--}3 \times 10^{-3}$) (Kvevi and Peberdy 1984). In the work presented here the frequency fusion without PEG (0.5×10^0) clearly shows the importance of this compound also in protoplast fusion between *Aspergillus* sp. A13 and *A. flavipes* F7 (Table

1). All prototrophic colonies developed were transferred many times in MM with the aim of selecting more stable hybrids. Only 13 were selected, these were grown on lemon peel at 29°C and 37°C to evaluate pectinase production and were compared with wild-type strains of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795. As shown in Fig. 2a, at 72 h and 37°C nine hybrids exhibited similar production to the largest producer, and four hybrids named HH, HF, HJ and HE displayed higher pectinase production than both strains. However, this difference was not observed at 29°C (Fig. 2b), therefore, the four hybrids were selected for further studies.

These results led us to follow the kinetics, not only of endo-pectinase but also pectin-lyase and exo-pectinase production of wild-type strains and hybrids (HH, HF, HJ, HE) grown on MF medium containing lemon peel at 37°C . Figure 3a shows that endo-pectinase production was detected after 24 h of fermentation in *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and proceeded linearly until 5 d. Endopectinolytic activity production by *A. flavipes* ATCC-16795 was also detected at 24 h but reached only 6.5 U ml^{-1} at 120 h while the other strain

Table 1 Properties of the auxotrophic mutant strains and fusion frequencies

Mutant strains	Spore colour	Phenotype	Spore reversion frequency	Protoplast reversion frequency	Fusion frequency
<i>Aspergillus</i> A13	white	sde ⁻	2.0×10^{-7}	4.0×10^0	1.0×10^{-2} (with PEG)
<i>A. flavipes</i> F7	brown	lys ⁻	3.0×10^{-7}	2.0×10^{-7}	0.5×10^{-6} (without PEG)

Reversion frequency was defined as the ratio of number of protoplasts regenerated in minimal medium and complete medium plates. For protoplast regeneration, KCl was added for A13 and sorbitol for F7 both at concentration 0.7 mol l^{-1} .

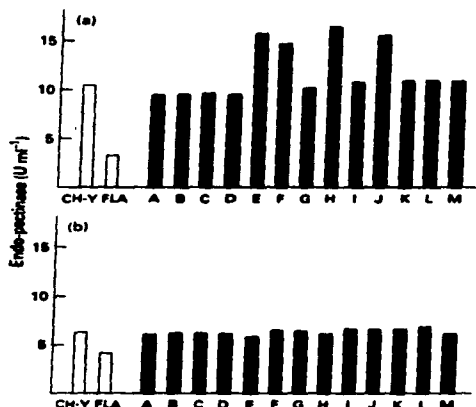


Fig. 2 Comparison of endopectinolytic activity production among hybrids, *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 grown on lemon peel for 72 h at (a) 37°C and (b) 29°C

produced 23.0 U ml⁻¹. Higher activity was observed after 48 h of fermentation in hybrids with respect to *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. Endo-pectinase production at 120 h was 130% in HH, HE and HF, but in HJ it was 150% with respect to the same wild-type strain (Fig. 3a). Pectin-lyase production was also higher in hybrids HE and HJ (211–222%) at 48 h, and at 72 h of culture, HJ, HE, HF and HH showed 155, 138, 118 and 119 respectively in relation to *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (Fig. 3b). After this time, a fall in pectin-lyase activity was observed, which could be due to proteolytic degradation, as observed in other species of genus *Aspergillus*. Susceptibility of pectin-lyases to the action of acid proteases which are liberated in the medium has been reported in *Aspergillus niger* (Kusters van Someren *et al.* 1992). On the other hand, exo-pectinase production was similar in hybrids and *Aspergillus* sp. CH-Y-1043, while *A. flavipes* presented lower production (Fig. 3c).

Maximal specific activities were obtained to determine if the increases in enzymatic activity were due to more growth. The HJ hybrid showed more growth than the other strains which was also related to greater endo-pectinase activity. However, as shown in Table 2, specific activity of HJ (15.8 U mg⁻¹) is higher than that of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043

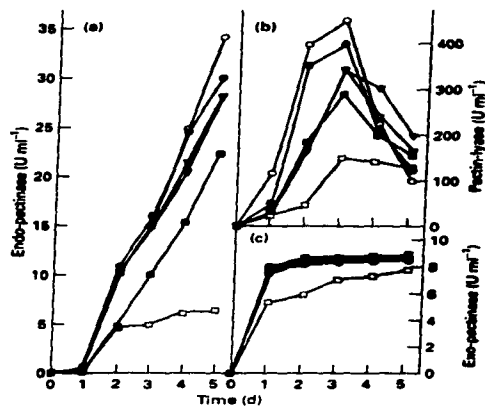


Fig. 3 Pectinolytic production profiles of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (■), *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 (□), hybrid HJ (○), hybrid HE (●), Hybrid HH (▽) and hybrid HF (▼) grown on 1% lemon peel. All values are the mean of three determinations

(12.8 U mg⁻¹) which indicates that other factors are probably also involved in the rise of specific endo-pectinase activity and that this is not only due to an increase in growth.

Table 2 also shows that the other three hybrids displayed a greater specific endo-pectinase activity than the wild-type strains of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and *A. flavipes* ATCC-16795, even though they showed less growth than HJ. With respect to the pectin-lyase activity, hybrids HJ and HE showed specific activities of 209 and 220 U mg⁻¹ at 72 h respectively which are 119 and 125% higher with respect to *A. flavipes*, the wild-type strain with highest specific activity (175.2 U mg⁻¹). On the other hand, the HH and HF activities were slightly higher. Table 2 also shows that hybrids HE, HH and HF had a specific exo-pectinase activity similar to *Aspergillus* sp. CH-Y-1043, but which is approximately half of that obtained by *A. flavipes*.

These results indicate that there is an improvement of endo-pectinase and pectin-lyase production and in the specific activity of the four hybrids of these enzymes, but particularly of hybrid HJ. This is an interesting fact regarding the practical potential of this new strain in extracellular pectinase production from agroindustrial by-products. At present, the

Table 2 Growth and specific pectinolytic activities produced by hybrids and parental strains

Strains	Mycelial protein (mg ml ⁻¹)	Endo-pectinases		Pectin-lyases		Exo-pectinases	
		U mg ⁻¹ protein	%	U mg ⁻¹ protein	%	U mg ⁻¹ protein	%
<i>Aspergillus</i> CH-Y-1043	1.74	12.8	100	167.2	95	4.92	55
<i>A. flavipes</i> ATCC-16795	0.87	7.3	57	175.2	100	8.94	100
Hybrid HJ	2.15	15.8	123	209.3	119	3.93	44
Hybrid HE	1.82	16.4	128	219.7	125	4.83	54
Hybrid HH	1.87	14.9	116	184.4	105	4.75	53
Hybrid HF	1.84	15.2	118	185.8	106	4.74	53

Growth and enzymatic determinations were carried out with samples of 120 h of fermentation on 1% lemon peel except for pectin-lyases (72 h).

data presented here cannot be compared to other pectinolytic enzyme production by hybrids obtained by protoplast fusion because as far as we know there are no published data on protoplast fusion of pectinolytic fungi. In conclusion, these results indicate that protoplast fusion is an important tool to improve the production of pectinolytic multi-enzymatic system in fungi.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express gratitude to Angeles López for secretarial assistance, José Avilés for photographic work and I. Pérez-Montfort for translation of the manuscript. This work was partially supported by a grant from Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado, UNAM, Project D/CCH/9262.

REFERENCES

Aguilar, G. and Huitrón, C. (1986) Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 9, 541-545.
 Aguilar G. and Huitrón, C. (1987) Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme and Microbial Technology* 9, 690-696.
 Aguilar G. and Huitrón, C. (1990). Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnology Letters* 12, 655-660.
 Aguilar G., Trejo, B., García, J. and Huitrón, C. (1991) Influence of pH on endo and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Canadian Journal of Microbiology* 37, 912-917.

Delgado, L., Trejo, B., Huitrón, C. and Aguilar, G. (1993) Pectin-lyase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 515-519.
 Ferenczy, L., Szegedi, M. and Kevei, F. (1976) Interspecific protoplast fusion and complementation in *Aspergilli*. *Experientia* 32, 184-186.
 Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. (1983) Pectic enzymes. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*, ed. Fogarty, W.M. pp. 131-182. London: Elsevier Applied Science.
 Hoh, Y.K., Taan, K.Y. and Yeoh, H.H. (1992) Protoplast fusion of β -glucosidase producing *Aspergillus niger* strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 37, 81-88.
 Kevei, F. and Peberdy, J. (1984) Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the *Aspergillus nidulans* group. *Journal of General Microbiology* 130, 2229-2236.
 Kusters van Sommeren, M.A., Flippi, M., Graff, L., van den Broeck, H., Kester, H. Hinnen, A. and Visser, J. (1992) Characterization of the *A. niger* pel B gene: structure and regulation of expression. *Molecular and General Genetics* 34, 113-120.
 Larios, G., García, J.M. and Huitrón, C. (1989) Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CG-Y-1043. *Biotechnology Letters* 11, 729-734.
 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
 Peberdy, J.F. (1989) Presidential address: fungi without coats protoplast as tools for mycological research. *Mycology Research* 93, 1-20.
 Peberdy, J.F. (1992) Fungal protoplast. In *More Gene Manipulations in Fungi* ed. Bennett, W. pp. 307-318. Academic Press.
 Pilknik, W. and Voragen, G.J.A. (1993) Pectic enzymes in fruit and vegetable fruits manufacture. In *Enzymes and Food Processing* ed. Ngodawithana, T. and Reed, G. p. 363. Academic Press.
 Pingyan, L. and Kaiying, C.H. (1987) Virus transmission through interspecies protoplast fusion in *Aspergillus* strains. *Transactions of the British Mycological Society* 1, 73-81.

Saval, S. and Huitrón, C. (1983) Microbial pectinases from henequen pulp. *Developments in Industrial Microbiology* 20, 547-551.

Solis, S., Flores, M.E. and Huitrón, C. (1996) Protoplasts from pectinolytic fungi: isolation, regeneration and pectinase production. *Letters in Applied Microbiology* (in press).

Ushijima, S. (1993) Improvement of industrial *Aspergillus* fungi. In *Biochemistry Handbooks* ed. Smith, J.E. pp. 41-64. New York: Plenum Press.

Ushijima, S., Nakadai, T. and Uchida, K. (1991) Interspecific electrofusion of protoplasts between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Agricultural and Biological Chemistry* 65, 129-130

**"OBTENCION Y CARACTERIZACION DE SEGREGANTES
INDUCIDOS POR LA *p*-FLUOROFENILALANINA EN
HIBRIDOS INTERESPECIFICOS DE *Aspergillus*".**

Solis, S.; Flores, M.E. y Huitrón, C.

Artículo en preparación para enviar a la revista Biotechnology Letters.

Obtención y caracterización de segregantes inducidos por la *p* - fluorofenilalanina en híbridos interespecie de *Aspergillus*

SARA SOLÍS; MARÍA ELENA FLORES Y CARLOS HUITRON

Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. A. P. 70228, México, D.F. 04510.

La segregación de híbridos interespecie por un agente haploidizante, se usó para obtener cepas estables, mejoradas en su capacidad de producir pectinasas. La fusión de protoplastos se realizó entre las cepas pectinólíticas *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 y *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 cuyas temperaturas óptimas de producción son de 37°C y 29°C respectivamente y producen diferentes perfiles de actividades pectinólíticas. Inicialmente los híbridos que aparecieron en el medio mínimo de regeneración fueron heterocariotes. El tratamiento de las cepas con la *p*-fluorofenilalanina permitió obtener sectores segregantes, entre los cuales se seleccionaron los segregantes denominados HL, HV, HB y HP que incrementaron la producción de endopectinasas a 29 °C y 37 °C y el segregante HZ que incrementó 4.5 veces la producción de pectina liasas en ambas temperaturas. Estas cepas se han mantenido estables después de muchas resiembras.

INTRODUCCION

Los hongos filamentosos del género *Aspergillus* son de especial interés debido a su habilidad para secretar metabolitos y enzimas que son requeridas para su aplicación en procesos industriales. Entre estas enzimas, las pectinasas tienen importancia biológica y práctica por su papel en patogénesis de plantas (Collmer and Keen, 1986), en la maduración de frutas y vegetales (Bennet and Della Penna, 1987) y en el procesamiento de alimentos, principalmente en la recuperación y clarificación de jugos de frutas (Voragen, 1986).

Un actividad importante en los microorganismos productores de compuestos de interés industrial es el mejoramiento genético de cepas. A través de la mutagénesis se han obtenido cepas sobreproductoras de la actividad endopoligalacturonasa en *Aspergillus niger* (Antier et al. 1993) y *Penicillium occitanis* (Jain et al. 1990) y la poligalacturonasa de *Penicillium sp.* (Sajer, 1974). También han sido obtenidas transformantes de *Aspergillus niger* que incrementaron la producción de la poligalacturonasa (Bussink et al. 1992). Nosotros estamos interesados en la producción de pectinasas *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 cuyos filtrados enzimáticos presentan al menos cuatro tipos de actividades pectinólíticas: endopectinasas, exopectinasas, pectina liasas y pectina esterases (Larios et al. 1989; Aguilar et al. 1991; Delgado et al. 1993). Como parte de los estudios del mejoramiento genético de esta cepa han sido obtenidas mutantes que incrementaron la producción de la endopoligalacturonasa (Solís et al. 1990).

Desde el punto de vista biotecnológico, si bien es importante obtener cepas altamente productoras de alguna de las enzimas que componen el sistema pectinólítico, también es conveniente explorar otras alternativas para incrementar los rendimientos y la eficiencia de las pectinasas como sistema multienzimático. En este sentido, la fusión de protoplastos descrita inicialmente por Peberdy en 1979, aumenta la probabilidad de recombinación de grandes segmentos del genoma de un organismo a otro, lo cual haría factible la transferencia y expresión de segmentos de DNA que

codificaran para un complejo multienzimático. La fusión de protoplastos ha sido aplicada para el mejoramiento de cepas industriales y se han obtenido híbridos interespecie de *Aspergillus* que incrementaron simultáneamente la producción de varias de las enzimas hidrolizantes que se requieren para la elaboración de alimentos fermentados (Ushijima, 1993).

En base a estos estudios y a la naturaleza multienzimática compleja del sistema pectinolítico de *Aspergillus sp.* consideramos la fusión de protoplastos como alternativa para obtener cepas con nuevas proporciones de componentes enzimáticos. Recientemente reportamos la obtención y fusión de protoplastos entre *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 y *A. flavipes* ATCC-16795 que producen pectinasas a 37 °C y 29 °C respectivamente, en donde se obtuvieron híbridos sobreproductores de endopectinasas y pectina liasas (Solís, et. al. 1996; 1997), sin embargo, los híbridos fueron inestables. Agentes recombinógenos, como el benomil, la *p*-fluorofenilalanina (PFA), el metilbenzimidazol-2-il-carbamato (MBC) y el hidrato de cloral, inducen la haploidización durante el ciclo parasexual que se presenta en hongos filamentosos (Caten, 1981) y han permitido la obtención de haploides estables mejorados en la producción de ácido cítrico (Kirimura et al. 1988) y enzimas (Bermúdez-Tórres et al. 1992; Ushijima et al. 1987, 1990).

En este trabajo reportamos la fusión de protoplastos de *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 y *A. flavipes* ATCC-16795, y el tratamiento de los híbridos con la PFA, con el fin de obtener híbridos estables mejorados en la producción de pectinasas.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Las cepas silvestres *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 (esporas blancas) y *Aspergillus flavipes* ATCC-16795 (esporas café) se utilizaron como cepas prototróficas. Las mutantes auxotróficas obtenidas a partir de ellas fueron *Aspergillus* A13 (adc⁻) y *A. flavipes* F7 (his⁻) (Solís et al. 1996).

Medios y condiciones del cultivo

Propagación: Las cepas prototróficas se crecieron en medios de papa dextrosa agar (PDA) a 37°C (*Aspergillus sp.*) y a 29 °C (*A. flavipes*). Las cepas mutantes se crecieron en medio completo (MC) conteniendo (p/v): 2% glucosa, 0.3% extracto de levadura (Difco) y 0.3% de bactopectona y 2% de agar bacteriológico. El medio mínimo (MM) contenía (p/v): 2% de glucosa, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄, 0.3% NaNO₃ y 2% de agar bacteriológico. El pH se ajustó a 4.5 con H₂SO₄ 2N. El medio para la producción de enzimas contenía (p/v): 0.2% (NH₄)₂ SO₄ y 1% de cáscara de limón y se esterilizaron por separado. El pH inicial se ajustó a 3.0.

Obtención y fusión de protoplastos.

Las condiciones empleadas para la obtención y fusión de protoplastos, han sido detalladas en trabajos previos (Solís et al. 1996, 1997). Los híbridos que aparecieron en MM se trataron de la siguiente manera: toda la población de esporas fue mezclada con MM (35°C) conteniendo 0.5% de agar bacteriológico y posteriormente se transfirió a placas y después de que solidificó el medio se incubaron a 29°C. Las colonias que presentaron un crecimiento vigoroso se seleccionaron y posteriormente estas colonias se crecieron en MC conteniendo 1 mg ml⁻¹ de PFA durante 15 días a 29°C. Los sectores segregantes que aparecieron en las colonias fueron purificados y posteriormente se seleccionaron aquellas que mantuvieron la prototrofia al crecer en MM.

Ensayos para la determinación de la actividad enzimática.

Las condiciones para la producción de pectinasas en las cepas segregantes y progenitores ha sido reportada previamente por Solís et al. (1997) y las mediciones de las actividades enzimáticas se realizaron en los filtrados libres de células. La actividad de endopectinasas se determinó por la reducción en la viscosidad de una solución de pectina al 1% a pH 4.2, usando un viscosímetro Ostwald, de acuerdo a Larios et al. (1989).

Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima que reduce al 50% la viscosidad inicial de una solución de pectina. La actividad de exopectinasas se determinó por la cuantificación de los grupos reductores liberados a partir de la pectina, como ha sido previamente reportado por Aguilar y Huitrón (1986). Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de equivalentes de ácido galacturónico h^{-1} a pH 5.0. La actividad de pectina liasa se determinó monitoreando el incremento en la absorbancia a 235 nm bajo las condiciones de ensayo reportadas por Delgado et al. (1993) (pectina 1%, buffer Tris-HCl pH 8.8, 40°C, 2h). Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.1 en la absorbancia a 235 nm en la mezcla de reacción.

Proteína micelial.

El micelio precipitado después de centrifugar 10 ml del cultivo, se resuspendió en 2.0 ml de ácido tricloroacético al 10% y almacenado a 4 °C durante la noche. Las muestras se homogenizaron durante 15 min y después centrifugadas a 3500 rev min^{-1} por 15 min. El precipitado se resuspendió en una sol. de NaOH 0.66 N. Se utilizaron alícuotas de 0.2 ml para cuantificar la proteína por el método de Lowry con albúmina sérica bovina (ASB) como estándar (Lowry et al. 1951). Después de la reacción las muestras se centrifugaron a 3500 rev min^{-1} .

Estimación del contenido de DNA.

La estimación del contenido de DNA se realizó por el método de Schneider (1946). Una alícuota de 10^7 conidias ml^{-1} en agua destilada, se utilizó para cada determinación. Las conidias lavadas y centrifugadas se resuspendieron en 2 ml de ácido perclórico 0.5 N (APC) a 0°C por 30 min para remover el material soluble en ácido frío. El material insoluble se colectó por centrifugación y se descartó. Posteriormente, las células se resuspendieron en 2 ml de agua destilada y 2 ml de ATC 0.5 N a 0°C. Después se incubaron las muestras en hielo durante 15 min para remover los compuestos de bajo peso molecular. Los ácidos nucleicos se hidrolizaron calentando a 80 °C durante 20 min en 2 ml de ATC. El hidrolizado se enfrió a 0°C, y después se centrifugó para recuperar el sobrenadante. Se realizó una reextracción del precipitado a 80°C por 20 min en 2 ml de APC 0.5N y se mezclaron los sobrenadantes. El DNA se estimó utilizando el reactivo de la difenilamina por el método de Burton (1956) usando DNA de timo de cabra como estándar.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

La electroforesis se realizó de acuerdo al método de Laemmli (1970), con un gel de resolución que contenía (p/v): acrilamida al 10%, bis-acrilamida (Bio-Rad) 2.7% y ASB 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El gel concentrador contenía acrilamida 4% y bis-acrilamida 2.7%. La concentración de SDS (Bio-Rad) fue de 0.1% en los geles y en el buffer de corrimiento. El buffer de la muestra contenía: SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, Tris-HCl 125 mM pH 6.8 y azul de bromofenol 0.003%. Las muestras se mezclaron con buffer de muestra y colocadas en un baño a ebullición durante 1 min. Las muestras se corrieron en un gel vertical de 1.5 mm a 30 mA durante 5 h en una cámara de electroforesis SE-600 (Hoefer Scientific Instruments). Las proteínas se fijaron y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizó la fusión de protoplastos entre *Aspergillus sp. A13* (ad^c) y *A. flavipes F7* (lis^c) con el fin de obtener cepas estables y mejoradas en su producción de pectinasas. Las colonias protótrofas recuperadas en MM después de la fusión, presentaron conidias del tipo de ambos padres (blancas y café), morfología irregular y crecimiento lento. Cuando algunas de estas colonias se subcultivadas en MM y MC, se observó la segregación de las mutantes progenitoras. Estos resultados sugieren que las cepas eran heterocarionces, ya que estas características han sido utilizadas para describirlos en fusiones realizadas en *Aspergillus* por Ogawa et al. (1989) y Kirimura et al. (1987).

Existen muchos reportes en *Aspergillus* en donde se ha mejorado la producción de compuestos mediante la diploidización de los heterocariotes y su haploidización con benomyl o PFA que interfieren con la subunidad β de la tubulina, causando pérdida de cromosomas al azar hasta alcanzar el estado haploide que es el más estable (Kevci y Peberdy, 1970, Caten, 1981). En este trabajo, se recolectaron las esporas de las colonias prototróficas para ser cultivadas en MM suave, a fin de seleccionar las colonias que aparecieron desde las primeras 24 h del cultivo, ya que ha sido establecido que aquellas que presentan un crecimiento más vigoroso se caracterizan por complementar mejor las auxotrofías que los heterocariotes, lo cual les permite crecer más rápido (Anné, 1982 ; Kiriimura et al. 1990). En base a este criterio se seleccionaron ocho colonias que mostraron diferencias morfológicas con respecto a los progenitoras y también se observó un mayor tamaño en las conidias, lo cual también sugiere su estado diploide. Posteriormente las esporas de estas colonias fueron platicadas en MC conteniendo PFA para obtener colonias aisladas, en donde fue observada la aparición de sectores segregantes. Bajo estas mismas condiciones las cepas progenitoras no segregaron sectores, lo cual indicó su estado haploide.

Se obtuvieron 82 segregantes, muchos de los cuales presentaron requerimientos auxotróficos, aunque también se aislaron cepas que crecieron en MM. Cinco segregantes prototróficos denominados HB, HV, HL, HP y HZ presentaron un buen crecimiento tanto a 37 °C como a 29 °C, a diferencia de *Aspergillus sp.* y *A. flavipes* que crecen mejor a 37 °C y 29 °C respectivamente. La tabla 1 presenta la comparación de algunas características de los segregantes seleccionados y los progenitoras.

Tabla 1
Propiedades de los segregantes y de las cepas progenitoras

cepas	pigmento extracelular	crecimiento		conidióforos	color de conidias
		29°C	37°C		
progenitoras					
<i>Aspergillus</i> A13	-	lento	bueno	abundantes	blanco
<i>A. flavipes</i> F7	café	bueno	lento	escasos	café
segregantes					
III	amarillo	bueno	bueno	escasos	blanco
III'	-	bueno	bueno	escasos	blanco
IV	-	bueno	bueno	escasos	blanco
HZ	café	bueno	bueno	abundantes	café

Las cepas fueron crecidas durante cinco días en MM.

Como parte de la caracterización de las cepas, se determinaron las actividades pectinolíticas volumétricas y específicas, producidas por los segregantes y las cepas progenitoras al ser crecidas en cáscara de limón. Los segregantes HL, HV, HB y HP incrementaron 146 % la actividad endopectinolítica a 37°C con respecto a *Aspergillus sp.* CH-Y-1043, mientras que el segregante HZ produjo una actividad similar a *Aspergillus flavipes* ATCC-16795, la cual es cinco veces menor que la de *Aspergillus sp.* (Fig. 1A). Cuando las cepas se crecieron a 29°C se detectaron incrementos de 191 %, 170 % y 220 % en HV, HP y HL respectivamente, en relación al más productivo de los progenitoras. Los segregantes HB y HZ produjeron una actividad pectinolítica similar a *Aspergillus sp.* y *A. flavipes* respectivamente (Fig. 1B).

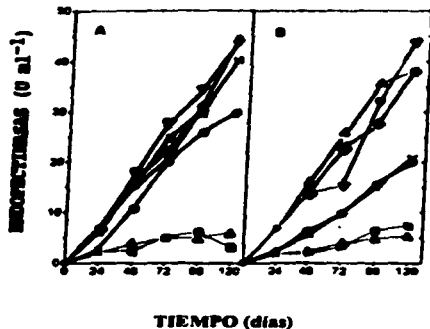


Fig. 1. Perfiles de producción de endopectinasas por segregantes HZ (Δ), HB (\square), HP (\circ), HV (\diamond), HL (\oplus) y progenitoras *Aspergillus* sp CH-V-1043 (\circ) and *A. flavipes* ATCC-16795 (\oplus) crecidas a 37°C (A) and 29°C (B).

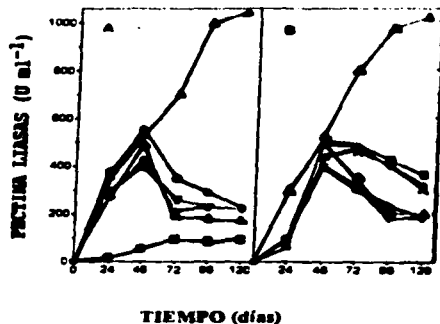


Fig. 2. Perfiles de la producción de pectina liasa por las cepas segregantes y progenitoras. Los símbolos y condiciones son los mismos de la figura 1.

Durante el cultivo, también se determinó la cinética de producción de pectina liasas (Fig. 2 A y 2 B), en donde únicamente el segregante HZ incrementó la producción de estas enzimas (450 % y 275 % a 37 °C y 29 °C respectivamente). Fue muy interesante observar que en HZ no se presenta la caída en la curva de actividad como en las otras cepas. La pérdida de la actividad de pectina-liasas en *Aspergillus niger* ha sido atribuida a la presencia de proteasas en el medio de cultivo (Kusters van Someren, 1992). No sabemos las causas del incremento en la producción de estas enzimas en HZ con respecto a las otras cepas, aunque pudieran ser considerados algunos factores como mayor secreción, resistencia a proteasas o una mayor estabilidad al pH o temperatura de las pectina liasas.

Se determinó la actividad específica a partir de la proteína micelial obtenida al final de los cultivos (Fig. 3). Los incrementos en la producción de endopectinasas detectada en los segregantes HP, HL, HV a 29°C no se debieron solamente a un mayor crecimiento ya que la actividad específica es hasta un 75 % mayor que en los progenitores. En relación a la actividad de pectina liasas el segregante HZ aumentó la actividad específica de 3 y 2.5 veces a 37 °C y 29 °C respectivamente, con respecto a los progenitores. A través de segregación inducida por agentes haploidizantes también se logró la obtención de cepas estables que incrementaron la producción de ácido giberélico (Bermúdez-Torres et al. 1992), proteasas y amilasas (Kirimura et al. 1989) y celulasas Sandhu y Bawa (1992). Aunque no han sido establecidos los eventos genéticos que causan el incremento de los productos en los híbridos, podría sugerirse, que durante el proceso de haploidización, ocurren mutaciones en genes, tales como integraciones, duplicaciones o la eliminación de fragmentos de genes que modifiquen la producción o secreción de enzimas.

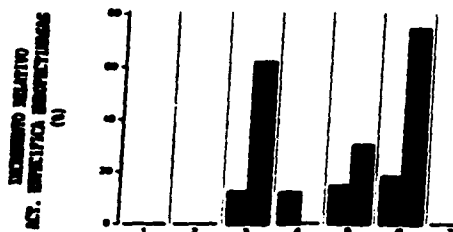


Fig. 3 Incremento relativo de la actividad específica de las endonucleasas en los segregantes: (3) HV; (4) HB; (5) HP; (6) HL; (7) HZ, con respecto a los progenitores: (1) *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 and (2) *A. flavipes* ATCC-16795. Las determinaciones fueron realizadas a las 120 h. a 29°C (■) y 37°C (□).

Un método generalizado para determinar el grado de ploidía de los segregantes es la determinación del contenido de DNA, por lo cual en este trabajo fue estimado el contenido de éste en las cepas progenitoras y en los segregantes. En la tabla 2 se muestran los resultados, en donde se puede observar que los segregantes presentan un contenido de DNA similar al de las cepas progenitoras.

Tabla 2
Contenido de DNA en las cepas segregantes y progenitoras.

Progenitoras	cont. DNA /conidia (10 ⁻⁷ µg)	segregantes	cont. DNA / conidia (10 ⁻⁷ µg)
<i>Aspergillus</i> sp. CH-Y-1043	5.52 (± 0.52)	HZ	4.77 (± 0.30)
		HP	5.21 (± 0.57)
		HL	5.33 (± 0.52)
<i>A. flavipes</i> ATCC-16795	4.99 (± 0.34)	HP	5.09 (± 0.32)
		HB	5.80 (± 0.44)

Estos resultados son el promedio de cinco determinaciones.

La caracterización de los segregantes en base a su ploidía, no es fácil debido a que se requieren de métodos analíticos muy precisos para identificar las etapas de heterocarión, diploide, así como los diferentes estados de aneuploidía que se presentan durante la haploidización. Además, en algunos casos, algunas etapas pueden escapar a su detección, como p. ej. en *Fusarium*, en donde la fase diploide demostró ser transitoria (Molnar et al., 1990) y también en *Cephalosporium* en donde los protótrofos seleccionados inicialmente fueron haploides y no pudieron ser detectadas las etapas de heterocarión y diploide (Hamlyn y Ball, 1979). Los segregantes obtenidos en este estudio, se han mantenido estables durante muchas resiembras y han mantenido su capacidad de producción de

pectinasas. Cuando las cepas se cultivaron nuevamente en presencia de la PFA no mostraron capacidad para segregar sectores. Estos resultados aunados a un contenido de DNA similar entre las cepas progenitoras y los segregantes, sugieren la haploidía de las cepas.

La comparación de perfiles electroforéticos de las proteínas presentes en los filtrados enzimáticos de las cepas progenitoras y el segregante HZ se presenta en la Fig. 4 en donde se observa que el segregante HZ presenta un perfil de proteínas diferente a los progenitores y confirma su genotipo recombinante.

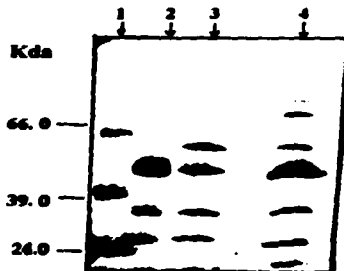


Fig 4. Electroforesis en gel desnaturalizante de las proteínas extracelulares producidas por las cepas progenitoras *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (2); *Aspergillus flavipes* (3) y el segregante HZ (4). (1): son marcadores de peso molecular.

En este trabajo, la fusión de protoplastos interespecie y la segregación inducida por PFA permitió la obtención de nuevas cepas con diferentes propiedades en relación a los progenitoras, lo cual indica que es un sistema adecuado para se llevar a cabo el mejoramiento genético de cepas de interés industrial.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores desean agradecer a Gabriela Angeles y José Avilés por su trabajo gráfico y fotográfico. Este trabajo fue apoyado en parte por una beca del Programa de Apoyo a las Divisiones del Posgrado, UNAM.

REFERENCIAS

- Aguilar G. and Huitrón C. 1986. Application of feed batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp.. *Enzyme and Microbial Technology*. 9: 541-545.
- Aguilar, G.; Trejo, B.; García, J. y Huitrón, C. (1991). Influence of pH endo and exopectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* 9: 541-545.
- Anná, J. (1982). Genetic evidence for selective cromosomal loss protoplast fusion of *Penicillium* from *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium stoloniferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 14: 191-196.
- Antier P.; Minjares, A.; Roussos, S.; Raimbault, M. y Viniçgra-González, G. (1993). Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 254- 260.

- Bennet, A.B. and Della-Penna, D. (1987). Polygalacturonase: its importance and regulation in fruit ripening. In : Plant senescence: its biochemistry and physiology. W.W. Tomson , E.A. Nothnagel eds. Academic Press.
- Bermudez-Torrez, K.; Bruckner, B and Meier, B. (1992). Obtaining mutants for protoplast fusion of Gibberellin-forming *Gibberella fujikuroi* strains. Applied Biochem. and Biotechnology. 33: 83-95.
- Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanisms of the properties of difenilamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acids. Biochem. J. 62: 315-323.
- Bussink, H.J., van den Homberg J.P., van den Ijssel and Visser, J. (1992). Characterization of polygalacturonase-overproducing *A. niger* transformants. Applied. Microbiol. Biotechnol. 37: 324-329.
- Caten, C.E. (1981). Parasexual processes in fungi. In : The fungal nucleus. K. Gull and S.G. Oliver eds. pp. 191-214. Cambridge University Press. Cambridge.
- Collmer, A. and Koen, T. (1986). The role of pectic enzyme in plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathology. 24: 383-409.
- Delgado, L.; Trejo, B.; Huitrón, C. y Aguilar, G. (1993). Pectin lyase production by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. Applied. Microbiol. and Biotechnol. 39: 515-519.
- Hamlyn P.F. y Ball, C. (1979). Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In: Proceedings of the third International Symposium on the Genetic of Industrial Microorganisms. O. Sebek (ed.) pp. 185-191. Washington, DC: American Society of Microbiology.
- Jain, S.; Parriche, M. Durand, H. y Teraby, G. (1990). Production of polysaccharidases by a cellulase-pectinase hyperproducing mutant (Pol6) of *Penicillium occitans*. Enzyme Microb. Technol. 12: 691-696.
- Kevei , F. y Peberdy, J. (1979). Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugosus* obtained by protoplast fusion. Mol. Gen. Genetics. 170: 213-218.
- Kirimura K, Pyro-Lee, S., Seichiro K, Usami, S. (1987). Haploid recombinants formed as sectors in the intraspecific fusants of *A. niger* producing citric acid. J. ferment. Technol. 65: 557-562.
- Kirimura K.; Imura, M.; Lee, S.; Kato, T. y Usami, S. (1989). Intergeneric hybridization between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viridae* by protoplast fusion. Agric. Biol. Chem. 53: 1589-1596.
- Kirimura, K., Pyo-Lee S., Nakajima I, Kawabe S and Usami, S. (1988). Improvement in citric acid production by haploidization of *Aspergillus niger* diploid acid. J. Ferment. Technol. 66: 375-382.
- Kusters-van Someres, M.; Flipphi, M.; Graff, L. van der Broeck, H.; Kester, H. ; Hinnen, A. y Visser, J. (1992). Characterization of an *Aspergillus niger* pectin lyase gene family: structure and regulation and expression. Mol. Gen. Genet. 244: 113-120
- Laemmli, U.J. (1970). Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 280-285.
- Larios, G., García, J.M. and Huitrón, C. (1990). Endopolygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. Biotechnol. Lett. 11: 729-734.
- Lowry, O.H, Rosenbrough, P.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Molnar, A.; Sulyok, L. and Hornok, L. (1990). Parasexual recombination between vegetatively incompatible strains in *Fusarium oxysporum*. Mycol. Research. 94: 393-398.
- Ogawa, K., Tsuchimochi, Taniguchi, K. and Nakatsu, S. (1989). Interspecific hybridization of *Aspergillus usamii* mut. *shirosumi* and *Aspergillus niger* by protoplast fusion. Agr. Biol. Chem. 53: 2873-2880.

- Pilknik, W. and Voragen, G.J.A. (1993). Pectic enzymes in fruit and vegetable juice technology. In: *Enzymes and Food Processing*. T. Nagodawithana and G. Reed eds. pp. 363. Academic Press.
- Sajer, I. (1974). Activity of polygalacturonase and pectinesterase of *Penicillium* sp. 7/4B after ethylmethimino and UV treatment. *Acta Microbiol. Polon.* 3: 119-123.
- Sandhu, D.K. and Bawa, S. (1992). Improvement of cellulase activity in *Trichoderma*. *Applied Biochem. and Biotechnol.* 34: 175-183.
- Schneider, W.C. (1946). Phosphorous compounds in animal tissues. III. A comparison of methods for estimation of nucleic acids. *J. Biol. Chem.* 164: 747-751.
- Solis, S., Flores, M.E. y Huitrón, C. (1990). Isolation of Endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Biotechnol Letters.* 12:751-756.
- Solis, S., Flores, M.E. and Huitrón, C. (1996). Protoplasts from pectinolytic fungi: isolation, regeneration and pectinase production. *Leti. Appl. Microbiol.* 23: 36-42.
- Solis, S., Flores, M.E. and Huitrón, C. (1997). Improvement of pectinases production by interspecific hybrids of *Aspergillus* strains. *Leti. Appl. Microbiol.* In Press.
- Ushijima, S., Nakadai, T. and Uchida, K. (1987). Improvement of enzymes productivities through mutation or haploidization of heterozygous diploids obtained by protoplast fusion of *A. sajei*. *Agric. Biol. Chem.* 27: 2781-2786.
- Ushijima, S., Nakadai, T. and Uchida, K. (1990). Breeding of new-Koji-moulds through interspecific hybridization between *Aspergillus oryzae* and *A. sajei* by protoplast fusion. *Agr. Biol. Chem.* 54: 1667-1679.
- Ushijima, S. (1993). Improvement of industrial *Aspergillus* fungi. In: *Biotechnology Handbooks* Ed. Smith, J.E. pp. 41-64. New York Plenum Press.
- Voragen, A.G.J., Schols, H.A., Silihu, H.A. and Pilknik, W. (1986). Enzymic lysis of pectic substances in cell walls, some implications for fruit juice technology. In: *Chemistry and function of pectins*. L.M. Fisherman and J.J. Fox eds. pp. 363. Academic Press.

**"PRODUCCION DE ENDOPECTINASAS POR HIBRIDOS
INTRAESPECIFICOS DE *Aspergillus sp.* CH-Y-1043
OBTENIDOS POR FUSION DE PROTOPLASTOS".**

Solis, S.; Flores-Sánchez y Huitrón, C.

Pectins and Pectinases (1996). En prensa.

BY TELEFAX
00 52 5 633 36 55

Instituto De Investigaciones Biomedicas
ANM. Department of Biotechnology
Apartado Postal 70228
Ciudad Universitaria
04310 Mexico

Ref: DC/ms

Tel: +31 20 485 3417
Fax: +31 20 485 5325
E-mail: d.capel@elsevier.nl

26 August 1996

Dear Dr Huitron,

Re: Pectines and Pectinases, edited by Dr J. Visser and Dr A.G.J. Voragen

Thank you for your fax message of 20 August concerning the above-mentioned book.

The book is presently in production and the expected publication date is December 1996. I have checked the contents and the article you mentioned, with Dr Sells as the first author, is included in the book.

I trust this information is satisfactory.

With kind regards,

Yours sincerely,
ELSEVIER SCIENCE

Mrs Desires J.H. Capel
(Administrative Editor)



Life Sciences

Moltenort 1
1033 AD Amsterdam
The Netherlands

P.O. Box 103
1000 AD Amsterdam
The Netherlands

Tel (+31) 20 485 3911
Fax (+31) 20 485 3269

Now available
in your
computer...



Computer in LIBRARY

80300
803011 803012
WWW:
http://www.elsevier.nl

Imprints:
Elsevier
Pergamon
North-Holland
Excerpta Medica

Subsidiary: Netherlands Bank-Unit
Netherlands 63.20.00.003
NIM Amsterdam 22100002

Endo-pectinase production by intraspecific hybrids of *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 obtained by protoplast fusion

S. Solís, E. Flores-Sánchez and C. Huitrón.

Department of Biotechnology, Institute of Biomedical Research, National University of Mexico, UNAM. A.P. 70228, Mexico City, D.F. 04510

Abstract

Protoplast fusion induced by polyethyleneglycol and Ca^{2+} was carried out between two auxotrophic mutants of *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. The hybrids obtained showed significant differences in endopectinase activity and morphology compared to the prototrophic strain. Strains grown on lemon peel showed production improvement with respect to the parental strain. Since H15 hybrid showed up to 90% higher endopectinase production than the wild type CH-Y-1043, kinetics of enzyme production in Fernbach flasks and Fermentor (14L) by H15 were determined.

1. INTRODUCTION

Microbial pectinases have a great number of applications in food industry such as the preparation of fruits and vegetables purées and olive oil extraction. Their use is important in wine and fruit juice technology since pectinolytic enzyme action results in greater yields of extracted juices and reduces the filtration time (1-2). The presence of endopectinases is essential for these applications. Commercial preparations of pectic enzymes mainly come from fungal sources, particularly from the genus *Aspergillus*.

We isolated a strain of *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 which grows better at 37°C and is capable to produce extracellularly variable amounts of inducible endo, exo-pectinases and pectin lyases when grown on pectin and a wide variety of materials containing pectin (3-6). Also, the presence of a constitutive conidial and cell bound exo-pectinase has been identified in this fungus (7). The specific activity of cell free filtrates of *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 is two times higher than the best commercial pectinases preparations and the yield of clarifying apple juice by both is similar. Factors influencing enzyme production, such as carbon and nitrogen source, temperature and pH have been studied (6-9). Our work on regulatory aspects demonstrated induction by galacturonic acid and catabolic repression by glucose (9). Recently we have been working on the isolation of protoplasts from this and other pectinolytic fungi (10) and have used them for genetic fusion through intra and interspecific

protoplast fusion, because we are interested in improving endopectinase production. Obtention of hybrids by intra and interspecific protoplast fusion has shown higher yields of enzymes which are biotechnologically interesting in the genus *Aspergillus* (11-13). In this work we describe intraspecific protoplast fusion in *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 mutant strains and the evaluation of endopectinolytic enzyme production by hybrids when were grown on lemon peel.

2. MATERIALS AND METHODS

2. 1. Strains.

Aspergillus sp. CH-Y-1043 was used as the prototrophic parental strain. The auxotrophic mutants A200 *ade* (an adenine-requiring mutant) and A400 *pyr* (a pyridoxine requiring mutant) were isolated from the parental strain by treatment with N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidina (NTG) as described previously (10).

2. 2. Media and culture conditions.

Parental cells were routinely grown in potato dextrose agar (PDA) at 37°C and the mutant strains in complete medium (CM) containing (w/v): 2% glucose, 0.3% yeast extract and 0.3% bactopectone. Minimal medium (MM) contained (w/v): 2% glucose, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KCl, 0.001% $FeSO_4$, 0.3% $NaNO_3$, pH 4.5. CM and MM were solidified with 2% bactoagar. Enzyme production medium in Erlenmeyer flasks (EP1) containing: 0.2% $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% KH_2PO_4 and 0.2% K_2HPO_4 and 1% lemon peel as sole carbon source (sterilized separately). The initial pH was 3.0. The medium for enzyme production in fermentor and Fernbach flasks (EP2) contained: 0.4% $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% KH_2PO_4 , 3% lemon peel and pH 2.8.

2. 3. Protoplast lation and fusion.

The method and conditions employed for protoplast isolation and regeneration have been detailed elsewhere (10). Fusion experiments were carried out with 10^6 protoplasts of two auxotrophs (*ade*, *pyr*) which were mixed and centrifuged 10 min at 2000 rpm. Pelleted protoplasts were resuspended in 1 ml of a solution containing (w/v) 30% polyethyleneglycol 3335 (PEG) and 0.01M $CaCl_2$ in 0.05M glycine-NaOH buffer, pH 7.5. After 10 min at room temperature, the suspension was centrifuged 10 min at 2000 rpm. The pellet was resuspended in osmotic stabilizer solution (0.7M KCl) and serial dilutions were plated for regeneration on MM and CM containing 0.7M KCl.

2. 4. Enzyme production conditions.

Experiments in 500 ml Erlenmeyer flasks and Fernbach flasks contained 200 ml and 1 L of EP1 and EP2 medium respectively. Inocula added to these cultures was 2 ml of spore suspension (5.0 optical density at 540 nm) for each 100 ml EP medium. All cultures were grown at 37°C in a shaking incubator (New Brunswick Sci. Co., USA), at 200 rpm. Then 10 ml of sample were withdrawn each 24 h during fermentation and immediately filtered through Millipore membranes of 0.45 μm pore size; these cell-free filtrates were used for enzymatic assays and extracellular protein determinations by the Lowry method (14). Experiments in the 14 L fermentor (Microgen Fermentor New Brunswick Sci. Co., USA) were carried with 10L of fermentation medium EP2 and inoculum added was 1L of mycelium grown 24 h in

Fernbach flask with the same medium (EP2). Temperature was 37°C. Aeration flow and agitation was 1 vvm and 200 rpm respectively.

2.5. Enzymatic assay

Endo-pectinases were determined by reduction of viscosity of a 1% (w/v) pectin solution at 30°C and pH 4.2 using an Ostwald viscosimeter as previously described (9). One unit was defined as the amount of enzyme which reduced the initial viscosity of the solution by 50%.

2.6. Extracellular protein.

Protein concentration was determined in cell free filtrates, according to the Lowry method (14) with bovine seric albumin (BSA) as standard.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Strains used in this study and characteristics of the mutants with respect to the parental strain are shown in Table 1. Although both A200 and A400 strains displayed a poor sporulation, their growth was different, A200 showed faster growth. Protoplasts were obtained from A200 and A400 mutants using *Trichoderma harzanium* lytic enzymes. As shown in Table 1 the protoplast yield from A200 was $1.4 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, this value was higher with respect to the protoplast number obtained from A400 mutant (0.5×10^6), in spite of incubation time of A200 mycelia being shorter. Protoplasts from mutants *ade* and *pyr* were fused with the addition of PEG and Ca^{2+} and many colonies developed after 5 days of incubation on MM plates with 0.7 M KCl, probably because they complemented auxotrophic requirements.

Of the total, twenty six hybrids were assayed for endo-pectinase production on lemon peel, because we are interested in the enzyme production from this raw material. The relative activity of the hybrids with respect to *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 is presented in Table 2. The highest increases (up to 46%) were observed in H5, H6, H15, H11, H13, H14, H10 and H25 hybrids. In some hybrids, lower values of endopectinases production with respect to parental strain were obtained.

Table 1
Characteristics of parental strain, mutants and conditions for protoplast isolation.

Strains	requirement	sporulation	growth	protoplast isolation			
				extracel. pigment	mycelial age (h)	time (h)	yield 10^6 ml^{-1}
<i>Aspergillus</i> CH-Y-1043	prototroph	good	good	--	13	0.5	1.4
A200	pyridoxine	poor	good	brown			
A400	adenosine	poor	very slow	greenish	22	1-2	0.5

Protoplasts were isolated using 2 mg ml^{-1} *Trichoderma harzanium* lytic enzymes and 0.7 M KCl as osmotic stabilizer in 0.05 M phosphate buffer

Table 2.
Comparison of relative endopectinolytic activity production between parental strain and hybrids

strains	ENDO-P (%)	strains	ENDO-P (%)	strains	ENDO-P (%)	strains	ENDO-P (%)
<i>Aspergillus</i>	100	H6	134	H13	136	H20	90
CH-Y-1043		H7	118	H14	139	H21	115
H1	84	H8	91	H15	143	H22	72
H2	75	H9	118	H16	92	H23	118
H3	96	H10	146	H17	112	H24	92
H4	78	H11	132	H18	136	H25	136
H5	136	H12	34	H19	90	H26	66

Determinations were carried out in cell free filtrates obtained at 96 h of fermentation on 1% lemon peel.

Four intraspecific hybrids were finally selected and they were grown to obtain the kinetics of endopectinases production and extracellular protein content. The course of endopectinase production by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 and hybrids during their growth on 1% lemon peel is shown in Figure 1.

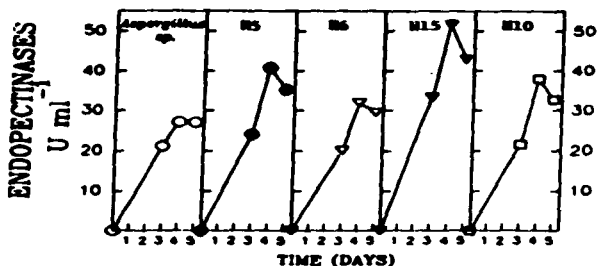


Fig. 1 Comparison of endo-pectinase production between hybrids and parental strain grown on 1% lemon peel.

In the parental strain enzymatic activity reached the maximum value at 96 h. The hybrids H5, H15 and H10 showed good activity compared to *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. Also, a difference with respect to parental strain was detected, a slight drop of activity in hybrids at 120 h. This effect was not due to changes of the pH during fermentation because it was similar in all cultures. The causes of this response in hybrids are unknown. More experiments for to evaluate the presence of proteases in the culture medium should be performed. Table 3 presents the data of the higher levels of endopectinases produced by

hybrids, extracellular protein and specific activity. The optimal strain was H15, which presented an increase of 90% with respect to the parental strain. Protein content in cell free-filtrates was also higher in hybrids and the specific activities were increased mainly in the H15 strain.

Table 3.
Increases in endopectinolytic activity in hybrids with respect to *Aspergillus sp.* CH-Y-1043

Strains	Protein (mg ml ⁻¹)	ENDO- P (U ml ⁻¹)	relative increase (%)	specific activity (U mg prot ⁻¹)
<i>Aspergillus</i> CH-Y-1043	0.310	27.17	-	87.36
H5	0.451	40.8	50	90.5
H6	0.344	32.0	40	92.9
H12	0.414	37.9	39	91.5
H15	0.441	51.6	90	116.0

Determinations were carried out in cell free filtrates obtained at 96 h of fermentation on 1% lemon peel.

Due to the potential for endo-pectinase production shown by the hybrid H15 on lemon peel, studies on fermentor using 3% lemon peel were performed. As shown in Figure 2A, maximum endopectinolytic activity was 80.0 U ml⁻¹ which is higher (60%) than the activity produced by hybrid H15 in 500 ml Erlenmeyer flasks we had previously observed in

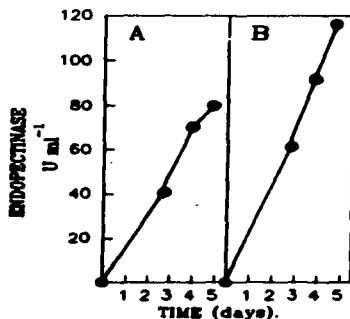


Fig. 2 Endo-pectinase production by the hybrid H15 grown on 3% lemon peel in (A) 14 L fermentor and (B) Fembach flask (2L)

On the other hand, simultaneous to the fermentation in fermenter, kinetics of endopectinase in other Fernbach flask with the same medium added as inoculum was determined. Under these conditions we found 48% more activity than in the fermenter. It is important to mention the aeration problems observed at the beginning of fermentation in the fermenter, that result in a high viscosity of the medium, then, factors affecting oxygen transference could be assessed and which probably does not occur in Fernbach flasks.

Intraspecific hybrid H15 is regarded as a useful strain exhibiting high strong endopectinase production from agroindustrial byproduct compared to parental strain *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. Also, intraspecific hybrids from *Penicillium caseicola* have been reported which produce twice the lipolytic activity than the parental strain (15) and in *Aspergillus sojae* hybrids were obtained with high protease and glutaminase activity (16). Protoplast fusion, like intraspecific fusion, has been shown in this work, to be adequate for strain improvement of pectinolytic fungi.

4. ACKNOWLEDGEMENT

The authors express gratitude to Angeles López for secretarial assistance.

5. REFERENCES

- 1 W.M. Fogarty and C.T. Kelly. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*. W.M. Fogarty (ed.) Appl. Sci. Publishers London. 1983.
- 2 W. Pilknik and E.M. Robmouts. In *Enzymes in Food Processing*. G.G. Birch, N. Brakenbrough and K.J. Parker (eds.) Appl. Sci. Publishers London. 1981.
- 3 S. Faval and C. Huitrón. Use of enzymes in food technology. P. Dupuy (ed.) *Technique et Documentation Lavoisier*. 1983.
- 4 C. Huitrón, S. Saval and M.E. Acuña. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 434 (1984) 110.
- 5 G. Larios, J.M. García and C. Huitrón. *Biotechnol. Lett.*, 11 (1990) 729.
- 6 L. Delgado, B. Trejo, C. Huitrón and G. Aguilar. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1993) 515.
- 7 G. Aguilar and C. Huitrón. *FEMS Microbiol. Lett.* 108 (1993) 127.
- 8 G. Aguilar, B. Trejo, J. García and C. Huitrón. *Can. J. Microbiol.* 37 (1991) 912.
- 9 G. Aguilar and C. Huitrón. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 9 (1986) 541
- 10 S. Solís, M. E. Flores and C. Huitrón. *Lett. Appl. Microbiol.* 1996 in press.
- 11 J.F. Peberdy. *Mycol. Res.* 93 (1989) 1.
- 12 S. Ushijima, T. Nakadai and U. Kinji. *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 2781.
- 13 K. Ogawa, M. Tsuchimochi, K. Taniguchi and S. Nakatsu. *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989) 2873.
- 14 O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Tarr and R.J. Randall. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
- 15 P. Reymond, P. Veau and M. Fevre. *Enzyme Microb. Technol.* 8 (1986) 45.
- 16 S. Ushijima. In *Biotechnology Handbook*. J.E. Smith (ed.) Plenum Pres New York. 1993.

DISCUSION GENERAL

DISCUSION GENERAL

La hidrólisis completa de la pectina, requiere la acción concertada de varias proteínas que involucran diferentes actividades enzimáticas, las cuales generalmente no son producidas por un solo organismo. En este sentido, la fusión de protoplastos podría ser una herramienta importante para obtener cepas pectinolíticas con nuevas combinaciones de genes a través de la recombinación genética, ya que mediante este sistema han sido obtenidos híbridos con propiedades mixtas de las cepas progenitoras. Para obtener microorganismos con un sistema multienzimático de pectinases mejorado, se fusionaron protoplastos intraespecie de *Aspergillus* sp. CH-Y-1643 e interespecie con *Aspergillus flavipes* ATCC-16796.

Para lograr el objetivo planteado en este trabajo, se realizó en primer lugar, el aislamiento de mutantes auxotróficas de cada una de las cepas a fusionar, para utilizarlas como marcadores y de esta manera facilitar la identificación de los híbridos resultantes. Esta estrategia ha sido la más comúnmente utilizada (Adams et al. 1987; Bradshaw et al. 1983), también se han utilizado, aunque en menor frecuencia, mutantes con marcadores de resistencia a antibióticos, fungicidas, e inhibidores metabólicos (Maráz y Subik, 1981; Minuth y Esser, 1983; Wright, 1978). Después del tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina, se obtuvieron auxótrofos para adenosina y adenina de *Aspergillus* sp. CH-Y-1643 y uno de lisina de *Aspergillus flavipes*. Un punto importante para el desarrollo de este trabajo, fue la estabilidad que mostraron las mutantes auxotróficas, ya que se obtuvieron bajas frecuencias de reversión al fenotipo prototrófico (10^{-7}) en esporas y después de formar y regenerar protoplastos. Estas frecuencias de reversión son comparables a las obtenidas en mutantes auxotróficas de *Trichoderma pseudokoningii* (Furlaneto y Pizzirani-Kleiner, 1992) y por lo tanto, los híbridos que se obtuvieron en este trabajo, pudieron ser manejados con mayor confianza como tales y no como revertantes.

Por otro lado, a diferencia de lo observado en las mutantes auxotróficas de *Claviceps purpúrea* y *Trichoderma reesei*, en donde la producción de alcaloides y celulasas disminuyeron en un 95% y 100% respectivamente (Sandhu y Bawa, 1992; Didek-Brumec et al. 1993), las mutantes *lia*⁻ y *ade*⁻ produjeron niveles similares a las cepas progenitoras en las mismas condiciones de crecimiento, de endopectininas, pectina liasas y exopectininas.

Posteriormente se hizo indispensable la optimización de las condiciones de formación y regeneración de protoplastos de las cepas mutantes, ya que aunque existe una gran cantidad de reportes en donde se detallan éstas, han sido establecidas diferentes condiciones, aún en cepas del mismo género y especie. Por esta razón, fue necesario establecer las condiciones en nuestras cepas. En este estudio, también las condiciones resultaron ser muy particulares para cada especie de *Aspergillus* utilizada. Así encontramos que las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*, que comercialmente se denominan Novozyrna 234 (Sigma), fueron las más eficientes en la obtención de protoplastos de *Aspergillus sp. ade*⁻ A13, en relación a las enzimas líticas de *Artrobacter luteus* y de las enzimas líticas de otras especies de *Aspergillus*. Una diferencia clara entre estas tres preparaciones de enzimas líticas es el elevado contenido de quitinasas presentes en la preparación enzimática Novozyrna 234 y probablemente se obtiene una mayor cantidad de protoplastos de esta mutante, en virtud de que en la pared celular de este microorganismo está presente la quitina como un componente importante, como ha sido reportado en otros hongos filamentosos por Farkas, (1985) y Wessels en (1990). Las enzimas de *T. harzianum* también mostraron una alta eficiencia en la obtención de protoplastos de cepas del género *Aspergillus* y *Trichoderma* (Collings et al. 1988; Sandhu et al. 1989 y Hashiba, 1992).

La adición de la albúmina sérica bovina (ASB) al sistema formador de protoplastos, en nuestro caso, provocó un aumento en el número de protoplastos obtenidos. Este efecto pudo deberse a la acción de las proteasas presentes en la preparación enzimática sobre la ASB, que puede actuar como sustrato adicional, disminuyendo el efecto negativo sobre los protoplastos de

A13. El efecto de las proteasas también se ha observado sobre los protoplastos de *Aspergillus oryzae* y *Flammulina velutipes*, en donde un tratamiento previo de las enzimas líticas con bentonita, disminuyó la actividad proteolítica y también se disminuyó el efecto negativo sobre los protoplastos (Kitamoto et al. 1988).

Tal como se mencionó anteriormente, las condiciones de formación de protoplastos de *Aspergillus flavipes* F7 no resultaron ser las mismas que en *Aspergillus* sp. A13. En este caso, la mejor preparación enzimática mostró ser el filtrado de *Aureobasidium* sp. CH-M-1018, un hongo que es celulolítico verdadero y que se aisló en nuestro laboratorio (Larios, et al. 1982; Huitrón et al. 1984; Gilbón et al. 1986). A la fecha, no existen reportes de la aplicación de enzimas celulolíticas obtenidas de organismos pertenecientes al género *Aureobasidium*, para la obtención de protoplastos de hongos filamentosos. Aunque nuestra preparación mostró ser eficiente en la formación de protoplastos, la adición de las enzimas de *T. harzanium* produjo un aumento de 727 % en el número de protoplastos, lo cual indica que para una buena formación de protoplastos, se requiere de la acción de diferentes enzimas líticas que no son producidas por un mismo organismo y por lo tanto existe complementaridad entre las preparaciones usadas. En muchos otros casos, la adición de mezclas de enzimas comerciales ha permitido una formación de protoplastos más eficiente (Hashiba y Yamada, 1982 ; Abe et al. 1982).

En relación a las condiciones de regeneración obtenidas para A13 y F7, nuevamente se observaron diferencias entre las cepas en cuanto al tipo de estabilizador osmótico que permite un mayor porcentaje de regeneración de los protoplastos. Para *Aspergillus* sp. A13, el KCl fue el estabilizador en donde se obtuvo el mayor porcentaje de regeneración (83 %) a diferencia de la regeneración de protoplastos de *A. flavipes* F7, en donde el sorbitol fue el único estabilizador entre los probados, en donde se obtuvo un 57% regeneración. Ambas frecuencias son mayores que las determinadas en otras especies de *Aspergillus*, las cuales no han pasado de un 30 % (Ogawa et al., 1989; Kiyohara et al. 1990). Las causas de las variaciones en las frecuencias de

regeneración entre las cepas aun no han sido esclarecidas, aunque algunos autores han atribuido las bajas frecuencias de regeneración a una incubación prolongada con las enzimas líticas que pueden dañar la membrana o bien, favorecer la obtención de protoplastos anucleados que son incapaces de regenerar (Lakshmi y Chandra, 1993; Silveira y Azevedo, 1987).

Por otro lado, la formación y regeneración de protoplastos de las mutantes A13 y F7, tampoco afectó negativamente su capacidad de producción de endo-pectinasas, exo-pectinasas y pectinaerasas, las cuales como ya se mencionó, tampoco se vieron afectadas por los marcadores auxotróficos. Estos hechos son importantes, ya que ha sido observado que durante la formación y regeneración de los protoplastos puede haber modificaciones en la producción de compuestos, inclusive pueden perder su capacidad para hacerlo, como en los protoplastos regenerados de cepas productoras de antibióticos y enzimas (Hotta et al., 1988; Kuwabara et al. 1989).

La fusión de protoplastos, es la parte más importante del proceso de obtención de híbridos. Para incrementar la fusión que ocurre espontáneamente a bajas frecuencias (Ferenczy, 1981), se ha utilizado principalmente el polietilenglicol (PEG), (Hopwood, 1981; Anné, 1983), y aunque en menor frecuencia, también se ha reportado el uso de otros compuestos como el NaNO_3 (Power et al. 1979), solución de Ca^{2+} a pH elevado (Toister y Loyter, 1971) y el polivinil alcohol (Nagata, 1978). Se ha observado que el tiempo de exposición, así como el peso molecular del PEG, son determinantes para obtener un buen porcentaje de híbridos. En nuestro caso, utilizando PEG 3350 en presencia de Ca^{2+} a pH 7.5 (Kao y Saleem, 1988) y un tiempo de exposición de 10 minutos se obtuvieron frecuencias de fusión de 10^{-2} , a diferencia de una frecuencia de 10^{-6} cuando no se usó el PEG. Esta frecuencia es mayor que las observadas en otras fusiones interespecie realizadas en el género *Aspergillus* (Ushijima et al. 1991; Liang-Pingyan y Chen-Kaiying, 1987), aunque son similares a las frecuencias reportadas para fusiones entre *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus rugulosus* (Kevai y Peberdy, 1984). En general, se ha reconocido que las frecuencias de fusión intraespecie son mayores que las de las fusiones interespecie, como en *Trichoderma reesei*, en donde se han obtenido frecuencias de 10% (Stasz et al. 1988). Aunque

no han sido esclarecidas las causas de tales diferencias, podría considerarse que están involucrados algunos factores como la homología y el número de cromosomas, la incompatibilidad de los organelos o diferencias en el tiempo de duplicación de los cromosomas de cada especie progenitora. De acuerdo a estos a estos datos y debido a que la frecuencia de reversión de los auxótrofos fue de 10^{-7} , es poco probable que las colonias que aparecieron en el medio mínimo usado para identificar a los híbridos, fueran revertantes.

Después de seleccionar los híbridos que permanecieron estables después de muchas resiembras en medio mínimo y de evaluar la producción de pectinasas, se caracterizaron más a fondo cuatro híbridos denominados HH, HF, HJ y HE, los cuales mostraron mayores niveles de producción de endopectinasas (50%) y de pectina-liasas (220% a las 48 h y 55% a las 72 h del cultivo) que las cepas progenitoras. Estos incrementos en los híbridos fueron atribuidos en parte a un mayor crecimiento, aunque los incrementos en la actividad específica indicaron que otros factores pudieran estar involucrados. Estos resultados fueron interesantes, ya que no existen reportes del mejoramiento en la producción de pectinasas por híbridos obtenidos por fusión de protoplastos. Entre los trabajos concernientes a la fusión de protoplastos interespecie en el género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. usami*), también se obtuvieron híbridos que incrementaron la actividad de varias enzimas hidrolizantes (Ushijima et al. 1987, 1990), de hecho, algunas de estas cepas mejoradas son utilizadas en la industria para la elaboración de alimentos fermentados. Otros ejemplos de su aplicación en la industria, son los híbridos interespecie de *Saccharomyces diasteticus*, en donde se combinó la habilidad de una cepa para producir glucoamilasas con la capacidad de la otra cepa para fermentar dextrinas, cuya acción combinada produjo cerveza baja en calorías (Freeman, 1981). También se reportó un híbrido de *Penicillium chrysogenum* que produce elevadas concentraciones de fenoximetil penicilina y es utilizado por la empresa Eli Lilly para la producción comercial de penicilina (Rowlands, 1984). Es importante recordar que el interés de producir las enzimas pectinolíticas, es para su aplicación en la industria alimentaria, por lo que en las cepas en donde se haya realizado el mejoramiento genético, será

conveniente llevar a cabo otros estudios complementarios como es la cuantificación de las aflatoxinas que producen las cepas mejoradas.

No existe publicación alguna, en los estudios dirigidos al mejoramiento de cepas por fusión de protoplastos, en donde de hayan identificado las modificaciones o eventos que ocurren en los híbridos y que dan lugar al incremento en la producción de compuestos. Algunos trabajos dirigidos al estudio de las relaciones genéticas entre diferentes especies de *Aspergillus*, mostraron a través del análisis de isoenzimas, diferentes perfiles entre los híbridos y las cepas progenitoras (Anné y Peberdy, 1981), por lo que ha sido postulado que durante la recombinación pueden ocurrir modificaciones como inserciones o eliminaciones, que afecten la regulación de genes, que modifiquen los productos o que afecten la secreción de los mismos.

Durante las propagaciones de los híbridos obtenidos en este trabajo, éstos mostraron inestabilidad, la cual ha sido reportada también en híbridos interespecie de *Aspergillus* (Toyama y Toyama, 1990) y en *Penicillium* (Anné y Peberdy, 1985). Este hecho pudiera deberse a que en los híbridos se pueden presentar las diferentes etapas del ciclo parasexual que existe en hongos filamentosos, que incluyen la fase de heterocarión, diploide y aneuploide que generalmente son inestables (Caten, 1981).

Debido a que el estado haploide en los híbridos es el más estable y las frecuencias para que esto ocurra espontáneamente son muy bajas, son utilizados agentes haploidizantes como el benomil y la *p*-fluorofenilalanina que interfieren con subunidad β de la tubulina durante el ensamblaje de microtúbulos, causando pérdida de cromosomas al azar (Hastie, 1970). Para obtener híbridos estables mejorados en la producción de pectininas, fueron realizadas nuevas fusiones, en donde las colonias recuperadas en medio mínimo presentaron características que se han reportado en la fase heterocarión, como un crecimiento lento e irregular. Posteriormente se seleccionaron las colonias que mostraron un crecimiento vigoroso y que presentaron un mayor tamaño en las esporas en relación a las cepas progenitoras, lo cual indicó su estado diploide.

Las cepas que presentaron características semejantes a los diploides, se trataron con PFA a fin de haploidizar los productos de la fusión. De esta manera se obtuvieron cepas segregantes que fueron denominadas HV, HP, HL, HB y HZ. Estas cepas mostraron características fenotípicas de ambos padres y también incrementaron, con excepción de HZ, la producción volumétrica y específica de endopectininas a 29°C y 37°C, que son las temperaturas óptimas de *A. flavipes* y *Aspergillus sp.* respectivamente. También llamó la atención el segregante HZ, que incrementó la producción de pectina liasas en ambas temperaturas, el cual a diferencia de las otras cepas no presentó la caída en la producción de estas enzimas. Esta disminución de la actividad de pectina liasas, ha sido atribuida a la presencia de proteasas en el medio de cultivo y se ha reportado también en las liasas de *Aspergillus niger* (Kusters van Someren et al. 1992). Las causas del mejoramiento en este híbrido, pudieran deberse a modificaciones que se presentaron durante la recombinación, las cuales afectasen la producción de proteasas, o bien que le confiriesen resistencia a proteasas, o que hubiesen ocurrido cambios a nivel de inducción, regulación o secreción de enzimas. La segregación inducida por PFA o benomil en otros estudios ha permitido obtener cepas recombinantes haploides estables y que han incrementado la producción de ácido giberélico, proteasas y amilasas (Bermúdez-Torres et al. 1992; Kirimura et al. 1989).

Otra parte de la caracterización, se realizó a través de la estimación del contenido de DNA en los segregantes y en las cepas progenitoras, en donde se observó que los segregantes mostraron un contenido de DNA similar a las cepas progenitoras. La estabilidad de las cepas segregantes se confirmó, porque no formaron sectores segregantes cuando se crecieron nuevamente en presencia de PFA y hasta la fecha, no han modificado su capacidad de producción de pectinasas.

Existen muchos reportes en donde se ha establecido la fase haploide o diploide o aneuploide a través de la cuantificación del DNA en los segregantes y progenitoras, sin embargo, la interpretación del grado de ploidía requiere ser muy cautelosa. Pueden haber casos, en donde el tipo de ploidía no es claro, como el del estado aneuploide o debido a que algunas

etapas del ciclo parasexual no puedan ser identificadas. Por ejemplo, se ha reportado que en *Fusarium oxysporum* no es posible detectar la fase diploide, por lo que se asumió que es transitoria (Molnar et al. 1990). También se observó en *Cephalosporium acremonium*, que las cepas haploides surgen directamente después de la fusión, sin que puedan detectarse las etapas de heterocarión y diploide, por lo que también asumieron que son muy transitorias (Hamlyn y Ball, 1979). La caracterización de los híbridos requiere entonces de métodos analíticos más específicos, en donde puedan identificarse con mayor precisión las diferentes etapas del ciclo parasexual. Algunos métodos que permitirían una mejor interpretación, serían la electroforesis en pulsos para determinar los cariotipos moleculares, o el uso de marcadores de isoenzimas, o el uso de sondas moleculares.

Las relaciones genéticas y taxonómicas incluyendo el grado de homología cromosomal entre *Aspergillus* sp. CH-Y-1643 y *Aspergillus flavipes* ATCC-16798 es totalmente desconocido, sin embargo en el presente estudio, la obtención de híbridos estables sugiere la existencia de homología entre estas especies.

También se logró incrementar la producción de endopectinasas por los híbridos obtenidos a través de la fusión intraespecie de *Aspergillus* sp. CH-Y-1643 utilizando una mutante con auxotrofia *ade*⁻ y otra mutante con auxotrofia *pir*⁻. Estas fusiones fueron realizadas, debido a que se ha establecido una mayor frecuencia de obtención de híbridos recombinantes a través de fusiones intraespecie en relación a las fusiones interespecie e intergenéricas (Gadau y Lingo, 1992). Otros ejemplos de mejoramiento en híbridos intraespecie han sido observados en *Trichoderma reesei* en donde se incrementó la producción de β-glucosidasas (Sandhu y Bawa, 1992) y dos veces la producción de carboximetilcelulasas (Toyama et al. 1984).

Este trabajo muestra que la fusión de protoplastos es una alternativa importante para el mejoramiento genético de hongos pectinolíticos del género *Aspergillus* y por lo tanto, es una línea que puede ser utilizada sola o combinada con otras como la mutagénesis y la tecnología de DNA

recombinante, que han sido utilizados en otros programas de mejoramiento genético de capas de interés industrial.

Bibliografía

Abu, M.; Umetsu, H.; Nakai, T. y Sasage, D. (1982). Regeneration and fusion of mycelial protoplasts of *Tricholoma matsutake*. *Agr. Biol. Chem.* 46: 1955-1957.

Adams, G.; Johnson, N.; Leslie, J.F. y Hart, L.P. (1987). Heterokaryons of *Gibberella zeae* formed following hyphal anastomosis or protoplast fusion. *Exp. Mycol.* 11 : 339-353.

Anné, J. (1983). Protoplasts of filamentous fungi in genetics and metabolic production. *Experientia. Suppl.* 46: 167-178.

Anné, J. y Peberdy, J.F. (1981). Characterization of inter-species hybrids between *Penicillium chrysogenum* and *P. roqueforti* by iso-enzyme analysis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77: 401-408.

Anné, J. y Peberdy, J.F. (1988). Protoplast fusion and interspecies hybridization in *Penicillium*. In: *Fungal Protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics.* J.F. Peberdy and L. Ferenczy (Eds.). pp. 259-277. Marcel Dekker Inc. New York.

Bermúdez-Terrez, K.; Bruckner, B. y Meier, B. (1992). Obtaining mutants for protoplast fusion of gibberellin-forming *Gibberella fujikuroi* strains. *Applied Biochem. and Biotechnol.* 33: 83-95.

Bradshaw, R. E.; Lee, K. y Peberdy, J.F. (1983). Aspects of genetic interaction in hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3525-3533.

Caten, C.E. (1981). Parasexual processes in fungi. In: *The fungal nucleus.* K. Gull and S.G. Oliver (Eds.) pp. 191-214. Cambridge University Press.

Collings, A.; Davis, B. and Mills, J. (1988). Factors affecting protoplast release from some mesophilic, thermophilic and thermotolerant species of filamentous fungi using Novozyme 234. *Microbios.* 53: 197-210.

Dišek-Brunec, M.; Gaberik-Porekar, Alacovic, M. y Socic, H. (1993). Strain improvement of *Claviceps purpurea* by protoplast fusion without introducing auxotrophic markers. *Appl. Microb. Biotechnol.* 38: 746-749.

Farkas, V. (1986). The fungal cell wall. In: *Fungal protoplasts.* J.F. Peberdy y L. Ferenczy. (Eds.) pp. 241-257. Marcel Dekker. Inc. New York.

Ferenczy, L. (1981). Microbial protoplast fusion. In: *Genetics as a tool in Microbiology.* Glover, S.W.; Hopwood, D.A. (Eds.) pp. 1-43. Cambridge. Cambridge University Press.

Freeman, R.F. (1981). Construction of brewing yeast production of low carbohydrate beers. *Eur. Brew. Conv. Congr.* 497-501.

- Furlaneto, M.C. y Pizzirani-Kleiner, A. (1982).** Interspecific hybridization of *Trichoderma pseudokoningii* by anastomosis and by protoplast fusion. *FEMS Microbiol. Lett.* 90: 191-196.
- Gilbón, A.; Huitrón, C.; González-Farías, F. y Ulloa, M. (1986).** Scanning electro microscopy of a true cellulolytic strain of *Aureobasidium* grown on crsataline cellulose. *Mycologia*, 78: 804-809.
- Gedau, E.G. y Lingg, A.J. (1982).** Protoplast fusion in fungi. In: *Handbook of Applied Mycology. Vol. 4. Fungal Biotechnology.* Dilip K. Arora; Richard, P. Elander. (Eds.). pp. 626-636. Marcel Dekker. Inc..
- Hamiyn, P.F. y Ball, C. (1979).** Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In: *Proceedings of the third International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.* O. Sebek. (Ed.) pp. 185-191. Washington, D.C. American Society of Microbiology.
- Hashiba, T. y Yamada, M. (1982).** Formation and purification of protoplasts from *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 72: 849-853.
- Hashiba, T. (1982).** Isolation of fungal protoplasts. In: *Handbook of Applied Micology. Fungal Biotechnology.* Arora, K.D.; Elander, P.R. and Mukerji, G.K. (Eds.) pp. 129-149. Marcel Dekker.
- Hastie, A.C. (1976).** Benlate induced inestability of *Aspergillus* diploids. *Nature*. 226: 771-772.
- Hopwood, D. (1981).** Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 237-222.
- Hotta, K.; Ishikawa, J.; Naganawa, H. y Misuno, N. (1988).** Mechanisms of increased kanamycin resistance regenerated by protoplast regeneration of *Streptomyces griseus*. *J. of Antibiotics*. 41: 94-103.
- Huitrón, C.; Saval, S. y Acuña, M. (1984).** Production of microbial enzymes from agroindustrial by-products. *Annals of New York Academy of Sciences*. 434: 110-114.
- Kao, K.N. y Saleem, M. (1986).** Improved fusion of mesophyl and cotyledon protoplast with PEG and high pH-Ca²⁺ solution. *J. Plant Physiol.* 122: 217-225.
- Kevei, F. y Peberdy, J. (1984).** Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the *Aspergillus nidulans* group. *J. of Gen. Microbiol.* 130: 2229-2236.
- Kirimura, K.; Imura, M.; Lee, S.; Kato, T. y Usami, S. (1989).** Intergeneric hibridization between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viridae* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1589-1596.
- Kitamoto, Y.; Mo, N.; Ohiwa, T. y Ichikawa, Y. (1988).** A simple method for protoplast formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Applied Microbiol. and Biotechnol.* 28: 445-450.
- Kiyohara, H.; Watanabe, T.; Imai, J.; Takizawa, N.; Haha, T.; Nagao, K. y Yamamoto, A. (1990).** Intergenic hybridization between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Applied Microbiol. and Biotechnol.* 33: 671-676.
- Kusters van Someren; Flipphi, M.; Graff, L.; van der Broeck, H.; Kester, H.; Hinnen, A. y Visser, J. (1992).** Characterization of an *Aspergillus niger* pectin lyase gene family: structure and regulation of expression. *Mol. Gen. Genet.* 244: 113-120.
- Kuwabara, H.; Watanabe, T.; Imai, J.; Takizawa, N.; Haha, T.; Nagao, K. y Yamamoto, A. (1989).** Intergenic hybridization between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 33: 671-676.

- Lakshmi, B.R. y Chandra, T.S. (1993). Rapid release of protoplast from *Eremothecium asbyii* in comparison with *Trichoderma reesei* and *Penicillium chrysogenum* using Novozyme and fucelase. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 699-702.
- Larios, G.; Gilbón, A.; Lara, Y. y Huitrón, C. (1992). Extracellular cellulase produced by a yeast-like fungus. *Enzyme Engineering.* 6:353-354.
- Liang-Pingyan y Chen-Kaiying. (1987). Virus transmission through interspecies protoplast fusion in *Aspergillus*. *Transactions of the British Mycological Society.* 80: 73-81.
- Maráz, A. y Subik, J. (1981). Transmission and recombination of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae* after protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 181: 131-133.
- Minuth, W. y Esser, K. (1983). Intraspécific, interspecific and intergeneric recombination in β -lactam producing fungi via protoplast fusion. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 38-43.
- Molnar, A.; Sulyok, L. y Hornok, L. (1990). Parasexual recombination between vegetatively incompatible strains in *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Research.* 94: 393-398.
- Nagata, T.; Eibl, H. y Melchers, G. (1979). Fusion of plant protoplasts induced by positively charged synthetic phospholipids. *Z. Naturforsch.* 34C: 460-462.
- Ogawa, K.; Tsuchimichi, M.; Taniguchi, K. y Nakatsu, S. (1989). Interspecific hybridization of *Aspergillus usami* mut. *shirousemii* and *Aspergillus niger* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* 52: 337-342.
- Power, J.B.; Cummins, S.E. y Cooking, E.C. (1970). Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature.* 225: 1918-1918.
- Rowlands, R.T. (1984). Industrial strain improvement: rational screens and genetic recombination. *Enzyme Microbial Technol.* 6:290-300.
- Shandhu, D.; Wadhwa, V. y Bagga, P. (1989). Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme and Microbial Technology.* 11: 21-25.
- Sandhu, D.K. y Sawa, S. (1992). Improvement of cellulase activity in *Trichoderma*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 34: 175-183.
- Silveira, W.D. y Azevedo, J.L. (1987). Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 149-152.
- Stasz, T.E.; Harman, G.E. y Weeden, N.F. (1988). Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia.* 80: 144-150.
- Toister, Z. y Loyter, A. (1971). Ca^{2+} induced fusion of avian erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 241: 719-724.
- Toyama, H.; Yokoyama, T.; Shinmyo, A. y Okada, H. (1984). Interspecific protoplast fusion of *Trichoderma*. *J. Biotechnol.* 1: 25-35.
- Toyama, H. y Toyama, N. (1990). Factors affecting the genetic stability of Non-progenitoras type segregants derived from fusants between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2789-2792.

Ushijima, S.; Nakadai, T. y Uchida, K. (1987). Improvement of enzyme productivities through mutation or haploidization of heterozygous diploids obtained by protoplast fusion of *Aspergillus sojae*. Agric. Biol. Chem. 51: 2781-2786.

Ushijima, S.; Nakadai, T. y Uchida, K. (1991). Interspecific electrofusion of protoplasts between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. Agric. Biol. Chem. 5: 129-134.

Ushijima, S.; Nakadai, T. y Uchida, K. (1990). Further evidence on the interspecific protoplast fusion between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* and subsequent haploidization, with special reference to their production of some hydrolyzing enzymes. Agric. Biol. Chem. 54: 2393-2399.

Wessels, J.G. (1990). Role of the cell wall architecture in fungal tip growth generation. In: Tip growth in plant and fungal cells. pp. 1-29. Academic Press.

Wright, W. E. (1967). The isolation of heterokaryons and hybrids by a selection system using irreversible biochemical inhibitors. Exp. Cell. Res. 112: 395-407.